

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan Bahan

1. Hasil determinasi beras hitam

Determinasi beras hitam dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian dengan mencocokkan ciri morfologis tanaman. Hasil determinasi tanaman beras hitam berdasarkan Backer & Bakhuizen dengan kunci determinasi 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27b-799b-800b-8001b-802a-803b-804b-805c-806b-807a-808a familia 203. Poaceae 1b-10b-11b-12b-13b-19a-20b-88b-92a-94b-96b-97b-98b-99b-100a-101b-102a-103b 44. *Oryza* 1b-3a-4b. *Oryza sativa* L.

Berdasarkan hasil determinasi tanaman beras hitam memiliki deskripsi tinggi 0,8-1 meter, akar serabut berwarna putih hingga kuning kotor atau coklat kekuningan. Batang lunak, bulat, berongga di bagian tengah, nodus mengalami penebalan, permukaan berambut hingga gundul dan licin. Daun tunggal, berseling hingga tersebar, helaian daun berbentuk garis-lanset hingga sampai memanjang hingga garis panjang 15-80 cm, ujung runcing, tepi rata atau kasar, pangkal tumpul, tulang daun sejajar, berwarna hijau muda atau tua, permukaan daun berambut kasar, pelepah daun berwarna hijau, lidah daun bercangkap, panjang 14mm, tipis seperti selaput dan permukaanya berambut hingga gundul. Bunga majemuk tipe malai, panjang 15-40cm, terdiri dari beberapa bulir terletak di ujung batang, tumbuh ke atas dan merunduk, perhiasan bunga terdiri atas *lemma* dan *palea* dengan ujung rata atau runcing hijau muda atau tua, benangsari 6, kepala sari berbentuk garis, tangkai putik 2 berlepasan. Buah berupa biji kering yang tidak pecah pada saat masak, bulat memanjang, seringkali melengkung dengan ujung meruncing berwarna hijau muda atau tua. Kulit biji berwarna hitam atau hitam kecoklatan. Surat keterangan hasil determinasi beras hitam dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pengambilan bahan dan pembuatan serbuk beras hitam

Tanaman beras hitam dalam penelitian ini diperoleh dari petani di daerah Trenggalek, Jawa Timur pada bulan November 2018. Padi beras hitam dijemur di bawah sinar matahari selama 4-5 hari. Bagian kulit atau bekatul dipisahkan sehingga didapatkan beras hitam pecah kulit. Beras hitam pecah kulit dicuci dan dioven dengan suhu 45°C. Peringan dilakukan selama sehari untuk mengurangi kadar air agar beras hitam tidak mudah mengalami kerusakan. Berat beras hitam setelah dikeringkan adalah 1100 g. Beras hitam yang telah dikeringkan tersebut dihitung bobot kering terhadap berat basah sehingga diperoleh rendemen sebesar 68,75%. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 1. Hasil perhitungan rendemen serbuk beras hitam

Berat basah (kg)	Berat kering (kg)	Rendemen b/b (%)
1,6	1,1	68,75

Beras hitam yang telah kering dibuat serbuk dengan menggunakan penggiling dan kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 60. Pembuatan serbuk simplisia bertujuan untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga mempercepat dan memperbesar senyawa yang terekstraksi oleh pelarut.

B. Ekstraksi dan Fraksinasi

1. Hasil pembuatan ekstrak etanol beras hitam

Pembuatan ekstrak etanol beras hitam menggunakan metode remaserasi dengan perbandingan serbuk dan pelarut adalah 1:10. Serbuk beras hitam yang digunakan adalah 800 g dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 8 liter, kemudian diremaserasi menggunakan 4 liter pelarut. Hasil rendemen ekstrak etanol beras hitam dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil perhitungan rendemen ekstrak beras hitam

Berat serbuk (g)	Etanol (ml)	Berat ekstrak (g)	Rendemen b/v (%)
800	12000	71	8,88

Hasil maserasi yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55°C dan didapatkan ekstrak kental dengan rendemen 8,88%.

2. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak beras hitam

Penetapan kadar air dilakukan pada serbuk dan ekstrak beras hitam dengan replikasi sebanyak 3 kali menggunakan metode destilasi *Sterling Bidwell*. Volume air yang tertampung kemudian dihitung persentasenya. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak beras hitam dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak beras hitam

Sampel	Kadar air (%)			Rata-rata±SD
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Serbuk	8	9	9	8,33±0,57
Ekstrak	6	7	7	6,67±0,57

Hasil penetapan kadar air serbuk beras hitam didapatkan rata-rata sebesar 8,33%, sedangkan pada ekstrak didapatkan rata-rata kadar air 6,67% dimana baik serbuk dan ekstrak beras hitam sudah memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 10% (Depkes 2011).

Tujuan penetapan kadar air adalah untuk menjaga kualitas mutu simplisia maupun ekstrak agar tidak mudah ditumbuhi jamur dan mikroorganisme. Hasil perhitungan kadar air serbuk beras hitam terlampir pada lampiran 4.

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak beras hitam

Penetapan susut pengeringan dilakukan pada serbuk dan ekstrak beras hitam dengan replikasi 3 kali menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan

Sampel	Kadar susut (%)			Rata-rata±SD
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Serbuk	9,5	12,3	10	10,60±1,22
Ekstrak	9,3	8,1	7,5	8,30±0,74

Penetapan susut pengeringan rata-rata dalam serbuk beras hitam adalah 10,60% dan rata-rata ekstrak beras hitam adalah 8,30%. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Di dalam penetapan kadar susut pengeringan yang dihitung adalah zat-zat yang menguap yang ada dalam simplisia termasuk air. Pada suhu 105°C, air dan senyawa-senyawa yang

mempunyai titik didih yang lebih rendah dari air akan ikut menguap. Hasil perhitungan persentase rata-rata susut pengeringan ekstrak beras hitam terlampir pada lampiran 5.

4. Hasil penetapan bobot jenis ekstrak beras hitam

Penetapan bobot jenis menggunakan piknometer dengan konsentrasi ekstrak 5%. Hasil penetapan bobot jenis ekstrak beras hitam dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil penetapan bobot jenis

Ekstrak Etanol (%)	Piknometer kosong (g)	Piknometer + air (g)	Piknometer + Ekstrak (g)	Bobot Jenis
	26,03	76,24	75,11	0,98
5	26,04	76,09	74,95	0,98
	26,06	76,51	75,16	0,97
Rata-rata±SD				0,97±0,00

Penetapan bobot jenis ekstrak dengan membandingkan bobot jenis ekstrak pada bobot jenis air pada suhu ruang. Bobot jenis ekstrak etanol beras hitam sebesar 0,97. Bobot jenis menggambarkan besarnya massa per satuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair. Berat jenis juga berkaitan dengan kandungan dari ekstrak. Hasil perhitungan bobot jenis terlampir pada lampiran 5.

5. Hasil identifikasi senyawa ekstrak beras hitam

Identifikasi kandungan kimia berguna untuk mengetahui beberapa senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Hasil dari metode tabung dapat dilihat secara kualitatif menggunakan reaksi warna untuk mengetahui kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil identifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol beras hitam dapat dilihat pada tabel 6 dan lampiran 7.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia

Senyawa	Hasil	Pustaka	Keterangan
Alkaloid	Tidak terbentuk endapan	Terbentuk endapan berwarna putih, kuning, coklat sampai hitam. (Depkes 1995).	Tidak mengandung alkaloid
Flavonoid	Warna merah pada lapisan amil alkohol	Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol (Sarker <i>et al.</i> 2006)	Mengandung flavonoid
Saponin	Terbentuk busa atau buih	Timbulnya buih yang stabil selama 10 menit (Depkes 1995)	Mengandung saponin
Tanin	Warna hijau atau biru kehitaman	Timbul warna biru kehitaman (Depkes 1995)	Mengandung tanin
Triterpenoid & Steroid	Cincin berwarna ungu kehitaman	Hasil positif steroid ditandai cincin warna biru, sedangkan pada triterpenoid ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna jingga atau ungu (Nugrahani <i>et al</i> 2016)	Mengandung triterpenoid

Skrining fitokimia dengan uji tabung ekstrak etanol beras hitam menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin tanin dan triterpenoid. Hasil gambar identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol beras hitam terlampir pada lampiran 7.

6. Hasil fraksinasi ekstrak etanol beras hitam

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan suatu senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Pemilihan pelarut yang mempunyai perbedaan polaritas akan mempengaruhi golongan senyawa yang tersari. Hasil fraksinasi ekstrak beras hitam dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil fraksinasi ekstrak beras hitam

Berat ekstrak (g)	Jenis fraksi	Berat (g)	Rendemen fraksi (%)
30	<i>n</i> -heksana	8,10	27,05±2,21
	Etil asetat	2,05	6,83±0,56
	Air	10,01	33,38±1,51

Proses fraksinasi dimulai dengan melarutkan ekstrak ke dalam beberapa bagian air, kemudian ditambah *n*-heksana untuk diekstraksi cair-cair. Dari ekstraksi cair-cair didapatkan fraksi *n*-heksana yang merupakan senyawa non

polar untuk mengekstraksi senyawa seperti alkaloid dan lemak. Residu hasil ekstraksi cair-cair kemudian difraksinasi lagi dengan menambah pelarut etil asetat untuk mengisolasi senyawa yang bersifat semi polar, polar dan non polar. Residu terakhir dari ekstraksi cair-cair dianggap sebagai fraksi air untuk mengisolasi senyawa polar.

Berdasarkan hasil fraksinasi menunjukkan fraksi *n*-heksana memiliki rendemen 27,05% dengan hasil fraksi berwarna hijau pekat. Hasil fraksi etil asetat memiliki rendemen 6,83% dengan hasil fraksi berwarna coklat. Hasil fraksi air memiliki rendemen 33,38% dengan hasil fraksi berwarna coklat kemerahan. Rendemen fraksi air yang didapatkan lebih besar daripada fraksi etil asetat dan *n*-heksana. Hal tersebut menunjukkan bahwa tanaman beras hitam mengandung senyawa polar yang lebih banyak, diikuti senyawa non polar dan semi polar. Perbedaan rendemen tiap fraksi diakibatkan karena kemampuan dari masing masing pelarut dalam menyari suatu senyawa juga berbeda.

C. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Pembuatan suspensi bakteri uji dengan mengambil satu ose dari biakan murni kemudian dipindah ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi media BHI dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Suspensi bakteri pada media BHI kemudian distandarkan dengan standar *Mc. Farland* 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dengan membandingkan tingkat kekeruhannya. Suspensi bakteri yang sudah distandarkan selanjutnya dilakukan untuk uji identifikasi.

2. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Identifikasi bakteri uji dilakukan untuk mengetahui kebenaran isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan cawan gores, biokimia dan pewarnaan Gram.

2.1 Identifikasi dengan cawan gores. Identifikasi dilakukan dengan menginokulasi bakteri uji ke dalam media selektif *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi kalium telurit 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penampakan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan dengan warna hitam karena *Staphylococcus aureus* mengubah telurit menjadi metalik telurit yang berwarna hitam dengan latar belakang berwarna kuning karena adanya fermentasi mannitol.

2.2 Identifikasi biokimia. Hasil identifikasi uji katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung udara, sedangkan pada uji koagulase ditunjukkan adanya gumpalan plasma. Hasil identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* secara biokimia tercantum pada tabel 8 gambar 8.

Tabel 8. Hasil Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Uji biokimia	Hasil	Pustaka
Katalase	Terdapat gelembung udara.	Adanya gelembung udara (Jawetz <i>et al.</i> 2007).
Koagulase	Terdapat gumpalan plasma.	Adanya gumpalan plasma darah & melekat pada tabung. (Jawetz <i>et al.</i> 2007).

Hasil identifikasi uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Hal tersebut dikarenakan bakteri *Staphylococcus aureus* dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Fungsi uji katalase pada bakteri berbentuk kokus adalah untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Enzim katalase berperan dalam proses pertumbuhan aerobik karena H₂O₂ yang dibentuk oleh berbagai enzim bersifat racun terhadap sel bakteri. Oleh karena itu komponen H₂O₂ harus dipecah agar tidak bersifat toksik pada bakteri katalase positif.

Hasil uji koagulase menunjukkan terbentuknya gumpalan plasma darah kelinci pada tabung. Koagulase merupakan enzim yang dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* yang mengubah fibrinogen (larut) dalam plasma menjadi fibrin (tidak larut). Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Reaksi koagulase positif sangat penting untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lain

2.3 Pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* diperoleh bentuk koloni bergerombol dan berwarna ungu. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif yang bersifat mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan terlihat berwarna ungu di bawah mikroskop.

Pada pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus*, pemberian kristal violet akan meninggalkan warna ungu. Perbedaan warna pada pewarnaan Gram pada bakteri didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada Gram negatif. Pada pemberian alcohol menyebabkan pori-pori mengkerut dan menurunkan daya rembes sehingga pada saat pemberian safranin tidak bisa masuk ke dalam sel.

3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi beras hitam secara difusi.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air secara difusi menggunakan metode kertas cakram. Seri konsentrasi yang digunakan baik ekstrak dan fraksi adalah 10%, 15% dan 20% dengan menggunakan pelarut DMSO 7%. Pelarut DMSO 7% digunakan karena pada konsentrasi 7%, DMSO tidak memiliki aktivitas antibakteri dan bisa untuk melarutkan ekstrak maupun fraksi beras hitam. Dalam metode cakram, sebanyak 50 µl bahan uji diteteskan pada cakram menggunakan mikropipet dan didiamkan selama 5 menit supaya bahan uji dapat berdifusi dan terserap sempurna ke dalam cakram. Media yang digunakan pada uji difusi adalah media MHA (*Mueller Hinton agar*). Inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MHA menggunakan kapas lidi steril dan dilakukan inokulasi secara merata. Cakram yang sudah diberi bahan uji kemudian diletakan di atas media MHA yang sudah diinokulasikan bakteri uji. Waktu inkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji aktivitas antibakteri diukur berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Ukuran zona hambat sangat kuat apabila nilai diameter lebih dari 20 mm, kuat 10-20 mm, sedang 5-10 mm dan lemah kurang dari 5 mm (Davis & Stout 1971). Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air beras hitam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi

Konsentrasi	Sampel	Diameter zona hambat			Rata-rata±SD
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
10%	Ekstrak	7,32	6,94	7,16	7,14±0,19
	Fraksi air	8,16	8,18	8,30	8,21±0,07
	Fraksi etil asetat	9,22	9,16	9,48	9,28±0,17
	Fraksi <i>n</i> -heksana	8,20	8,24	7,98	8,14±0,14
15%	Ekstrak	8,56	8,48	8,30	8,40±0,13
	Fraksi air	9,96	10,18	9,68	9,94±0,25
	Fraksi etil asetat	10,96	11,20	11,04	11,06±0,01
	Fraksi <i>n</i> -heksana	9,74	10,24	9,62	9,86±0,32
20%	Ekstrak	11,62	11,46	11,22	11,43±0,20
	Fraksi air	12,18	12,00	11,92	12,03±0,13
	Fraksi etil asetat	13,16	12,98	13,04	13,06±0,09
	Fraksi <i>n</i> -heksana	12,04	11,76	11,60	11,80±0,22
7%	DMSO	0	0	0	0±0
5 µg	Ciprofloxacin	25,10	24,60	25,08	24,92±0,28

Pada pengujian aktivitas antibakteri beras hitam metode difusi dengan menggunakan cakram disk 6 mm baik ekstrak maupun fraksi menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram. Zona hambat terbentuk dikarenakan adanya suatu senyawa yang memiliki sifat antibakteri, sehingga berdifusinya senyawa ini dapat membunuh atau mengambat bakteri.

Hasil aktivitas antibakteri dilihat berdasarkan nilai diameter zona hambat yang terbentuk dan konsentrasi bahan uji yang digunakan. Diameter zona hambat ekstrak pada konsentrasi 10% dan 15% menunjukkan aktivitas antibakteri yang sedang, yaitu dengan rata-rata diameter 7,14 mm pada konsentrasi 10% dan 8,40 mm pada konsentrasi 15%. Sedangkan konsentrasi ekstrak 20% menunjukkan zona hambat 11,43 mm, dimana termasuk dalam kategori kuat. Aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 10% menunjukkan diameter 8,14

mm dan 15% dengan diameter 9,86 mm dikategorikan dalam aktivitas sedang. Sedangkan pada konsentrasi 20%, fraksi *n*-heksana menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat ditandai dengan diameter zona hambat 11,80 mm. Aktivitas antibakteri fraksi etil asetat pada konsentrasi 10% dengan diameter 9,98 mm menunjukkan aktivitas antibakteri sedang, namun pada konsentrasi 15% (11,06 mm) dan 20% (13,16 mm) menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat. Pada fraksi air dengan konsentrasi 10% (8,21 mm) dan 15% (9,94 mm) menunjukkan aktivitas antibakteri sedang. Sedangkan pada konsentrasi 20% fraksi air dengan diameter 12,03 mm termasuk dalam aktivitas antibakteri kuat. Kontrol negatif yang digunakan adalah Ciprofloksasin 5 µg yang sudah terbukti masuk dalam kategori antibiotik berspektrum luas menghasilkan diameter yang sangat kuat, yaitu 24,92 mm.

Berdasarkan pengujian aktivitas antibakteri secara difusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan ekstrak maupun fraksi yang lain. Penggunaan pelarut etil asetat dapat menyari senyawa seperti flavonoid, tanin, triterpenoid dan saponin. Senyawa tersebut memiliki mekanisme tersendiri dalam aktivitas antibakteri. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme merusak membran sitoplasma sehingga mengakibatkan kebocoran metabolit penting, nukleotida dan asam amino merembes keluar, keadaan ini dapat menyebabkan lisis dan kematian bakteri (Volk *et al.* 1998). Senyawa tanin memiliki mekanisme menginaktivasi enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dinding sel, sehingga proses pembentukan dinding sel bakteri akan terganggu dan menyebabkan kematian bakteri (Cowan 1999). Triterpenoid diketahui memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme berinteraksi dengan protein transmembran pada dinding sel bakteri membentuk ikatan polimer yang kuat. Akibatnya protein transmembran rusak dan mengganggu proses keluar masuknya senyawa dalam sel bakteri. Selain itu rusaknya protein transmembran juga akan mengurangi permeabilitas dinding sel menyebabkan kematian sel bakteri dan terhambatnya pertumbuhan sel bakteri. Senyawa saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme menurunkan

tegangan permukaan sehingga menyebabkan gangguan permeabilitas sel dan mengakibatkan kebocoran senyawa intraseluler (Nurin *et al* 2009). Senyawa saponin berdifusi melalui celah pada dinding sel bakteri lalu mengikat membran sitoplasma. Akibatnya terjadi kebocoran pada sitoplasma dan terganggunya sel intraseluler lainnya (Cavalieri 2005). Adanya perbedaan senyawa dan mekanisme antibakteri dapat berinteraksi satu sama lain memperkuat aktivitas antibakteri, sehingga aktivitas antibakteri pada fraksi etil asetat semakin kuat.

Pada fraksi air yang bersifat polar, menyebabkan senyawa polar seperti flavonoid, saponin dan tanin dapat tersari, namun aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak lebih besar jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Hal ini disebabkan karena pada fraksi air juga dapat menyari enzim-enzim yang terkandung di dalam tanaman. Sehingga campuran antara enzim-enzim dan metabolit sekunder tanaman menyebabkan aktivitas antibakterinya menjadi menurun.

Pada fraksi *n*-heksan juga memiliki rata-rata diameter zona hambat yang lebih kecil daripada fraksi etil asetat. Hal ini disebabkan karena dalam fraksi *n*-heksana juga dapat menyari senyawa lipid seperti minyak nabati, trigliserida, triasgliserol dan senyawa gliserol lainnya. Adanya senyawa lipid yang juga ikut tersari oleh pelarut *n*-heksan akan menyebabkan penurunan pelarut *n*-heksan untuk menyari suatu senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan menjadi kurang aktif.

Ekstrak etanol beras hitam dapat menarik semua senyawa, tetapi aktivitas antibakteri lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat. Hal tersebut bisa diakibatkan karena senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja sinergis sehingga menghasilkan daya hambat yang kecil. Selain itu perbedaan aktivitas antibakteri juga dipengaruhi oleh kemampuan difusi suatu senyawa. Senyawa dengan kemampuan difusi yang baik akan memberikan aktivitas yang lebih baik daripada senyawa dengan kemampuan difusi yang jelek.

Analisis statistik untuk mengetahui hubungan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan pada ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi air dan fraksi etil asetat dengan seri konsentrasi 10%, 15%

dan 20%. Analisa pertama menggunakan uji normalitas menggunakan uji *One-Sample Kolmogorove-Sminov* diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,155 > 0,05$ berarti H_0 diterima dan data tersebut terdistribusi normal. Pada uji *homogeneity of variances* menunjukkan nilai *Levenne Statistic* dengan signifikansi 0,340. Nilai signifikansi yang lebih besar daripada 0,05 menunjukkan bahwa keempat sampel memiliki varian yang sama atau homogen.

Untuk mengetahui apakah ada hubungan antara jenis dan konsentrasi terhadap zona hambat, maka dilakukan uji *Two-Way Anova* dengan menggunakan uji *Post Hoc*. Hasil pengujian *Two-Way Anova* diperoleh nilai signifikansi untuk variabel jenis, nilai signifikansi sebesar $0.004 < 0.05$, artinya ada perbedaan zona hambat berdasarkan jenis sampel yang digunakan. Pada variabel konsentrasi, nilai signifikansi sebesar $0.00 < 0.05$, artinya ada perbedaan zona hambat berdasarkan variasi konsentrasi yang digunakan. Pada variabel jenis*konsentrasi, nilai signifikansi sebesar $0.387 > 0.05$, artinya tidak ada interaksi antara jenis dengan konsentrasi. sebesar 0,00 yang berarti bahwa keempat sampel memiliki perbedaan dalam diameter zona hambat. Uji lanjut atau *Post Hoc* berguna untuk melihat perbedaan diantara jenis dan konsentrasi yang digunakan. Hasil uji lanjut jenis menunjukkan fraksi etil asetat berbeda signifikan terhadap ekstrak, fraksi *n*-heksan dan fraksi air. Sedangkan pada konsentrasi 20% menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 10%, 15% dan 20%. Sehingga fraksi teraktif dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat 20% dengan daya hambat yang paling besar yaitu 13,06 mm dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksan dan fraksi air.

4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif secara dilusi.

Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bertujuan untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh minimum (KBM). Seri konsentrasi fraksi etil asetat yang digunakan yaitu 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 12,5%, 0,625% dan 0,3125%. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri dan kontrol negatif menggunakan fraksi etil asetat 40%.

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan melihat kekeruhan pada masing-masing tabung. Pada penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan cara melihat konsentrasi terendah yang tidak memiliki kekeruhan.

Namun dikarenakan fraksi yang digunakan bersifat keruh maka nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) tidak bisa ditentukan. Penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), dilakukan dengan menginokulasikan semua tabung reaksi ke dalam media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati pertumbuhan bakteri.

Tabel 10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat secara dilusi.

Konsentrasi (%)	Replikasi		
	I	II	III
40	-	-	-
20	-	-	-
10	-	-	-
5	-	-	-
2,5	+	+	+
1,25	+	+	+
0,625	+	+	+
Kontrol (-) fraksi etil asetat	-	-	-
Kontrol (+) suspensi bakteri	+	+	+

Keterangan: (-) tidak ada pertumbuhan koloni bakteri

(+) ada pertumbuhan koloni bakteri

Berdasarkan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat beras hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 5%. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) 5% pada penelitian ini jauh lebih besar jika dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Pornpan & Natthanej (2013) bahwa ekstrak etanol beras hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan nilai KBM 250 µg/ml atau setara dengan 0,025%. Perbedaan aktivitas antibakteri secara dilusi disebabkan karena adanya perbedaan varietas tanaman yang digunakan dan perbedaan metode penelitian. Selain itu pembuatan suspensi bakteri dengan menyamakan kekeruhan antara suspensi bakteri dengan standar *Mc Farland* menyebabkan jumlah suspensi bakteri belum bisa dipastikan sama, yaitu sebesar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Suspensi bakteri yang melebihi standar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml menyebabkan jumlah konsentrasi fraksi untuk membunuh bakteri menjadi lebih tinggi.

D. Hasil Identifikasi Senyawa dengan KLT

Identifikasi terhadap golongan senyawa kimia menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan pada etil asetat. Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif sehingga perlu untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang berperan dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil KLT kemudian dilakukan penyemprotan dan pengamatan di bawah lampu UV 254 dan UV 366. Pada lampu UV 254 akan terjadi fluoresensi lempeng dan peredaman pada sampel. Pada lampu UV 366 sampel akan berfluoresensi dan lempeng mengalami peredaman. Fungsi penyemprotan adalah untuk menunjukkan warna spesifik pada suatu golongan senyawa, sehingga bisa diamati pada sinar tampak dan sinar UV.

1. Identifikasi flavonoid

Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak *n*-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Pereaksi sempot yang digunakan adalah sitroborat. Baku flavonoid menggunakan kuersetin. Hasil identifikasi KLT flavonoid dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT

Sampel	Kode Rf	Warna bercak			
		Visual	Visual Sitroborat	UV 254	UV 366
Quersetin	A 0,90	Kekuningan	Kuning-coklat	Peredaman	Ungu gelap
Fraksi etil asetat	A 0,90	Kekuningan	Kuning-coklat	Peredaman	Ungu gelap
	B 0,68	Kekuningan	Kuning-coklat	Peredaman	Biru gelap

Hasil identifikasi KLT flavonoid menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai nilai Rf 0,90, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kekuningan secara visual, lalu setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat, bercak menjadi terlihat jelas berwarna kuning kecoklatan. Pada lampu UV 254 bercak mengalami peredaman dan pada UV 366 bercak berwarna ungu gelap. Fraksi etil asetat memiliki senyawa flavonoid dimana ditandai dengan nilai Rf yang sama dengan baku kuersetin. Hasil identifikasi KLT flavonoid bisa dilihat pada lampiran 15.

2. Identifikasi tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : metanol : air (7:3:4). Pereaksi yang digunakan adalah FeCl_3 . Baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Hasil identifikasi KLT tannin dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil identifikasi tanin secara KLT

Sampel	Kode Rf	Warna bercak			
		Visual	Visual FeCl_3	UV 254	UV 366
Asam galat	A 0,94	Kuning coklat	Kecoklatan	Peredaman	Biru gelap
Fraksi etil asetat	A 0,94	Kuning coklat	Kecoklatan	Peredaman	Biru gelap

Hasil identifikasi tanin menunjukkan nilai Rf yang sama untuk asam galat dan etil asetat, yaitu 0,94. Penampakan bercak pada UV 254 terlihat peredaman diantara kedua sampel, sedangkan pada UV 366 terlihat warna biru gelap. Hasil identifikasi KLT tanin bisa dilihat pada lampiran 15.

3. Identifikasi triterpenoid

Identifikasi triterpenoid menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform metanol (10:1). Pereaksi yang digunakan adalah anisaldehyd asam sulfat. Hasil positif ditandai jika bercak berwarna ungu atau biru setelah disemprot pereaksi anisaldehyd asam sulfat (Risnafiani *et al* 2015). Hasil identifikasi KLT triterpenoid dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil identifikasi triterpenoid secara KLT

Sampel	Kode Rf	Warna bercak			
		Visual	UV 254	UV 366	UV 366 Anisaldehyd as.sulfat
Fraksi etil asetat	A 0,86	Kuning-coklat	Peredaman	Biru gelap	Ungu
	B 0,76	Tidak berwarna	Peredaman	Biru gelap	Ungu gelap

Hasil identifikasi triterpenoid menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung triterpenoid. Hal tersebut ditunjukkan dengan bercak berwarna biru pada lampu UV 366 dan berwarna ungu gelap setelah dilakukan penyemprotan dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat. Nilai Rf yang dihasilkan sebesar 0,86 dan 0,76. Hasil identifikasi KLT triterpenoid bisa dilihat pada lampiran 15.