

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil identifikasi tanaman kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

1.1 Determinasi tanaman. Determinasi dilakukan dengan tujuan mengetahui apakah tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang dibuktikan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Hasil determinasi tanaman *Hibiscus rosa-sinensis* L. berdasarkan Steenis : FLORA : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b. golongan 8.109b-119b-120b-128b-129b-135b-136b-139b-140b-142b-143b-146b-154b-155b-156b-162b-163b-167b-169b-171a-172b-173b-174b-176a. familia 75. Malvaceae 1a-2b-3b. Hibiscus 1b-2a-3a. ***Hibiscus rosa-sinensis* L.**

1.2 Deskripsi Tanaman. Deskripsi tanaman *Hibiscus rosa-sinensis* L. sebagai berikut : Perdu tinggi 1-4 m, berakar tunggang. Batang berkayu, silindris, percabangan monopodial. Daun tunggal, bulat telur sampai jorong, ujung meruncing, tepi bergerigi kasar, pangkal membulat sampai tumpul, pangkal bertulang daun menjari, panjang 7,8-9,5 cm, memiliki daun penumpu bentuk garis. Bunga tunggal diketiak, tidak atau sedikit menggantung, daun kelopak tambahan 6-9 berbentuk lanset garis dan lebih pendek dari kelopak, kelopak bentuk tabung sampai setengahnya bercangap 5, daun mahkota bulat telur terbalik berbentuk baji memiliki panjang 6,5-7 berwarna merah, tabung benangsari lebih panjang daripada mahkota. Bakal buah menumpang, beruang 5, tangkai bunga beruas.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan dan pembuatan serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. diambil didaerah Boyolali, Jawa Tengah dengan kriteria bunga segar yang mekar sempurna berwarna merah. Bunga yang

sudah dikumpulkan dibersihkan, dicuci kemudian dikeringkan. Pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°-60°C dengan tujuan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah timbulnya jamur atau mikroorganisme yang menyebabkan pembusukan dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Bobot basah	Bobot kering	Rendemen
8000 gram	1437 gram	17,96 %

Hasil dari bobot basah 8000 gram diperoleh bobot kering 1437 gram dan diperoleh persentase rendemen 17,96 % b/b. Perhitungan persentase rendemen dapat dilihat pada lampiran 13.

3. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Penetapan kadar air dilakukan pada serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. sebanyak 3 kali replikasi. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell* untuk mengetahui volume air kemudian dihitung persentasenya. Hasil penetapan kadar air pada serbuk dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Persentase kadar air serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Sampel	Kadar air (%)			
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Rata-Rata
Serbuk	8	8,5	7	7,8±0,8
Ekstrak	6	7	6	6,3±0,6

Hasil rata-rata kadar air dari 20 gram serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. adalah 7,8 % dengan nilai SD 0,8 yang berarti sudah memenuhi syarat kadar air simplisia yaitu kurang dari 10% (Kemenkes RI 2013). Penetapan kadar air juga dilakukan pada 10 gram ekstrak bunga dengan tiga kali replikasi menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan hasil rata-rata kadar air 6,3% dengan nilai SD 0,6 yang berarti sudah memenuhi syarat kadar air simplisia yaitu kurang dari 10% (Kemenkes RI 2013).

Penetapan kadar air ini memiliki tujuan untuk menjaga kualitas serbuk simplisia agar tidak ditumbuhi jamur dan mikroorganisme yang dapat mempengaruhi mutu. Hasil perhitungan kadar air pada serbuk dan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 14.

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Penetapan susut pengeringan dilakukan pada serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. sebanyak 3 kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance* pada suhu 105° C dengan setting alat auto untuk mengetahui persentasenya. Hasil penetapan susut pengeringan pada serbuk dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Persentase susut pengeringan serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Sampel	Susut Pengeringan (%)			Rata-Rata
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Serbuk	8,0	7,6	5,5	7,03±1,34
Ekstrak	6,7	6,4	5,7	6,26±0,51

Hasil rata-rata susut pengeringan dari 2 gram serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. adalah 7,03 % dengan nilai SD 1,34. Penetapan susut pengeringan juga dilakukan pada ekstrak bunga dengan tiga kali replikasi. Hasil rata-rata susut pengeringan dari 2 gram ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. adalah 6,26% dengan nilai SD 0,51. Penetapan susut pengeringan ini memiliki tujuan untuk mengetahui batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil pengujian susut pengeringan pada serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada lampiran 5.

5. Hasil pembuatan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Pembuatan ekstrak dari serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dilakukan dengan metode maserasi. Keuntungan menggunakan metode maserasi adalah sederhana, mudah dilakukan dan tanpa menggunakan pemanasan sehingga tidak merusak senyawa-senyawa yang tidak tahan panas. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol 70 % dipilih karena termasuk pelarut universal sehingga dapat menarik semua senyawa dalam simplisia. Filtrat hasil maserasi

dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 50-60° C. Hasil pembuatan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Persentase rendemen ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	155,02	31,00

Rendemen pembuatan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. sebesar 31% b/b yang menunjukkan banyaknya komponen yang tersari pada proses maserasi. Ekstrak yang diperoleh memiliki warna coklat kemerahan dengan konsistensi kental. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada lampiran 12.

6. Hasil uji berat jenis ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Uji berat jenis ekstrak dilakukan menggunakan alat piknometer dengan konsentrasi ekstrak yaitu 1%. Hasil uji berat jenis ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji berat jenis ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

No	Bobot Awal (g)	Bobot jenis (g/ml)
1	0,5	0,89
2	0,5	0,89
3	0,5	0,89
Rata-rata		0,89

Hasil pengujian berat jenis ekstrak dengan konsentrasi 1% memiliki rata-rata berat jenis 0,89. Perhitungan berat jenis dibandingkan dengan berat jenis air pada suhu 25° C. Berat jenis menggambarkan karakterisasi ekstrak yaitu besarnya massa persatuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair, ekstrak kental. Berat jenis juga berkaitan dengan kontaminasi dan kemurnian dari ekstrak (Depkes RI 2000). Perhitungan persentase berat jenis dapat dilihat pada lampiran 15.

7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Identifikasi senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia pada serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. Identifikasi kandungan kimia meliputi alkaloid, tanin, saponin, steroid atau terpenoid, flavonoid dan antrakuinon. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Senyawa	Hasil serbuk	Hasil ekstrak	Pustaka	Ket.
Flavonoid	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	Positif apabila menghasilkan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone, 1996)	+
Alkaloid	Terbentuk endapan putih & endapan coklat merah	terbentuk endapan putih & endapan coklat merah	Positif apabila terbentuk endapan merah sampai jingga pada pereaksi Dragendorf dan endapan putih pada pereaksi Mayer (Depkes, 1978)	+
Tanin	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman	Positif apabila terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Robinson 1995)	+
Steroid/ Triterpenoid	Terbentuk cincin coklat kemerahan	Terbentuk cincin coklat kemerahan	Positif triterpenoid terbentuk warna cincin coklat pada kedua lapisan, positif steroid terbentuk warna hijau atau biru (Nugrahani dkk, 2016)	+
Saponin	Terbentuk busa stabil setelah ditambahkan HCl 2N	Terbentuk busa stabil setelah ditambahkan HCl 2N	Terbentuk busa stabil \pm 10 menit setelah penambahan HCl 2N (Depkes 1978)	+

Identifikasi kandungan kimia pada serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. menunjukkan hasil bahwa dalam serbuk dan ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. mengandung senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, saponin. Hasil identifikasi senyawa kimia dapat dilihat pada lampiran 6.

8. Hasil fraksinasi ekstrak bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Fraksinasi adalah suatu cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan polaritasnya. Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dimulai dari pelarut non polar ke pelarut yang polar. Senyawa-senyawa yang tersari dalam setiap pelarut memiliki polaritas sesuai dengan pelarutnya. Senyawa yang bersifat non polar akan tersari pada pelarut non polar seperti *n*-heksana, senyawa yang bersifat

semi polar akan tersari pada pelarut semi polar seperti etil asetat dan senyawa yang bersifat polar akan tersari pada pelarut polar seperti air.

8.1 Fraksi *n*-Heksana. Ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana untuk mendapatkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti steroid, triterpenoid. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali volume 75 ml. Hasil fraksinasi *n*-heksana dilakukan pemekatan menggunakan water bath. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Rendemen fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	30	0,87	2,91
2	30	0,97	3,25
3	30	0,81	2,70
Rata-rata			2,95±0,28

Hasil fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana memiliki rendemen sebesar 2,95 % dengan nilai SD 0,28 yang menunjukkan jumlah komponen non polar yang dapat tertarik oleh pelarut dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. Hasil fraksi yang diperoleh berwarna kehijauan dengan konsistensi kental. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 13.

8.2 Fraksi Etil Asetat. Residu hasil ekstraksi cair-cair dengan *n*-Heksana dilakukan ekstraksi kembali menggunakan pelarut semi polar yaitu etil asetat untuk menarik senyawa yang bersifat semi polar seperti flavonoid, alkaloid, fenolik. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing dengan volume 75 ml. Hasil fraksinasi etil asetat dilakukan pemekatan menggunakan water bath. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Rendemen fraksi etil asetat dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	30	1,37	4,56
2	30	1,47	4,91
3	30	1,40	4,68
Rata-rata			4,72±1,80

Hasil fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat memiliki rendemen sebesar 4,72 % dengan nilai SD 1,80 yang menunjukkan jumlah komponen semi polar yang dapat tertarik oleh pelarut dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-*

sinensis L. Hasil fraksi yang diperoleh berwarna coklat kemerahan dengan konsistensi kental. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 13.

8.3 Fraksi Air. Residu dari fraksinasi etil asetat ditampung sehingga didapatkan fraksi air. Pelarut polar seperti air dapat menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti saponin, tanin. Hasil fraksinasi air dilakukan pemekatan menggunakan water bath. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Rendemen fraksi air dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	30	19,44	64,79
2	30	19,00	63,32
3	30	20,00	66,67
Rata-rata			64,93±1,68

Hasil fraksinasi menggunakan pelarut air memiliki rendemen sebesar 64,93% dengan nilai SD 1,68 yang menunjukkan jumlah komponen polar yang dapat tertarik oleh pelarut dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. Hasil fraksi yang diperoleh berwarna coklat kemerahan dengan konsistensi kental. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 13.

9. Hasil identifikasi bakteri uji

9.1 Identifikasi bakteri secara makroskopis. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara makroskopis dilakukan dengan cara menggores bakteri pada media selektif PSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Hasil identifikasi yaitu tumbuhnya koloni bakteri berbentuk bulat berwarna kehijauan. Warna hijau pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 disebabkan karena meningkatnya pigmen pioverdin karena adanya cetrimide dalam komposisi media PSA (Jawetz *et al.* 2007). Hasil goresan pada media PSA dapat dilihat pada lampiran 7.

9.2 Identifikasi bakteri secara mikroskopis. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara mikroskopis dilakukan dengan Pewarnaan Gram. Teknis Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara mengulaskan bakteri dalam objek glass kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan pada api, fiksasi dilakukan dengan tujuan agar bakteri menempel pada objek glass tanpa merusak struktur selnya. Preparat dilakukan pewarnaan dengan cara meneteskan Gram A ditunggu 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir,

selanjutnya ditetesi dengan Gram B tunggu 30 detik kemudian cuci dengan air mengalir, bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif akan berwarna ungu. Pewarnaan dilanjutkan dengan meneteskan Gram C untuk melunturkan zat warna, pada tahap ini bakteri Gram-positif akan tetap berwarna ungu karena bakteri Gram-positif memiliki dinding sel yang tebal sehingga dapat mempertahankan warna dengan baik sedangkan pada bakteri Gram-negatif dengan adanya Gram C dapat memecah lipid pada membran luar bakteri dan mengeluarkan kristal violet dari peptidoglikan yang menyebabkan warna akan luntur. Penetasan Gram D dilakukan sebagai zat pewarna penutup, hal ini menyebabkan bakteri Gram-positif tetap berwarna ungu dan bakteri Gram-negatif akan berwarna merah karena hanya bakteri gram negatif yang dapat menerima pewarna penutup. Preparat diamati dibawah mikroskop hingga perbesaran 100x kemudian diamati warna dan bentuk bakterinya. Hasil pewarnaan dibawah mikroskop menunjukkan hasil bakteri memiliki bentuk batang halus, berwarna merah, koloni membentuk rantai pendek dan soliter. Hal ini telah sesuai dengan hasil pewarnaan Gram pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang berbentuk batang, berwarna merah dan koloni dapat ditemukan soliter, berpasangan dan membentuk rantai pendek karena tergolong dalam bakteri Gram-negatif (Pratiwi 2008; Todar 2011). Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 8.

9.3 Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dilakukan dengan menanam bakteri pada media SIM, KIA, LIA, dan Citrat, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil identifikasi biokimia dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil identifikasi biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Media	Warna Media	Hasil	Pustaka (Radji, 2010)
SIM	Pertumbuhan koloni menyebar diseluruh media	- - +	- - +
KIA	Dasar merah, lereng merah	K/K S-	K/K S-
LIA	Dasar ungu, lereng ungu	K/K S-	K/K S-
Citrat	Biru	+	+

Hasil pengujian SIM dengan cara tusuk dan setelah ditambah 5 tetes masing-masing reagen Erlich A dan B menunjukkan hasil media berwarna kuning,

negatif sulfida, negatif indol dan positif motilitas yang ditunjukkan adanya pertumbuhan koloni menyebar pada media dan pada bekas tusukan, hal ini sesuai dengan pustaka bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 negatif sulfida karena tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida atau berwarna hitam. Negatif cincin merah karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptofan oleh enzim triptopanase menjadi indol dan asam piruvat yang berarti bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak menggunakan triptofan sebagai salah satu sumber karbon. Positif motilitas ditunjukkan dengan adanya penyebaran berwarna putih disekitar inokulasi.

Hasil pengujian KIA dengan cara tusuk gores menunjukkan hasil media berwarna merah pada lereng dan dasar, hal ini sesuai dengan pustaka bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak mampu memfermentasi glukosa dan laktosa sehingga tidak merubah warna media menjadi kuning akibat hasil fermentasi yang bersifat asam karena dalam media KIA mengandung laktosa, glukosa dan phenol red yang akan berubah warna menjadi kuning jika suasana berubah menjadi asam. negatif sulfida karena bakteri tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida atau berwarna hitam (Muhaimin *et al.* 2003).

Hasil pengujian LIA dengan cara tusuk gores menunjukkan hasil media berwarna ungu pada lereng dan dasar, hal ini sesuai dengan pustaka bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak mampu mendeaminasi lisin sehingga bersifat basa. Negatif sulfida karena bakteri tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida atau berwarna hitam (Muhaimin *et al.* 2003).

Hasil pengujian Citrat dengan cara tusuk gores menunjukkan hasil media berwarna biru, hal ini sesuai dengan pustaka bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal dan menghasilkan produk limbah berupa senyawa karbonat basa yang mampu meningkatkan pH menjadi basa sehingga menyebabkan perubahan warna media dari hijau menjadi biru (Muhaimin *et al.* 2003). Hasil pengujian biokimia dapat dilihat pada lampiran 9.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 ose biakan bakteri murni *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 masukkan dalam 10 ml media BHI, kemudian inkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam selanjutnya setarakan dengan standard Mc Farland 0,5.

Tujuan dilakukan penyetaraan dengan standard Mc Farland 0,5 adalah untuk memperkirakan jumlah bakteri yang digunakan dalam pengujian atau pengendalian jumlah bakteri. Mc Farland 0,5 terbuat dari 0,05 ml BaCl₂ dalam 9,95 ml H₂SO₄. Hasil pembuatan suspensi bakteri sudah sesuai dengan standard Mc Farland 0,5 yang setara dengan perkiraan kepadatan sel 0,5 x 10⁸ CFU/ml.

11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

11.1 Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam konsentrasi 10%, 20% dan 40% dilakukan dengan cara cakram yang sudah ditetesi bahan uji sebanyak 50 µl kemudian didiamkan 4-5 menit agar bahan uji dapat terserap maksimal dalam kertas cakram, selanjutnya kertas cakram ditempelkan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang sudah diinokulasikan bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan perataan menggunakan kapas lidi steril dan didiamkan selama 10 menit agar bakteri berdifusi kedalam media.

Aktivitas antibakteri diukur dari diameter zona hambat yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar cakram. Diameter zona hambat menurut Davis dan Stout (1971) dikelompokkan menjadi sangat kuat > 20 mm, kuat 10-20 mm, sedang 5-10 mm, dan lemah < 5 mm. Zat uji dibuat seri konsentrasi menggunakan pelarut DMSO 3%. Pelarut DMSO 3% digunakan karena DMSO 3% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan dapat melarutkan ekstrak serta ketiga fraksi. Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin 5 µl. Hasil pengujian aktivitas ekstrak etanol,

fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi

Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)			
	I	II	III	Rata-rata ± SD
Konsentrasi 40 %				
Ekstrak	15	16	15,6	15,53±0,50
Fraksi <i>n</i> -Heksana	11	12	11	11,33±0,58
Fraksi Etil Asetat	16,3	18	18,5	17,60±1,15
Fraksi Air	13	14	13	13,33±0,58
Konsentrasi 20 %				
Ekstrak	14,5	13	14	13,83±0,76
Fraksi <i>n</i> -Heksana	9	9,1	8,5	8,87±0,32
Fraksi Etil Asetat	14,3	15	15	14,77±0,40
Fraksi Air	12,1	12	11	11,70±0,61
Konsentrasi 10 %				
Ekstrak	9	10,2	9	9,40±0,69
Fraksi <i>n</i> -Heksana	7	6	6,8	6,60±0,53
Fraksi Etil Asetat	11	12	12	11,67±0,58
Fraksi Air	8	8,2	7	7,73±0,64
Kontrol Positif				
Siprofloksasin 5µg	26,4	27	26	26,47±0,50
Kontrol Negatif				
DMSO 3%	0	0	0	0±0

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan cakram menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Hasil pengujian diameter zona hambat ekstrak dengan konsentrasi 40% (15,53 mm) dan ekstrak dengan konsentrasi 20% (13,83 mm) termasuk dalam kategori kuat, sedangkan ekstrak dengan konsentrasi 10% (9,40 mm) termasuk dalam kategori sedang. Diameter zona hambat fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi 40% (11,33 mm) termasuk dalam kategori kuat, sedangkan fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi 20% (8,87 mm) dan fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi 10% (6,60 mm) termasuk dalam kategori sedang. Diameter zona hambat fraksi etil asetat dengan konsentrasi 40% (17,60 mm), fraksi etil asetat dengan konsentrasi 20% (14,77 mm) dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10%

(11,67 mm) termasuk dalam kategori kuat. Diameter zona hambat fraksi air dengan konsentrasi 40% (13,33 mm) dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 20% (11,70 mm) termasuk dalam konsentrasi kuat, sedangkan fraksi air dengan konsentrasi 10% (7,73 mm) termasuk dalam kategori sedang. Kontrol positif yaitu siprofloksasin memiliki diameter zona hambat 26,47 yang termasuk dalam kategori sangat kuat.

Aktivitas antibakteri terbesar dari hasil diameter zona hambat adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi 40% yang dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Aktivitas antibakteri terbesar pada fraksi etil asetat diduga disebabkan karena kandungan flavonoid, saponin dan tanin yang tertarik pada fraksi etil asetat yang memiliki sifat semi polar. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme membentuk ikatan dengan protein lalu mendenaturasi ikatan protein pada membran sel yang menyebabkan sel menjadi lisis (Sari 2010). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme membentuk ikatan dengan molekul hidrofilik dan molekul lipofilik sehingga dapat merusak membran sitoplasma dan membunuh mikroba (Cheeke 2000). Tanin memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme menginaktivasi enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel sehingga pembentukan dinding sel kurang sempurna yang menyebabkan lisisnya sel (Cowan 1999).

Konsentrasi yang memiliki aktivitas paling besar adalah konsentrasi 40%, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi berbanding lurus dengan peningkatan diameter zona hambat. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 10.

Hasil pengujian dianalisis menggunakan statistik SPSS. Hasil pengujian menggunakan *One-Sample Kolmogorof-Smirnov* diperoleh signifikan $0,591 > 0,05$ maka H_0 diterima, sehingga dapat diketahui bahwa data terdistribusi normal, berdasarkan pengujian *Levene's Test of Equality of Error Variances* didapatkan hasil nilai signifikan $0,072 > 0,05$ yang berarti data pengujian homogen sehingga dapat dilanjutkan ke pengujian *Two way ANOVA* untuk membandingkan pengaruh larutan uji, konsentrasi terhadap daya hambat. Data yang dianalisis adalah ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air berbagai

konsentrasi serta kontrol positif yaitu siprofloksasin dan kontrol negatif yaitu DMSO 3% yang dibandingkan dengan zona hambatnya.

Hasil pengujian dengan metode Tukey pada tabel *Homogeneous subsets* yang memiliki tujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan yang ditunjukkan dengan larutan uji yang terdapat dalam subset yang berbeda memiliki perbedaan yang nyata dalam aktivitas antibakteri sedangkan larutan uji yang terdapat dalam satu subset tidak memiliki perbedaan yang nyata dalam aktivitas antibakterinya. Hasil analisis menunjukkan terdapat 6 subset yang menunjukkan bahwa ekstrak dan ketiga fraksi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang dibandingkan dengan kontrol negatif, berdasarkan 6 subset tersebut juga dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dibandingkan fraksi *n*-heksana, fraksi air dan ekstrak, tetapi fraksi etil asetat tidak memiliki aktivitas yang sebanding dengan kontrol positif. Pengujian terhadap fraksi etil asetat dapat dilanjutkan ke tahap isolasi terhadap senyawa aktifnya untuk dapat mengembangkan aktivitas antibakterinya. Hasil analisis dengan SPSS dapat dilihat pada lampiran 17.

11.2 Hasil pengujian antibakteri secara dilusi. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dilakukan dengan tujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pengujian menggunakan fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dengan seri konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,15625%, 0,078125%, kontrol positif dan kontrol negatif.

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan pada masing-masing tabung yang kemudian digores pada media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) untuk melihat pertumbuhan bakteri uji. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat diketahui dari kekeruhan pada tabung uji sesudah diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, namun pada penelitian ini kekeruhan larutan pada tabung uji tidak dapat ditentukan karena fraksi yang digunakan berwarna gelap dan pekat sehingga KHM tidak dapat ditentukan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara penggoresan semua larutan dalam tabung uji pada media PSA kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, kemudian amati

pertumbuhan bakterinya. Konsentrasi yang tidak ada pertumbuhan bakterinya dapat ditetapkan sebagai KBM. Hasil pengujian dilusi dapat dilihat pada tabel 12

Tabel 12. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) hasil pengujian dilusi fraksi etil asetat bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Konsentrasi uji % b/v	Fraksi etil asetat		
	Replikasi		
	I	II	III
Kontrol (-)	-	-	-
40 %	-	-	-
20 %	-	-	-
10 %	-	-	-
5 %	+	+	+
2,5 %	+	+	+
1,25 %	+	+	+
0,625 %	+	+	+
0,3125 %	+	+	+
0,15625 %	+	+	+
0,078125 %	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan

(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : fraksi etil asetat

Kontrol (+) : suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi fraksi etil asetat dari ekstrak etanol bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan tiga kali replikasi. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) adalah 10% yang dapat dilihat dari tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media PSA diketiga replikasinya sedangkan pada konsentrasi 5% ada pertumbuhan bakteri pada media PSA diketiga replikasinya. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi terdapat pada lampiran 11.

12. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi teraktif bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang dibandingkan dengan baku. Identifikasi dilakukan pada ekstrak dan fraksi teraktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu fraksi etil asetat dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

12.1 Hasil identifikasi flavonoid. Pengujian dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-butanol-asam asetat glasial-air (4:1:5). Pereaksi semprot yang digunakan adalah sitoborat dan uap ammonia. Baku yang digunakan adalah baku kuersetin. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 13

Tabel 13. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dengan KLT

	Kode	Rf	Warna Noda			
			Visual	Visual (Sitoborat)	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	A	0,92	Kekuningan	Kuning	Kuning	Kuning
Ekstrak	B ₁	0,92	Kekuningan	Kuning	Kuning	Kuning
	B ₂	0,79	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
	B ₃	0,71	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
	B ₄	0,61	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
	B ₅	0,57	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
Fraksi	C ₁	0,92	Kekuningan	Kuning	Kuning	Kuning
	C ₂	0,73	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
	C ₃	0,61	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat mempunyai Rf 0,92, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kekuningan secara visual, berwarna kuning setelah disemprot pereaksi sitoborat, berfluoresen kuning pada UV 254 nm dan berwarna ungu kuning pada UV 366 nm. Hasil menunjukkan di dalam ekstrak dan fraksi etil asetat dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. mengandung senyawa flavonoid yang dapat dilihat dari harga Rf yang sama dengan baku serta warna noda pada UV 254 nm dan 366 nm setelah disemprot dengan sitoborat. Hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran 12.

12.2 Hasil identifikasi tanin. Pengujian dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase kloroform-metanol-air (7:3:4). Pereaksi semprot yang digunakan adalah FeCl₃. Baku yang digunakan adalah baku asam galat . Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Hasil identifikasi senyawa tanin dengan KLT

	Kode	Rf	Warna noda			
			Visual	Visual (FeCl ₃)	UV 254nm	UV 366 nm
Baku	A	0,96	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Kebiruan
Ekstrak	B ₁	0,98	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Kebiruan
	B ₂	0,64	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Terang	Kecoklatan
Fraksi	C	0,96	Kecoklatan	Kecoklatan	Peredaman	Kebiruan

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat mempunyai Rf 0,96 dan 0,98, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kecoklatan secara visual, mengalami peredaman pada UV 254 nm dan berwarna kebiruan pada UV 366 nm. Hasil menunjukkan bahwa didalam ekstrak dan fraksi etil asetat dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. mengandung senyawa tanin yang dapat dilihat dari harga Rf yang hampir sama dengan baku serta warna noda pada UV 254nm dan 366 nm setelah disemprot FeCl₃. Hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran 12.

12.3 Hasil identifikasi alkaloid. Pengujian dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak toluene-etil asetat-dietil amin (7:2:1). Pereaksi semprot yang digunakan adalah pereaksi dragendorf. Baku yang digunakan adalah baku nikotin . Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Hasil identifikasi senyawa alkaloid dengan KLT

	Kode	Rf	Warna noda			
			Visual	Visual Dragendorf	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	A	0,82	Tidak berwarna	Jingga	Kebiruan	Ungu gelap
Ekstrak	B ₁	0,82	Tidak berwarna	Jingga	Kebiruan	Ungu gelap
	B ₂	0,68	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Peredaman	Ungu gelap
	B ₃	0,21	kecoklatan	kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap
Fraksi	C ₁	0,82	Tidak berwarna	Jingga	Kebiruan	Ungu gelap
	C ₂	0,66	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Peredaman	Ungu gelap
	C ₃	0,20	kecoklatan	kecoklatan	Peredaman	Ungu gelap

Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat mempunyai Rf 0,82 dan 0,82, bercak yang dihasilkan menunjukkan warna jingga secara visual, berwarna kebiruan pada UV 254 nm dan berwarna ungu gelap pada UV 366 nm setelah disemprot dragendorf. Hasil menunjukkan bahwa didalam ekstrak dan fraksi etil asetat dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. mengandung senyawa alkaloid yang dapat dilihat dari harga Rf yang sama dengan baku serta warna yang dihasilkan yaitu jingga secara visual setelah disemprot dragendorf. Hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran 12.