

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **1. Hasil determinasi tanaman karandas (*Carissa carandas* L.)**

Tanaman karandas yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Tujuan determinasi adalah untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian ini. Hasil determinasi menurut 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 – 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.**

Berdasarkan hasil identifikasi diketahui bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman karandas (*Carissa carandas* L.). Hasil determinasi tanaman karandas dapat dilihat pada lampiran 1.

#### **2. Pengumpulan bahan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karandas yang masih segar, bersih, dan bebas hama. Daun diambil secara acak dari pangkal sampai ujung daun, tidak teralu muda, dan tidak teralu tua. Daun karandas diperoleh dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat. Gambar daun karandas segar dapat dilihat pada lampiran 2.

#### **3. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun karandas**

Daun karandas yang segar dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir. Daun yang sudah bersih diletakkan pada loyang alumunium dan dikeringkan di dalam oven 50°C selama 4-5 hari. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh jamur atau mikroorganisme lain, dan mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Daun karandas yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling dan diblender. Serbuk diayak dengan ayakan nomor 40, sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk

bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Gambar serbuk daun karandas dapat dilihat pada lampiran 2.

**Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun karandas**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%) bb
8000	1600	20,00

Hasil rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun karandas sebesar 20% b/b. Hasil perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun karandas dapat dilihat pada tabel 1 dan lampiran 4.

#### **4. Hasil penetapan kadar air serbuk daun karandas**

Penetapan kadar air serbuk daun karandas dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Prinsip kerja *Sterling Bidwell* adalah dilakukan pemanasan dengan api langsung, kemudian ditunggu sampai air tidak menetes. Volume air dibaca pada skala, kemudian dihitung dengan rumus untuk menetapkan kadar air. Hasil penetapan kadar air serbuk daun karandas dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun karandas**

No	Bobot penimbangan (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar air %
1.	20,0	1,6	8,0
2.	20,0	1,4	7,0
3.	20,0	1,8	9,0
Rata-rata ± SD			8,0 ± 1,0

Berdasarkan tabel 2 dapat diketahui bahwa rata-rata kadar air dalam serbuk daun karandas yang diperoleh adalah 8,0%. Kadar air serbuk daun karandas memenuhi persyaratan kadar air simplisia yaitu kurang dari 10% (Katno 2008). Gambar dan hasil perhitungan penetapan kadar air serbuk daun karandas dapat dilihat pada lampiran 5.

#### **5. Hasil pembuatan ekstrak etanolik daun karandas**

Pembuatan ekstrak etanolik dari daun karandas dilakukan dengan metode maserasi. Kelebihan metode maserasi adalah mudah dalam pengerjaannya, alatnya sederhana, dan dapat menghindari kerusakan senyawa aktif yang rusak akibat pemanasan. Serbuk daun karandas yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak

sebanyak 700 gram simplisia. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup dengan wadah gelap agar terhindar dari sinar matahari langsung.

**Tabel 3. Pembuatan ekstrak etanolik daun karandas**

Serbuk daun karandas (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%) b/b
700	174,28	24,89

Hasil dari maserasi daun karandas didapatkan ekstrak berwarna coklat tua dan berbentuk kental sebanyak 174,28 gram. Presentase rendemen ekstrak etanol daun karandas diperoleh sebesar 24,89%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana, kloroform, dan air. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol daun karandas dapat dilihat pada tabel 3 dan lampiran 6.

## 6. Hasil susut pengeringan ekstrak etanol daun karandas

Penetapan susut pengeringan ekstrak bertujuan untuk mengetahui kelembaban dalam ekstrak daun karandas. Susut pengeringan mewakili kandungan senyawa yang menguap. Kelembaban tidak boleh melebihi 10% untuk mengurangi kontaminasi ekstrak oleh mikroorganisme dan mencegah kerusakan ekstrak. Hasil susut pengeringan ekstrak daun karandas dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil susut pengeringan ekstrak daun karandas**

Serbuk	Penimbangan (g)	Kadar lembab (%)
1	2,0	1,8
2	2,0	1,4
3	2,0	1,4
Rata-rata ± SD		1,53 ± 0,23

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas sebesar 1,53%. Presentase kadar lembab yang terlalu kecil dapat disebabkan oleh lapisan kaku yang terbentuk dipermukaan ekstrak saat proses susut pengeringan, sehingga lapisan dibawahnya tidak dapat menguap secara optimal. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar lembab ekstrak daun karandas memenuhi parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, dimana kadar diperoleh kurang dari 10% (Depkes 2000). Gambar dan hasil perhitungan penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas dapat dilihat pada lampiran 7.

## 7. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun karandas

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan metode uji esterifikasi. Uji bebas etanol bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung alkohol sehingga tidak mengganggu aktivitas antibakteri dari ekstrak daun karandas. Ekstrak yang sudah bebas dari alkohol dapat dilanjutkan ke tahap fraksinasi.

**Tabel 5. Uji bebas etanol dari ekstrak daun karandas**

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Kurniawati 2015).

Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak daun karandas telah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Hasil uji bebas etanol dapat dilihat pada tabel 5 dan lampiran 8.

## 8. Hasil fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan dengan tujuan memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dalam dua pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda pula (Pratiwi *et al.* 2016). Tiap 10 gram ekstrak kental daun karandas dilakukan fraksinasi dengan tiga pelarut berbeda, yaitu pelarut *n*-heksana (nonpolar), kloroform (semipolar), dan air (polar). Gambar hasil fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 9.

**Tabel 6. Rendemen fraksi *n*-heksana, kloroform dan air dari ekstrak daun karandas**

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

**8.1. Fraksinasi *n*-heksana.** Ekstrak daun karandas dilarutkan dengan aquadest sebanyak 75 mL, kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut nonpolar yaitu *n*-heksana dengan alat corong pisah. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 75 mL, kemudian hasil fraksi *n*-heksana diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu sisa fraksinasi

dengan pelarut *n*-heksana dilakukan ekstraksi lanjutan dengan menggunakan pelarut kloroform. Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksana dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi *n*-heksana daun karandas berwarna hijau tua, dan tak berbau. Pada tabel 6 diperoleh perhitungan presentase rendemen fraksi *n*-heksana daun karandas sebesar 4,20%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana daun karandas dapat dilihat pada lampiran 10.

**8.2. Fraksinasi kloroform.** Residu sisa fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana difraksinasi 3 kali dengan pelarut kloroform masing-masing sebanyak 75 mL. Hasil fraksi kloroform diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C. Rendemen hasil fraksi kloroform dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi kloroform daun karandas berwarna hijau tua, dan tak berbau. Pada tabel 6 diperoleh perhitungan presentase rendemen fraksi kloroform daun karandas sebesar 25,04%. Hasil perhitungan rendemen fraksi kloroform daun karandas dapat dilihat pada lampiran 10.

**8.3. Fraksinasi air.** Residu sisa fraksinasi dengan pelarut kloroform daun karandas dilakukan pemekatan dengan cara diuapkan di atas *waterbath* sehingga diperoleh fraksi air. Rendemen hasil fraksi air dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi air daun karandas berwarna merah tua, dan tak berbau. Pada tabel 6 diperoleh perhitungan presentase rendemen fraksi air daun karandas sebesar 61,09%. Hasil perhitungan rendemen fraksi air daun karandas dapat dilihat pada lampiran 10.

## **9. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun karandas**

Identifikasi kandungan senyawa kimia merupakan pengujian pendahuluan untuk mengetahui kebenaran kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam serbuk dan ekstrak daun karandas. Senyawa yang akan diidentifikasi yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid, dan steroid. Hasil pengujian kandungan kimia dapat dilihat pada tabel 7.

**Tabel 7. Hasil uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun karandas**

Senyawa	Hasil		Pustaka	Ket
	Serbuk	Ekstrak		
Flavonoid	Warna merah pada lapisan amil alkohol	Warna merah pada lapisan amil alkohol	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ismiyarto 2009).	(+)
Alkaloid	Dragendof : Terbentuk endapan jingga Mayer: Terbentuk endapan putih	Dragendof : Terbentuk endapan jingga Mayer: Terbentuk endapan putih	Uji positif ditandai dengan dengan penambahan Dragendrof akan terbentuk endapan jingga dan dengan penambahan Mayer terbentuk endapan putih hingga kekuningan (Ismiyarto 2009).	(+)
Tanin	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman (Robinson 1995).	(+)
Saponin	Buih tetap setinggi 2 cm	Buih tetap setinggi 2 cm	Uji positif ditandai dengan terbentuknya buih mantap kurang lebih 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Ismiyarto 2009).	(+)
Triterpnoide /steroid	Terbentuk cincin warna merah	Terbentuk cincin warna merah	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan adanya steroid, sedangkan bila ungu atau merah menandakan adanya triterpenoid (Ismiyarto 2009).	(+)

keterangan : ( + ) : mengandung golongan senyawa

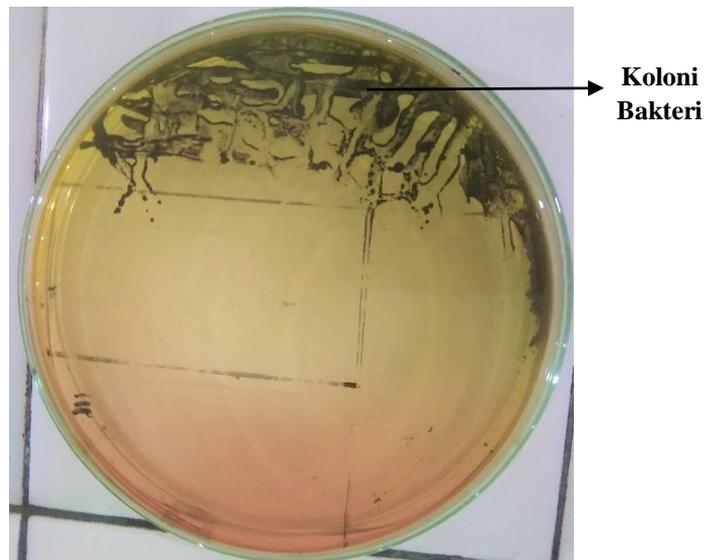
( - ) : tidak mengandung golongan senyawa

Hasil identifikasi kandungan senyawa pada tabel 7 menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak dari daun karandas mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid, dan steroid. Gambar hasil identifikasi kandungan kimia dari serbuk dan ekstrak daun karandas dapat dilihat pada lampiran 11.

## 10. Hasil identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**10.1. Identifikasi makroskopis.** Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditambah kalium tellurit 3,5% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna hitam dan warna medium di sekitar menjadi berwarna kuning. Koloni yang berwarna hitam ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan mereduksi kalium tellurit menjadi metalik tellurium. Warna disekitar koloni berwarna kuning karena

*Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam. Fermentasi manitol dideteksi oleh perubahan warna indikator phenol red dari merah menjadi kuning (Supartono 2006). Gambar hasil identifikasi secara makroskopis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 8.

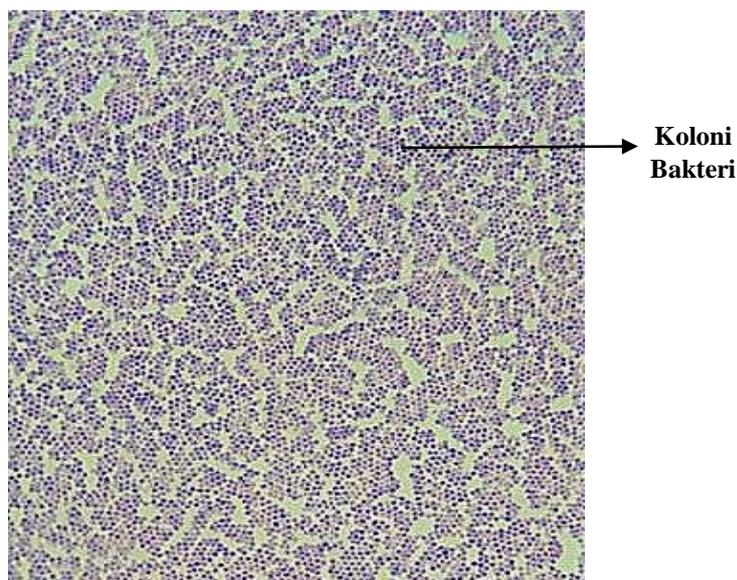


**Gambar 1.** Hasil identifikasi secara makroskopis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA).

**10.2. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui sifat Gram dan kemurnian sel bakteri. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan Gram positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur (Supartono 2006). Bakteri Gram positif mengandung lebih banyak protein (peptidoglikan) dibandingkan dengan bakteri Gram negatif yang mengandung lemak (lipopolisakarida) dan dinding selnya yang lebih tipis. Pemberian kristal violet pada bakteri Gram positif akan meninggalkan warna ungu pada dinding selnya, kemudian diberi larutan lugol iodine sehingga akan terbentuk suatu kompleks antara kristal violet dan iodin.

Pemberian alkohol pada pewarnaan Gram menyebabkan lipid terekstraksi sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel Gram negatif. Pewarna safranin masuk ke dalam dinding sel dan menyebabkan dinding sel berwarna merah pada bakteri Gram negatif, sedangkan pada bakteri Gram positif dinding selnya akan

terdehidrasi dengan perlakuan alkohol, pori-pori mengkerut, daya rembes dinding sel dan membran menurun sehingga pewarnaan safranin tidak dapat masuk dan membuat sel tetap berwarna ungu dan kompleks iodin-kristal tidak luntur saat dicuci dengan alkohol (Madigan *et al.* 2011). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan tampaknya koloni berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Gambar hasil pewarnaan Gram bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 9.



**Gambar 2.** Hasil pewarnaan Gram bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**10.3. Uji katalase.** Uji katalase positif ditandai dengan adanya buih atau gelembung udara setelah koloni ditetesi dengan  $H_2O_2$  3%. Uji ini bertujuan untuk membedakan antara genus *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini mengaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida akan terbentuk saat metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan enzim tersebut (Jawetz *et al.* 2012). Gambar hasil uji katalase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 10.



**Gambar 3. Hasil uji katalase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

**10.4. Uji koagulase.** Uji koagulase positif ditandai dengan adanya gumpalan plasma yang tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim koagulase. Koagulase merupakan enzim yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat berikatan dengan protombin inang untuk membentuk sebuah kompleks yang disebut stafilotrombin. Stafilotrombin ini dapat mengubah fibrinogen menjadi fibrin untuk membentuk lapisan pelindung fibrin disekitar bakteri dan membatasi rekrutmen sel imun (Jawetz *et al.* 2012). Gambar hasil uji koagulase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 11.



**Gambar 4. Hasil uji koagulase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

## **11. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Standar Mc Farland merupakan suatu standar yang diperoleh dengan cara menyetarakan konsentrasi mikroba menggunakan larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Standar kekeruhan Mc Farland ini bertujuan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu persatu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba (Haris *et al.* 2013). Gambar hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 12.

## **12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air daun karandas.**

**12.1. Metode difusi.** Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi bertujuan untuk skrining aktivitas antibakteri dari fraksi-fraksi dan ekstrak daun karandas. Besarnya zona hambat yang terbentuk dapat menentukan fraksi yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Larutan stok dibuat dalam tiga konsentrasi yaitu 50%; 25%; 12,5%. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% dan kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin 5 µg/disk. Kontrol positif digunakan sebagai standar untuk melihat dan membandingkan kemampuan penghambatan ekstrak dan fraksi daun karandas.

Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dilakukan dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri yang digunakan disetarakan dengan Mc Farland dan diencerkan lagi sebanyak 10<sup>-3</sup>. Larutan stok berisi ekstrak dan fraksi daun karandas ditetesi di atas cakram disk berukuran 6 mm sebanyak 50 µL. Adanya area jernih disekitar cakram disk yang tidak ditumbuhi bakteri menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air daun karandas memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil diameter hambat pengujian aktivitas antibakteri daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Diameter hambatan uji aktivitas antibakteri daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi**

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambatan (mm)			Rata-rata ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Ekstrak	50%	12,00	10,25	11,00	11,08 ± 0,88
	25%	9,00	9,00	8,00	8,67 ± 0,58
	12,50%	7,75	8,00	7,25	7,67 ± 0,38
Fraksi <i>n</i> -heksana	50%	10,00	10,25	9,00	9,75 ± 0,66
	25%	9,00	8,25	8,00	8,42 ± 0,52
	12,50%	7,00	6,50	7,00	6,83 ± 0,29
Fraksi kloroform	50%	15,25	15,00	14,75	15,00 ± 0,25
	25%	12,75	13,00	12,00	12,58 ± 0,52
	12,50%	8,75	9,25	9,00	9,00 ± 0,25
Fraksi air	50%	10,00	8,00	11,75	9,92 ± 1,88
	25%	9,00	8,75	8,00	8,58 ± 0,52
	12,50%	8,00	7,00	7,75	7,58 ± 0,52
Siprofloksasin	5 µg	23,00	22,00	24,00	23,00 ± 1,00
DMSO	5%	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi-fraksi dan ekstrak daun karandas menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Dari tabel 8 dapat dilihat bahwa fraksi kloroform 50% mempunyai daya hambatan yang paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya. Hasil rata-rata diameter daya hambatan fraksi kloroform konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% berturut-turut adalah 15,00 mm, 12,58 mm dan 9,00 mm, sedangkan siprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki diameter sebesar 23,00 mm. Kontrol negatif yaitu DMSO 5% yang tidak memiliki daya hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah dilakukan orientasi. DMSO merupakan salah satu pelarut sampel yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik nonpolar maupun polar (Mukhriani *et al.* 2015). Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri dari daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi dapat dilihat pada lampiran 13.

Analisis data menggunakan *Analisis of Varians* (ANOVA) *One Way*. Hasil uji dengan *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh signifikansi  $0,108 > 0,05$  ( $H_0$  diterima), maka dapat disimpulkan data terdistribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan uji *Analisis of Varians* (ANOVA) *One Way*. Penggunaan metode ANOVA *One Way* bertujuan untuk membandingkan perbedaan diameter hambat dari tiap konsentrasi antara ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, fraksi air, kontrol positif dan kontrol negatif. Nilai probabilitas *Levene Statistic* adalah  $0,064 > 0,05$  yang artinya keempat sampel memiliki varian yang sama (homogen). Hasil signifikasi dari data uji ANOVA adalah  $0,00 < 0,05$  yang artinya keempat sampel mempunyai perbedaan yang nyata dalam nilai diameter zona hambat. Pada tabel *Tukey HSD* terdapat tanda \* pada *Mean Difference* yang menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Tabel *Homogenous Subset* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogenous Subset* terbagi dalam 8 subset, kelompok yang berada pada 1 subset yang sama menunjukkan perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Diameter hambat subset 1-8 diketahui mempunyai perbedaan aktivitas antibakteri. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov*, *Levene Statistic* dan ANOVA dapat dilihat pada lampiran 19.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa fraksi kloroform 50% mempunyai aktivitas terbesar dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lain. Fraksi kloroform 50% juga mempunyai perbedaan yang signifikan dengan ekstrak dan fraksi lain. Sifat kloroform yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan dengan fraksi polar dan fraksi nonpolar. Berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dengan KLT, fraksi kloroform lebih banyak menarik senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri yakni alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan steroid, hal tersebut mengakibatkan fraksi kloroform menjadi fraksi teraktif dan membentuk daya hambat paling besar dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya.

Ekstrak etanol daun karandas mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun karandas, tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak mampu

bekerja secara optimum sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dibandingkan fraksi kloroform. Fraksi air dan fraksi *n*-heksana memiliki daya hambat yang lebih kecil dibandingkan fraksi kloroform, hal tersebut kemungkinan dikarenakan fraksi air dan fraksi *n*-heksana tidak banyak menarik senyawa yang aktif sebagai antibakteri.

Fraksi kloroform mampu menarik senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin, dan steroid. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati (Nimah *et al.* 2012). Flavonoid sebagai antibakteri mempunyai mekanisme kerja membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri diikuti keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid juga berperan dalam inhibisi sintesis DNA-RNA melalui interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat (Nuria *et al.* 2009). Mekanisme triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri dan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan 1999). Senyawa steroid memiliki polisakarida sehingga dapat menembus membran sel bakteri dan menyebabkan sel bakteri tersebut rusak atau mati (Nimah *et al.* 2012).

**12.2. Metode dilusi.** Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bertujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil uji difusi menunjukkan bahwa fraksi kloroform merupakan fraksi yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sehingga dilanjutkan dengan metode dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam uji dilusi untuk mendapatkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195% serta kontrol (+), dan kontrol (-). Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

dan kontrol negatif menggunakan fraksi kloroform dengan konsentrasi 50%. Hasil penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif kloroform terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Hasil penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif kloroform terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

No	Konsentrasi (%)	Fraksi kloroform		
		Replikasi		
		1	2	3
1	25,00	-	-	-
2	12,50	-	-	-
3	6,25	-	-	-
4	3,12	+	+	+
5	1,56	+	+	+
6	0,78	+	+	+
7	0,39	+	+	+
8	0,19	+	+	+
9	K(+)	+	+	+
10	K(-)	-	-	-

**Keterangan :** ( + ) : ada pertumbuhan bakteri

( - ) : tidak ada pertumbuhan bakteri

**K(+)** : suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**K(-)** : fraksi kloroform konsentrasi 50%

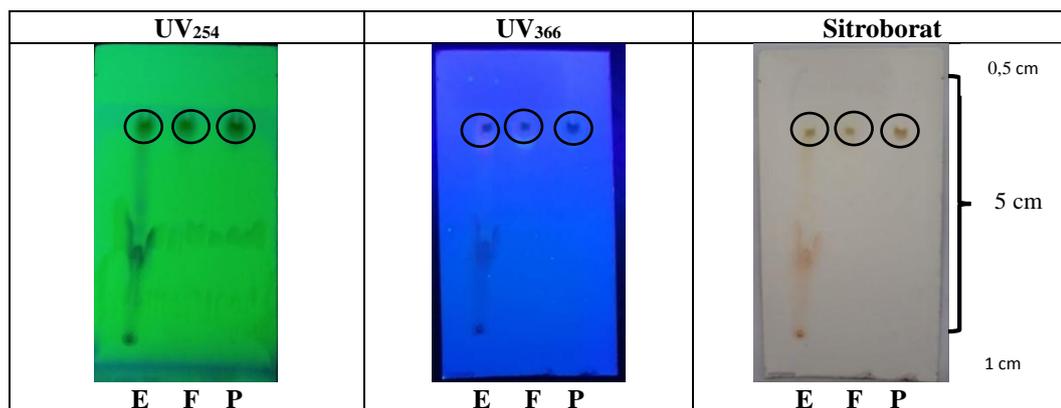
Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih, akan tetapi pada saat uji dilusi hal ini sulit untuk diamati karena fraksi yang digunakan terlihat pekat sehingga perlu dilakukan pengamatan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) untuk masing-masing tabung. Penetapan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media VJA. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri uji. Nilai KBM diperoleh pada konsentrasi 6,25% yang merupakan konsentrasi terendah dari fraksi kloroform daun karandas yang dapat membunuh pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC

25923. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri dari daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 14.

### 13. Hasil Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara KLT

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada fraksi teraktif. Identifikasi kandungan kimia dengan uji Kromatografi lapis tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi kloroform karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**13.1. Hasil identifikasi flavonoid.** Identifikasi golongan senyawa flavonoid dengan KLT dikatakan positif jika pada penyemprotan dengan pereaksi sitroborat menunjukkan warna kuning atau kuning kecoklatan. Pada sinar UV<sub>254</sub> mengalami peredaman, pada sinar UV<sub>366</sub> akan berflouresensi kuning, biru atau ungu, dan terlihat kuning tanpa pereaksi (Koirewoa *et al.* 2012).



Gambar 5. Hasil identifikasi flavonoid fraksi kloroform daun karandas fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5).

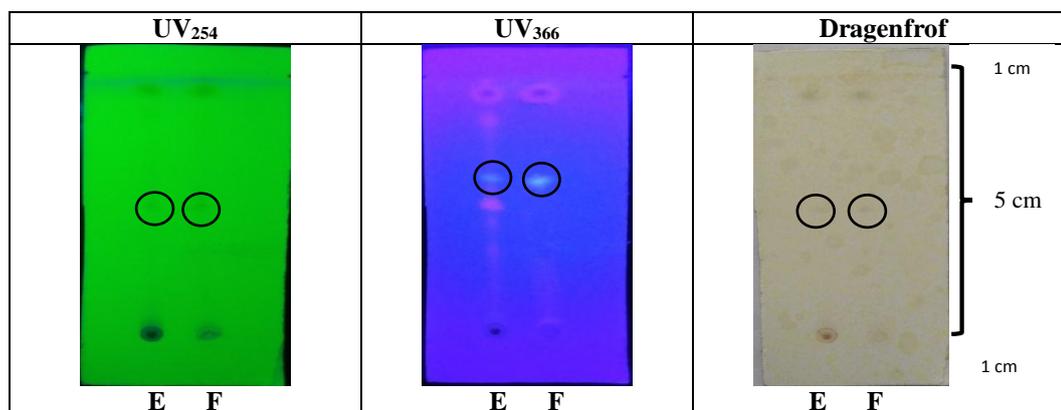
**Keterangan :**

- E : Ekstrak etanol
- F : Fraksi kloroform
- P : Kuersetin

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif daun karandas menunjukkan bahwa fraksi kloroform positif mengandung senyawa flavonoid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning kecoklatan setelah penyemprotan dengan sitroborat, berwarna biru di bawah UV<sub>366</sub>, dan nilai R<sub>f</sub> yang dihasilkan ekstrak serta fraksi kloroform sebesar 0,74 sama seperti nilai R<sub>f</sub> baku kuersetin. Hasil perhitungan R<sub>f</sub> dapat dilihat pada lampiran 17.

Flavonoid adalah senyawa turunan polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$  yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga atom karbon yang merupakan rantai alifatik (Nugrahaningtyas *et al.* 2005). Flavonoid sebagai antibakteri mempunyai mekanisme kerja membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri diikuti keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid juga berperan dalam inhibisi sintesis DNA-RNA melalui interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat (Nuria *et al.* 2009).

**13.2. Hasil Identifikasi alkaloid.** Identifikasi golongan senyawa alkaloid dengan KLT dikatakan positif jika pada penyemprotan dengan pereaksi Dragendrof menunjukkan warna coklat jingga sampai merah tua. Pada sinar  $UV_{366}$  akan berflouresensi kuning atau biru dan pada  $UV_{254}$  berwarna jingga, dan ungu atau biru kehijauan tanpa pereaksi (Budiman *et al.* 2010).



Gambar 6. Hasil identifikasi alkaloid fraksi kloroform daun karandas fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : etanol (94 : 4).

**Keterangan :**

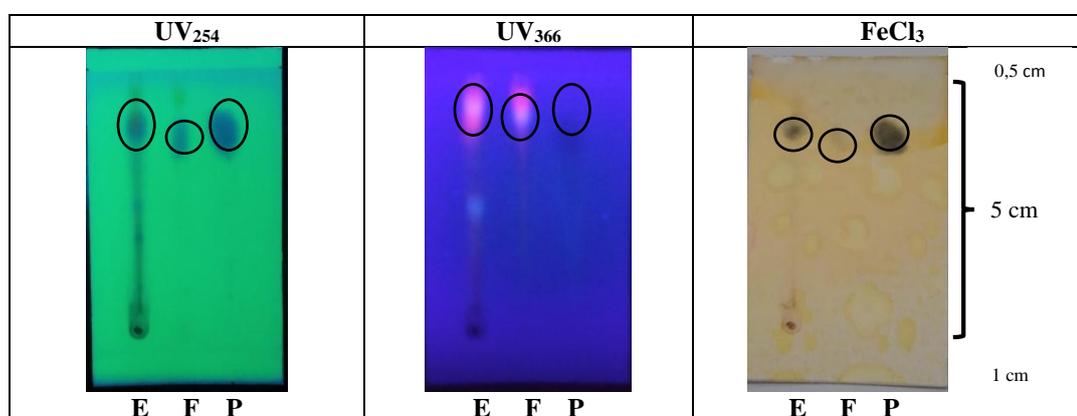
**E :** Ekstrak etanol

**F :** Fraksi kloroform

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif daun karandas menunjukkan bahwa fraksi kloroform positif mengandung senyawa alkaloid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna coklat setelah penyemprotan dengan Dragendroff, berwarna biru di bawah  $UV_{366}$ , dan berwarna jingga di bawah  $UV_{254}$ . Nilai Rf yang dihasilkan ekstrak dan fraksi kloroform sebesar 0,46. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 17.

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, dan dapat bereaksi dengan pereaksi alkaloid. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati (Nimah *et al.* 2012).

**13.3. Hasil Identifikasi tanin.** Identifikasi senyawa tanin dengan KLT dikatakan positif jika di bawah UV<sub>254</sub> berwarna hijau gelap, di bawah UV<sub>366</sub> ungu kehitaman dan menggunakan pereaksi FeCl<sub>3</sub> berwarna hitam (Nuria *et al.* 2009).



Gambar 7. Hasil identifikasi tanin fraksi kloroform daun karandas fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1).

**Keterangan :**

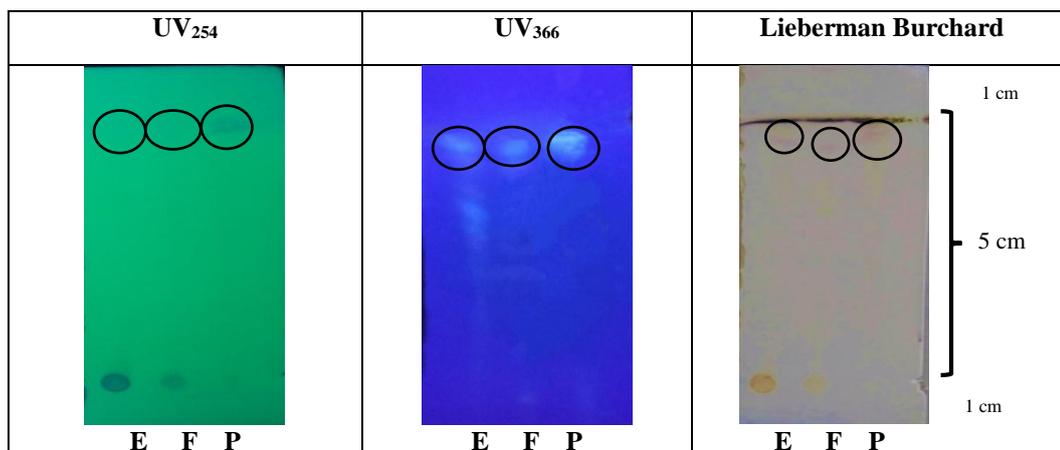
**E :** Ekstrak etanol

**F :** Fraksi kloroform

**P :** Asam galat

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif daun karandas menunjukkan bahwa fraksi kloroform tidak mengandung senyawa tanin. Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna ungu di bawah sinar UV<sub>366</sub> dan nilai R<sub>f</sub> yang dihasilkan fraksi kloroform berbeda dengan nilai R<sub>f</sub> baku asam galat. Hasil perhitungan R<sub>f</sub> dapat dilihat pada lampiran 17.

**13.4. Hasil Identifikasi steroid.** Identifikasi senyawa steroid dengan KLT dikatakan positif jika pada penyemprotan dengan pereaksi Lieberman Burchard akan menunjukkan warna ungu atau hijau biru yang menandakan sampel mengandung triterpenoid bebas atau steroid. Pada sinar UV<sub>366</sub> terbentuk bercak berwarna biru, ungu sampai coklat (Risnafiani *et al.* 2015).



Gambar 8. Hasil identifikasi steroid fraksi kloroform daun karandas fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak CHCl<sub>3</sub> : metanol (10 : 1).

**Keterangan :**

**E :** Ekstrak etanol

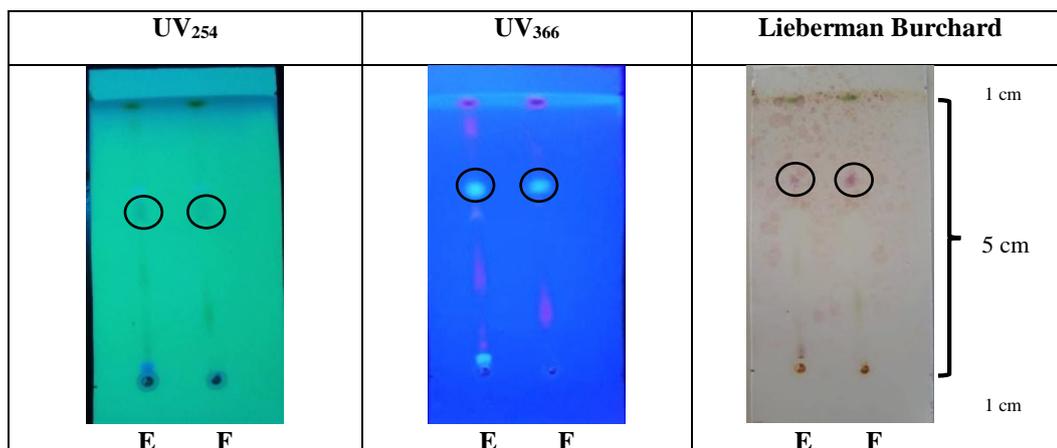
**F :** Fraksi kloroform

**P :** Stigmasterol

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif daun karandas menunjukkan bahwa fraksi kloroform positif mengandung senyawa steroid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna biru di bawah UV<sub>366</sub>, berwarna biru keunguan setelah penyemprotan dengan Lieberman Burchard, dan nilai R<sub>f</sub> yang dihasilkan ekstrak serta fraksi kloroform sampel sebesar 0,8 sama seperti nilai R<sub>f</sub> baku stigmasterol. Hasil perhitungan R<sub>f</sub> dapat dilihat pada lampiran 17.

Steroid merupakan turunan dari senyawa terpenoid. Steroid berpotensi sebagai antibakteri, senyawa ini memiliki polisakarida sehingga dapat menembus membran sel bakteri dan menyebabkan sel bakteri tersebut rusak atau mati (Nimah *et al.* 2012). Senyawa stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol merupakan senyawa turunan fitosterol (Harborne 1987).

**13.5. Hasil Identifikasi triterpenoid.** Identifikasi senyawa triterpenoid dengan KLT dikatakan positif jika pada penyemprotan dengan Lieberman Burchard akan menunjukkan warna ungu atau biru yang menandakan sampel mengandung triterpenoid bebas atau steroid. Pada sinar UV<sub>366</sub> terbentuk bercak berwarna biru ungu (Risnafiani *et al.* 2015).



Gambar 9. Hasil identifikasi steroid fraksi kloroform daun karandas fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak eter : dikloroetilena : asam asetat (50 : 50 : 0,7).

**Keterangan :**

**E : Ekstrak etanol**

**F : Fraksi kloroform**

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif daun karandas menunjukkan bahwa fraksi kloroform positif mengandung senyawa triterpenoid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna biru di bawah UV<sub>366</sub> dan berwarna ungu setelah penyemprotan dengan Lieberman Burchard . Nilai Rf yang dihasilkan ekstrak dan fraksi kloroform sebesar 0,68. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 17.

Triterpenoid adalah senyawa yang memiliki kerangka enam karbon satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C-30 asiklik yaitu skualena. Mekanisme triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri dan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan 1999).