

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman karandas dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan, mencocokkan ciri morfologis yang terdapat pada tanaman yang diteliti dengan kunci determinasi, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

Berdasarkan hasil identifikasi surat No. 017/UN27.9.6.4/Lab/2019 telah mendeterminasi tumbuhan karandas (*Carissa carandas* L.) sebagai berikut :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31b-403b-404b-405b-414a-415b-451a-452b-453a-454a-455b-456b-457b-458b-459b. 160. Apocynaceae 1b-3b-6a-7a-8a. 2. *Carissa* 1. ***Carissa carandas* L.**

Dipastikan bahwa yang digunakan dalam penelitian adalah daun karandas. Deskripsi lengkap dari tanaman karandas dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun karandas

Daun karandas diambil di Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat. Daun karandas dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Data rendemen berat daun karandas kering terhadap daun karandas segar dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen serbuk daun karandas dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun karandas

Bobot basah (gram)	Bobot serbuk (gram)	Rendemen % (b/b)
8000	1500	18,75

Hasil bobot basah daun karandas 8 kg dan bobot kering serbuk daun karandas 1,5 kg, sehingga diperoleh rendemen bobot daun kering terhadap daun basah adalah 18,75% b/b. Pengeringan harus konstan pada suhu 50°C dalam oven, apabila suhunya terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada senyawa aktif. Proses pengeringan dengan suhu terlalu rendah menyebabkan pengeringan

menjadi tidak sempurna dan memerlukan waktu yang lama sehingga terjadi proses pembusukan.

Pengeringan bertujuan untuk mencegah terjadinya kerusakan kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun karandas. Pengeringan juga bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah pertumbuhan jamur, dan memperpanjang waktu pemakaian sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Jika tidak dilakukan pengeringan maka akan terjadi kerusakan akibat penguraian zat aktif secara enzimatis seperti hidrolisis, oksidasi, dan polimerasi. Setelah dirajang sebaiknya segera dikeringkan untuk menghindari naiknya aktivitas enzim dengan adanya air dalam simplisia. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel yang semakin luas dapat meningkatkan kontak antara cairan penyari dan serbuk.

3. Penetapan kadar air serbuk daun karandas

Penetapan kadar air serbuk daun karandas menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Penetapan kadar air ini bertujuan untuk mengetahui prosentase kandungan air yang masih tertinggal dalam serbuk. Prosentase kadar air yang baik adalah kurang dari 10% (BPOM RI 2014). Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 2. Perhitungan penetapan kadar air dapat dilihat pada lampiran 8.

Tabel 2. Penetapan kadar air serbuk daun karandas

Replikasi	Berat serbuk (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%)
1	20	1,4	7
2	20	1,8	9
3	20	1,6	8
Rata-rata ± SD			8 ± 1

Hasil rata-rata prosentase penetapan kadar air serbuk daun karandas yaitu sebesar 8%, sehingga telah memenuhi syarat yaitu kurang dari 10%. Kadar air yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan jamur dan mikroorganisme lain dengan mudah, serta menyebabkan perubahan kimiawi yang dapat merusak atau menurunkan mutu dan kualitas daun karandas.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun karandas

Serbuk daun karandas sebanyak 700 gram diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sangat sederhana, peralatan

yang digunakan murah, cara pengerjaan mudah, dan dapat menghindari senyawa yang rusak oleh pemanasan. Serbuk daun karandas dimasukkan dalam botol maserasi berwarna gelap, ditambahkan etanol 70% sebanyak 7000 mL, digojok sesekali pada 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam kemudian. Hasil maserasi disaring menggunakan kain flanel, selanjutnya disaring dengan kertas saring, hasil filtrasi ditampung dan residu ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 3500 mL, digojok 6 jam pertama dan didiamkan 18 jam kemudian. Hasil maserasi disaring dengan kain flanel, selanjutnya disaring lagi dengan kertas saring. Hasil penyaringan maserat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* suhu 40°C. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rendemen ekstrak daun karandas

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%) b/v
700	174,285	24,9

Rendemen ekstrak daun karandas yaitu 24,9%. Rendemen yang diperoleh cukup banyak, hal ini dikarenakan proses penggojokan dilakukan secara maksimal sehingga senyawa dapat tertarik dengan maksimal. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada lampiran 9.

5. Uji bebas etanol ekstrak daun karandas

Uji bebas etanol ekstrak daun karandas dilakukan penambahan reagen asam sulfat pekat dan asam asetat pekat, setelah itu dipanaskan. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun karandas dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak daun karandas

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

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun karandas tidak mengandung etanol 70%, ditandai dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari etanol pada ekstrak. Pelarut etanol yang tersisa dalam ekstrak dapat mengakibatkan bakteri terbunuh bukan karena ekstrak, melainkan oleh sisa pelarut etanol yang tertinggal. Etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Hasil uji bebas etanol ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada lampiran 10.

6. Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas

Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas menggunakan alat *Moisture Balance*. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas

Replikasi	Bobot ekstrak (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,02	1,40
2	2,01	1,40
3	2,01	1,80
Rata-rata ± SD		1,53 ± 0,23

Hasil rata-rata prosentase penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas adalah 1,53%, sehingga telah memenuhi syarat yaitu kurang dari 10%. Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen (Depkes RI 2000). Berdasarkan literatur penetapan kadar air ekstrak seharusnya menggunakan *Sterling Bidwell*. Hasil perhitungan penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada lampiran 12.

7. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun karandas

Fraksinasi adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Hasil dari proses fraksinasi akan diperoleh jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda. Penarikan senyawa non polar digunakan pelarut *n*-heksan, senyawa semi polar digunakan pelarut kloroform, dan senyawa polar digunakan pelarut air (Mutiasari 2012).

Hasil ekstrak yang diperoleh dari metode maserasi dilakukan fraksinasi dengan 3 jenis pelarut dengan sifat kepolaran yang berbeda. Pelarut non polar yaitu *n*-heksan, pelarut semi polar yaitu kloroform, dan pelarut polar yaitu air yang selanjutnya dilakukan proses fraksinasi.

Tabel 6. Rendemen fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air daun karandas

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksan	100	4,20	4,20
Kloroform	100	25,04	25,04
Air	100	61,09	61,10

7.1. Fraksinasi *n*-heksan. Ekstrak hasil maserasi yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan pelarut nonpolar yaitu *n*-heksan. Ekstrak yang telah ditimbang dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali dengan penambahan pelarut *n*-heksan masing-masing 75 mL. Hasil fraksinasi *n*-heksan ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang diperoleh selanjutnya difraksinasi lanjutan dengan pelarut semipolar (kloroform). Hasil prosentase rendemen fraksi *n*-heksan daun karandas dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi *n*-heksan daun karandas berwarna kehijauan, kering, dan tidak berbau. Hasil prosentase diatas, rata-rata rendemen fraksi *n*-heksan yang diperoleh adalah 4,2%. Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi *n*-heksan dapat dilihat pada lampiran 13.

7.2. Fraksinasi kloroform. Residu dari fraksi *n*-heksan difraksinasi lanjutan dengan pelarut semipolar yaitu kloroform. Residu dari fraksi *n*-heksan dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali dengan penambahan pelarut kloroform masing-masing 75 mL. Hasil fraksinasi pelarut kloroform kemudian ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil prosentase rendemen fraksi kloroform daun karandas dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi kloroform daun karandas berwarna kehijauan, kering, dan tidak berbau. Hasil prosentase di atas, rata-rata rendemen fraksi kloroform yang diperoleh adalah 25,04%. Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi kloroform dapat dilihat pada lampiran 13.

7.3. Fraksinasi air. Residu hasil fraksinasi dengan pelarut kloroform selanjutnya dilakukan pemekatan pada *waterbath* suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Berdasarkan hasil pengamatan fraksi air daun karandas berwarna hitam kemerahan, kental, dan tidak berbau. Hasil prosentase rendemen fraksi air daun karandas dapat dilihat pada tabel 6.

Hasil prosentase diatas, didapatkan rata-rata rendemen fraksi air daun karandas sebesar 61,1%. Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi air daun karandas dapat dilihat pada lampiran 13.

8. Pengujian kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia ini bertujuan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun karandas. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun karandas

Senyawa	Hasil		Pustaka	Ket
	Serbuk	Ekstrak		
Alkaloid	Pereaksi Mayer : terbentuk endapan berwarna putih Pereaksi Dragendorf : terbentuk endapan berwarna merah	Pereaksi Mayer : terbentuk endapan berwarna putih Pereaksi Dragendorf : terbentuk endapan berwarna merah	Terbentuk endapan menggumpal berwarna putih dengan reagen Mayer, terdapat endapan berwarna merah sampai jingga dengan reagen Dragendorf (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)
Flavonoid	Terbentuk warna merah pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna merah pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)
Saponin	Terbentuk busa stabil setinggi 2 cm	Terbentuk busa stabil setinggi 2 cm	Terbentuk busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik (Bintoro 2017).	(+)
Tanin	Terbentuk warna coklat kehitaman	Terbentuk warna coklat kehitaman	Adanya perubahan warna biru kehitaman atau coklat kehitaman (Robinson 1995).	(+)
Steroid/ Triterpenoid	Triterpenoid terbentuk warna merah	Triterpenoid terbentuk warna merah	Larutan berwarna merah atau ungu untuk pertama kali mengandung triterpenoid, warna menjadi biru atau hijau mengandung steroid (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)

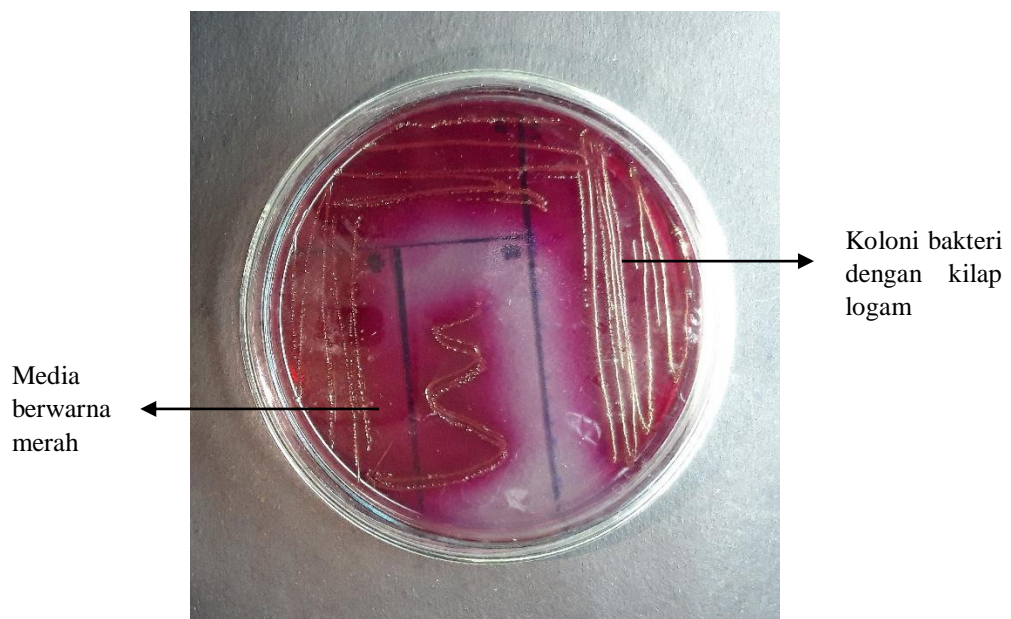
Keterangan (+) : mengandung senyawa yang diuji
(-) : tidak mengandung senyawa yang diuji

Berdasarkan tabel 9 dapat disimpulkan bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun karandas positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid yang diduga mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Foto hasil identifikasi senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada lampiran 15.

9. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

9.1. Identifikasi *Escherichia coli* secara makroskopis. Isolasi bakteri *Escherichia coli* pada media EA (*Endo Agar*) didapatkan hasil positif, ditandai dengan adanya koloni berwarna merah dengan kilat logam. Hal ini terjadi karena

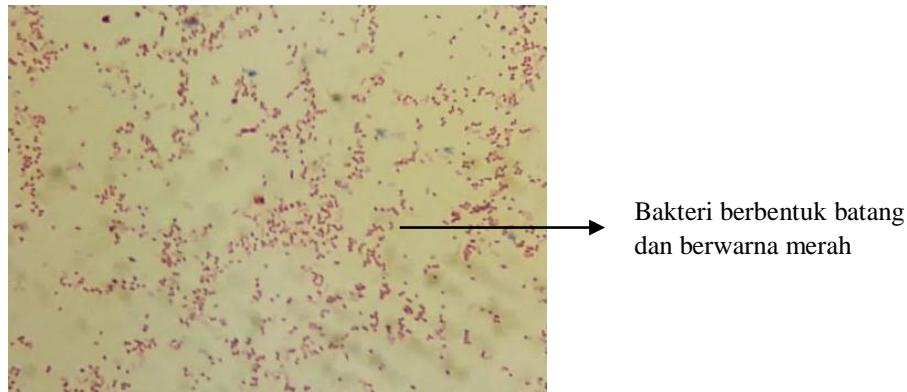
bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 mampu memfermentasi laktosa sehingga menyebabkan warna *Endo Agar* disekitar koloni berwarna merah dengan kilat logam. *Escherichia coli* memfermentasi laktosa menghasilkan asam dan aldehyd. Aldehyd dengan bantuan oksidasi akan memecah ikatan fuschin dan sulfite yang ada di medium, sehingga fuschin membentuk kilat logam dan medium menjadi merah (Volk & Wheller 1988). Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 1. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Endo Agar*

9.2. Identifikasi *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 termasuk golongan bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri uji berbentuk batang pendek dan berwarna merah. Pada bakteri Gram negatif, etanol meningkatkan porositas dinding sel dengan melarutkan lipid lapisan luar (lipid larut dalam etanol). Jadi, kompleks kristal ungu-lugol's iodine dapat lebih mudah dihilangkan dari lapisan peptidoglikan yang tidak terikat silang dengan kuat. Oleh karena itu, pencucian dengan alkohol memfasilitasi pelepasan kompleks kristal ungu-lugol's iodine yang tidak terikat, yang membuat sel menjadi tidak berwarna. Hanya sel-sel Gram negatif yang mengalami kehilangan warna. Pewarna Gram D (safranin) menyebabkan bakteri Gram negatif yang kehilangan warna

memiliki warna yang kontras yaitu merah. Hasil identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 2. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram

9.3. Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan media yaitu, *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kliger's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), dan citrate. Uji biokimia ini bertujuan untuk mengidentifikasi suatu biakan bakteri murni pada media uji berdasarkan sifat fisiologisnya.

Tabel 8. Identifikasi biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922

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

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Motility*

KIA : *Kliger's Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

A/A : kuning (media KIA)

G : terbentuk gas

K/K : terbentuk warna ungu (media LIA)

S⁻ : tidak terbentuk warna hitam

Pengujian pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Media yang telah diinokulasi, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dengan hasil +++. Hal ini disebabkan karena pada uji sulfida, *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide dan media tidak berwarna hitam. Uji indol bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophanase. Uji indol positif

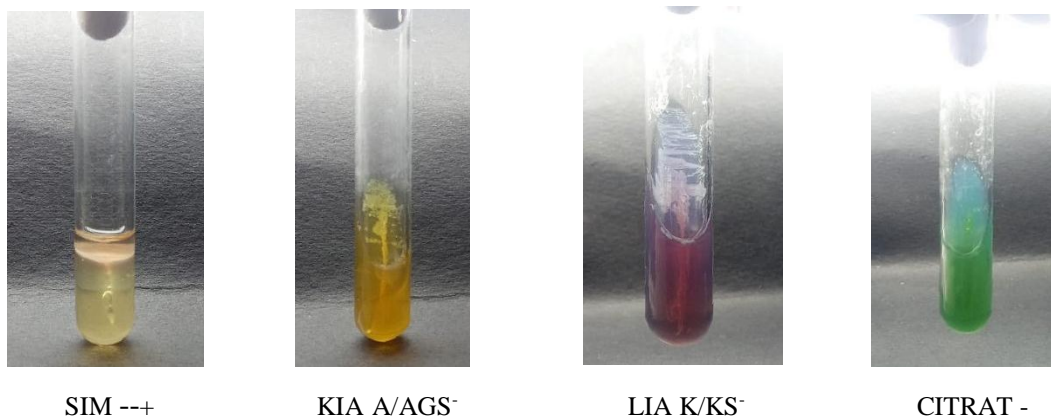
setelah dilakukan penambahan reagen Erlich A dan Erlich B terbentuk warna merah muda pada permukaan yang artinya bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptophan sebagai sumber karbon. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada bekas tusukan pada media SIM.

Media *Kliger's Iron Agar* (KIA) digunakan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), terbentuknya gas, dan sulfida. Hasil pengujian pada media KIA menunjukkan hasil A/AGS⁻. Hal ini dimaksudkan pada lereng dan dasar media terjadi perubahan warna menjadi kuning (A/A), yang artinya bakteri memfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil G⁻ artinya tidak terbentuk gas yang ditandai dengan tidak terangkatnya media. Hasil S⁻ yang artinya tidak terbentuk warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. Sulfida (H₂S) yang tidak terbentuk tidak akan bereaksi dengan Fe³⁺ sehingga tidak terbentuk warna hitam. Media KIA mengandung 1% laktosa dan 0,1% glukosa, serta indikator phenol red yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Media KIA mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk penghasil H₂S.

Pengujian pada media *Lysine Iron Agar* (LIA) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, deaminasi, atau dekarboksilasi lisin. Hasil pengamatan pada media LIA menunjukkan hasil K/KS⁻. Hasil K/K artinya bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin. Dekarboksilasi lisin terjadi karena bakteri menghasilkan *cadaverine* (pentametilen diamin) yang bersifat basa, adanya indikator *Bromo Cresol Purpel* (BCP) akan berwarna ungu pada seluruh media. Hasil S⁻ artinya tidak adanya warna hitam pada media, karena bakteri tidak dapat mereduksi natrium tiosulfat, sehingga tidak terbentuk H₂S yang bereaksi dengan Fe³⁺ yang membentuk endapan hitam.

Hasil pengujian dengan media citrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan organisme memanfaatkan satu-satunya sumber karbon tunggal dan energi. Medium citrat mengandung indikator *Bromo Thymol Blue* (BTB), apabila bakteri mampu menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Hasil pengamatan uji adalah negatif, hal ini dikarenakan tidak adanya perubahan warna

pada medium citrat. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 8. Foto hasil identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 3. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 digunakan untuk standarisasi dan pengendalian jumlah bakteri. Biakan bakteri murni diambil 1 sampai 2 ose selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) sebanyak 10 mL kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang telah diinkubasi diencerkan dengan BHI murni dan dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5 sampai didapat kekeruhan yang sama. Bakteri yang telah distandarkan McFarland 0,5 selanjutnya dilakukan pengenceran hingga 10^{-3} . Foto hasil standarisasi suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan standar McFarland 0,5 dapat dilihat pada lampiran 16.

11. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi air dari daun karandas dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi. Pengujian antibakteri dengan metode ini bertujuan untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50%, 25%, dan 12,5%. Perhitungan pembuatan konsentrasi ekstrak dan masing-masing fraksi dapat dilihat pada lampiran 21.

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%. Pelarut DMSO 5% merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air. Hasil dari pengujian DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari ekstrak dan fraksi daun karandas. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antibiotik siprofloksasin. Mekanisme kerja dari antibiotik ini dengan menghambat sintesis asam nukleat. Antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan difusi pasif.

Kekeruhan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 disesuaikan dengan standar McFarland 0,5. Suspensi yang telah distandarkan, selanjutnya dilakukan pengenceran hingga 10^{-3} . Metode difusi ini menggunakan metode *disc diffusion*, kertas cakram yang telah steril selanjutnya ditetesi dengan larutan stok masing-masing konsentrasi. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun karandas dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Daya hambat dari ekstrak dan fraksi dapat dilihat dari ada tidaknya zona bening disekitar cakram disk, yang diukur dalam satuan mm.

Tabel 9. Uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 metode difusi

Sediaan Uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm)± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	11,25	11,75	10,25	11,08 ± 0,76
	25%	9,00	8,75	8,50	8,75 ± 0,25
	12,50%	7,25	7,00	7,00	7,08 ± 0,14
Fraksi <i>n</i> -heksan	50%	9,75	8,75	9,00	9,17 ± 0,52
	25%	8,00	8,25	7,00	7,75 ± 0,66
	12,50%	6,75	7,25	6,00	6,67 ± 0,63
Fraksi kloroform	50%	14,25	13,00	13,75	13,67 ± 0,63
	25%	11,00	11,75	10,75	11,17 ± 0,52
	12,50%	9,75	9,25	8,00	9 ± 0,90
Fraksi air	50%	11,00	9,50	10,75	10,42 ± 0,80
	25%	7,25	7,75	8,00	7,67 ± 0,38
	12,50%	6,75	7,00	7,25	7 ± 0,25
Siprofloksasin	5µg	24,00	23,00	25,00	24 ± 1
DMSO	5%	0,00	0,00	0,00	0 ± 0

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air daun karandas menunjukkan bahwa ekstrak dan masing-masing fraksi mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Hal ini dibuktikan dengan adanya zona bening yang terbentuk di sekitar cakram disk. Hasil uji dari ekstrak dan fraksi selanjutnya dibandingkan dengan antibiotik siprofloksasin. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi dapat dilihat pada tabel 9.

Hasil data pada tabel 9 dapat diketahui bahwa fraksi kloroform memiliki daya hambat paling besar dibandingkan ekstrak dan fraksi yang lain. Senyawa aktif dari daun karandas lebih banyak tertarik pada kloroform seperti senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan triterpenoid diantaranya asam ursolic, asam oleanolic, asam batulinic, carandinol, stigmasterol, dan β -sitosterol yang telah dibuktikan pada uji kandungan kimia ekstrak etanol dan fraksi daun karandas (Tiwari *et al.* 2011). Ekstrak etanol daun karandas mampu menarik semua senyawa dalam daun karandas, tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara sinergis, sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dari fraksi teraktif yaitu fraksi kloroform. Fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas antibakteri paling kecil dibanding dengan fraksi kloroform dan fraksi air. Hal ini dipengaruhi oleh sifat polaritas pelarut yang menarik senyawa aktif dari daun karandas yang memiliki aktivitas antibakteri. Pelarut *n*-heksan dan air tidak mampu menarik senyawa aktif triterpenoid sehingga menyebabkan aktivitas antibakteri lebih kecil dibandingkan dengan fraksi teraktif kloroform.

Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Alamsyah *et al.* 2014). Mekanisme kerja flavonoid dengan mengganggu sintesis membran sel melalui penghambatan yang menyebabkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang pada peptidoglikan membran sel sehingga menuju struktur yang lemah dan mengakibatkan kerusakan dinding sel bakteri. Mekanisme kerja steroid berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang impermeabel terhadap senyawa lipofilik, sehingga menyebabkan integritas menurun, morfologi membran sel

berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis. Mekanisme kerja triterpenoid bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer kuat yang menyebabkan porin rusak. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuk senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2015).

Analisa data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik dengan Analisis of Varian (ANOVA) *one way*. Metode analisis ANOVA *one way* ini bertujuan untuk membandingkan fraksi pada setiap konsentrasi. Data yang akan dianalisis dengan ANOVA *one way* adalah ekstrak dan fraksi dari daun karandas. Data yang diperoleh digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi-fraksi dan ekstrak etanol daun karandas sehingga diketahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 24.

Hasil signifikan yang diperoleh dari uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* adalah $0,076 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Nilai probabilitas Levene Statistic adalah $0,112 > 0,05$ maka H_0 diterima, keempat sampel memiliki varian yang sama. Hasil signifikansi dari ANOVA adalah $0,000 < 0,05$, keempat sampel ada perbedaan dalam diameter zona hambat.

Tabel *Homogenous Subsets* bertujuan untuk melihat kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogenous Subsets* ini terbagi menjadi 8 subset, semakin ke kanan semakin besar diameter daya hambatnya. Subset 1 terdapat kontrol negatif yaitu DMSO 5%. Subset 2 terdapat ekstrak, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air. Subset 3 terdapat ekstrak, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air. Subset 4 dan 5 terdapat ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi air. Subset 6 terdapat ekstrak, fraksi kloroform, dan fraksi air. Subset 7 terdapat fraksi kloroform. Subset 8 terdapat kontrol positif yaitu antibiotik siprofloksasin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antara subset 1 sampai 8 mempunyai beda yang signifikan dalam menghambat bakteri. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dapat dilihat pada lampiran 17.

12. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Hasil fraksi kloroform daun karandas dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,563%; 0,781%; 0,391%; 0,196% dengan kontrol positif yaitu suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, dan kontrol negatif yaitu fraksi teraktif kloroform.

Aktivitas antibakteri dapat dilihat dari kekeruhan masing-masing tabung uji yang selanjutnya digores pada media MacConkey. Nilai KHM dapat dilihat dari konsentrasi terendah larutan uji yang terlihat jernih, namun hal ini sulit diamati karena warna dari larutan uji yang keruh. Oleh karena itu, nilai KHM tidak dapat ditentukan sehingga untuk mengetahui nilai KBM masing-masing tabung uji dilakukan penggosresan pada media MacConkey, yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode ini dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Uji dilusi dari fraksi kloroform daun karandas

No	Konsentrasi (%)	Fraksi kloroform		
		Replikasi		
		I	II	III
1	K (-)	-	-	-
2	25	-	-	-
3	12,5	-	-	-
4	6,25	-	-	-
5	3,125	+	+	+
6	1,56	+	+	+
7	0,78	+	+	+
8	0,39	+	+	+
9	0,19	+	+	+
10	K (+)	+	+	+

Keterangan :

(+) = terdapat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

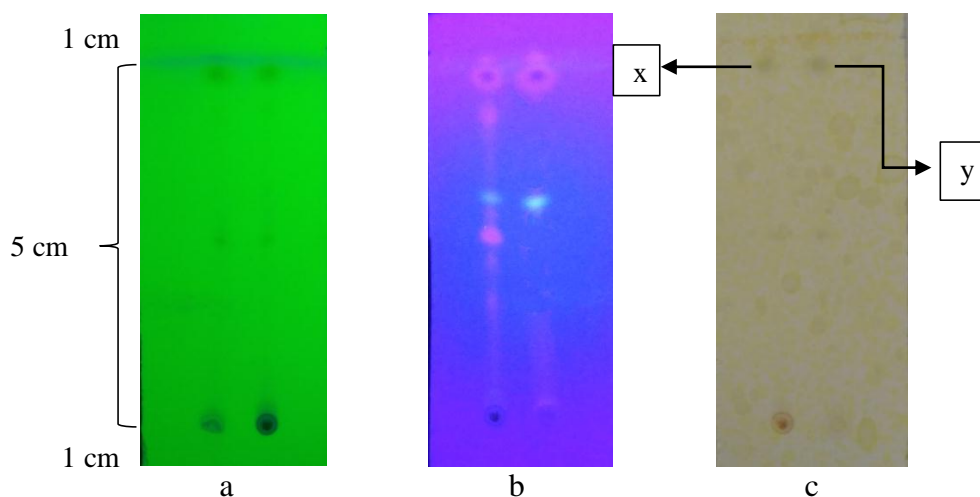
(-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa fraksi kloroform mampu membunuh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada konsentrasi 6,25%. Nilai KBM pada konsentrasi 6,25% yang merupakan konsentrasi terendah dari fraksi kloroform yang dapat membunuh pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922. Foto hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 18.

13. Pengujian kandungan senyawa secara KLT

Identifikasi ekstrak dan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi dengan KLT bertujuan untuk mengetahui senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun karandas.

13.1 Identifikasi alkaloid. Identifikasi KLT senyawa alkaloid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform : etanol (94 : 4) dengan pereaksi semprot Dragendrof. Senyawa alkaloid akan terlihat bercak berwarna coklat atau jingga (Budiman *et al.* 2010).

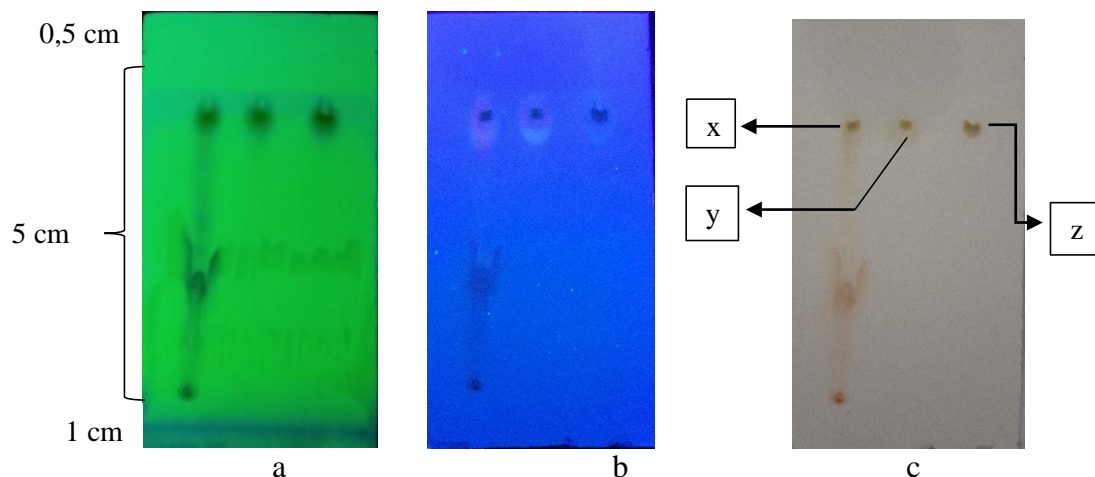


Gambar 4. Profil kromatogram senyawa alkaloid, a) UV254 nm sebelum disemprot; b) UV366 nm sebelum disemprot; c) sinar tampak setelah disemprot pereaksi Dragendrof; x) ekstrak; y) fraksi kloroform

Hasil identifikasi KLT pada sinar tampak diperoleh bercak ekstrak dan fraksi kloroform berwarna coklat, UV₂₅₄ nm memberikan peredaman, UV₃₆₆ nm berfluoresensi biru. Nilai R_f bercak fraksi kloroform adalah 0,46. Berdasarkan hasil reaksi warna tersebut bahwa fraksi kloroform daun karandas positif mengandung alkaloid. Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Alamsyah *et al.* 2014). Hasil identifikasi dengan UV dapat dilihat pada gambar 11.

13.2 Identifikasi flavonoid. Identifikasi KLT senyawa flavonoid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air

(4 : 1 : 5). Senyawa flavonoid akan terlihat bercak berwarna kuning (Koirewoa *et al.* 2012).

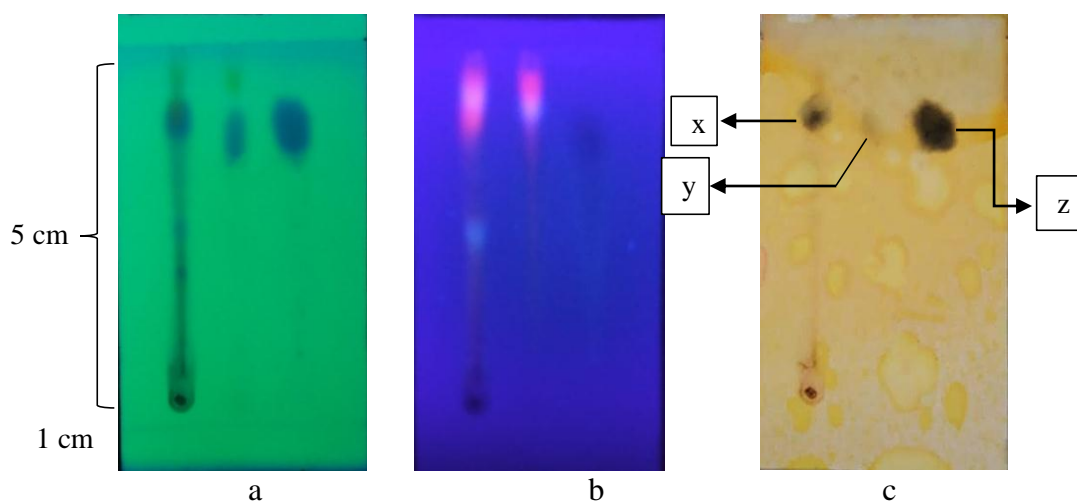


Gambar 5. Profil kromatogram senyawa flavonoid, a) UV254 nm sebelum disemprot; b) UV366 nm sebelum disemprot; c) sinar tampak setelah disemprot pereaksi Sitroborat; x) ekstrak; y) fraksi kloroform; z) baku kuersetin

Hasil identifikasi KLT pada sinar tampak diperoleh bercak ekstrak dan fraksi kloroform berwarna kuning kecoklatan, pada sinar UV₂₅₄ nm memberikan peredaman, pada sinar UV₃₆₆ nm berwarna biru. Nilai Rf bercak fraksi kloroform adalah 0,74 yang hampir sama dengan pembanding kuersetin dengan nilai Rf 0,74. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform daun karandas positif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT dan nilai Rf yang hampir sama dengan pembanding kuersetin. Flavonoid dapat digambarkan dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆, yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambung oleh rantai alifatik tiga karbon. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan mengganggu sintesis membran sel melalui penghambatan yang menyebabkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang pada peptidoglikan membran sel sehingga menuju struktur yang lemah dan mengakibatkan kerusakan dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2015). Hasil identifikasi dengan UV dapat dilihat pada gambar 12.

13.3 Identifikasi tanin. Identifikasi KLT senyawa tanin menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1), 0,5 cm dilihat pada sinar UV₂₅₄ nm, UV₃₆₆ nm, dan sinar tampak. Senyawa tanin akan terlihat bercak berwarna hitam (Nuria *et al.* 2009).

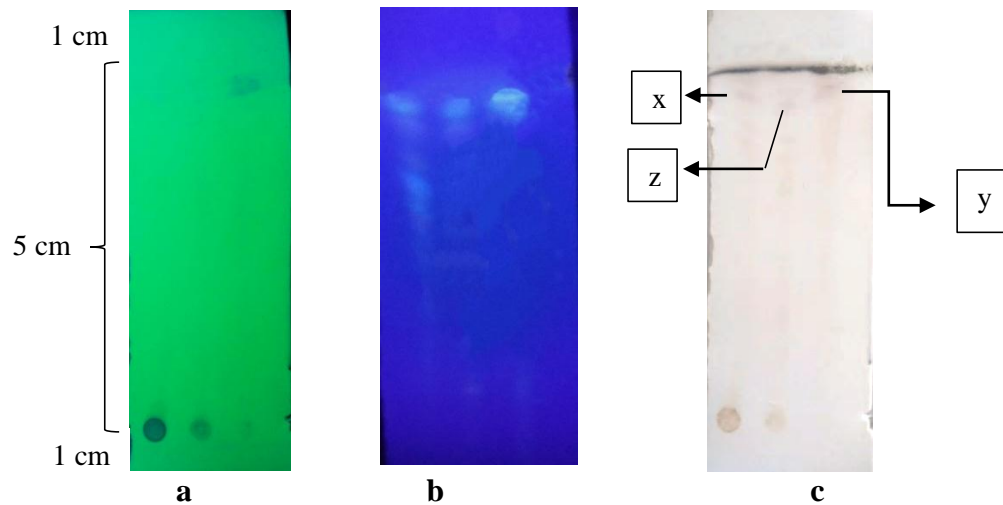
1 cm



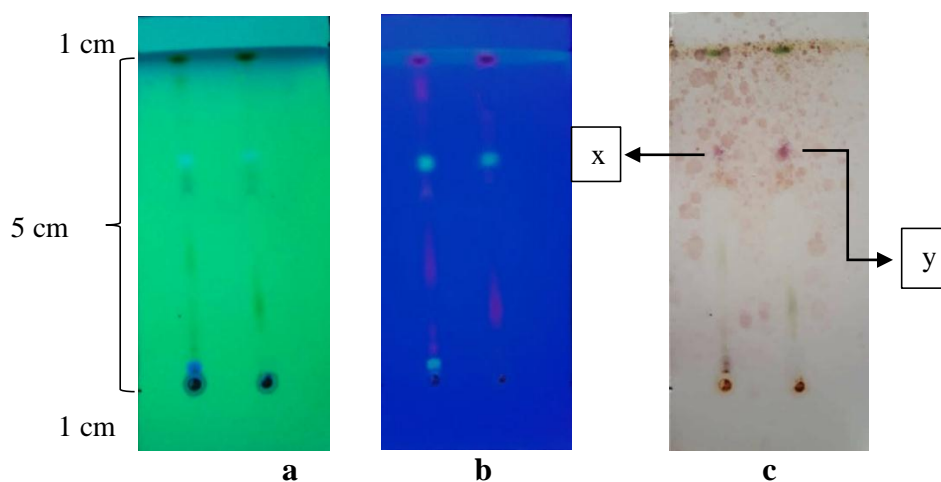
Gambar 6. Profil kromatogram senyawa tanin, a) UV254 nm sebelum disemprot; b) UV366 nm sebelum disemprot; c) sinar tampak setelah disemprot pereaksi FeCl₃; x) ekstrak; y) fraksi kloroform; z) baku asam galat

Identifikasi KLT pada sinar tampak diperoleh bercak ekstrak dan fraksi kloroform berwarna hitam, UV₂₅₄ nm berfluoresensi ungu kehitaman, UV₃₆₆ nm berfluoresensi ungu terang. Nilai R_f bercak fraksi kloroform adalah 0,74 dan pembandingan asam galat dengan nilai R_f 0,74. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform daun karandas negatif mengandung tanin dilihat dari letak bercak fraksi kloroform dan baku asam galat pada lempeng KLT yang tidak sejajar. Hasil identifikasi dengan UV dapat dilihat pada gambar 13.

13.4 Identifikasi steroid/triterpenoid. Identifikasi KLT senyawa steroid dan triterpenoid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄. Fase gerak senyawa steroid yaitu kloroform : metanol (10 : 1) dan fase gerak senyawa triterpenoid yaitu eter minyak bumi : dikloroetilen : asam asetat (50 : 50 : 0,7). Senyawa steroid dan triterpenoid akan terlihat bercak berwarna ungu atau biru (Risnafiani 2015).



Gambar 7. Profil kromatogram senyawa steroid, a) UV254 nm sebelum disemprot; b) UV366 nm sebelum disemprot; c) sinar tampak setelah disemprot pereaksi Lieberman Bourchard; x) ekstrak; y) fraksi kloroform; z) baku stigmasterol



Gambar 8. Profil kromatogram senyawa triterpenoid, a) UV254 nm sebelum disemprot; b) UV366 nm sebelum disemprot; c) sinar tampak setelah disemprot pereaksi Lieberman Bourchard; x) ekstrak; y) fraksi kloroform

Identifikasi KLT senyawa steroid pada sinar tampak, UV₂₅₄ nm, UV₃₆₆ nm diperoleh bercak ekstrak dan fraksi kloroform berwarna biru. Nilai R_f bercak fraksi kloroform adalah 0,8 yang hampir sama dengan pembanding stigmasterol dengan nilai R_f 0,8. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform daun karandas positif mengandung steroid dari bercak pada lempeng KLT dan nilai R_f yang hampir sama dengan pembanding stigmasterol. Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang impermeabel terhadap senyawa lipofilik, sehingga menyebabkan integritas menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan

lisis (Sulastrianah *et al.* 2015). Hasil identifikasi dengan UV dapat dilihat pada gambar 14.

Identifikasi KLT senyawa triterpenoid pada sinar tampak diperoleh bercak ekstrak dan fraksi kloroform berwarna ungu, UV₂₅₄ nm berfluoresensi hijau, UV₃₆₆ nm berfluoresensi biru kehijauan, dan nilai Rf bercak adalah 0,68. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform daun karandas positif mengandung flavonoid. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik. Mekanisme kerja triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer kuat yang menyebabkan porin rusak. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuk senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2015). Hasil identifikasi dengan UV dapat dilihat pada gambar 15.