

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah dengan melakukan determinasi tanaman sirsak dan alpukat yang bertujuan untuk mencocokkan morfologi sirsak dan alpukat sesuai dengan literatur. Determinasi daun sirsak dan alpukat dilakukan dibagian Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

1.1. Daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Berdasarkan hasil determinasi menunjukkan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun sirsak dengan hasil determinasi sebagai berikut :

Nama Sampel : *Annona muricata* L.

Familia : Annonaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76a-77a-78b-103c-104b-106b-107b-186b-287b-288b-289b-298b-302b-308b-309b-310b-311a-312a-313b_____

_____ **10. Annonaceae**

1b-10b-13b-17a_____ **27. Annona**

1a-2a_____ ***Annona muricata* L.**

Gambar hasil determinasi yang dilakukan dapat dilihat pada lampiran 1.

1.2. Daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Berdasarkan hasil determinasi menunjukkan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun alpukat dengan hasil determinasi sebagai berikut :

Nama Sampel : *Persea americana* Mill.

Familia : Lauraceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27b-799b-800b-801b-802b-806b-807b-809b-810b-811a-812b-815b-816b-818b-820b-821b-822b-824b-825b-826b-829b-830b-831b-832b-833b-834b-835a-836a-837c-851a-852b-853b-854a-855c-856b-857a-858a-859c-860b-872a-873b_____

12. Lauraceae

1b-2a-3b-5b-8b-9b-10a_____ **27. Persea**

1a-2b_____ ***Persea americana* Mill.**

Gambar hasil determinasi yang dilakukan dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun sirsak dan daun alpukat

Daun sirsak dan daun alpukat dicuci bersih di bawah air mengalir, kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Setelah dikeringkan, dibuat serbuk menggunakan mesin penggiling lalu diayak dengan pengayak mesh 40 untuk menghomogenkan ukuran serbuk dan memperluas ukuran partikel serbuk yang kontak dengan pelarut sehingga pada saat penyarian dapat berlangsung secara efektif. Partikel serbuk tidak boleh terlalu kecil sebab kemungkinan dapat lolos pada saat penyaringan. Hasil presentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak dan alpukat

Nama simplisia	Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Presentase (%b/b)
Daun sirsak	8,850	3,386	38,26
Daun alpukat	7,954	2,680	33,69

Berdasarkan tabel 1. Hasil dari bobot basah daun sirsak 8,850 gram, diperoleh bobot kering daun sirsak 3,386 gram dan diperoleh presentase randemen 38,26 % b/b. Gambar daun dan serbuk sirsak dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil dari bobot basah daun alpukat 7,954 gram, diperoleh bobot kering daun alpukat 2,680 gram dan diperoleh presentase randemen 33,69 % b/b. Gambar daun dan

serbuk alpukat dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 15.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk dan kadar air ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan yang dinyatakan dalam nilai persen atau sampai berat konstan, dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air. Kadar air yang lebih dari 10% yang terdapat dalam ekstrak dapat mengaktifkan enzim-enzim dalam simplisia yang berakibat rusak atau berubahnya komposisi kimia sehingga menurunkan kualitas pada simplisia tersebut.

Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance*. Gambar hasil penetapan susut pengeringan dan penetapan kadar air serbuk daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak dan daun alpukat

No	Bobot awal (gram)		Susut pengeringan (%)	
	A	B	A	B
1	2,0	2,0	6,4	6,5
2	2,0	2,0	7,9	7,0
3	2,0	2,0	6,9	5,0
Rata-rata			7,1	6,2

Keterangan :

A : serbuk daun sirsak

B : serbuk daun alpukat

Berdasarkan tabel 2. Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak yang dilakukan sebanyak tiga kali replikasi yaitu 7,1%. Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat yang dilakukan tiga kali sebanyak replikasi yaitu 6,2%. Nilai ini menyatakan jumlah maksimal senyawa yang mudah menguap atau hilang pada proses pengeringan. Nilai susut pengeringan pada hal ini khusus identik dengan kadar air dan sisa pelarut organik

yang menguap. Artinya serbuk daun sirsak dan daun alpukat sudah memenuhi syarat pengeringan simplisia karena kurang dari 10% untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk. Hasil perhitungan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 17.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

No	Bobot awal (gram)		Volume air (ml)		Kadar air (% v/b)	
	A	B	A	B	A	B
1	10	10	1,0	1,9	5,0	9,5
2	10	10	1,8	1,6	9,0	8,0
3	10	10	1,2	1,4	6,0	7,0
Rata-rata					6,7	8,2

Keterangan :

A : ekstrak daun sirsak

B : ekstrak daun alpukat

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Tujuan penetapan kadar air adalah untuk mengetahui batasan maksimal tentang besarnya kandungan air didalam bahan, untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh jamur, bakteri, dan mencegah perubahan kimiawi yang bisa menurunkan mutu serbuk dan ekstrak. Berdasarkan tabel 3. Hasil yang didapatkan rata-rata kadar air ekstrak daun sirsak yang dilakukan sebanyak tiga replikasi yaitu 6,7% v/b. Hasil didapatkan rata-rata kadar air ekstrak daun alpukat yang dilakukan sebanyak tiga replikasi yaitu 8,2% v/b. Kadar air suatu simplisia memenuhi syarat apabila tidak melebihi dari 10%. Artinya daun sirsak dan daun alpukat memenuhi syarat penetapan kadar air karena kurang dari 10%. Hasil perhitungan penetapan kadar air dapat dilihat pada lampiran 18.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat

Serbuk daun sirsak dan daun alpukat masing-masing diekstraksi dengan metode maserasi. Tujuan metode maserasi untuk menarik semua komponen

senyawa kimia yang terdapat dalam sampel, dimana pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif dari luar dan dalam sel (DepKes 1986). Kemudian ekstrak cair yang diperoleh dipisahkan dalam evaporator pada suhu 40°C. Gambar hasil pembuatan ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat

Nama simplisia	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Persentase (%b/b)
Daun sirsak	500,0	5,475	10,95
Daun alpukat	500,0	4,954	9,91

Persentase randemen menunjukkan kemaksimalan dari pelarut yang digunakan untuk menyari, randemen tidak kurang dari 8,0% dengan pelarut etanol. Hasil dari tabel 4 ekstrak daun sirsak memiliki randemen 10,95% b/b dan ekstrak daun alpukat memiliki randemen 9,91% b/b, maka persentase hasil randemen kedua ekstrak memenuhi syarat yaitu tidak kurang dari 8,0%. Dimana ekstrak daun sirsak mempunyai randemen yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak daun alpukat, yang artinya hasil randemen menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung didalam ekstrak daun sirsak lebih banyak dibandingkan ekstrak daun alpukat. Hasil perhitungan randemen dapat dilihat pada lampiran 16.

5. Uji bebas etanol ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Ekstrak daun sirsak dan daun alpukat dilakukan uji bebas etanol. Uji bebas etanol bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Nama simplisia	Prosedur	Hasil	Pustaka
Daun sirsak	Ekstrak + H ₂ SO _{4conc} + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes 1997)
Daun alpukat	Ekstrak + H ₂ SO _{4conc} + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes 1997)

Hasil uji bebas etanol pada tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak dan daun alpukat sudah terbebas dari pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester khas dari etanol.

6. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak daun sirsak dan daun alpukat dimaksudkan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terkandung dalam daun sirsak dan daun alpukat menggunakan uji tabung.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun sirsak

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Warna merah atau jingga/kuning pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).	Terbentuk warna kuning/jingga pada amil alkohol (+)	Terbentuk warna jingga/kuning pada lapisan amil alcohol (+)
Alkaloid	Terbentuk keruhan /endapan coklat pada Dragendroff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada Mayer (Depkes 1978).	Dragendroff terbentuk endapan coklat (+)	Dragendroff terbentuk endapan coklat (+)
Tanin	Reaksi + bila terbentuk warna coklat atau biru kehitaman (Robinson 1995).	Berwarna biru kehitaman (+)	Berwarna biru kehitaman (+)
Saponin	Reaksi + bila busa masih terbentuk 1-10 cm setelah penambahan HCl 2N tidak hilang (Depkes 1978).	Terbentuk buih (+)	Terbentuk buih (+)

Keterangan : (+) mengandung (-) tidak mengandung

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun alpukat

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Warna merah atau jingga/ kuning pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).	Terbentuk warna kuning/jingga pada amil alkohol (+)	Terbentuk warna jingga/kuning pada lapisan amil alcohol (+)
Alkaloid	Terbentuk keruhan /endapan coklat pada Dragendroff dan endapan putih kekuningan pada Mayer (Depkes 1978).	Dragendroff terbentuk endapan coklat (+)	Dragendroff terbentuk endapan coklat (+)
Tanin	Reaksi + bila terbentuk warna coklat atau biru kehitaman (Robinson 1995).	Berwarna biru kehitaman (+)	Berwarna biru kehitaman (+)
Saponin	Reaksi + bila busa masih terbentuk 1-10 cm setelah penambahan HCl 2N tidak hilang (Depkes 1978).	Terbentuk buih (+)	Terbentuk buih (+)

Keterangan : (+) mengandung (-) tidak mengandung

Hasil pada tabel 6 dan 7 menunjukkan identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk, ekstrak daun sirsak dan daun alpukat dengan menggunakan tabung reaksi, gambar dapat dilihat pada lampiran 7. Hasil penelitian mengenai kandungan kimia dalam serbuk, ekstrak daun sirsak dan daun alpukat telah sesuai dengan pustaka, sehingga dapat dikatakan bahwa serbuk, ekstrak daun sirsak dan daun alpukat mengandung flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin.

7. Identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 35668

7.1. Identifikasi bakteri dengan cawan gores. *Streptococcus mutans* ATCC 35668 diinokulasikan pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dan

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan, hasil goresan pada bakteri uji adalah positif karena ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau transparan. Warna koloni pada media agar darah menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans* bersifat alfa hemolisis, hal ini karena lisisnya sel darah merah disebabkan terjadinya reduksi hemoglobin menjadi methemoglobin. Gambar hasil inokulasi dapat dilihat pada lampiran 9.

Streptococcus sp dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan hemolisis dalam agar darah yaitu alpha hemolisis (tidak komplit, hemolisis hijau), beta hemolisis (terang, lisis komplit sel darah), gamma hemolisis (tidak terjadi hemolisis). Alpha hemolisis disebabkan reduksi zat besi dalam hemoglobin, menjadikan *Streptococcus sp* berwarna hijau dalam agar darah. Hemolisis beta adalah sel darah merah yang meluruh secara penuh, terang luas, daerah bersih sekitar koloni bakteri dalam agar darah. Gamma hemolisis merupakan jenis *Streptococcus sp* yang tidak mengalami hemolisis (Jawetz *et al.* 2001).

7.2. Identifikasi pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk meyakinkan bahwa *Streptococcus mutans* ATCC 35668 merupakan bakteri Gram positif dan untuk melihat morfologi bakteri. Pewarnaan Gram dilakukan dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet (Gram A). Kemudian diberikan larutan iodine (Gram B) dan seluruh bakteri akan terwarnai menjadi biru dalam proses pewarnaan. Kemudian sel diberikan alkohol (Gram C). Sel Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodine sehingga tetap berwarna ungu, sedangkan sel Gram negatif warnanya hilang oleh alkohol sehingga diberikan safranin (Gram D) menyebabkan sel berwarna merah pada bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans* merupakan bakteri Gram positif yang ditandai dengan dapat dipertahankannya warna ungu dari kristal violet sehingga pengamatan dengan mikroskop dapat dilihat bahwa bakteri berwarna ungu, berbentuk bulat, membentuk rantai panjang dan berderet. Warna ungu pada bakteri Gram positif disebabkan karena dinding selnya terdiri dari satu lapis peptidoglikan yang tebal dan permeabilitas dinding sel kurang, sehingga warna ungu dari kristal violet dapat terikat kuat karena mempunyai pori dinding sel akibat dekolonisasi oleh alkohol dan dinding sel tetap

menahan warna ungu. Gambar hasil pewarnaan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dapat dilihat pada lampiran 10.

7.3. Identifikasi uji biokimia. Identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 35668 secara biokimia yaitu meliputi uji koagulase dan uji katalase bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Streptococcus mutans*.

Tabel 8. Hasil identifikasi biokimia *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Jenis uji	Prosedur	Hasil	Pustaka
Uji katalase	1 ose bakteri pada objek glass + 2-3 tetes H ₂ O ₂ 3%	Tidak terbentuk gelembung udara (-)	Tidak terbentuk gelembung udara (-)
Uji koagulase	Plasma sitrat 200µl dalam tabung reaksi + 3-4 koloni bakteri (uji tabung)	Terbentuknya gumpalan (+)	Terbentuknya gumpalan (+)
	Plasma sitrat pada objek glass + 1 ose bakteri (uji <i>slide</i>)	Terbentuknya gumpalan (+)	Terbentuknya gumpalan (+)

Pada uji katalase untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim katalase pada bakteri uji. Bakteri yang positif ditandai dengan adanya gelembung udara karena bakteri tersebut mempunyai enzim katalase dimana H₂O₂ yang ditetaskan akan terurai menjadi H₂O (air) dan O₂ (oksigen), sedangkan bakteri yang negatif ditandai tidak terbentuknya gelembung udara. Hasil uji katalase pada bakteri uji menunjukkan katalase negatif, hal ini sesuai dengan teori yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara (O₂).

Uji koagulase pada bakteri uji dilakukan dengan menggunakan plasma atau darah yang telah ditambahkan dengan sitrat, untuk mengetahui ada atau tidaknya gumpalan yang terbentuk. Pada pengujian ini terbentuk gumpalan sehingga menandakan bakteri tersebut adalah *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Hal ini disebabkan karena bakteri *Streptococcus mutans* dapat menghasilkan enzim koagulase yang menyebabkan fibrin dalam plasma menjadi koagulan. Gambar

hasil uji biokimia pada bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dapat dilihat pada lampiran 11.

8. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dengan metode difusi

Uji aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui diameter hambat ekstrak daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dengan metode difusi sumuran. Ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat masing-masing dibuat dalam konsentrasi yang sama yaitu 50% ekstrak dalam pelarut Tween 80 5%. Hasil luas daerah hambat pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Ekstrak	Konsentrasi	Diameter Hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Daun Sirsak	50%	18,25	19,50	17,00	18,25±1,25
Daun Alpukat	50%	17,50	17,75	16,25	17,17±0,80
Kontrol					
Siprofloksasin (+)	0,5%	26,25	26,00	24,25	25,50±1,09
Kontrol Tween 80 (-)	5%	0	0	0	0

Berdasarkan tabel 9 menunjukkan bahwa ekstrak etanol tunggal daun sirsak dan daun alpukat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Hasil rata-rata ekstrak etanol daun sirsak 50% memiliki daya hambat yaitu sebesar 18,25 mm dan hasil rata-rata ekstrak etanol daun alpukat 50% memiliki daya hambat yaitu sebesar 17,17 mm. Kekuatan daya hambat yang diberikan oleh ekstrak etanol tunggal sirsak dan daun alpukat menggunakan kriteria yang diusulkan oleh Davis dan Stout (1971), termasuk dalam kategori kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus*

mutans karena memiliki diameter zona hambat dengan rerata 10-20 mm. Dari tabel 9 dapat dilihat ekstrak etanol tunggal daun sirsak memiliki daya hambat yang lebih besar dan lebih efektif dibandingkan dengan ekstrak etanol tunggal daun alpukat.

Kemampuan ekstrak etanol tunggal daun sirsak dan daun alpukat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dipengaruhi kandungan senyawa yang terdapat didalam masing-masing ekstrak. Kandungan senyawa yang terdapat didalam ekstrak daun sirsak dan daun alpukat yakni flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dari bakteri. Senyawa tanin bekerja dengan cara merusak permeabilitas barier dalam mikroorganisme. Senyawa alkaloid bekerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Senyawa saponin bekerja dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel.

Kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kontrol positif dan ekstrak bahan uji. Kontrol negatif yang digunakan yaitu Tween 80 5%, menunjukkan tidak adanya zona hambat pada bakteri uji. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut melainkan karena aktivitas senyawa yang ada pada daun sirsak dan daun alpukat. Pemilihan tween 80 5% sebagai kontrol negatif karena, tween merupakan surfaktan golongan nonionik yang bersifat tidak toksik dan mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Selain itu, tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri berkisar antara 2-8% (Sugijanto 2009).

Kontrol positif menunjukkan perbedaan yang nyata, karena menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap bakteri uji dibanding kontrol negatif dan ekstrak bahan uji. Dikarenakan antibiotik Siprofloksasin memiliki tingkat sensitif sebesar 93,35% terhadap golongan bakteri *Streptococcus sp.* Pemilihan Siprofloksasin sebagai kontrol positif dengan pertimbangan Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolon yang mempunyai

mekanisme kerja menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA girase selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Diameter zona hambat kontrol positif sebesar 25,50 mm. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 12.

Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak etanol daun sirsak, ekstrak etanol daun alpukat, kontrol positif dan kontrol negatif untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Hasil uji *One-Sampel Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa nilai signifikasinya sebesar $0,139 > 0,05$ maka H_0 diterima, artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *Analysis of Varians* (ANOVA). Berdasarkan hasil test homogenitasnya data dinyatakan homogen dengan nilai signifikansi $0,163 > 0,05$.

Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil diameter hambat ekstrak etanol daun sirsak dan ekstrak etanol daun alpukat menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan. Analisis *Homogeneous Subsets* ini untuk mencari grup/subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous* terbagi dalam 3 subset, disimpulkan bahwa sampel yang tergabung dalam satu grup maka tidak mempunyai perbedaan yang nyata. Hasil perbandingan ekstrak tunggal daun sirsak dan daun alpukat memiliki efektifitas yang sama atau bisa dikatakan tidak adanya perbedaan dikarenakan berada dalam satu subset. Tabel hasil statistik uji aktivitas ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 22.

9. Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dengan metode difusi

Ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dibuat kombinasi ekstrak dengan variasi 1:1, 1:2 dan 2:1 masing-masing perbandingan dibuat dalam konsentrasi yang sama yaitu 50%

ekstrak dalam pelarut Tween 80 5%. Variasi kombinasi ekstrak yang memiliki diameter daerah hambat paling besar akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* secara bioautografi. Hasil luas daerah hambat pengujian aktivitas antibakteri dari kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668

Ekstrak	Konsentrasi	Diameter Hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Daun sirsak : Daun Alpukat (1:1)	50%	18,00	19,25	19,75	19,00±0,90
Daun sirsak : Daun Alpukat (2:1)	50%	21,50	23,00	22,50	22,33±0,76
Daun sirsak : Daun Alpukat (1:2)	50%	21,00	21,75	22,25	21,67±0,63
Kontrol Siprofloksasin (+)	0,5%	25,50	27,00	25,75	26,08±0,80
Kontrol Tween 80 (-)	5%	0	0	0	0

Berdasarkan tabel 10 menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Hasil rata-rata kombinasi (1:1) 50% memiliki daya hambat yaitu sebesar 19 mm, hasil rata-rata kombinasi (2:1) 50% memiliki daya hambat yaitu sebesar 22,33 mm dan hasil rata-rata kombinasi (1:2) 50% memiliki daya hambat yaitu sebesar 21,67 mm. Dari tabel 9 dapat dilihat kombinasi ekstrak (2:1) memiliki daya hambat yang besar dan lebih efektif dibandingkan dengan kombinasi ekstrak lainnya.

Kekuatan daya hambat yang diberikan oleh kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat menggunakan kriteria yang diusulkan oleh Davis dan Stout (1971) yang memiliki daya hambat kuat yaitu (1:1) karena memiliki diameter zona hambat dengan rata-rata 10-20 mm sedangkan yang memiliki daya hambat sangat kuat (2:1) dan (1:2) dengan rata-rata lebih dari 20 mm.

Kemampuan daya hambat yang kuat dan sangat kuat ini diduga karena adanya kekuatan sinergis dari kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat. Menurut Spinella (2002), efek sinergis bahan aktif merupakan kondisi ketika efek yang dihasilkan oleh senyawa aktif secara bersama lebih besar daripada jumlah dari efek tunggal dari masing-masing senyawa aktif.

Pada perbandingan 1:1 yang terdiri dari 500 mg ekstrak daun sirsak dan 500 mg ekstrak daun alpukat memiliki sifat adisi yaitu efek kombinasi ekstrak sama dengan jumlah aktivitas dari masing-masing ekstrak. Diameter hambatan yang dihasilkan sama dengan diameter yang dihasilkan oleh ekstrak tunggal daun sirsak dan daun alpukat. Pada perbandingan 1:2 yang terdiri dari 500 mg ekstrak daun sirsak dan 1.000 mg ekstrak daun alpukat memiliki sifat sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* karena diameter hambatan yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan ekstrak tunggal daun sirsak dan daun alpukat meskipun masih lebih besar diameter kombinasi 2:1.

Pada perbandingan 2:1 yang terdiri dari 1.000 mg ekstrak daun sirsak dan 500 mg ekstrak daun alpukat memiliki sifat sinergis yaitu efek kombinasi ekstrak saling memperkuat melebihi dari jumlah aktivitas masing-masing ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Diameter hambatan yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan ekstrak tunggal daun sirsak dan daun alpukat. Kemampuan kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dalam menghambat aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668 diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid. Komponen senyawa dari kombinasi kedua ekstrak tersebut saling mendukung satu sama lain dalam mekanisme kerjanya.

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan menghambat metabolisme penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid juga mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme.

Mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah dengan cara merusak membran sel bakteri akibat terjadinya peningkatan permeabilitas membran oleh karena saponin yang berinteraksi dengan dinding sel bakteri. Rusaknya membran sel bakteri menyebabkan bocornya membran sel bakteri, akhirnya komponen penting dari dalam sel bakteri akan keluar dan mengakibatkan kematian bakteri. Mekanisme kerja tanin bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri, menginaktivasi enzim dan mendestruksi atau menginaktivasi fungsi materi genetik bakteri.

Kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kontrol positif dan kombinasi ekstrak bahan uji. Kontrol negatif yang digunakan yaitu Tween 80 5%, menunjukkan tidak adanya zona hambat pada bakteri uji. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut melainkan karena aktivitas senyawa yang ada pada daun sirsak dan daun alpukat. Pemilihan tween 80 5% sebagai kontrol negatif karena, tween merupakan surfaktan golongan nonionik yang bersifat tidak toksik dan mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Selain itu, tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri berkisar antara 2-8% (Sugijanto 2009).

Kontrol positif menunjukkan perbedaan yang nyata, karena menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap bakteri uji dibanding kontrol negatif dan kombinasi ekstrak bahan uji. Dikarenakan antibiotik Siprofloksasin memiliki tingkat sensitif sebesar 93,35% terhadap golongan bakteri *Streptococcus sp.* Pemilihan Siprofloksasin sebagai kontrol positif dengan pertimbangan Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolon yang mempunyai mekanisme kerja menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA girase selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Diameter zona hambat kontrol positif sebesar 26,08 mm.

Gambar hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 13. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara kombinasi (1:1), (1:2) , (2:1), kontrol

positif dan kontrol negatif untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Uji *One-Sampel Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Hasil menunjukkan bahwa nilai signifikasinya sebesar $0,116 > 0,05$ maka H_0 diterima, artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *Analysis of Varians* (ANOVA). Berdasarkan hasil test homogenitasnya data dinyatakan homogen dengan nilai signifikansi $0,121 > 0,05$.

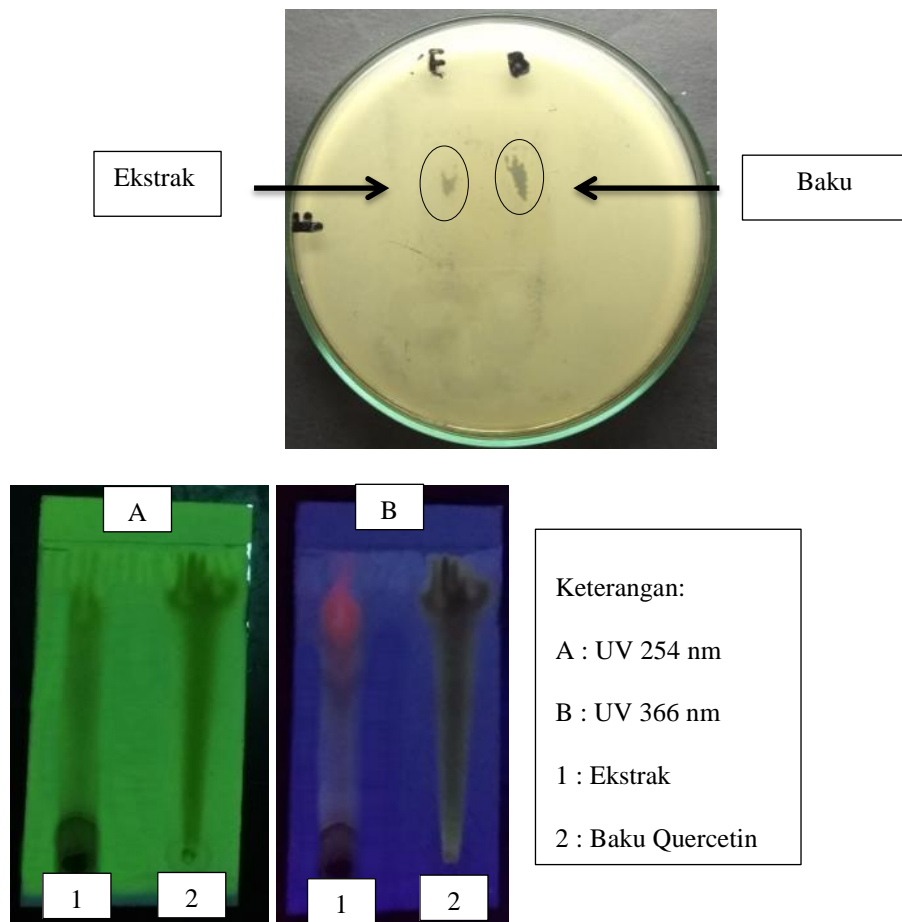
Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya adanya perbedaan signifikan sedangkan hasil diameter hambat kombinasi ekstrak (1:2) dan (2:1) menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan tetapi memiliki perbedaan signifikansi dengan kombinasi (1:1). Analisis *Homogeneous Subsets* ini untuk mencari grup/subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous* terbagi dalam 4 subset, disimpulkan bahwa sampel yang tergabung dalam satu grup maka tidak mempunyai perbedaan yang nyata. Hasil antara kontrol positif, kontrol negatif dan perbandingan kombinasi (1:1) adanya perbedaan dikarenakan tidak berada dalam satu subset sedangkan perbandingan (2:1) dan (1:2) memiliki efektifitas yang sama atau bisa dikatakan tidak adanya perbedaan dikarenakan berada dalam satu subset. Tabel hasil statistik uji aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 23.

10. Uji aktivitas antibakteri secara bioautografi

Bioautografi dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang mempunyai aktivitas antibakteri. Penelitian bioautografi dilakukan pada perbandingan teraktif yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus*

mutans ATCC 35668 yaitu perbandingan 2:1. Sampel ekstrak dan pembanding ditotol pada plat KLT dengan volume penotolon 2 μ l dan dielusi dengan menggunakan fase gerak yang berbeda-beda. Fase gerak untuk flavonid yaitu butanol-asam asetat-air (4:1:5), untuk tanin yaitu metanol-air (6:4), dan untuk saponin yaitu kloroform-metanol-air (60:30:10). Metode yang digunakan dalam bioautografi ialah metode kontak yaitu dengan cara menempelkan lempeng KLT yang sudah terelusi diatas permukaan medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah dinokulasikan mikroba uji. Setelah 30 menit, lempeng KLT diangkat dari permukaan medium. Golongan senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatogram ke dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengamati adanya zona jernih yang terbentuk pada permukaan medium.

Berdasarkan dari ketiga golongan senyawa yang diuji yaitu flavonoid, tanin, dan saponin didapatkan hasil bahwa golongan senyawa flavonoid yang sangat berperan penting dalam aktivitas antibakteri, sedangkan golongan senyawa yang lain juga berkhasiat antibakteri, namun dalam kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat dengan perbandingan (2:1) golongan senyawa yang paling aktif dan efektif adalah golongan senyawa flavonoid yang ditandai adanya bercak pada ekstrak dengan nilai Rf 0,8. Bercak tersebut memiliki aktivitas antibakteri dengan adanya difusi membentuk zona bening. Diameter zona hambat yang terbentuk dari bercak kombinasi ekstrak (2:1) yakni sebesar 5 mm. Hasil dapat dilihat pada Gambar 12.

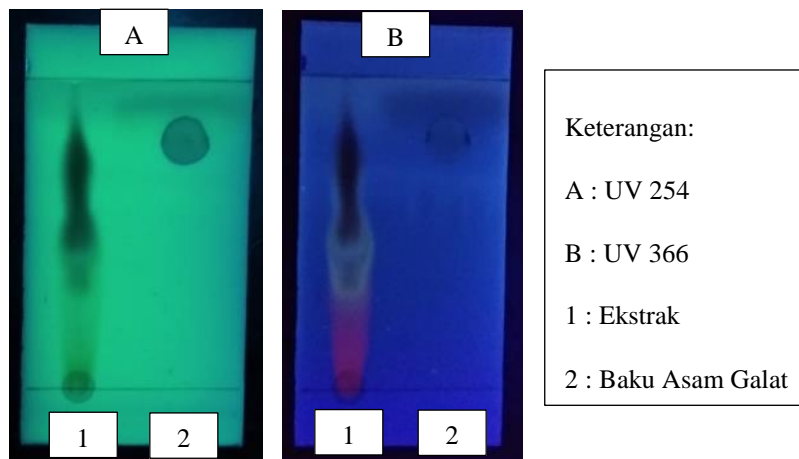
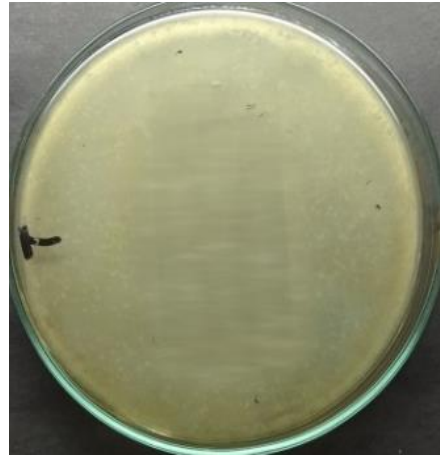


Gambar 12. Hasil bioautografi golongan senyawa flavonoid

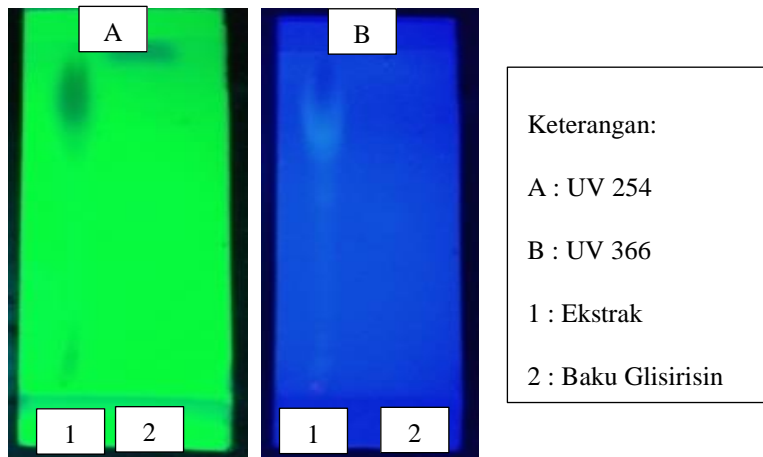
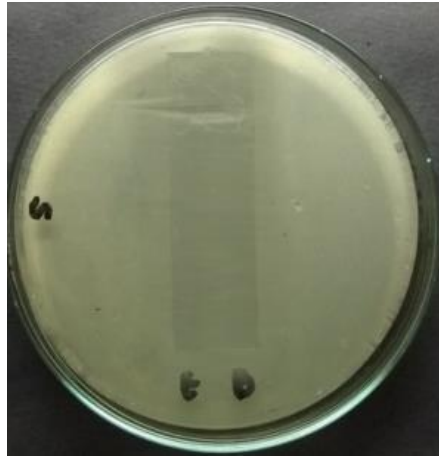
Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi mikroorganisme. Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid yaitu menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas pada dinding sel bakteri. Salah satu senyawa turunan flavonoid yaitu quercetin yang digunakan sebagai pembanding. Quercetin memiliki aktivitas antibakteri yang baik karena adanya gugus fenol dengan mekanisme mengkoagulasi protein dengan menonaktifkan enzim-enzim dan mengganggu dinding sel bakteri (Katzung 2004).

Kedua golongan senyawa lainnya yaitu saponin menggunakan baku pembanding glisirisin dan golongan senyawa tanin menggunakan pembanding asam galat. Kedua golongan senyawa tersebut tidak menunjukkan adanya zona hambat pada pengamatan. Hal ini kemungkinan disebabkan bahwa noda yang bergerak setelah ditarik oleh eluen, senyawa tanin dan saponin memiliki konsentrasi yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi senyawa

flavonoid, sehingga kekuatan aktivitas antibakteri menjadi lebih lemah. Hasil dapat dilihat pada Gambar 13 dan 14.



Gambar 13. Hasil bioautografi golongan senyawa tanin



Gambar 14. Hasil bioautografi golongan senyawa saponin