

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don].

Determinasi tanaman senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don] dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi tanaman senduduk bulu dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran dari sampel yang di ambil dan untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta kemungkinan terjadinya percampuran bahan dengan tumbuhan yang lainnya.

Hasil determinasi daun senduduk bulu menurut Steenis: FLORA : 1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 16b. golongan 10. 239b – 243b – 244a – 245b – 246b – 247b. familia 95. Melastomataceae. 1a. 1.*Clidemia. Clidemia hirta D. Don.*

Hasil determinasi tanaman senduduk bulu secara lengkap dapat di lihat pada lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan dan pengeringan daun senduduk bulu.

Daun senduduk bulu diambil dalam keadaan masih segar yang di petik pada bagian nomor 2 dari pucuk. Daun senduduk bulu diambil dari Desa Bumi Makmur, Kecamatan Mesuji Raya, Kabupaten Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan pada bulan Januari 2019. Hasil yang didapatkan setelah dilakukan sortasi pada daun yang sudah terkumpul sebanyak 4000 gram daun senduduk bulu basah yang kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C dan diperoleh berat daun senduduk bulu kering sebanyak 1300 gram. Data rendemen berat daun kering terhadap berat basah daun senduduk bulu dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah.

Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%) b/b
4000	1300	32,5

Dari tabel 1 diatas dapat diketahui bahwa hasil rendemen berat kering terhadap berat basah daun senduduk bulu adalah 32,5 %. Suhu yang digunakan

pada saat proses pegeringan harus konstan sebab jika terlalu tinggi atau terlalu rendah akan memungkinkan terjadinya kerusakan senyawa aktif di dalam daun hingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada simplisia.

3. Pembuatan serbuk daun senduduk bulu.

Daun senduduk bulu yang sudah di keringkan kemudian dihaluskan menggunakan alat penggiling dan diayak menggunakan ayakan nomor 40. Hasil pembuatan serbuk daun senduduk bulu 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 (gram)	Berat serbuk (gram)	Rendemen (%) b/b
1300	1200	92,3

Tabel 2 menunjukkan bahwa berat daun kering sebanyak 1300 gram dan berat serbuk yang didapat sebanyak 1200 gram sehingga didapatkan hasil rendemen sebanyak 92,3 %. Tujuan dilakukannya pembuatan serbuk daun senduduk bulu adalah untuk memperluas ukuran partikel serbuk yang kontak dengan pelarut sehingga pada saat penyarian dapat berlangsung secara efektif. Partikel serbuk tidak boleh terlalu kecil sebab memungkinkan dapat lolos pada saat penyaringan serta dapat menyebabkan terjadinya emulsi pada saat maserasi.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun senduduk bulu.

Ekstrak etanol daun senduduk bulu dibuat dengan menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dipilih untuk menarik semua komponen senyawa kimia yang terdapat dalam sampel, dimana pelarut dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel daun yang mengandung senyawa aktif. Adanya perbedaan konsentrasi akan melarutkan senyawa aktif dari dalam dan luar sel (Depkes 1986). Hasil rendemen pembuatan ekstrak dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil rendemen pembuatan ekstrak etanol daun senduduk bulu.

Serbuk daun senduduk bulu (gram)	Hasil ekstrak kental (gram)	Rendemen ekstrak (%) b/b
1000	122	12,2

Berat serbuk daun senduduk bulu yang di maserasi sebanyak 1000 gram didapatkan ekstrak kental sebanyak 122 gram serta rendemen sebesar 12,2 %. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 7.

5. Karakterisasi serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu.

5.1 Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak dilakukan sebanyak tiga kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance*. Tujuan dilakukannya penentuan susut pengeringan adalah untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Handayani *et al.* 2017). Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun senduduk bulu.

Replikasi	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2	5,6
2	2	6,9
3	2	5,5
Rata-rata±SD		6±0,637

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun senduduk bulu adalah 6% yang menunjukkan bahwa nilai ini menyatakan jumlah maksimal senyawa yang mudah menguap atau hilang pada proses pengeringan. Gambar hasil penetapan susut pengeringan serbuk dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 5. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun senduduk bulu.

Replikasi	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2	13,7
2	2	11,9
3	2	12,4
Rata-rata±SD		12,6±0,75

Dilihat dari tabel 5 diatas bahwa hasil rata-rata penetapan susut pengeringan ekstrak daun senduduk bulu adalah 12,66% yang artinya ekstrak daun senduduk bulu belum memenuhi syarat pengeringan simplisia karena lebih dari 10% (Depkes RI 1994). Sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimiawi yang menurunkan mutu ekstrak. Gambar dan perhitungan hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun senduduk bulu dapat dilihat pada lampiran 8.

5.2 Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak secara destilasi. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Tujuan dilakukannya penetapan kadar air adalah mengetahui besarnya kandungan air, terkait dengan kemurnian dan

kontaminasi yang mungkin terjadi (Azizah & Salamah 2013). Hasil penetapan kadar air serbuk dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar air serbuk daun senduduk bulu.

No	Penimbangan (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%v/b)
1	20	0,6	3
2	20	0,7	3,5
3	20	0,5	2,5
Rata-rata±SD			3±0,40

Hasil rata-rata yang didapat dari penetapan kadar air serbuk daun senduduk bulu adalah 3% yang artinya serbuk sudah memenuhi syarat pengeringan karena kadar air kurang dari 10% (Depkes RI 1994). Hal ini menunjukkan serbuk daun senduduk bulu dapat terhindar dari pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimiawi yang dapat menurunkan mutu serbuk. Gambar hasil dan perhitungan kadar air serbuk dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 7. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun senduduk bulu

No	Penimbangan (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%v/b)
1	20	1,6	8
2	20	1,8	9
3	20	1,5	7,5
Rata-rata±SD			8,16±0,62

Berdasarkan tabel 7 diatas, hasil rata-rata penetapan kadar air ekstrak daun senduduk bulu adalah 8,16%. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun senduduk bulu masih masuk ke dalam *range* kadar air yang di perbolehkan. Dimana *range* kadar air yang diperbolehkan untuk jenis ekstrak kental adalah antara 5-30%. Sementara untuk ekstrak cair adalah lebih dari 30% dan untuk ekstrak kering lebih kecil dari 5%. Penentuan kadar air juga terkait dengan kemurnian ekstrak, semakin sedikit kadar air pada ekstrak maka semakin sedikit kemungkinan ekstrak terkontaminasi oleh pertumbuhan jamur atau mikroorganisme lainnya (Haryani *et al.* 2013). Dengan hal ini ekstrak daun senduduk bulu memiliki mutu yang cukup baik, karena dilihat dari hasil kadar air ekstrak yang memungkinkan ekstrak terhindar dari pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimiawi. Gambar hasil dan perhitungan kadar air ekstrak dapat dilihat pada lampiran 9.

5.3 Hasil penentuan berat jenis ekstrak. Penentuan berat jenis ekstrak bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak (Depkes RI 2000). Penentuan berat jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer (Utami *et al.* 2016).

Tabel 8. Hasil penentuan berat jenis ekstrak daun senduduk bulu.

Replikasi	Bobot awal ekstrak (gram)	Bobot jenis (g/mL)
I	2,5	0,832
II	2,5	0,832
III	2,5	0,838
Rata-rata±SD		0,834±0,002

Dari tabel diatas didapatkan hasil berat jenis ekstrak daun senduduk bulu sebesar 0,834 g/mL. Ini menggambarkan besarnya massa per satuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair dan ekstrak kental, selain itu juga bobot jenis terkait bagaimana mengetahui kemurnian suatu zat yang ditentukan bobot jenisnya (Depkes RI 2000). Gambar hasil dan perhitungan penentuan berat jenis ekstrak dapat dilihat pada lampiran 10.

6. Tes bebas etanol ekstrak daun senduduk bulu.

Ekstrak kental daun senduduk bulu dilakukan uji tes bebas etanol dengan cara esterifikasi alkohol. Cara dan hasil tes bebas etanol dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Cara dan hasil tes bebas etanol ekstrak daun senduduk bulu.

Uji bebas etanol	Hasil pengujian
2 mg ekstrak kental + 5 tetes asam asetat (CH ₃ COOH) + 2 tetes asam sulfat pekat (H ₂ SO ₄), dipanaskan	Tidak tercium bau ester etil asetat

Hasil uji tes bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak daun senduduk bulu sudah bebas dari etanol yang ditandai dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari hasil reaksi esterifikasi yang telah dilakukan. Menurut Raymon *et al.* (2016) jika ekstrak tidak tercium bau ester maka ekstrak tidak mengandung etanol. Dilakukan uji tes bebas etanol bertujuan untuk memastikan bahwa di dalam ekstrak daun senduduk bulu tidak ada kandungan etanol, sehingga dapat digunakan untuk uji antibakteri serta daya hambat yang terbentuk pada saat uji

aktivitas antibakteri bukan karena senyawa pelarut etanol yang membunuh bakteri tersebut tetapi senyawa aktif yang ada pada ekstrak daun senduduk bulu.

7. 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 senduduk bulu kemudian di fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air sebanyak 3 kali replikasi. Hasil rendemen pembuatan fraksi dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil rendemen pembuatan fraksi daun senduduk bulu.

Total bobot ekstrak (g)	Pelarut	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)b/b
30	<i>n</i> -heksana	6,96	23,20
	Etil asetat	4,49	14,96
	Air	10,50	35

Berdasarkan tabel dapat dilihat bahwa hasil tiap pelarut berbeda-beda, dimana hasil dari 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 yaitu 100%, hal ini mungkin terjadi karena masih ada ekstrak yang menempel di wadah pada saat proses fraksinasi. Hasil perhitungan rendemen fraksi daun senduduk bulu dapat dilihat pada lampiran 11.

8. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu.

Pengujian kandungan kimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna dan tabung reaksi, kemudian diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif ditunjukkan dengan tanda yang khas dari setiap pengujian senyawa. Hasil pengujian kandungan kimia dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu.

Kandungan kimia	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Terbentuk intensitas warna merah atau jingga (Sukmawati <i>et al.</i> 2014).	+ flavonoid	+ flavonoid
Saponin	Terbentuk busa dan bertahan selama 10 menit (Sukmawati <i>et al.</i> 2014)	+ saponin	+ saponin
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman (Sukmawati <i>et al.</i> 2014)	+ tanin	+ tanin
Steroid/ triterpenoid	Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut untuk hasil positif triterpenoid dan positif steroid terbentuk warna hijau kebiruan (Sukmawati <i>et al.</i> 2014)	+ steroid (terbentuk warna hijau kebiruan)	+ steroid (terbentuk warna hijau kebiruan)

Keterangan : + : ada senyawa

- : tidak ada senyawa

Dari tabel dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu mengandung senyawa yaitu flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Senyawa flavonoid, saponin, tanin dan steroid diduga memiliki aktivitas antibakteri. Menurut (Yemima 2018) senyawa yang terkandung dalam daun senduduk bulu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Gambar hasil identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu dapat dilihat pada lampiran 12.

9. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

9.1 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 di tetesi kalium telurit 3% sebanyak 3 tetes kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil yang di peroleh ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna hitam yang di hasilkan 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). Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 14.

9.2 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 (Radji 2011). Warna ungu yang didapat pada pewarnaan Gram menandakan 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 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk bulat, berwarna ungu dan bergerombol seperti buah anggur. Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 14.

9.3 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* ATCC 25923 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* ATCC 25923 serta menunjukkan sifat virulensi bakteri yaitu dapat melindungi dirinya dari fagositosis dan menghalangi kerja sistem imunitas inang (Radji 2011). Gambar dapat dilihat pada lampiran 14.

9.4 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 H₂O₂ 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 14.

10. 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* ATCC 25922 dapat memetabolisme laktosa dan menghasilkan aldehid dan asam. Aldehid akan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilat logam (Kartika *et al.* 2014). Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 15.

10.2 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri tersebut golongan bakteri *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel berwarna merah, bentuk 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 15.

10.3 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia. Identifikasi dengan uji biokimia pada *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan tabel 12 dan gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 15.

Hasil 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 di tandai terangkatnya media, S(-) artinya H₂S negatif yang di tunjukkan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S, dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ 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. Media KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk penghasil H₂S.

Media *Lysin Irin Agar* (LIA) digunakan untuk mengetahui deaminasi lisisn 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 lisisn tetapi mendekarboksilasi lisisn yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media. S(-) artinya uji H₂S negatif di tunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Hasil pengujian pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM) 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* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dengan menambah 3 tetes Erlich A dan B bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri mereduksi enzim triptopanase yang ditandai dengan permukaan media berwarna merah muda yang artinya bakteri *Escherichia coli* positif membentuk indol. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran di media SIM.

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*

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.

Tabel 12. Hasil identifikasi biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922.

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

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Motility*

KIA : *Kligler Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

A/A : kuning (pada media KIA)

G : terbentuk gas

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

S(-) : tidak terbentuk warna hitam

11. Pembuatan suspensi bakteri uji.

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam masing-masing biakan murni diambil satu ose, dimasukkan ke dalam tabung steril yang telah diisi 10 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian di vortex dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri yang telah diencerkan di setarakan dengan larutan standart Mc Farland 0,5 atau setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL sampai di dapat kekeruhan yang sama. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi dan pengendalian jumlah bakteri.

12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun senduduk bulu secara difusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ekstrak yang telah didapatkan kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Fraksi yang telah diperoleh dari ekstrak daun senduduk bulu 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 20%, 10%, 5% dan pembanding

Dilihat dari tabel 13 menunjukkan bahwa hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Daya hambat yang didapatkan memiliki ukuran yang berbeda-beda. Fraksi yang memiliki daya hambat paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu fraksi etil asetat dengan hasil rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 20%, 10% dan 5% berturut-turut sebesar $17,9 \pm 0,4$ mm, $14,2 \pm 0,3$ mm dan $12,4 \pm 0,6$ mm. Siprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki rata-rata zona hambat sebesar 26 mm dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif tidak memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Fraksi etil asetat juga memiliki daya hambat yang paling besar terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu pada konsentrasi 20%, 10%, dan 5% berturut-turut sebesar $15,9 \pm 0,4$ mm, $12,2 \pm 0,2$ mm dan $10,8 \pm 0,3$ mm. Siprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki rata-rata zona hambat sebesar 25 mm dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif tidak memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri karena tidak memiliki zona bening pada cakram, sehingga dapat dipastikan zona hambat yang dihasilkan murni berasal dari ekstrak dan fraksi daun senduduk bulu tidak dipengaruhi oleh pelarut. Daun senduduk bulu diketahui memiliki kandungan senyawa kimia seperti flavonoid, tanin, steroid dan saponin yang dapat memiliki aktivitas antibakteri (Yemima 2018). Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri yaitu dengan menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan menghambat motilitas bakteri (Darsana *et al.* 2012). Tanin juga menyerang polipeptida dinding sel sehingga menyebabkan kerusakan dinding sel pada bakteri. Steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis. Saponin memiliki molekul yang dapat menarik air atau hidrofilik dan molekul yang dapat melarutkan lemak atau lipofilik sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan

hancurnya bakteri (Ji Ys *et al.* 2012). Sehingga dapat ditentukan bahwa ekstrak dan fraksi daun senduduk bulu memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di bandingkan dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Perbedaan zona hambat yang terbentuk diantara bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan Gram negatif (*E. coli*) kemungkinan terjadi karena susunan dinding sel bakteri Gram negatif dan Gram positif yang berbeda. Bakteri Gram positif cenderung lebih sensitif terhadap antibakteri karena struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana dibandingkan struktur dinding sel bakteri Gram negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk kedalam sel bakteri Gram positif (Sari *et al.* 2017). Lapisan dinding sel bakteri *E. coli* lebih kompleks jika dibandingkan dengan *S. aureus*. Bakteri Gram positif (*S. aureus*) dinding selnya hanya tersusun oleh peptidoglikan dan membran plasma tunggal. Sedangkan bakteri Gram negatif (*E. coli*) tersusun oleh membran plasma luar, membran plasma dalam, serta peptidoglikan. Membran plasma luar di bagian dinding sel bisa melindungi bakteri tersebut dengan menghalangi masuknya zat antibiotik dan juga sistem dari pertahanan inang. Oleh karena itu, bakteri *E. coli* memiliki ketahanan yang lebih kuat terhadap senyawa antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun senduduk bulu (Utomo *et al.* 2018). Dengan demikian zona hambat pada *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih kecil.

Dari hasil uji difusi pada tabel diatas selanjutnya diuji kebenarannya dengan cara analisa statistik menggunakan uji SPSS *two way* Anova. Uji ini dilakukan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis adalah konsentrasi 20%, 10% dan 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 mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji one-sampel *Kolmogorov smirnov* menunjukkan bahwa nilai signifikasinya sebesar $0,172 > 0,05$ untuk data diameter zona hambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan nilai signifikasi sebesar $0,058 > 0,05$

untuk diameter zona hambat *Escherichia coli* ATCC 25922 maka H_0 diterima, artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji *two way* ANOVA. Uji ini digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan tabel Tukey test menunjukkan tanda (*) pada angka mean difference, artinya hasil diameter hambat ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air menunjukkan perbedaan yang signifikan. Analisis Homogeneous Subsets ini untuk mencari grup subsets mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel Homogenous Subsets untuk diameter hambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terbagi dalam 6 subsets dan untuk *Escherichia coli* ATCC 25922 terbagi dalam 5 subsets yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada setiap sampel. Sampel yang berada pada satu kolom/subsets menandakan tidak adanya perbedaan signifikan, sedangkan sampel yang berada dalam kolom/subsets yang berada paling dekat dengan kontrol positif menandakan bahwa sampel tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif diantara sampel yang lainnya walaupun sampel tersebut aktifitasnya tidak sebanding dengan kontrol positif. Berdasarkan tabel homogenous subsets, fraksi etil asetat berada pada subsets 5 sedangkan kontrol positif berada pada subsets 6 untuk diameter hambat *S.aureus* dan fraksi etil asetat berada pada subsets 4 sedangkan kontrol positif berada pada subsets 5 untuk diameter hambat *E.coli*. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun senduduk bulu memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif walaupun aktivitasnya masih dibawah kontrol positif. Tabel homogenous subsets dapat dilihat pada lampiran 24.

Hasil uji statistik yang dilakukan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki daya hambat lebih optimal dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 jika dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air, dikarenakan fraksi etil asetat mampu menarik senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun senduduk bulu seperti flavonoid, steroid dan tanin yang diketahui memiliki

aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun senduduk bulu, namun senyawa tersebut tidak bekerja secara optimum sehingga daya hambatnya lebih kecil dari fraksi etil asetat. Fraksi air memiliki aktivitas lebih kecil dari ekstrak hal tersebut dikarenakan fraksi air dapat menarik senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri maupun yang tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga senyawa tersebut kurang bekerja secara optimum. 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. Perbedaan diameter zona hambat tiap fraksi dikarenakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun senduduk bulu memiliki kepolaran yang berbeda, sehingga senyawa yang tertarik oleh fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air berbeda pula sesuai tingkat kepolaran masing-masing.

13. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun senduduk bulu secara dilusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabel 14. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun senduduk bulu 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	20	-	-	-	-	-	-
3	10	-	-	-	-	-	-
4	5	-	-	-	-	-	-
5	2,5	-	-	-	-	-	-
6	1,25	-	-	-	-	-	-
7	0,625	-	-	-	+	+	+
8	0,312	+	+	+	+	+	+
9	0,156	+	+	+	+	+	+
10	0,078	+	+	+	+	+	+
11	0,039	+	+	+	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+	+	+	+

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

Fraksi teraktif daun senduduk bulu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan

Escherichia coli ATCC 25922 dengan konsentrasi 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,312%; 0,156%; 0,078%; 0,039% serta kontrol negatif berupa fraksi etil asetat dan kontrol positif suspensi bakteri. 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 dapat di tentukan.

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 *Volger Jhonson Agar* dengan tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media VJA dan untuk bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media *Endo Agar*.

Berdasarkan tabel 14 dapat dilihat bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat daun senduduk bulu terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 0,625%. Hasil uji dilusi menunjukkan bahwa konsentrasi 0,625% tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada replikasi pertama, kedua dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 0,312% pada replikasi pertama, kedua dan ketiga sehingga dapat ditentukan bahwa KBM fraksi etil asetat adalah 0,625. Sedangkan KBM fraksi etil asetat daun senduduk bulu terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 1,25% yang di tunjukkan dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada replikasi pertama, kedua dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 0,625% sehingga dapat ditentukan bahwa KBM dari fraksi etil asetat adalah 1,25%. Gambar hasil uji dilusi dapat dilihat pada lampiran 20, 21, 22, dan 23.

14. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun senduduk bulu secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa yang terkandung didalamnya, fase diam yang digunakan berupa lempeng silika Gel GF. Identifikasi dilakukan terhadap beberapa senyawa diantaranya flavonoid, tanin dan steroid. Hasil identifikasi fraksi teraktif daun senduduk bulu secara KLT dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Hasil identifikasi fraksi teraktif daun senduduk bulu secara KLT.

Identifikasi	Pembanding	Warna noda			Keterangan
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	
Flavonoid (Rf 0,5)	Rutin (Rf 0,46)	Kuning (sampel & pembanding)	Kuning- kecoklatan (sampel & pembanding)	Coklat- kehitaman (sampel & pembanding)	+ Flavonoid
Tanin (Rf 0,8)	Asam galat (Rf 0,8)	Hitam (sampel & pembanding)	Hitam (sampel & pembanding)	Hitam (sampel & pembanding)	+tanin
Steroid (Rf 0,94; 0,8; 0,7; 0,5; 0,44; 0,3 dan 0,24)	Stigmasterol (Rf tidak ada)	Hijau tua (sampel)	Hijau tua (sampel)	Merah muda (sampel)	- steroid

Berdasarkan tabel 15 fraksi teraktif daun senduduk bulu positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Menurut Afifuddin *et al.* (2015) tanaman senduduk bulu mengandung senyawa flavonoid dan tanin dengan konsentrasi tinggi.

Pertama, identifikasi senyawa flavonoid secara KLT menunjukkan hasil positif jika pada penyemprotan dengan sitroborat menunjukkan warna kuning atau kuning-coklat dan pada UV 366 akan berflouresensi biru, hijau atau kuning bila tanpa pereaksi. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase grak butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) dan baku pembanding rutin. Hasil nilai Rf pada baku pembanding adalah 0,46 dan nilai Rf sampel Rf 1 adalah 0,5 dan Rf 2 adalah 0,96. Nilai Rf baku pembanding dan sampel Rf 1 memiliki nilai yang sama sehingga menandakan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid.

Kedua, identifikasi senyawa tanin fraksi teraktif daun senduduk bulu 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 FeCl₃ (Harborne 1987). Hasil nilai Rf pada baku pembanding adalah 0,8 sedangkan nilai Rf sampel adalah 0,8. Dengan demikian nilai Rf baku dan sampel sama, ini menandakan bahwa sampel mengandung senyawa tanin.

Keempat, identifikasi senyawa steroid secara KLT menggunakan fase gerak kloroform : etanol (9:1) dan baku pembanding stigmasterol. Hasil nilai Rf pada baku pembanding adalah 0 karena tidak terdapat bercak pada baku pembanding, sehingga nilai Rf tidak dapat dihitung. Sedangkan nilai Rf sampel pada Rf 1 adalah 0,94; Rf 2 0,8; Rf 3 0,7; Rf 4 0,5; Rf 5 0,44; Rf 6 0,3 dan Rf 7 0,24. Nilai Rf baku pembanding dan nilai Rf pada sampel tidak memiliki nilai yang sama ataupun mendekati sama, hal ini menandakan bahwa sampel tidak mengandung senyawa steroid.

Nilai Rf merupakan data yang diperoleh dari uji KLT, yang memiliki tujuan untuk identifikasi senyawa pada fraksi teraktif daun senduduk bulu. 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 23.