

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi dan deskripsi tanaman stevia

1.1 Hasil determinasi tanaman stevia. Determinasi suatu tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang digunakan, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Hasil determinasi tanaman stevia adalah sebagai berikut:

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27b – 799a. Familia 166. Asteraceae. 1b – 3a – 4b – 5b – 23b – 28 a – 29b. 11. *Stevia sp.*

1.2 Hasil deskripsi tanaman stevia. Habitus: semak, semusim, tinggi dapat mencapai 90 cm. Daun: tunggal, berhadapan, bertangkai pendek, bentuk bulat telur, tepi bergerigi, ujung tumpul, tulang daun menyirip, berbulu, berwarna. Bunga: majemuk malai, di ujung dan di ketiak daun. Buah: berbentuk kotak, berambut, berwarna coklat. Biji: berbentuk jarum. Akar: tunggang.

2. Hasil pengeringan dan pembuatan serbuk daun stevia

Tujuan dilakukannya pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama.

Tabel 1. Persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun stevia

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
10300	5250	50,97

Hasil daun kering yang didapat yaitu sebanyak 5250 gram, dengan rendemen sebesar 50,97%. Pengertian dari rendemen 50,97% adalah setelah melalui proses pengeringan, daun stevia segar kehilangan bobot sebesar 49,03%. Perhitungan rendemen daun stevia kering dapat dilihat pada lampiran 16.

Tujuan dilakukannya penyerbukan adalah untuk memperbesar luas permukaan partikel serbuk, sehingga memudahkan kandungan kimia untuk larut dalam cairan penyari.

Tabel 2. Persentase rendemen bobot serbuk terhadap bobot kering daun stevia

Bobot basah (gram)	Bobot serbuk (gram)	Rendemen (%)
5250	3050	58,10

Hasil serbuk yang didapat yaitu sebanyak 3050 gram, dengan rendemen sebesar 58,10%. Pengertian dari rendemen 58,10% adalah setelah melalui proses penyerbukan, daun stevia kering kehilangan bobot sebesar 41,90%. Perhitungan rendemen serbuk daun stevia dapat dilihat pada lampiran 16.

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk menggambarkan zat yang menghilang selama proses pemanasan, tidak hanya menggambarkan air yang hilang tetapi juga zat mudah menguap lain yang hilang.

Tabel 4. Persentase susut pengeringan daun stevia

Replikasi	Bobot serbuk (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,00	7,00
2	2,00	6,00
3	2,00	7,00
Rata-rata ± SD		6,67 ± 0,58

Berdasarkan hasil pada tabel diatas, menunjukkan bahwa kadar susut pengeringan pada replikasi kedua berbeda dari replikasi pertama dan ketiga. Hal tersebut dapat disebabkan karena alat *moisture balance* yang digunakan tidak bekerja dengan baik, sehingga menghasilkan kadar yang berbeda. Hasil rata-rata kadar susut pengeringan serbuk daun stevia sebesar 6,67%. Hasil tersebut menunjukkan kandungan air dan senyawa mudah menguap yang terdapat dalam serbuk daun stevia sebesar 6,67%.

4. Hasil pembuatan ekstrak daun stevia

Pembuatan ekstrak daun stevia dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi paling sederhana karena prosesnya mudah, peralatan yang digunakan sederhana, dan cocok untuk tanaman yang memiliki kandungan senyawa yang tidak tahan panas. Pada penelitian ini serbuk yang digunakan untuk ekstraksi adalah sebanyak 600 gram. Cairan penyari yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol merupakan pelarut yang murah dan mudah didapat, serta bersifat universal yang dapat menarik hampir semua kandungan kimia

pada tanaman. Menurut Tiwari *et al.* (2011), etanol dapat menyari golongan senyawa seperti tanin, polifenol, terpenoid, sterol, dan alkaloid. Botol kaca gelap sebagai wadah yang digunakan dalam proses maserasi bertujuan untuk menghindari terjadinya oksidasi oleh cahaya matahari yang dapat merusak kandungan kimia pada tanaman. Pada maserasi dilakukan penggojogan setiap harinya agar terjadi keseimbangan konsentrasi zat kimia di bagian bawah dan di bagian atas larutan.

Tabel 5. Persentase rendemen bobot ekstrak terhadap bobot serbuk daun stevia

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
600	170	28,33

Hasil ekstrak kental yang didapat yaitu sebanyak 170 gram, dan didapatkan rendemen sebesar 28,33%. Pengertian dari rendemen 28,33% adalah kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak kental daun stevia sebesar 28,33%. Perhitungan rendemen ekstrak daun stevia dapat dilihat pada lampiran 17.

5. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun stevia

Penetapan kadar air pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan air dalam serbuk maupun ekstrak. Penghilangan kadar air berguna untuk memperpanjang daya tahan sampel selama penyimpanan, berkaitan dengan kontaminasi serbuk terhadap mikroorganisme. Pada uji ini digunakan pelarut yang memiliki titik didih lebih tinggi daripada air, tidak campur dengan air, dan memiliki bobot jenis yang lebih rendah daripada air (Rohman & Sumantri 2014), salah satunya toluen. Toluena bisa menarik air, sehingga harus dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, agar pada saat proses destilasi toluena tidak lagi menarik air dari serbuk daun stevia. Standar dari hasil penetapan kadar air adalah tidak lebih dari 10% (Depkes RI 2000). Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun stevia, masing-masing dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Persentase kadar air serbuk daun stevia

Replikasi	Bobot serbuk (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%)
1	20,00	1	5,00
2	20,00	1	5,00
3	20,00	1,4	7,00
Rata-rata \pm SD			5,67 \pm 1,15

Berdasarkan hasil pada tabel diatas, menunjukkan bahwa kadar air pada replikasi ketiga lebih besar dari kadar air replikasi pertama dan kedua. Hal tersebut dapat disebabkan karena alat yang digunakan tidak benar-benar dalam keadaan kering, sehingga volume air yang tertampung lebih banyak dan kadar airnya lebih besar. Hasil rata-rata kadar air serbuk daun stevia sebesar 5,67%. Hasil tersebut menunjukkan kandungan air yang terdapat dalam serbuk daun stevia sebesar 5,67%. Kadar air serbuk daun stevia pada penelitian ini memenuhi syarat standar, yaitu tidak lebih dari 10%. Perhitungan kadar air serbuk daun stevia dapat dilihat pada lampiran 18.

Tabel 7. Persentase kadar air ekstrak daun stevia

Replikasi	Bobot serbuk (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%)
1	20,00	1,4	7,00
2	20,00	1,6	8,00
3	20,00	1,4	7,00
Rata-rata \pm SD			7,33 \pm 0,41

Berdasarkan hasil pada tabel diatas, menunjukkan bahwa kadar air pada replikasi kedua lebih besar dari kadar air replikasi pertama dan ketiga. Hal tersebut juga disebabkan karena alat yang digunakan tidak benar-benar dalam keadaan kering, sehingga volume air yang tertampung lebih banyak dan kadar airnya lebih besar. Hasil rata-rata kadar air ekstrak daun stevia sebesar 7,33%. Hasil tersebut menunjukkan kandungan air yang terdapat dalam ekstrak daun stevia sebesar 7,33%. Kadar air ekstrak daun stevia pada penelitian ini memenuhi syarat standar, yaitu tidak lebih dari 10%. Perhitungan kadar air serbuk daun stevia dapat dilihat pada lampiran 18.

6. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun stevia

Uji bebas etanol pada ekstrak daun Stevia dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian antibakteri ini benar-benar bebas dari kandungan etanol, karena diketahui bahwa etanol memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Hasil uji bebas etanol pada ekstrak daun stevia dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun stevia

Hasil	Pustaka (Susilo <i>et al.</i> 2017)
Tidak tercium bau ester (tidak mengandung etanol)	Tercium bau ester (mengandung etanol)

Terciumnya bau ester dikarenakan hasil dari reaksi esterifikasi antara alkohol dengan asam karboksilat pada suasana asam (Susilo *et al.* 2017). Hasil uji bebas etanol pada ekstrak daun stevia tidak tercium bau khas ester setelah dilakukan pemanasan. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada lagi etanol yang terkandung pada ekstrak kental daun stevia.

7. Hasil fraksinasi ekstrak daun stevia

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan kandungan senyawa pada ekstrak berdasarkan tingkat polaritasnya. Pelarut yang digunakan yaitu pelarut *n*-heksana yang bersifat non polar, etil asetat yang bersifat semi polar, dan air yang bersifat polar. Alat pada fraksinasi adalah corong pisah yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam suatu campuran antara dua fasa pelarut dengan densitas atau massa jenis yang berbeda yang tidak saling campur (Leba 2017). Fraksinasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 5 kali replikasi.

7.1 Fraksi *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana didapatkan dari proses fraksinasi ekstrak kental daun stevia menggunakan pelarut *n*-heksana dan air. *n*-Heksana dan air merupakan dua pelarut yang tidak saling campur karena perbedaan sifat kepolarannya, sehingga pada proses ini akan terbentuk dua lapisan. Hasil dari fraksi *n*-heksana terdapat pada lapisan atas, karena *n*-heksana memiliki bobot jenis yang lebih rendah daripada air. Penelitian Agustina *et al.* (2018) menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana mampu menyari golongan senyawa steroid dan triterpenoid.

Tabel 9. Persentase rendemen fraksi *n*-heksana daun stevia

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
<i>n</i> -Heksana	10,00	0,873	8,73
	10,00	0,843	8,43
	10,00	0,885	8,85
	10,00	0,788	7,88
	10,00	0,798	7,98
Rata-rata \pm SD			8,374 \pm 0,43

Hasil total fraksi *n*-heksana daun stevia dari 5 kali replikasi diperoleh sebanyak 4,187 gram, dan rata-rata rendemen sebesar 8,374%. Pengertian rendemen 8,374% adalah kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi *n*-heksana

sebesar 8,374%. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana dapat dilihat pada lampiran 19.

7.2 Fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat didapatkan dari proses fraksinasi antara fraksi air dan pelarut etil asetat. Etil asetat dan air juga merupakan dua pelarut yang tidak saling campur karena perbedaan sifat kepolarannya, sehingga akan terbentuk dua lapisan pada corong pisah. Hasil dari fraksi etil asetat terdapat pada lapisan atas, karena etil asetat memiliki bobot jenis yang lebih rendah daripada air. Penelitian Firdiyani *et al.* (2015) menunjukkan bahwa pelarut etil asetat dapat menyari golongan senyawa fenolik, terpenoid, steroid, dan flavonoid. Penelitian lain yang dilakukan Wati *et al.* (2017), golongan metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi etil asetat yaitu senyawa alkaloid, fenolik dan flavonoid.

Tabel 10. Persentase rendemen fraksi etil asetat daun stevia

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
Etil asetat	10,00	1,106	11,06
	10,00	1,066	10,66
	10,00	1,109	11,09
	10,00	1,079	10,79
	10,00	1,094	10,94
Rata-rata \pm SD			10,908 \pm 0,18

Hasil total fraksi etil asetat daun stevia dari 5 kali replikasi diperoleh sebanyak 5,454 gram, dan rata-rata rendemen sebesar 10,908%. Pengertian rendemen 10,908% adalah kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi etil asetat sebesar 10,908%. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat dapat dilihat pada lampiran 19.

7.3 Fraksi air. Fraksi air merupakan fraksi terakhir dari proses fraksinasi. Air merupakan pelarut polar yang dapat menarik golongan senyawa polar seperti antosianin, tanin, saponin, polipeptida, dan juga pati (Tiwari *et al.* 2011).

Tabel 11. Persentase rendemen fraksi air daun stevia

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
Air	10,00	7,390	73,90
	10,00	7,451	74,51
	10,00	7,419	74,19
	10,00	7,553	75,53
	10,00	7,515	75,15
Rata-rata \pm SD			74,656 \pm 0,67

Hasil total fraksi air daun stevia dari 5 kali replikasi diperoleh sebanyak 37,328 gram, dan rata-rata rendemen sebesar 74,656%. Pengertian rendemen 74,656% adalah kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi air sebesar 74,656%. Perhitungan rendemen fraksi air dapat dilihat pada lampiran 19.

8. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran golongan senyawa yang berfungsi sebagai antibakteri pada ekstrak daun stevia. Penelitian Siddique *et al.* (2014) menunjukkan golongan senyawa pada daun Stevia yang berperan sebagai antibakteri yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia

Golongan senyawa	Pustaka	Hasil identifikasi
Alkaloid	Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan dengan reagen Mayer, endapan jingga hingga merah dengan reagen Dragendorf, dan endapan merah kecoklatan dengan reagen Wagner (Fajriaty <i>et al.</i> 2018).	(+) Alkaloid dengan pereaksi Dragendorf. Terbentuk endapan berwarna jingga. (+) Alkaloid dengan pereaksi Mayer. Terbentuk endapan berwarna putih. (+) Alkaloid dengan pereaksi Wagner. Terbentuk endapan berwarna coklat kehitaman.
Steroid	Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin steroid berwarna coklat kemerahan pada batas kedua larutan (Siddique <i>et al.</i> 2014).	(+) Steroid. Terbentuk cincin berwarna coklat kemerahan pada batas kedua lapisan.
Tanin	Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman yang menunjukkan tanin katekol dan warna biru kehitaman yang menunjukkan tanin pirogalol (Lallo <i>et al.</i> 2018).	(+) Tanin. Terbentuk warna hijau kehitaman pada larutan, menunjukkan tanin katekol.
Saponin	Hasil positif ditandai dengan terbentuknya buih pada permukaan cairan yang stabil selama 2 menit setelah diberi HCl 2N (Minarno 2016).	(+) Saponin. Terbentuk busa pada permukaan cairan sepanjang 3,5 cm, dan stabil setelah diberi HCl.
Flavonoid	Hasil positif yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid, ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Mentari <i>et al.</i> 2016).	(+) Flavonoid. Terbentuk cincin berwarna jingga pada lapisan amil alkohol.

Berdasarkan hasil pada tabel, ekstrak daun stevia mengandung golongan senyawa alkaloid, steroid, tanin, saponin, dan flavonoid. Gambar dari hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia dapat dilihat pada lampiran 9.

9. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

9.1 Hasil identifikasi makroskopis. Hasil dari identifikasi ini adalah adanya koloni *P. aeruginosa* berwarna hijau. Warna yang dihasilkan dari bakteri *P. aeruginosa* karena bakteri tersebut memiliki pigmen piosianin yang akan menghasilkan warna hijau pada media PSA. Media PSA memiliki kandungan yang dapat mengeluarkan warna pigmen dari bakteri *P. aeruginosa* seperti magnesium klorida, kalium sulfat, dan tambahan gliserol. Gambar dari hasil identifikasi makroskopis bakteri *P. aeruginosa* dapat dilihat pada lampiran 12.

9.2 Hasil identifikasi mikroskopis. Identifikasi ini bertujuan untuk memastikan jika bakteri uji *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif. Bakteri *P. aeruginosa* yang merupakan bakteri Gram-negatif, akan memberikan warna merah muda karena memiliki peptidoglikan yang tipis, sehingga menyebabkan warna sedikit luntur saat pemberian alkohol dan terwarnai oleh safranin (Dwita *et al.* 2018). Morfologi bakteri *P. aeruginosa* yaitu berbentuk batang, tampak dalam bentuk tunggal atau berpasangan, kadang-kadang berantai pendek (Sastrahidayat 2015).

Hasil identifikasi yang diamati di bawah mikroskop adalah terlihatnya sel bakteri berwarna merah muda, berbentuk batang berantai dan juga tunggal. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diamati adalah bakteri *P. aeruginosa* dan merupakan bakteri Gram-negatif. Gambar dari hasil identifikasi mikroskopis bakteri *P. aeruginosa* dapat dilihat pada lampiran 12.

9.3 Hasil uji biokimia. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisiologi bakteri *P. aeruginosa*. Medium yang digunakan untuk uji biokimia yaitu KIA, SIM, LIA, dan *Citrate*. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil uji biokimia

Media uji	Hasil	Pustaka (Sulviana <i>et al.</i> 2017)
KIA	K/KS ⁻	K/KS ⁻
SIM	-- +	-- +
LIA	K/KS ⁻	K/KS ⁻
<i>Citrate</i>	Media berwarna biru	Media berwarna biru

Keterangan:

KIA = *Kligler Iron Agar*

SIM = *Sulfide Indol Motility*

LIA = *Lysine Iron Agar*

Uji KIA bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, asam dan gas (Harti 2015). Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng medium berwarna merah ditulis K, bagian dasar medium berwarna merah ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻ (Sulviana *et al.* 2017). Hasil uji ini adalah K/KS⁻, bagian lereng medium berwarna merah ditulis K, bagian dasar medium berwarna merah ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻. Gambar dari hasil uji KIA dapat dilihat pada lampiran 12.

Uji SIM bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis (-), tidak terbentuk cincin indol berwarna merah setelah penambahan Erlich A dan B (1:1) ditulis (-), dan adanya motilitas ditulis (+). Motilitas ditandai dengan kekeruhan pada seluruh medium yang menunjukkan pertumbuhan dan penyebaran bakteri (Sulviana *et al.* 2017). Hasil uji ini adalah - - +, tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis (-), tidak terbentuk cincin indol berwarna merah setelah penambahan Erlich A dan B (1:1) ditulis (-), dan adanya motilitas ditulis (+). Gambar dari hasil uji SIM dapat dilihat pada lampiran 12.

Uji LIA bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, deaminasi atau dekarboksilasi lisin (Harti 2015). Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng medium berwarna ungu ditulis K, bagian dasar medium berwarna ungu ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻ (Sulviana *et al.* 2017). Hasil uji ini adalah K/KS⁻, bagian lereng medium berwarna ungu ditulis K, bagian dasar medium berwarna ungu ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻. Gambar dari hasil uji LIA dapat dilihat pada lampiran 12.

Pada uji *citrate*, hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Perubahan warna disebabkan oleh peningkatan pH media di atas 7,6 karena adanya amonia yang berasal dari monoammonium pospat yang terdapat pada media (Sulviana *et al.*

2017). Hasil identifikasi ini adalah perubahan warna medium dari hijau menjadi biru. Gambar dari hasil uji *citrata* dapat dilihat pada lampiran 12.

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi bertujuan untuk mengetahui zat yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun stevia dengan konsentrasi 12,5, 25 dan 50% digunakan dalam pengujian antibakteri secara difusi pada penelitian ini. Pengencer yang digunakan pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air adalah larutan DMSO 5%. Pengencer pada fraksi *n*-heksana adalah pelarut *n*-heksana, karena fraksi *n*-heksana tidak dapat larut dengan DMSO. Suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil pengenceran 1000 kali dari standar *Mc Farland* 0,5. Pengenceran 1000 kali suspensi bakteri dilakukan karena pada saat orientasi, ekstrak tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap suspensi bakteri dengan standar *Mc Farland* 0,5. Gambar dari hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dapat dilihat pada lampiran 13.

Tabel 14. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Sampel	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata \pm SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Konsentrasi 50%				
Ekstrak	11,50	10,75	11,50	11,25 \pm 0,43
Fraksi <i>n</i> -heksana	11,25	11,00	10,75	11,00 \pm 0,25
Fraksi etil asetat	14,50	14,00	14,25	14,25 \pm 0,25
Fraksi air	8,00	8,50	8,50	8,33 \pm 0,289
Konsentrasi 25%				
Ekstrak	10,00	10,25	9,75	10,00 \pm 0,25
Fraksi <i>n</i> -heksana	8,25	8,50	8,00	8,25 \pm 0,25
Fraksi etil asetat	13,25	12,75	13,00	13,00 \pm 0,25
Fraksi air	7,00	7,00	7,25	7,08 \pm 0,14
Konsentrasi 12,5%				
Ekstrak	8,50	7,75	8,00	8,08 \pm 0,38
Fraksi <i>n</i> -heksana	6,25	6,50	6,25	6,33 \pm 0,14
Fraksi etil asetat	10,75	10,50	11,00	10,75 \pm 0,25
Fraksi air	6,00	6,25	6,00	6,08 \pm 0,14
Kontrol positif (+) Gentamicin 10 μ g	17,25	16,75	17,00	17,00 \pm 0,25
Kontrol negatif (-) DMSO 5%	0	0	0	0 \pm 0

Hasil dari tabel diatas menunjukkan bahwa, ekstrak dan fraksi daun stevia pada konsentrasi 50% memiliki rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar

daripada konsentrasi 25 dan 12,5%. Diameter zona hambat paling besar pada konsentrasi 50% adalah fraksi etil asetat, dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 14,25 mm.

Pada pengujian ini digunakan cakram antibiotik gentamisin 10 µg sebagai kontrol positif, terbukti efektif dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853, memiliki rata-rata diameter zona hambat sebesar 17 mm. DMSO 5% sebagai kontrol negatif tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri, yang ditunjukkan dengan tidak adanya diameter zona hambat di sekitar cakram.

Tabel hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi kemudian dilakukan analisis data. Hasil analisis data dapat dilihat pada lampiran. Hasil analisis dengan uji *One-Sample Kolmogrov-Smirnov*, diperoleh signifikansi $0,491 > 0,05$ (H_0 diterima). Dapat disimpulkan bahwa data tersebut terdistribusi normal, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Hasil uji *oneway* ANOVA diperoleh $F = 777,960$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang artinya, dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *P. aeruginosa*. Hasil tabel Tukey HSD terdapat tanda bintang (*) pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa adanya perbedaan diameter zona hambat yang signifikan.

Tabel *Homogenous Subsets* terdapat 9 subset. Pada tabel ini terdapat satu sampel dalam satu subset, artinya sampel memiliki perbedaan rata-rata zona hambat yang signifikan dengan sampel lainnya. Sedangkan beberapa sampel dalam satu subset, artinya sampel tersebut tidak memiliki perbedaan rata-rata zona hambat yang signifikan. Subset 1 terdapat kontrol negatif, subset 2-8 terdapat sampel uji yang berbeda dengan konsentrasi yang berbeda juga. Subset 7, 8, dan 9 memiliki rata-rata zona hambat yang berbeda secara signifikan. Subset 7 berisi sampel fraksi etil asetat 25%, dan subset 8 berisi sampel fraksi etil asetat 50%. Pada hasil tersebut sampel fraksi etil asetat 50% lebih efektif daripada sampel fraksi etil asetat 25% karena memiliki rata-rata zona hambat yang lebih besar. Subset 9 berisi kontrol positif yang memiliki rata-rata zona hambat paling besar.

Berdasarkan hasil analisis data, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun stevia merupakan fraksi teraktif sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Penelitian Firdiyani *et al.* (2015) menunjukkan bahwa etil asetat dapat menyari golongan senyawa fenolik, terpenoid, steroid, dan flavonoid.

Penelitian lain yang dilakukan Wati *et al.* (2017), golongan senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat yaitu alkaloid, fenolik dan flavonoid. Kandungan kimia tersebut yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dapat menjadi fraksi teraktif, karena etil asetat dapat menarik hampir semua kandungan kimia yang memiliki aktivitas antibakteri pada daun stevia.

Golongan senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun stevia yang berperan sebagai antibakteri yaitu alkaloid, steroid, tanin, saponin dan flavonoid. Alkaloid memiliki mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan sel lisis, sehingga sel akan mati (Amalia *et al.* 2014). Steroid memiliki mekanisme kerja melalui interaksi dengan membran fosfolipid yang bersifat permeabel, menyebabkan ketuhan membran menurun dan morfologi membran sel berubah sehingga sel rapuh dan lisis (Sapara *et al.* 2016). Tanin bekerja dengan cara menonaktifkan molekul yang menempel pada sel inang yang terdapat pada permukaan sel bakteri, dan mampu menghambat enzim transport protein melalui dinding sel (Romas *et al.* 2015). Saponin memiliki mekanisme kerja melalui peningkatan tegangan permukaan pada dinding sel bakteri. Dinding sel akan mengalami peregangan yang sangat kuat dan kemudian mengakibatkan kerusakan dinding sel, dan pada akhirnya sel bakteri lisis (Romas *et al.* 2015). Flavonoid memiliki mekanisme kerja melalui pembentukan senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga merusak dinding sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Sani *et al.* 2017).

11. Identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat daun stevia

Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif yang didapat dari hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi. Identifikasi kandungan kimia ini dilakukan dengan metode KLT. Pada identifikasi ini fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Golongan senyawa yang diidentifikasi adalah alkaloid, steroid, tanin, saponin, dan flavonoid.

Tabel 15. Rf dan warna bercak KLT alkaloid

Rf	Sebelum disemprot pereaksi		Sesudah disemprot pereaksi
	UV 254	UV 366	Sinar tampak
P = 0,71	P = meredam	P = biru	P = jingga
S = 0,17	S = meredam	S = biru	S = jingga

Keterangan :

Pereaksi semprot = Dragendorf

P = Baku pembanding papaverin

S = Sampel fraksi etil asetat

Identifikasi untuk golongan senyawa alkaloid pada penelitian ini menggunakan fase gerak etil asetat-metanol-air (90:9:1). Baku pembanding yang digunakan adalah papaverin. Papaverin termasuk senyawa golongan alkaloid. Berdasarkan tabel hasil, bercak baku memiliki Rf sebesar 0,71. Bercak sampel yang memiliki warna yang sama dengan bercak baku memiliki Rf sebesar 0,17. Pengamatan dengan sinar UV 254 terlihat peredaman pada bercak baku dan sampel, di UV 366 berpendar biru pada bercak baku dan sampel, setelah disemprot dilihat dengan sinar tampak berwarna jingga pada bercak baku dan sampel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat daun stevia terkandung golongan senyawa alkaloid. Bercak sampel memiliki Rf yang sangat rendah, hal tersebut dapat disebabkan karena penggunaan fase gerak yang kurang sesuai dan penotolan sampel yang terlalu tebal, sehingga senyawa tidak dapat terelusi dengan baik. Gambar dari hasil identifikasi KLT golongan senyawa alkaloid dapat dilihat pada lampiran 14, tabel 21.

Tabel 16. Rf dan warna bercak KLT steroid

Rf	Sesudah disemprot pereaksi		
	UV 254	UV 366	Sinar tampak
P = 0,55	P = meredam	P = biru	P = coklat
S = -	S = -	S = -	S = -

Keterangan :

Pereaksi semprot = Liebermann Burchard (LB)

P = Baku pembanding stigmasterol

S = Sampel fraksi etil asetat

Identifikasi untuk golongan senyawa steroid pada penelitian ini menggunakan fase gerak *n*-heksana-etil asetat (6:4). Baku pembanding yang digunakan adalah stigmasterol. Stigmasterol termasuk senyawa golongan steroid. Bercak baku memiliki Rf sebesar 0,55. Bercak pada baku baru terlihat setelah disemprot dengan reagen LB dan dipanaskan di oven dengan suhu 100°C selama 1 menit. Pengamatan dengan sinar UV 254 terlihat peredaman, di UV 366 berpendar

biru, setelah disemprot dilihat dengan sinar tampak berwarna coklat. Steroid memberikan warna biru atau ungu setelah disemprot dengan pereaksi LB (Fajriaty *et al.* 2018), sehingga bercak baku tidak memberikan hasil positif terhadap golongan senyawa steroid. Hal tersebut dapat disebabkan kualitas dari baku stigmasterol atau pereaksi LB yang kurang baik. Pada sampel juga tidak terdapat bercak yang menunjukkan positif steroid, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun stevia tidak terdapat golongan senyawa steroid. Gambar dari hasil identifikasi KLT golongan senyawa steroid dapat dilihat pada lampiran 14, tabel 22.

Tabel 17. Rf dan warna bercak KLT tanin

Rf	Sebelum disemprot pereaksi		Sesudah disemprot pereaksi
	UV 254	UV 366	Sinar tampak
P = 0,67	P = meredam	P = lembayung	P = hitam
S = 0,25	S = meredam	S = lembayung	S = hitam

Keterangan :

Pereaksi semprot = FeCl₃

P = Baku pembanding asam galat

S = Sampel fraksi etil asetat

Identifikasi untuk golongan senyawa tanin pada penelitian ini menggunakan fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air (4:1:5). Baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Asam galat termasuk senyawa golongan tanin. Bercak baku memiliki Rf sebesar 0,67. Bercak sampel yang memiliki warna yang sama dengan bercak baku memiliki Rf sebesar 0,25. Pengamatan dengan sinar UV 254 terlihat peredaman pada bercak baku dan sampel di UV 366 berpendar lembayung atau violet pada bercak baku dan sampel, setelah disemprot dilihat dengan sinar tampak berwarna hitam pada bercak baku dan sampel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat daun stevia terkandung golongan senyawa tanin. Bercak sampel memiliki Rf yang rendah, hal tersebut dapat disebabkan karena penggunaan fase gerak yang kurang sesuai dan penotolan sampel yang terlalu tebal, sehingga senyawa tidak dapat terelusi dengan baik. Gambar dari hasil identifikasi KLT golongan senyawa tanin dapat dilihat pada lampiran 14 tabel 23.

Tabel 18. Rf dan warna bercak KLT saponin

Rf	Sebelum disemprot pereaksi		Sesudah disemprot pereaksi
	UV 254	UV 366	Sinar tampak
P = 0,8	P = meredam	P = -	P = -
S = -	S = -	S = -	S = -

Keterangan :

Pereaksi semprot = Liebermann Burchard (LB)

P = Baku pembanding gliserisin

S = Sampel fraksi etil asetat

Identifikasi untuk golongan senyawa saponin pada penelitian ini menggunakan fase gerak kloroform-metanol-air (6:3:1). Baku pembanding yang digunakan adalah gliserisin. Gliserisin termasuk senyawa golongan saponin. Bercak baku memiliki nilai Rf sebesar 0,8 yang hanya terlihat pada UV 254. Saponin memberikan warna biru, biru keunguan, atau merah setelah disemprot dengan pereaksi LB (Minarno 2016), sehingga bercak baku tidak memberikan hasil positif terhadap golongan senyawa saponin. Hal tersebut dapat disebabkan kualitas dari baku gliserisin atau pereaksi LB yang kurang baik. Pada sampel juga tidak terdapat bercak yang menunjukkan positif saponin, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun stevia tidak terdapat golongan senyawa saponin. Gambar dari hasil identifikasi KLT golongan senyawa saponin dapat dilihat pada lampiran 14, tabel 24.

Tabel 19. Rf dan warna bercak KLT flavonoid

Rf	Sebelum disemprot pereaksi		Sesudah disemprot pereaksi
	UV 254	UV 366	Sinar tampak
P = 0,47	P = meredam	P = biru	P = kuning
S = 0,47	S = meredam	S = biru	S = kuning

Keterangan :

Pereaksi semprot = Sitroborat

P = Baku pembanding rutin

S = Sampel fraksi etil asetat

Identifikasi untuk golongan senyawa flavonoid menggunakan fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air (4:1:5). Baku pembanding yang digunakan adalah rutin. Rutin termasuk senyawa golongan flavonoid. Bercak sampel sejajar dengan bercak baku yang memiliki nilai Rf sebesar 0,47. Pengamatan dengan sinar UV 254 terlihat peredaman, di UV 366 berpendar biru, setelah disemprot dilihat dengan sinar tampak berwarna kuning. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat daun stevia terkandung golongan senyawa flavonoid. Gambar dari hasil

identifikasi KLT golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada lampiran 13, tabel 25.

Berdasarkan hasil identifikasi diatas, dapat disimpulkan bahwa kandungan kimia yang terdapat pada fraksi etil asetat daun stevia yaitu alkaloid, tanin dan flavonoid.

12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi

Fraksi etil asetat daun stevia sebagai fraksi teraktif yang didapatkan dari uji aktivitas antibakteri secara difusi, dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bertujuan untuk menentukan KHM dan KBM suatu antibakteri (Yanuhar 2016). Fraksi etil asetat daun stevia dengan konsentrasi 50% digunakan dalam pengujian antibakteri secara dilusi ini. Pada uji ini menggunakan 12 tabung. Konsentrasi pengenceran fraksi etil asetat pada tabung 2 sampai 12 yaitu 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195 dan 0,0975%. Tabung 1 berisi fraksi etil asetat sebagai kontrol negatif, dan tabung 12 berisi suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 sebagai kontrol positif.

Nilai KHM ditentukan dengan mengamati tabung jernih yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, tetapi tidak dapat ditentukan karena fraksi etil asetat berwarna hitam pekat. Tabung-tabung tersebut kemudian diinokulasikan pada medium PSA untuk menentukan nilai KBM. Penggunaan medium PSA bertujuan untuk memastikan bahwa suspensi pada tabung tidak terkontaminasi oleh bakteri lain selain *P. aeruginosa*. Bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan karakteristik yang berbeda dari bakteri lain pada medium PSA, yaitu timbul koloni berwarna hijau. Nilai KBM ditentukan dengan mengamati konsentrasi terkecil dari fraksi etil asetat yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada medium. Gambar dari hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 15.

Tabel 20. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi

Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
50	–	–	–
25	–	–	–
12,5	–	–	–
6,25	–	–	–
3,125	+	+	+
1,562	+	+	+
0,781	+	+	+
0,390	+	+	+
0,195	+	+	+
0,0975	+	+	+
K (–)	–	–	–
K (+)	+	+	+

Keterangan:

– = tidak ada pertumbuhan bakteri

+

K (–) = kontrol negatif, fraksi etil asetat

K (+) = kontrol positif, suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853

Berdasarkan hasil tabel diatas, fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% sampai 6,25% tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat pada pengenceran konsentrasi 6,25% merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, maka dapat didapatkan nilai KBM adalah 6,25%.