

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman biduri yang dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti dengan kunci determinasi dan menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan. Hasil determinasi dapat dilihat pada kunci determinasi di bawah ini :

1b - 2b - 3b - 4b - 6b - 7b - 9b - 10b - 11b - 12b - 13b - 14b - 16a. Golongan 10.239a - 240b - 241b - 242b. Familia 106. Asclepiadaceae. 1a-2b. 3. *Calotropis*. ***Calotropis gigantea* Dryand.** Hasil determinasi tanaman biduri secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 1.

#### **2. Pengambilan bahan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun biduri yang diperoleh di daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah, pada bulan Januari tahun 2019. Pengambilan sampel dilakukan pada sore hari, karena pada sore hari proses fotosintesis dari tumbuhan sudah berlangsung dengan sempurna sehingga diharapkan dapat diperoleh komponen kimia yang maksimal dari sampel. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

#### **3. Pembuatan simplisia dan serbuk**

Daun biduri yang segar dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian ditiriskan, setelah itu daun biduri dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pengeringan tanaman bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada tanaman, selain itu kadar air yang terlalu tinggi dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang akan menyebabkan pembusukan pada tanaman. Daun biduri yang telah kering diserbuk dan hasil penyerbukan dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan no.

40. Penyerbukan bertujuan untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut saat penyarian. Daun biduri sebanyak 8500 g yang dikeringkan, diperoleh persentase bobot kering terhadap bobot basah, hasil presentase rendemen dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 3.

**Tabel 1. Hasil persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun biduri**

Bahan	Bobot basah (g)	Bobot kering (kg)	Rendemen b/v (%)
Daun biduri	8500	1200	14,12

Tujuan penentuan rendemen adalah untuk mengetahui bobot kering yang didapat ketika proses pengeringan dan juga untuk mengetahui berat yang hilang ketika proses pengeringan. Persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun biduri adalah 14,12 %. Pada saat proses pengeringan suhu harus konstan sebab jika terlalu tinggi atau terlalu rendah maka dapat memungkinkan terjadi kerusakan senyawa aktif di dalam daun hingga menyebabkan terjadinya kerusakan terhadap simplisia. Daun biduri yang sudah di keringkan kemudian dihaluskan menggunakan alat penggiling dan diayak menggunakan ayakan nomor 40. Hasil pembuatan serbuk daun biduri dapat dilihat pada tabel 2 dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 4.

**Tabel 2. Rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering.**

Berat daun kering (g)	Berat serbuk (kg)	Rendemen b/v (%)
1200	900	75

Tujuan penentuan rendemen adalah untuk mengetahui bobot serbuk yang didapat ketika proses penyerbukan dan juga untuk mengetahui berat yang hilang ketika proses penyerbukan. Tabel 2 menunjukkan bahwa berat daun kering sebanyak 1200 gram dan berat serbuk yang didapat sebanyak 900 gram sehingga didapatkan hasil rendemen sebanyak 75%. Tujuan pembuatan serbuk daun biduri adalah untuk memperluas ukuran partikel serbuk yang kontak dengan pelarut sehingga pada saat penyarian dapat berlangsung secara efektif.

#### **4. Penentuan susut pengeringan serbuk daun biduri**

Penentuan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun biduri dilakukan sebanyak tiga kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance* yang bertujuan

untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Handayani *et al.* 2017). Berdasarkan tabel 3 hasil penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun biduri didapatkan rata-rata sebesar 4,2% yang menunjukkan jumlah maksimal senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan. Gambar hasil penetapan susut pengeringan serbuk dapat dilihat pada lampiran 5.

**Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun biduri**

Replikasi	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2	4,3
2	2	4,0
3	2	4,3
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>4,2±0,14</b>

### 5. Penentuan susut pengeringan ekstrak daun biduri

Pada tabel 4 dibawah ditunjukkan bahwa hasil penetapan kadar susut pengeringan ekstrak daun biduri didapatkan rata rata sebesar 8,8% dengan demikian ekstrak daun biduri memenuhi syarat pengeringan simplisia karena kurang dari 10% (Depkes RI 1994). Gambar hasil penetapan susut pengeringan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 5.

**Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun biduri**

Replikasi	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2	9,3
2	2	8,8
3	2	8,3
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>8,8±0,40</b>

### 6. Pembuatan ekstrak etanol daun biduri

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan maserasi. Metode maserasi bertujuan untuk menyari kandungan zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, menghindari kerusakan zat aktif seperti flavonoid yang mudah rusak akibat pemanasan dan paling sederhana pengerjaannya serta cepat dilakukan. Etanol 96% digunakan sebagai larutan penyari karena sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai perbandingan, disamping itu etanol memiliki titik didih rendah sehingga mudah dan cepat diuapkan.

Serbuk daun biduri dimaserasi selama 5 hari dengan sesekali penggojokan berulang-ulang. Penggojokan dilakukan agar larutan yang konsentrasinya tinggi

terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Setelah 5 hari, maserat disaring dengan menggunakan kain flanel kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental, dari 750 gram serbuk daun biduri diperoleh berat ekstrak 96,33 gram. Perhitungan rendemen ekstrak terhadap serbuk dapat dilihat pada lampiran 6.

**Tabel 5. Hasil persentase rendemen ekstrak terhadap serbuk daun biduri**

Bahan	Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen b/v (%)
Daun biduri	750	96,33	12,84

Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Besar kecilnya nilai rendemen yang diperoleh menunjukkan efisiensi dan efektivitas pada proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, ukuran partikel simplisia, metode yang digunakan dan lamanya ekstraksi (Permawati 2008).

## 7. Hasil pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun biduri tercantum pada tabel 6.

**Tabel 6. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun biduri**

Bahan	Hasil	Pustaka
Daun Biduri	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Kurniawati 2015)

Hasil uji ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak daun biduri positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester setelah dilakukan pemanasan dengan penambahan asam asetat dan asam sulfat pekat. Tujuan dari uji bebas etanol pada ekstrak daun biduri adalah untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi untuk tahap penelitian selanjutnya pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, karena etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Kurniawati 2015).

## 8. Hasil fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu metode pemisahan yang tujuannya untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama yang lainnya. Proses fraksinasi memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran senyawa dalam suatu tanaman. Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 10 gram ekstrak etanol daun biduri kemudian di fraksinasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan air sebanyak 3 kali replikasi. Hasil rendemen pembuatan fraksi dapat dilihat pada tabel 7.

**Tabel 7. Hasil fraksinasi ekstrak daun biduri**

Total bobot ekstrak (g)	Pelarut	Bobot fraksi (g)	Rendemen b/v (%)
30	n-heksana	6,60	22
	Etil asetat	6,35	21,17
	Air	8,00	26,67

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa hasil tiap pelarut berbeda, hasil menunjukkan bahwa fraksi air lebih besar dibandingkan dengan hasil fraksi n-heksana dan etil asetat, sedangkan fraksi n-heksana lebih besar dari fraksi etil asetat. Hasil rendemen fraksi yang didapat masih jauh dari yang diharapkan, hal ini mungkin terjadi karena masih ada ekstrak yang menempel di wadah pada saat proses fraksinasi. Hasil perhitungan rendemen fraksi daun biduri dapat dilihat pada lampiran 7.

## 9. Identifikasi senyawa daun biduri dengan metode reaksi kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran dari zat kimia yang terkandung di dalam daun biduri. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan flavonoid, tannin dan saponin. Hasil identifikasi kandungan kimia daun biduri dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun biduri**

Kandungan kimia	Pustaka	Interpretasi hasil
		<b>Ekstrak</b>
<b>Flavonoid</b>	Terbentuk intensitas warna kuning, merah atau jingga (Sukmawati <i>et al.</i> 2014)	+
<b>Saponin</b>	Terbentuk busa dan bertahan selama 10 menit (Tiwati <i>et al.</i> 2011)	+
<b>Tanin</b>	Terbentuk warna hijau kehitaman (Sukmawati <i>et al.</i> 2014)	+

**Keterangan :** + : ada golongan senyawa  
- : tidak ada golongan senyawa

Data pada tabel menunjukkan bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun biduri positif mengandung flavonoid, tanin, dan saponin, kandungan kimia tersebut diduga mempunyai aktivitas antibakteri. Hasil uji identifikasi ekstrak etanol daun biduri dapat dilihat pada lampiran 8.

## **10. Hasil identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922**

**10.1 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis.** Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis menunjukkan koloni berwarna merah dengan kilat logam, hal ini disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* 25922 mampu memetabolisme laktosa dan menghasilkan aldehyd dan asam. Aldehyd akan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna kuning kilat logam (Kartika *et al.* 2014). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 11.

**10.2 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan gram.** Identifikasi bakteri dengan pewarnaan dilakukan untuk menyatakan bahwa bakteri tersebut golongan bakteri *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel berwarna merah, berbentuk cocobasil dan memiliki flagel berarti positif golongan *Escherichia coli*. Hasil identifikasi yang didapatkan berupa sel bakteri berwarna merah, bentuk batang. Kristal ungu (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Lugol iodine (Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal ungu–iodine tidak menempel pada dinding sel bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 11.

### 10.3 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia.

Pengujian pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM) dilakukan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Pengujian dengan media SIM setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil ---. Pada uji sulfida bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dengan penambahan Ehrlich A dan B menunjukkan hasil positif yaitu terbentuk lapisan cincin berwarna merah pada permukaan biakan artinya bakteri ini membentuk indol dari triptophan sebagai sumber karbon. Asam amino triptophan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganismenya. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran di media SIM.

Pengujian pada media *Kliger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada atau tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil A/AGS(-), A/A berarti pada lereng dasar media berwarna kuning yang menunjukkan bahwa bakteri memfermentasi glukosa dan laktosa, G artinya terbentuk gas yang ditandai terangkatnya media, S(-) artinya H<sub>2</sub>S negatif yang ditunjukkan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak dapat mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, maka akan bereaksi dengan Fe<sup>++</sup> yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Media KIA mengandung laktosa dan glukosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% glukosa dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam.

Pengujian pada media *Lysin Iron Agar* (LIA) dilakukan untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian dengan media LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/KS(-). K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa

(warna ungu) di seluruh media. S(-) artinya uji H<sub>2</sub>S negatif di tunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Pengujian pada media Citrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian pada media citrat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil negatif sehingga warna media tetap hijau. Hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Media citrat terdapat indikator Bromo Tymol Blue (BTB) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan citrat menyebabkan suasana basa, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna media dari hijau menjadi biru. Hasil dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 10. Hasil identifikasi biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922**

Pengujian	Hasil	Pustaka (Volk and Wheller 1988)
SIM	+++	+++
KIA	A/AGS (-)	A/AGS (-)
LIA	K/KS (-)	K/KS (-)
Citrat	-	-

**Keterangan :**

SIM : *Sulfida Indol Motility*

KIA : *Kliger Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

G : terbentuk gas (pada media KIA)

A/A : kuning (pada media KIA)

K/K : terbentuk warna ungu (pada media LIA)

S(-) : tidak terbentuk warna hitam

## 11. Hasil identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**11.1 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram.** Uji identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25423 dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan cara koloni diamati menggunakan mikroskop, tampak menyerupai buah anggur, bulat berwarna ungu dan bergerombol. Warna ungu yang didapat pada pewarnaan gram menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, karena bakteri gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal sehingga pada saat dilunturkan dengan alkohol bakteri ini tidak luntur dan akan tetap berwarna ungu. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa bakteri *Staphylocooccus aureus* merupakan bakteri



gram positif yang berbentuk bulat, berwarna ungu dan bergerombol seperti buah anggur. Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 10.

**11.2 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan cawan gores.** Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinokulasi pada medium VJA dalam cawan petri yang telah ditetesi kalium telurit 3% sebanyak 3 tetes kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil yang diperoleh ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna hitam yang dihasilkan dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dapat mereduksi kalium telurit menjadi metalik telurit, sedangkan warna di sekitar koloni berwarna kuning akibat dari kemampuan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol menjadi asam yang dideteksi oleh perubahan warna indikator phenol red dari merah menjadi kuning (Jawetz *et al.* 2007).

**11.3 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan uji koagulase.** Hasil identifikasi dengan uji koagulase pada tabung reaksi yang berisi plasma kelinci, asam sitrat, dan bakteri menunjukkan adanya gumpalan pada plasma kelinci dan tetap melekat pada tabung reaksi. Hal ini terjadi karena *Staphylococcus aureus* menghasilkan koagulase yaitu protein ekstraseluler yang dapat berikatan dengan protombin inang untuk membentuk sebuah kompleks yang disebut stafilotrombin. Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui keberadaan *Staphylococcus aureus* serta menunjukkan sifat virulensi bakteri yaitu dapat melindungi dirinya dari fagositosis dan menghalangi kerja sistem imunitas inang (Radji 2011). Gambar dapat dilihat pada lampiran 10.

**11.4 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan uji katalase.** Hasil yang diperoleh dari uji katalase pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan adanya gelembung dan oksigen setelah ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebanyak 2 tetes. Hal ini terjadi karena bakteri *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim katalase, uji katalase juga dapat digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dengan bakteri

*Streptococcus* karena bakteri *Streptococcus* tidak menghasilkan enzim katalase (Radji 2011). Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 10.

## **12. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji**

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam masing-masing biakan murni diambil satu ose dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril yang telah diisi 10 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian di vortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi yang telah diencerkan di setarakan dengan larutan standar Mc farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$ CFU/ml) sampai di dapat kekeruhan yang sama agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian. Standar yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi klinik adalah standar Mc Farland 0,5 yang digunakan untuk pengujian kerentanan antimikroba dan pengujian kinerja media kultur. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi dan pengendalian jumlah bakteri.

## **13. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun biduri secara difusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.**

Ekstrak yang telah didapatkan kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air. Fraksi yang diperoleh dari ekstrak daun biduri yaitu fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian ini dilakukan menggunakan sediaan dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5% dan pembanding kontrol positif siprofloksasin serta kontrol negatif DMSO 5%. Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol dari zat uji, dengan membandingkan diameter daerah hambat yang terbentuk. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun biduri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi yang dilakukan dalam waktu 24 jam pada suhu 37°C. Adanya

daerah jernih disekitar disk cakram yang tidak di tumbuh oleh bakteri menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil pengukuran diameter hambat pengujian aktivitas antiakteri ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat dan air daun biduri dapat dilihat pada tabel 10 dan gambar dapat dilihat pada lampiran 13 dan 14.

**Tabel 11. Diameter hambat pada uji aktibakteri daun biduri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi.**

Sampel	Konsentra si (%)	Diameter hambat (mm)			Rata-rata ± SD	Diameter hambat (mm)			Rata-rata ±SD
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923				<i>E. coli</i> ATCC 25922			
		Replikasi				Replikasi			
		1	2	3		1	2	3	
Ekstrak	12,50 %	9	9,5	9,3	9,3±0,21	8	8,4	8,2	8,2±0,16
	25%	9,5	10	10	9,8±0,24	9,3	9,2	9	9,2±0,12
	50%	12	12,3	12,5	12,3±0,21	10,2	10,4	10,1	10,2±0,12
Fraksi n- heksana	12,50 %	8,2	8,4	8,7	8,4±0,21	7,8	7,6	8	7,8±0,16
	25%	8,8	9,1	9,3	9,1±0,21	8,3	8,5	8,4	8,4±0,08
	50%	10,5	10,1	10,3	10,3±0,16	9	9,4	9,6	9,3±0,25
Fraksi Etil asetat	12,50 %	13,8	13,9	13,7	13,8±0,08	12,7	12,6	12,8	12,7±0,08
	25%	14,2	14,4	14,3	14,3±0,08	13,4	13,2	13,5	13,4±0,12
	50%	17,6	17,5	17,3	17,5±0,12	15,2	15,3	15,5	15,3±0,12
Fraksi air	12,50 %	10,6	10,4	10,7	10,6±0,12	9,6	9,8	9,5	9,6±0,05
	25%	11,2	11,4	11,3	11,3±0,08	10,8	10,5	10,7	10,7±0,12
	50%	12,1	12,6	12,4	12,4±0,21	11,4	11,2	11	11,2±0,16
Kontrol (+) Siprofloksasin 5µg/disc	-	28	28	27,6	27,9±0,19	27	27	27,3	27,1±0,14
Kontrol (-) DMSO 5%	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Dilihat pada tabel diatas menunjukkan bahwa hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun biduri memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Daya hambat yang dihasilkan menunjukkan ukuran yang berbeda yakni fraksi yang memiliki daya hambat paling besar terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu fraksi etil asetat dengan hasil rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berturut-turut sebesar 15,3mm, 13,4mm dan 12,7mm. Siprofloksasin 5µg/disc sebagai kontrol

positif memiliki rata-rata zona hambat sebesar 27,1mm dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif tidak memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Fraksi etil asetat juga memiliki daya hambat yang paling besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% berturut-turut sebesar 17,5mm, 14,3mm dan 13,8mm. Siprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki rata-rata zona hambat sebesar 27,9mm dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif tidak memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sehingga dapat ditentukan bahwa ekstrak dan fraksi daun biduri memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di bandingkan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Perbedaan zona hambat yang terbentuk diantara bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 kemungkinan terjadi karena susunan dinding sel dari tiap bakteri berbeda. Ekstrak dan fraksi daun biduri menghasilkan daya hambat yang lebih besar pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun biduri lebih efektif pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang merupakan bakteri Gram positif. Septiani *et al.* (2017) berpendapat bahwa bakteri Gram positif memiliki struktur Gram dinding sel dengan lebih banyak peptidoglikan, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida. Polisakarida merupakan polimer yang larut dalam air, yang berfungsi sebagai transport ion positif untuk keluar atau masuk. Karena sifat larut air inilah yang menunjukkan bahwa dinding sel bakteri Gram positif bersifat lebih polar. Senyawa flavonoid dan tanin merupakan bagian yang bersifat polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang bersifat polar dari pada lapisan lipid yang non polar. Hal tersebut menyebabkan aktivitas penghambatan pada bakteri Gram positif lebih besar daripada bakteri Gram negatif.

Dari hasil uji difusi selanjutnya dianalisis dengan pengujian statistik menggunakan uji SPSS *Two Way Anova*. Pengujian ini dilakukan guna membandingkan sampel pada tiap-tiap konsentrasi. Data yang dianalisis adalah

konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% dari ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat, air, antibiotik siprofloksasin dan DMSO 5%. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi n-heksan, etil asetat, air, kontrol positif (siprofloksasin) dan kontrol negatif (DMSO 5%) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *one-sampel Kolmogorov smirnov* menunjukkan bahwa nilai signifikasinya sebesar  $0,086 > 0,05$  untuk data diameter zona hambat *Staphylococcus aureus* dan nilai signifikasi sebesar  $0,055 > 0,05$  untuk diameter zona hambat *Escherichia coli* maka  $H_0$  diterima, artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji *two way ANOVA*.

Berdasarkan tabel Tukey test menunjukkan tanda (\*) pada angka mean difference, yang artinya hasil pada diameter hambat ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat dan air menunjukkan perbedaan yang signifikan. Analisis homogeneous subsets digunakan untuk mencari grup subsets mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel hasil homogeneous subsets, menunjukkan perbedaan signifikan pada setiap sampel. Sampel yang berada pada satu kolom menandakan tidak adanya perbedaan signifikan, sementara sampel yang berada pada kolom yang dekat dengan kolom kontrol positif menandakan bahwa sampel tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif diantara sampel yang lain. Berdasarkan tabel homogeneous subsets, fraksi etil asetat berada pada kolom 5 sedangkan kontrol positif berada pada kolom 6, melihat dari hasil tabel tersebut dapat disimpulkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 walaupun aktivitasnya tidak sebagus kontrol positif yaitu siprofloksasin. Untuk hasil analisis ANOVA *two way* dapat dilihat pada lampiran 20.

Hasil uji statistik yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 50% memiliki daya hambat paling efektif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 jika dibandingkan dengan yang lain dikarenakan fraksi etil asetat mampu

menarik senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun biduri seperti flavonoid dan tanin yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler.

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menginaktivasi enzim bakteri serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel, juga melisiskan sel bakteri karena target dari tanin sendiri adalah pada dinding peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel kurang sempurna dan menyebabkan kematian sel.

Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun biduri, namun senyawa tersebut tidak bekerja secara optimal sehingga daya hambatnya lebih kecil dari fraksi etil asetat. Fraksi n-heksana memiliki daya hambat yang paling kecil dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya, hal ini kemungkinan terjadi karena senyawa-senyawa yang tertarik oleh n-heksana memiliki aktivitas antibakteri yang sangat rendah. Fraksi air memiliki aktivitas lebih kecil dari fraksi etil asetat dan lebih besar dari fraksi n-heksana, hal tersebut dikarenakan fraksi air dapat menarik senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri maupun yang tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga senyawa tersebut kurang bekerja secara efektif. Perbedaan diameter zona hambat tiap fraksi dikarenakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun biduri memiliki kepolaran yang berbeda, sehingga senyawa yang tertarik oleh fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air berbeda sesuai tingkat kepolaran dari masing-masing.

#### **14. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun biduri secara dilusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.**

Fraksi etil asetat daun biduri dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Seri konsentrasi 50%; 25%;12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,57%; 0,79%;

0,40%; 0,20%; 0,10% dengan kontrol negatif berupa fraksi etil asetat dan kontrol positif suspensi bakteri.

**Tabel 12. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun biduri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922**

No	Konsentrasi (% b/v)	Fraksi teraktif					
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923			<i>E. coli</i> ATCC 25922		
		1	2	3	1	2	3
1	Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-
2	50	-	-	-	-	-	-
3	25	-	-	-	-	-	-
4	12,5	-	-	-	-	-	-
5	6,25	-	-	-	+	+	+
6	3,13	+	+	+	+	+	+
7	1,57	+	+	+	+	+	+
8	0,79	+	+	+	+	+	+
9	0,40	+	+	+	+	+	+
10	0,20	+	+	+	+	+	+
11	0,10	+	+	+	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+	+	+	+

**Keterangan :** (+) ada pertumbuhan bakteri  
 (-) tidak ada pertumbuhan bakteri  
 Kontrol (-) fraksi teraktif  
 Kontrol (+) suspensi bakteri

Hasil gambar uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada lampiran. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilihat dari kejernihan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil yang didapat Konsentrasi Hambat Minimum terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak dapat dilihat dari kejernihannya karena tertutupi oleh kepekatan dari bagian fraksi yang digunakan sehingga KHM tidak bisa ditentukan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri fraksi etil asetat yang dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung yang selanjutnya diinokulasikan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dengan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media VJA dan untuk bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media *Endo Agar* (EA).

Berdasarkan tabel 11 dapat dilihat bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat daun biduri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC

25923 adalah 6,25%. Hasil uji dilusi menunjukkan bahwa konsentrasi 6,25% tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada replikasi pertama, kedua dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 3,13%; 1,57%; 0,79% ;0,40%; 0,20% dan 0,10% pada replikasi pertama, kedua dan ketiga sehingga dapat ditentukan bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat adalah 6,25%. Sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat daun biduri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 12,5% yang di tunjukkan dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada replikasi pertama, kedua dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 6,25%; 3,13%; 1,57%; 0,79% ;0,40%; 0,20% dan 0,10% sehingga dapat ditentukan bahwa KBM dari fraksi etil asetat adalah 12,5%. Menurut Jawetz *et al* (2007) bakteri *E.coli* memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan bakteri *S.aureus*. *E.coli* adalah bakteri Gram negatif yang resisten terhadap beberapa antibakteri hal ini disebabkan karena tiga lapisan dinding sel pada bakteri ini, sehingga beberapa senyawa tidak mampu merusak jaringan dari dinding sel bakteri *E.coli*. Dinding sel bakteri bakteri Gram negatif mengandung tiga polimer yaitu lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida dan lapisan dalam peptidoglikan dan membran luar berupa bilayer (mempunyai ketahanan lebih baik terhadap senyawa-senyawa yang keluar atau masuk sel dan menyebabkan efek toksik). Pada dasarnya dinding sel yang paling mudah terdenaturasi adalah dinding sel yang tersusun oleh polisakarida dibandingkan dengan dinding sel yang tersusun oleh fosfolipid. Gram positif dinding selnya mengandung peptidoglikan dan juga asam teikoat dan asam teikuronat. Oleh sebab itu dinding sel bakteri gram positif sebagian adalah polisakarida, sedangkan pada dinding sel gram negatif terdapat peptidoglikan yang sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel.

#### **15. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara KLT**

Identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun biduri secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya, fase diam yang digunakan berupa lempeng silika Gel GF. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid dan tanin.



Hasil identifikasi KLT fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun biduri positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 12.

**Tabel 13. Hasil identifikasi fraksi teraktif daun biduri secara KLT.**

Identifikasi	Pembanding	Warna noda			Keterangan
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	
Flavonoid (Rf 0,55;0,66; 0,76;0,84)	Rutin (Rf 0,55)	Kuning (sampel & pembanding)	Kuning- kecoklatan (sampel & pembanding)	Coklat- kehitaman (sampel & pembanding)	+ Flavonoid
Tanin (Rf 0,3)	Asam galat (Rf 0,3)	Hitam (sampel & pembanding)	Hitam (sampel & pembanding)	Hitam (sampel & pembanding)	+tanin

Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT menunjukkan hasil positif jika pada penyemprotan dengan sitroborat menunjukkan warna kuning atau kuning-coklat dan pada UV 366 akan berfluoresensi biru kehijauan atau kuning bila tanpa pereaksi. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) dan baku pembanding rutin. Hasil nilai Rf pada baku pembanding adalah 0,55 dan nilai Rf sampel Rf 1 adalah 0,55, Rf 2 adalah 0,66; Rf 3 adalah 0,76 dan Rf 4 adalah 0,84. Nilai Rf baku pembanding dan sampel Rf 1 memiliki nilai yang sama sehingga menunjukkan bahwa sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

Identifikasi senyawa tanin fraksi teraktif daun biduri secara KLT menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (6:4) dan baku pembanding asam galat. Hasil positif ditunjukkan jika bercak senyawa tanin berwarna hijau gelap pada UV 254 nm dan biru hitam pada UV 366 nm (Hayati *et al.* 2010), serta terlihat bercak berwarna biru hitam setelah disemprot dengan FeCl<sub>3</sub> (Harborne 1987). Hasil nilai Rf pada baku pembanding adalah 0,3 sedangkan nilai Rf sampel adalah 0,3. Dapat ditarik kesimpulan nilai Rf baku dan sampel sama, hal ini menandakan bahwa sampel positif mengandung senyawa tanin.

Nilai Rf merupakan data yang diperoleh dari uji KLT, yang memiliki tujuan untuk identifikasi senyawa pada fraksi teraktif daun biduri. Nilai Rf dari senyawa dapat dibandingkan dengan nilai Rf dari senyawa standard. Nilai Rf

dapat didefinisikan dengan jarak yang di tempuh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang di tempuh pelarut. Nilai Rf selalu lebih kecil dari 1. Hasil uji KLT menunjukkan pemisahan dan kenaikan bercak yang bervariasi. Pemisahan yang terbaik dalam uji KLT memiliki ciri yaitu terbentuknya bercak yang banyak dan terpisah dengan jelas. Gambar hasil uji KLT dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 19.