

BAB IV
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi daun wangon (*Olax scandens* Roxb.)

1.1 Determinasi tanaman. Tujuan dilakukan determinasi tanaman pada penelitian untuk mengetahui kebenaran dari tanaman wangon sebagai obyek penelitian dengan cara mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman dengan menggunakan kunci dari determinasi, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta tercampurnya bahan dengan tanaman lain pada saat pengambilan bahan. Determinasi tanaman wangon ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.

Hasil determinasi tanaman wangon berdasarkan C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963,1965) : 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-59a-60b-64b-

66a _____ **125. Olacaceae**

1b-4b _____ **1. Olax**

1a _____ ***Olax scandens* Roxb.**

1.2 Deskripsi tanaman. Deskripsi tanaman wangon dapat dijabarkan sebagai berikut: tanaman perdu, menahun, tumbuh tegak atau merambat, tinggi 2-10 m. Akarnya tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan. Batangnya berbentuk bulat, berkayu, bercabang. Daunnya tunggal, tersusun berseling, helaian anak daun berbentuk bulat telur-ellips yang memanjang, panjang 2-9,5 cm, dengan lebar 0,75-3,5 cm, dengan pangkalnya yang tumpul atau membulat tidak simetris.

Tangkai daun wangon berbentuk bulat, panjangnya 0,5-0,75 cm, dengan warna hijau. Bagian bunganya berupa majemuk yang tandan, di ketiak daun, bunganya tersusun atas 2 baris, dengan panjang tandan sekitar 0,5-3,5 cm, kelopak bunga berwarna hijau, mahkota bunganya berwarna putih, panjang 7-9 mm. Tumbuhan wangon juga memiliki buah yang berupa batu (drupa), berbentuk

elipsoid, dengan warna jingga, dan terdapat sisa kelopak bunga di bagian pangkalnya dan sisa tangkai putik di ujung. Dan juga memiliki biji yang jumlahnya kecil, dan banyak.

Berdasarkan hasil determinasi tanaman dapat dilihat bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb.). Gambar determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pengambilan bahan dan pengeringan daun wangon

Tahap awal sebelum dilakukan berbagai uji terhadap helaian daun wangon, tanaman tersebut dikumpulkan terlebih dahulu. Pengambilan tanaman seperti bagian tanaman yang akan digunakan, umur tanaman, waktu panen, serta lingkungan tempat tumbuhnya tanaman sangat berpengaruh terhadap kadar senyawa aktif yang dapat diperoleh. Proses pengambilan sampel diambil secara acak dari daun yang masih segar, hijau dan diperoleh pada bulan Januari 2019 dari Desa Bantengan, Kecamatan Jati, Kabupaten Blora, Jawa Tengah.

Daun wangon yang telah dikumpulkan dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang masih menempel pada sampel tanaman seperti kerikil, tanah, rumput, serangga, serta pengotor yang lain. Proses selanjutnya yaitu dilakukan perajangan yang tujuannya untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Proses perajangan selesai kemudian langkah selanjutnya adalah tahap pengeringan, proses pengeringan pada sampel dengan menggunakan alat oven pada suhu 50°C. Tujuan dari proses pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan pengeringan juga dapat mengurangi jumlah kadar air yang terdapat pada simplisia, sehingga dapat mencegah dari reaksi enzimatik yang menurunkan kualitas simplisia.

3. Hasil pembuatan serbuk daun wangon

Daun wangon yang telah dikeringkan kemudian dilakukan perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun wangon. Hasil perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun wangon dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun wangon

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (% b/b)
6000	3400	56%

Berdasarkan tabel 1 dapat diketahui bahwa daun wangon dengan bobot basah 6000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 3400 gram. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun wangon diperoleh dengan hasil sebesar 56%. Perhitungan rendemen hasil bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada lampiran 3. Serbuk daun wangon yang telah kering kemudian diserbuk dengan cara diblender yang kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomer 40 mesh. Penyerbukan dilakukan dengan tujuan untuk memperluas partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung secara efektif.

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun wangon

Tujuan dilakukannya penetapan susut pengeringan yaitu untuk mengetahui kadar lembab air yang terdapat dalam serbuk dan ekstrak daun wangon dengan menggunakan alat *moisture balance*. Hasil dari penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun wangon dapat dilihat di tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun wangon

Replikasi ke-	Bobot serbuk (gram)	Persentase (%)	
		Serbuk	Ekstrak
1	2,000	6,4	6,8
2	2,000	6,5	6,7
3	2,000	5,4	6,8
Rata – rata ± SD		6,1% ± 0,06	6,7% ± 0,05

Berdasarkan tabel 2 dapat dilihat persentase susut pengeringan serbuk daun wangon sebesar 6,1% dan susut pengeringan ekstrak sebesar 6,7% setelah dilakukan 3 kali replikasi. Hasil tersebut memenuhi persyaratan karena kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 1985). Kadar lembab yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim, sehingga kandungan zat aktif yang ada di dalamnya tidak berkurang dan bahan lebih awet.

5. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun wangon

Hasil penetapan kadar air serbuk daun wangon dapat diperoleh dengan cara mengukur kadar air dengan menggunakan alat *sterling bidwell* dengan melihat volume pada skala alat yang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk daun wangon

Replikasi	Bobot serbuk (g)	Volume air(ml)	Persentase(% ^v / _b)
1	10,125	0,4	3,95%
2	10,022	0,5	4,98%
3	10,101	0,5	4,95%
Rata – rata ± SD			4,63% ± 0,005

Dimana persentase kadar air pada serbuk daun wangon sebesar 4,63%, sehingga dari hasil tersebut kandungan kadar air pada serbuk daun wangon tidak lebih dari 10%. Hasil perhitungan penetapan kadar air serbuk dapat dilihat pada lampiran 7. Tujuan dilakukannya penetapan kadar air yaitu untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan.

Hasil penetapan kadar air pada ekstrak daun wangon dengan menggunakan alat *sterling bidwell* dengan melihat volume pada skala alat dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar air pada ekstrak daun wangon

Replikasi	Bobot ekstrak (g)	Volume air (ml)	Persentase(% ^v / _b)
1	10,204	0,8	7,84%
2	10,109	0,5	4,94%
3	10,045	0,8	7,96%
Rata – rata ± SD			6,91% ± 0,01

Penetapan kadar air pada ekstrak daun wangon didapatkan hasil sebesar 6,91%. Menurut literatur kadar air dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10%. Hal ini bertujuan untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur dalam ekstrak (Soetarno dan Soediro 1997). Perhitungan kadar air pada ekstrak daun wangon dapat dilihat di lampiran 8.

6. Hasil penetapan bobot jenis ekstrak daun wangon

Tabel 5. Hasil penetapan bobot jenis ekstrak daun wangon

Replikasi	Bobot ekstrak (g)	Bobot jenis
1	5	0,83
2	5	0,83
3	5	0,82
Rata-rata ± SD		0,82 ± 0,05

Hasil rata-rata penetapan bobot jenis ekstrak daun wangon yang telah dilakukan sebanyak 3 kali replikasi yaitu sebesar 0,82. Tujuan dari penetapan bobot jenis ekstrak yaitu memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair, sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang (Depkes RI 2000). Perhitungan bobot jenis ekstrak daun wangon dapat dilihat di lampiran 9.

7. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun wangon

Proses penyiapan simplisia selesai dilanjutkan dengan proses ekstraksi simplisia daun wangon. Pemilihan proses ekstraksi daun wangon dengan metode maserasi dikarenakan memiliki keuntungan diantaranya yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana.

Menurut Tiwari *et al.* 2011, etanol lebih banyak menarik senyawa seperti flavonoid, alkaloid, fenol, dan tanin, sedangkan saponin lebih banyak terlarut di dalam air. Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Penggunaan pelarut ini dikarenakan sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai pembanding, disamping itu pelarut etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah dan juga cepat diuapkan.

Wadah maserasi yang digunakan yaitu berkaca gelap untuk menghindari dari sinar matahari secara langsung. Proses maserasi dilakukan sebanyak 1000 gram serbuk daun wangon dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 7500 ml di dalam botol kaca gelap dan dilakukan selama 5 hari kemudian, didiamkan sambil digojog sesekali dan disaring dengan kain flanel steril, lalu ampas dibilas sampai diperoleh 100 bagian atau dengan penambahan sisa pelarut sebanyak 2500 ml hingga diperoleh filtrat 10000 ml. Hasil ekstraksi digabungkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan *evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Keuntungan yang didapat yaitu untuk mencegah terurainya atau rusaknya senyawa aktif yang tidak stabil terhadap suhu tinggi. Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun wangon dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 6. Hasil rendemen ekstrak etanol 96% daun wangon

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	86,110	8,6%

Hasil ekstraksi serbuk daun wangon dengan persentase rendemen sebesar 8,6%. Pemilihan pelarut etanol dalam proses maserasi pada daun wangon mempengaruhi banyaknya yang didapat, dikarenakan sifat etanol yang dapat melarutkan hampir semua zat, sehingga komponen yang terekstrak semakin banyak (Arifin 2006).

8. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun wangon

Ekstrak daun wangon dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan esterifikasi alkohol. Hasil uji bebas etanol daun wangon dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun wangon

Uji bebas etanol	Hasil uji
Ekstrak etanol daun wangon + H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas

Uji bebas etanol ekstrak daun wangon dilakukan dengan cara, ekstrak daun wangon ditambah asam sulfat kemudian, ditambahkan asam asetat dan dipanaskan. Hasil uji tidak tercium bau ester yang khas.

Pengamatan hasil uji di atas menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun wangon telah bebas dari etanol 96% yaitu ditandai dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari etanol pada ekstrak tersebut. Tujuan dilakukannya uji bebas etanol adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian selanjutnya. Adanya pelarut etanol yang tertinggal di dalam ekstrak dapat mengakibatkan terbunuhnya bakteri dikarenakan bukan karena ekstraknya tetapi, dari sisa pelarut etanol yang tertinggal. Foto hasil uji bebas etanol dapat dilihat pada lampiran 6.

9. Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun wangon

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan kandungan yang satu dari yang lainnya berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang sifatnya

polar akan masuk ke pelarut yang polar, begitu juga dengan senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Tiwari *et al* 2011). Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi berikut ini adalah *n*-heksana, etil asetat dan air. *n*-heksana sebagai senyawa yang sifatnya nonpolar akan menarik akan menarik senyawa-senyawa yang sifatnya juga nonpolar yaitu minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, alkaloid, klorofil dan resin. Pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar akan menarik senyawa yang bersifat semi polar antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Air sebagai pelarut polar akan menarik senyawa yang sifatnya polar seperti antosianin, tanin, saponin, glikosida dan gula.

Hasil maserasi yang berupa ekstrak yang sudah dipekatkan kemudian ditimbang sebanyak 10 gram ekstrak daun wangon dengan perbandingan air:etanol (70:5). Kemudian difraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sebanyak 75 ml, dilanjutkan dengan pelarut etil asetat yang sifatnya semi polar dan residu akhir sebagai fraksi air dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Data hasil pembuatan fraksinasi ekstrak etanol 96% daun wangon dapat dilihat seperti pada tabel berikut.

Tabel 8. Hasil rendemen faksinasi daun wangon

Berat ekstrak (g)	Pelarut (ml)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
40,000	<i>n</i> -heksana	3,900	9,75%
	Etil asetat	9,500	23,75%
	Air	11,000	27,5%

Perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-heksana daun wangon didapat persentase sebesar 9,75%. Residu dari fraksi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat sebanyak 75 ml, sehingga didapat fraksi etil asetat dan air. Perhitungan persentase rendemen fraksi etil asetat sebesar 23,75%, sedangkan persentase rendemen fraksi air sebesar 27,5%. Perhitungan untuk rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dapat dilihat di lampiran 11.

Hasil fraksinasi menunjukkan adanya perbedaan persen rendemen dengan bobot fraksi air yang memiliki persen rendemen paling besar diantara fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Perbedaan hasil fraksinasi dimungkinkan oleh adanya kepolaran dari masing-masing golongan senyawa kimia. Fraksi air memiliki kepolaran paling tinggi diantara kedua fraksi lainnya, karena fraksi air

berperan dalam menarik senyawa kimia yang bersifat polar. Fraksi *n*-heksana menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar. Sedangkan fraksi etil asetat merupakan pelarut yang sifatnya semi polar, mudah terbakar, dan mudah menguap (Harborne 1987). Faktor lain yang dapat mempengaruhi persen rendemen fraksi adalah kemungkinan sebagian besar senyawa yang ada di dalam daun wangon bersifat polar. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu mendekati 100% atau 100%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh ekstrak daun wangon yang banyak menempel pada wadah dan juga corong.

10. Hasil uji kandungan kimia ekstrak dan serbuk daun wangon

Uji kandungan kimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang tersari di dalam ekstrak etanol 96% daun wangon (*Olax scandens* Roxb.) sehingga dapat diketahui metabolit sekunder yang berpotensi untuk memiliki aktivitas antibakteri.

Tabel 9. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan serbuk daun wangon

Senyawa	Hasil	Pustaka	Interpretasi	
			Ekstrak	Serbuk
Alkaloid	Hijau pekat	Dragendroff : endapan Berwarna merah sampai jingga.	-	-
		Mayer : endapan berwarna-putih sampai kuning (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	-	-
Flavonoid	Jingga atau kemerahan	Terbentuk larutan berwarna kuning, merah atau jingga (Harborne 1996)	+	+
Saponin	Buih bertahan selama 10 menit	Terbentuk buih bertahan selama 10 menit (Tiwari <i>et al.</i> 2011)	+	+
Tanin	Biru kehitaman	Terbentuk warna biru kehitaman (Jones <i>et al.</i> 2006)	+	+
Steroid	Berwarna hijau	Terbentuk warna hijau (Setyowati <i>et al.</i> 2004)	+	+

Keterangan :

(+) : ada senyawa

(-) : tidak terdapat senyawa

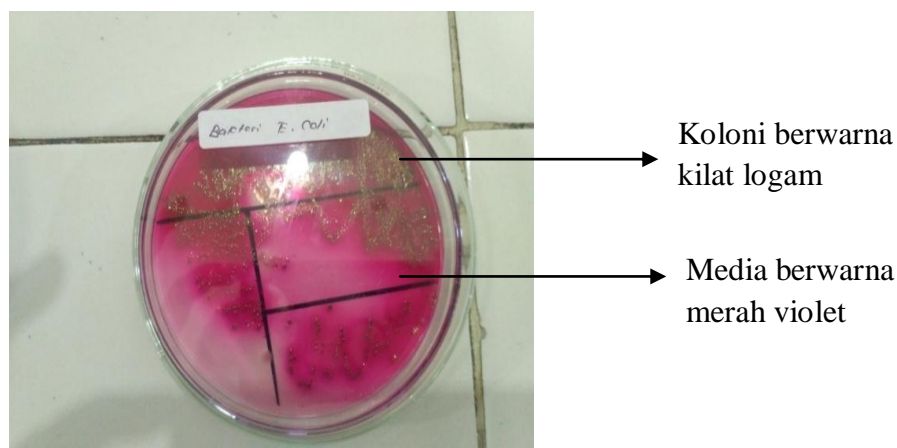
Berdasarkan tabel 10 di atas menunjukkan bahwa identifikasi yang telah dilakukan pada ekstrak dan serbuk daun wangon mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan dari tanaman wangon mengandung steroid,

flavonoid, tanin, saponin (Majumder *et al.* 2015). Untuk hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak dan serbuk dapat dilihat pada lampiran 12.

B. Pengujian Aktivitas Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

1. Hasil identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

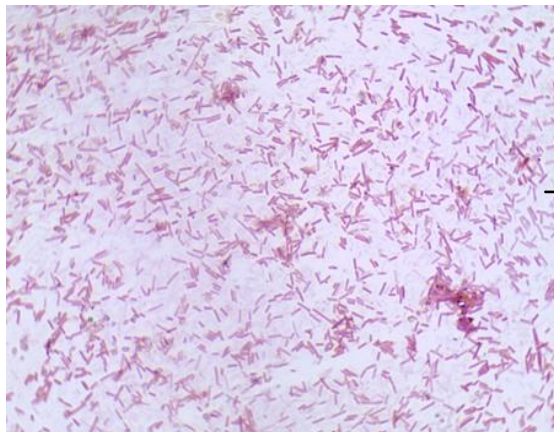
1.1 Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 secara goresan. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada medium *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan penampakan koloni berwarna kilat logam dan warna mediumnya berwarna merah violet (Volk & Wheeler 1988). Media *Endo Agar* mengandung laktosa, warna merah pada media disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 mampu memfermentasi laktosa menjadi aldehid dan asam. Aldehid akan memecah antara ikatan natrium sulfit dengan fuchsin (cat). Koloni kilat logam disebabkan karena *Escherichia coli* ATCC 25922 bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin diserap. Hasil gambar identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada gambar 6 dan lampiran 13.



Gambar 6. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Endo Agar*

1.2 Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri *Escherichia coli* tersebut termasuk Gram positif atau Gram negatif. Hasil dari

pengecatan Gram menunjukkan bakteri *Escherichia coli* termasuk Gram negatif yang ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah dan berbentuk batang. Prinsip dari pewarnaan Gram khususnya bakteri Gram negatif adalah bakteri tersebut akan berikatan dengan pewarna akhir yang diberikan pada pengujian. Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat ulasan (smear) yang difiksasi dan kemudian ditetesi oleh kristal violet (Gram A) yang menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri. Penetesan mordant (lugol's iodine/Gram B) menyebabkan adanya ikatan kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh bakteri. Penetesan Gram C (alkohol) akan menyebabkan pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet tidak menempel di dinding sel (luntur), yang menyebabkan Gram negatif menjadi bening. Penetesan safranin (Gram D) akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah (Volk dan Wheller 1988). Gambar hasil identifikasi morfologi dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 7 dan lampiran 13.



Sel bakteri berwarna merah dan berbentuk batang

Gambar 7. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram

11.3 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara biokimia. Uji biokimia bakterisuat cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Bakteri ditanam dalam media *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Klinger's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar*

(LIA), *Simmon Citrat* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada tabel 10 dan lampiran 13.

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

Penguji	Hasil	Pustaka (Volk & Wheeler 1988)	Interpretasi data
SIM	+++	+++	Sesuai
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)	Sesuai
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)	Sesuai
Citrat	-	-	Sesuai

Keterangan :

SIM : Sulfide Indol Motility	(+) : Reaksi positif	K : Alkali (merah atau ungu)
KIA : Klinger's Iron Agar	(-) : Reaksi negatif	S : Sulfida (hitam)
LIA : Lysine Iron Agar	A : Acid (kuning)	G : Gas

Hasil pengujian identifikasi pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*) dilakukan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media SIM menunjukkan hasil (+++). Sulfida negatif (-) artinya bakteri tersebut tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media. Indol positif (+) setelah dilakukan penambahan *Ehrlich A* dan *B* terbentuk warna merah muda pada permukaan yang artinya bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptophan sebagai sumber karbon. Tryptophan merupakan suatu enzim asam amino esensial yang dapat mengalami reaksi oksidasi dalam kegiatan enzimatik bakteri. Uji motilitas positif (+) menunjukkan ada pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, artinya bakteri tersebut memiliki flagel yang ditunjukkan dengan adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar pada media SIM.

Hasil pengujian pada medium *Klinger's Iron Agar* (KIA) dilakukan untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Medium KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 1% dan fenol merah sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu substrat untuk menghasilkan H₂S. Pengujian *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media KIA menunjukkan hasil A/AG S(-). A/A (asam/asam) pada lereng dan dasar media berwarna kuning artinya bakteri tersebut memfermentasi glukosa dan dasar media berwarna kuning artinya bakteri

tersebut memfermentasi glukosa dan laktosa karena bakteri tersebut merubah indikator fenol merah menjadi kuning, G (+) artinya terbentuknya gas yang ditandai dengan terangkat atau pecahan pada media. Sulfida (-) ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media berarti bakteri tersebut tidak mampu mendesulfurasi asam amino methion yang akan menghasilkan H₂S, sehingga H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media.

Identifikasi pada medium LIA (*Lysine Iron Agar*) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media LIA menunjukkan hasil K/K S(-). K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu yang menunjukkan bakteri tidak mendeaminasi lisin, tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu), S (-) negatif artinya uji H₂S negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino methion yang akan menghasilkan H₂S, sehingga H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media (Volk dan Wheller 1988).

Hasil pengujian identifikasi pada media *Simmons Citrate* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Simmons Citrate* menunjukkan hasil (-) negatif. Warna media tidak berubah atau tetap hijau, menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium *Simmons Citrate* terdapat indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana basa dan asam akan dihilangkan dari medium biakan sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru (menambah indikator BTB).

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri secara biokimia dapat disimpulkan bahwa benar bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil identifikasi bakteri secara biokimia dapat dilihat pada lampiran 13.

2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun wangen serta pembanding sediaan uji yaitu kotrimoksazol 25 µg/disk sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi untuk mengetahui fraksi yang paling aktif dengan cara melihat daya hambat paling besar yang ditunjukkan oleh masing-masing fraksi. Medium yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar *disc blanc* (kertas cakram) menandakan bahwa kandungan ekstrak daun wangen mempunyai daya hambat terhadap bakteri uji. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 5%, 10%, 20%, 40%. Kontrol positif yang digunakan yaitu cakram kotrimoksazol 25µg dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran 17.

Tabel 11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air secara difusi terhadap *Escherichia coli* ATCC 2592

Bahan uji	Konsentrasi	Zona hambat (mm)			Rata-rata ± SD
		1	2	3	
Ekstrak	5%	7,0	6,5	6,5	6,6 ± 0,28
	10%	8,0	7,0	8,0	7,6 ± 0,57
	20%	9,0	8,0	10,0	9,0 ± 1
	40%	10,0	9,0	9,0	9,3 ± 0,57
Fraksi <i>n</i> -Hek	5%	7,5	7,5	7,5	7,5 ± 0
	10%	6,5	7,0	8,0	7,1 ± 0,7
	20%	7,0	7,5	8,5	7,6 ± 0,7
	40%	7,0	8,0	9,0	8,0 ± 1
Fraksi Etil A	5%	8,0	9,0	9,0	8,6 ± 0,5
	10%	8,0	10,0	10,0	9,3 ± 1,1
	20%	10,0	9,0	11,0	10,3 ± 1,1
	40%	11,0	10,0	11,0	10,6 ± 0,5
Fraksi Air	5%	6,0	8,0	6,5	6,8 ± 1,0
	10%	6,5	6,0	6,0	6,1 ± 0,2
	20%	7,0	8,0	7,0	7,6 ± 0,5
	40%	7,5	8,0	7,0	7,3 ± 0,5
DMSO 5%		0,0	0,0	0,0	0
Kotrimoksazol		21,0	22,0	21,5	21,5 ± 0,5

Pengujian aktifitas antibakteri ekstrak etanol daun wangen, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*

ATCC 25922 menunjukkan adanya daya hambat. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya daerah jernih disekitar disk. Diameter zona hambat rata-rata yang paling besar adalah fraksi etil asetat pada konsentrasi 40%. Hal ini kemungkinan disebabkan karena fraksi etil asetat mampu menarik senyawa semipolar seperti flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri lebih baik atau potensial jika dibandingkan dengan senyawa yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana, maupun fraksi air dan senyawa fenolik yang diduga mempunyai senyawa sebagai antibakteri (Harborne 2007). Fraksi *n*-heksana memiliki zona hambat yang kecil diduga karena kandungan senyawa yang ada pada *n*-heksana hanya dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat sebagai antibakteri seperti senyawa steroid (Tiwari *et al* 2011). Kontrol positif yang digunakan yaitu kotrimoksazol yang telah terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan ditunjukkan diameter rata – rata yang paling besar dibandingkan dengan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 40%. DMSO 5% sebagai kontrol negatif juga tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri. DMSO 5% digunakan untuk pengenceran dalam pembuatan konsentrasi larutan stok pada ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Hasil pengujian dengan metode difusi dapat dilihat pada lampiran 19.

Penggolongan kekuatan daya hambat antibakteri dari bahan alam didasarkan pada kriteria kekuatan daya antibakteri menurut David and Stout (1971) yaitu jika diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan kekuatannya sedang, untuk diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Hal ini jelas terlihat pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 20% dan 40% dan untuk fraksi etil asetat konsentrasi 5% dan 10% memiliki kekuatan zona hambat yang tergolong sedang terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Fraksi yang lain seperti *n*-heksana, fraksi air dan ekstrak memiliki rerata zona hambat dengan kekuatan yang tergolong sedang.

Hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Duraipandiyani (2006), ekstrak daun wangon menggunakan metode perkolasi dingin dengan pelarutnya yaitu *n*-heksana dan metanol yang menunjukkan hasil aktivitas antibakteri.

Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Majumder *et al* (2015) menggunakan tanaman wangon yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antioksidan dengan menggunakan sinonim *Olox psittacorum* dengan bagian yang dipakai adalah batang dan daunnya. Metode yang dipakai berbeda dengan peneliti sebelumnya, yaitu menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada konsentrasi 25 mg/ml daun memiliki zona hambat sekitar 3,67 mm, dan untuk batang diameter zona hambatnya sebesar 0 mm.

3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi

Hasil uji difusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, karena memiliki zona hambat yang paling besar diantara fraksi atau ekstrak lainnya. Rata-rata diameter zona hambat fraksi etil asetat dengan konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% adalah 8,6 mm, 9,3 mm, 10,3 mm, 10,6 mm, maka dapat dilanjutkan dengan uji dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam uji dilusi untuk mendapatkan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,156%, 0,078%, kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun wangon dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi

Konsentrasi	Fraksi EA	Replikasi		
		1	2	3
40%		-	-	-
20%		+	+	+
10%		+	+	+
5%		+	+	+
2,5%		+	+	+
1,25%		+	+	+
0,625%		+	+	+
0,3125%		+	+	+
0,156%		+	+	+
0,078%		+	+	+
Kontrol + (suspensi bakteri)		+	+	+
Kontrol – (fraksi etil asetat)		-	-	-

Keterangan : (+) ada pertumbuhan bakteri
 (-) tidak ada pertumbuhan bakteri

Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari kadar terendah yang jernih, akan tetapi pada saat uji dilusi hal ini sulit untuk diamati karena fraksi yang digunakan terlihat sangat pekat sehingga perlu diadakannya pengamatan pada media *Endo Agar* (EA) untuk masing-masing tabung. Penetapan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan menginokulasikan larutan cairan dari tabung ke media *Endo Agar* (EA). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dari tabel 12 dapat diamati bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 40% diketahui memiliki Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 20.

4. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi paling aktif dengan metode KLT

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat, yaitu flavonoid, tanin, dan steroid.

Tabel 14. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi yang paling aktif secara KLT

Pengujian	Fase gerak	Pustaka	Pereaksi semprot Hasil	Rf
Tanin	Butanol:as. Asetat:air (4:1:5)	(Hayati <i>et al</i> 2010)	FeCl ₃ +	0,88
Flavonoid	Butanol:as.asetat:air (4:1:5)	(Marliana 2007)	Sitroborat +	0,56

Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun wongon mengandung senyawa tanin dan flavonoid. Identifikasi senyawa tanin yang menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5) dengan menggunakan pereaksi semprot FeCl₃. Senyawa tanin akan terlihat berwarna hijau atau biru gelap (Hayati *et al* 2010). Berdasarkan hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat mengandung senyawa tanin. Hal ini ditunjukkan dengan bercak terlihat berwarna hijau kehitaman yang terlihat pada KLT setelah disemprot pereaksi FeCl₃. Pada saat di UV 254 berwarna hijau gelap sebelum disemprot pereaksi semprot dan di UV 366 bercak berwarna biru hitam sebelum

disemprot dengan pereaksi semprot (Hayati *et al* 2010). Hasil identifikasi UV dapat dilihat pada lampiran 21.

Tanin adalah senyawa yang bersifat fenol yang memiliki rasa yang sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Tanin sifatnya larut dalam air, larutan alkalin, alkohol, gliserol, dan aseton. Tanin dapat juga mengendapkan logam berat, alkaloid, glikosida, dan gelatin. Tanin tidak larut dalam pelarut organik nonpolar seperti benzena dan kloroform. Tanin merupakan senyawa kompleks, biasanya merupakan campuran polifenol yang tidak atau sukar dipisahkan karena tidak dalam bentuk kristalnya (Harborne 1987). Senyawa polifenol yang terkandung dalam tanin diduga mempunyai mekanisme dengan cara merusak permeabilitas barrier dalam mikroorganisme, sehingga bersifat sebagai antibakteri (Harborne 1987).

Identifikasi senyawa flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan pereaksi semprot sitroborat. Senyawa flavonoid terlihat bercak dengan berwarna kuning (Marliana 2007).

Berdasarkan hasil identifikasi KLT, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak terlihat berwarna fluoresensi biru pada sinar UV 254 nm, berwarna biru pada UV 366 nm, dan R_f yang dihasilkan sebesar 0,88. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dapat dilihat pada lampiran 21.

Flavonoid memiliki struktur kimia C₆-C₃-C₆, artinya kerangka karbon terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzene tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Redha 2010). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri karena kemampuannya dalam membentuk ikatan kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Prayudhani *et al* 2012).

5. Hasil analisis data uji ANOVA fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, ekstrak etanol daun wangon, kontrol positif dan kontrol negatif

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi secara statistik *Analisis of Varian* (ANOVA) two way untuk membandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun wangon dengan konsentrasi masing-masing. Data yang dianalisis dengan two way ANOVA dengan konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air, kontrol positif, kontrol negatif juga diikutsertakan dalam analisis ANOVA two way, karena untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan dengan membandingkan hubungan antara ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air, kontrol positif, kontrol negatif dari daun wangon.

Hasil signifikansi yang diperoleh dari uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* adalah $0,007 < 0,05$ maka H_0 ditolak, data tersebut tidak terdistribusi normal sehingga dilanjutkan ke uji non-parametric yaitu Kruskal-Wallis. Pada tabel Levene's test diperoleh hasil sig. sebesar 0,104 yang artinya nilai sig. $0,104 > 0,05$ maka H_0 diterima yang artinya terdapat homogenitas data. Hasil uji dilanjutkan ke tahap Kruskal-Wallis yang didapatkan hasil sig sebesar $(0,006 < 0,05)$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara diameter zona hambat terhadap *Esherichia coli* ATCC 25922 pada kelompok ekstrak dan fraksi daun wangon. Hasil uji Kruskal-Wallis dapat dilihat pada lampiran 19.