

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 1. Hasil determinasi tanaman alamanda (*Allamanda cathartica* L.)

Tanaman alamanda yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan determinasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Tujuan determinasi adalah untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian ini. Berdasarkan hasil determinasi yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman alamanda (*Allamanda cathartica* L.). Hasil determinasi tanaman alamanda dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Pengumpulan bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga alamanda yang bersih, segar, dan dipanen saat bunga telah mekar. Bunga alamanda diperoleh dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Gambar bunga alamanda yang masih segar dapat dilihat pada lampiran 2.

#### 3. Pengeringan bunga alamanda

Bunga alamanda yang telah dicuci kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 3 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri yang menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk. Bahan yang telah kering akan mempermudah proses penyerbukan.

#### 4. Pembuatan serbuk bunga alamanda

Bunga alamanda yang telah dikeringkan kemudian dilakukan perhitungan bobot kering terhadap bobot basah bunga alamanda. Hasil perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah bunga alamanda dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah bunga alamanda**

<b>Bobot basah (g)</b>	<b>Bobot kering (g)</b>	<b>Rendemen % (b/b)</b>
5000	773	15,46

Tabel 2 menunjukkan bahwa 5000 gram bunga alamanda dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 773 gram. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah sebesar 15,46% b/b. perhitungan terdapat pada lampiran 3.

Bunga alamanda yang telah dikeringkan kemudian diserbuk dengan menggunakan alat. Penyerbukan yang dilakukan bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung secara efektif. Serbuk yang sudah halus, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40, pengayakan bertujuan untuk memperoleh serbuk dengan ukuran partikel yang relatif homogen.

### 5. Hasil penetapan kadar air serbuk bunga alamanda

Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui persentase kadar air yang terkandung dalam serbuk bunga alamanda sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur atau mikroorganisme lain yang dapat merusak kualitas bahan uji.

**Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk bunga alamanda**

No	Bobot penimbangan (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar air (%)
1	20,0	1,2	6,0
2	20,0	1,2	6,0
3	20,0	1,4	7,0
<b>Rata-rata</b>			6,3

Berdasarkan tabel 3 dapat diketahui bahwa rata-rata kadar air dalam serbuk bunga alamanda diperoleh sebesar 6,3%. Kadar air ekstrak bunga alamanda memenuhi persyaratan kadar air simplisia yaitu kurang dari 10% (Depkes 2008). Gambar dan hasil perhitungan penetapan kadar air serbuk bunga alamanda dapat dilihat pada lampiran 4.

### 6. Hasil pembuatan ekstrak etanol bunga alamanda

Pembuatan ekstrak etanol bunga alamanda dilakukan dengan metode maserasi. Kelebihan metode maserasi adalah proses pengerjaannya mudah, menggunakan alat yang sederhana, dan dapat digunakan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif akibat pemanasan. Serbuk bunga alamanda yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak etanol adalah sebanyak 700 gram serbuk simplisia. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup dengan wadah gelap agar terhindar dari sinar matahari langsung.

**Tabel 4. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol bunga alamanda**

Serbuk bunga alamanda (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen % (b/b)
700	133	19

Hasil dari maserasi serbuk bunga alamanda didapatkan ekstrak berwarna coklat tua dan berbentuk kental sebanyak 133 gram. Persentase rendemen ekstrak etanol bunga alamanda diperoleh sebesar 19%. Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal, semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Rendemen suatu ekstrak dapat dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, ditinjau dari segi waktu untuk memperoleh zat aktif yang lebih banyak dibutuhkan waktu dan proses yang lama karena ekstraksi ini tidak menggunakan bantuan panas, sedangkan metode maserasi pada penelitian ini hanya dilakukan perendaman selama 2 hari saja, hal ini mengakibatkan rendemen yang didapat hanya 19%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan petroleum eter, kloroform, dan air. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol bunga alamanda dapat dilihat pada tabel 4 dan lampiran 5.

#### 7. Hasil penetapan kadar air ekstrak bunga alamanda

Penetapan susut pengeringan serbuk bunga alamanda 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 (Depkes 2008). Hasil penetapan kadar air ekstrak bunga alamanda dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil penetapan kadar air ekstrak bunga alamanda**

No	Bobot penimbangan (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar air (%)
1	20,0	1,2	6,0
2	20,0	1,0	5,0
3	20,0	1,1	5,5
<b>Rata-rata</b>			5,5

Berdasarkan tabel 5 dapat diketahui rata-rata kadar air dalam ekstrak bunga alamanda yang diperoleh sebesar 5,5%. Kadar air ekstrak bunga alamanda memenuhi persyaratan kadar air simplisia yaitu kurang dari 10% (Depkes 2008). Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui persentase kadar air yang

terkandung dalam serbuk bunga alamanda sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur atau mikroorganisme lain yang dapat merusak kualitas bahan uji. Gambar dan hasil perhitungan penetapan kadar air ekstrak bunga alamanda dapat dilihat pada lampiran 6.

### 8. Hasil uji bebas etanol ekstrak bunga alamanda

Eksrak bunga alamanda dilakukan uji bebas etanol dengan metode esterifikasi. Uji bebas etanol bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung alkohol sehingga tidak mempengaruhi aktivitas antimikroba dari ekstrak bunga alamanda. Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak bunga alamanda telah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% dengan ditandai tidak tercium bau ester yang khas dari etanol. Hasil tes bebas etanol dapat dilihat pada lampiran 7.

### 9. 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. Ekstrak kental bunga alamanda sebanyak 40 g dilakukan fraksinasi dengan tiga pelarut berbeda yaitu pelarut petroleum eter (nonpolar), kloroform (semipolar), dan air (polar). Gambar hasil fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 9.

**Tabel 6. Hasil fraksinasi dari ekstrak bunga alamanda**

Fraksi	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (mL)	Rendemen (%)b/b
Petroleum eter		3,05	7,63
Kloroform	40	6,11	15,28
Air		29,23	73,08

Berdasarkan hasil pengamatan fraksi petroleum eter bunga alamanda berwarna kuning kehijauan dan tidak berbau. Perhitungan persentase rendemen fraksi petroleum eter bunga alamanda sebesar 7,63%. Fraksi kloroform bunga alamanda berwarna coklat dan tidak berbau. Perhitungan persentase rendemen fraksi kloroform bunga alamanda sebesar 15,28%. Fraksi air bunga alamanda berwarna coklat kehitaman dan berbau khas. Perhitungan persentase rendemen fraksi air bunga alamanda sebesar 73,08%. Total rendemen dari ketiga fraksi

tersebut sebesar 95,99%. Berdasarkan total rendemen tersebut dapat diketahui bahwa pengerjaan selama fraksinasi berlangsung cukup optimal.

Hasil fraksinasi dari ekstrak bunga alamanda didapat rendemen fraksi air lebih banyak dari pada rendemen fraksi petroleum eter dan kloroform, hal ini kemungkinan terjadi karena fraksi air mampu menarik kandungan senyawa kimia bersifat polar seperti saponin dan tanin yang memiliki bobot molekul yang besar (Harbone 2006), sehingga bobot fraksi yang didapat juga besar. Hasil perhitungan rendemen fraksi air bunga alamanda dapat dilihat pada tabel 6 dan lampiran 10.

### 9. Hasil identifikasi kandungan serbuk dan ekstrak bunga alamanda

Identifikasi kandungan bunga alamanda dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam serbuk dan ekstrak bunga alamanda. Hasil identifikasi kandungan kimia dapat dilihat pada tabel 7.

**Tabel 7. Hasil identifikasi serbuk dan ekstrak bunga alamanda**

Senyawa	Pereaksi	Hasil		Pustaka (Tiwari <i>et al.</i> 2011)	Ket
		Serbuk	Ekstrak		
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	Hasil positif terbentuk warna biru kehitaman / hijau kehitaman.	(+)
Saponin	Air panas + HCl 2N	Buih mantap setinggi 1,5 cm	Buih mantap setinggi 1,3 cm	Hasil positif terbentuk buih mantap selama 10 menit setinggi 1-10 cm, penambahan HCl 2N buih tidak hilang.	(+)
Flavonoid	Mg + HCl pekat + amil alkohol	Warna merah pada lapisan amil alkohol	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	Hasil positif terbentuk warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.	(+)
Alkaloid	Dragendorf  Mayer	Tidak terbentuk endapan jingga  Tidak terbentuk endapan putih	Tidak terbentuk endapan jingga  Tidak terbentuk endapan putih	Hasil positif dengan penambahan Dragendorf terbentuk endapan jingga. Hasil positif penambahan Mayer terbentuk endapan putih.	(-)
Triterpenoid /steroid	Liebermann-Burchard	Terbentuk cincin ungu kecoklatan	Terbentuk cincin ungu kecoklatan	Hasil positif steroid terbentuk warna biru sampai hijau dan positif triterpenoid terbentuk warna merah sampai ungu.	(+)

Keterangan : ( + ) : mengandung golongan senyawa  
( - ) : tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan penelitian Joselin *et al.* (2012) bunga alamanda mengandung golongan senyawa flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid/steroid. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada tabel 7 menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak bunga alamanda mengandung golongan senyawa yang sama dengan penelitian sebelumnya. Gambar hasil identifikasi kandungan kimia dari serbuk dan ekstrak bunga alamanda dapat dilihat pada lampiran 8.

## 10. Identifikasi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

**10.1. Hasil identifikasi makroskopis.** Identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 secara makroskopis pada media SGA terbentuk koloni lunak berwarna krem, bulat, agak cembung yang mempunyai bau seperti ragi.



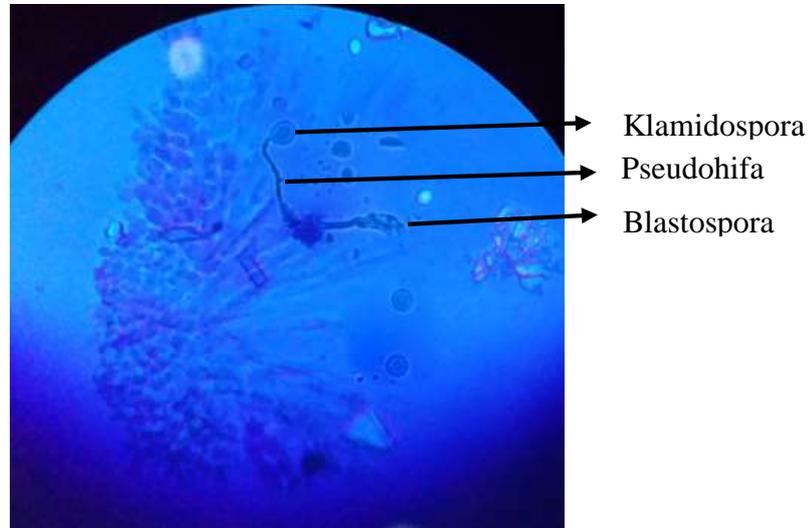
Koloni *Candida albicans*

**Gambar 6. Identifikasi makroskopis *Candida albicans* ATCC 10231**

**10.2. Hasil identifikasi mikroskopis.** Identifikasi mikroskopis menggunakan serum. Serum merupakan plasma darah yang tidak mengandung fibrinogen. Serum berperan dalam mempercepat pengembangbiakan sel *Candida albicans* ke dalam bentuk pseudohifa. Sel-sel *Candida albicans* mulai membentuk tabung benih dalam serum selama 90 menit pada suhu 37°C, sedangkan pada media yang kekurangan nutrisi belum terbentuk komponen tersebut (Simatupang 2009). Komponen aktif dalam serum yang mampu menginduksi terbentuknya tabung benih pada *Candida albicans* adalah D-glukosa. Komponen ini didapatkan melalui proses destruksi oleh enzim glukosa oksidase terhadap glukosa yang terkandung dalam serum (Hudson *et al.* 2004), kemudian komponen aktif tersebut berikatan dengan *G-Protein-coupled Receptor* (GPR1) yang terletak pada membran sel

*Candida albicans* sehingga dapat meninduksi perkembangbiakan *Candida albicans* secara cepat (Rolland *et al.* 2002).

**Gambar 7. Identifikasi mikroskopis *Candida albicans* ATCC 10231**



Hasil identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 secara mikroskopis tampak tabung benih dengan filamen pendek. Blastospora yang saling bersambung dan bertambah panjang merupakan bentuk pseudohifa dari *Candida albicans* ATCC 10231 (Mutiawati 2016). Pengecatan menggunakan LCB membuat *Candida albicans* ATCC 10231 tampak berwarna biru. Warna ini diperoleh dari komponen *cotton blue* yang terdapat dalam LCB. Komponen fenol berperan sebagai desinfektan, asam laktat berperan mempertajam struktur *Candida albicans* ATCC 10231, dan gliserol berperan menjaga sel terhadap kekeringan (Basava *et al.* 2016).

**10.3. Hasil identifikasi fermentasi glukosa.** Identifikasi fermentasi glukosa *Candida albicans* ATCC 10231 memfermentasi maltosa dan glukosa, menghasilkan asam dan gas, serta menghasilkan asam dari sukrosa dan tidak bereaksi dengan laktosa. Pertumbuhan menjadi lebih cepat pada kondisi asam dibandingkan dengan pH normal atau alkalis. Proses fermentasi pada *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan dalam suasana aerob dan anaerob, karbohidrat diubah menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dalam suasana aerob, sedangkan pada suasana anaerob diubah menjadi hasil fermentasi berupa asam laktat atau etanol dan CO<sub>2</sub>

(Jawezt *et al.* 2007). Hasil identifikasi fermentasi glukosa dapat dilihat pada gambar 8.



Keterangan :

GB = *glucosa broth*

MB = *maltosa broth*

SB = *sukrosa broth*

LB = *laktosa broth*

Gambar 8. Identifikasi fermentasi karbohidrat *Candida albicans* ATCC 10231

Tabel 8. Hasil identifikasi fermentasi karbohidrat *Candida albicans* ATCC 10231

Media	Hasil
<i>glucosa broth</i>	F+/G+
<i>maltosa broth</i>	F+/G+
<i>sukrosa broth</i>	F+/G+
<i>laktosa broth</i>	F-/G-

Keterangan :

F+ : terjadi fermentasi

G+ : terbentuk gas pada tabung durham

F- : tidak terjadi fermentasi

G- : tidak terbentuk gas pada tabung durham`

Hasil uji dapat diketahui bahwa *Candida albicans* ATCC 10231 pada media GB, SB, dan MB terjadi fermentasi karbohidrat menjadi asam organik yang ditandai dengan adanya perubahan warna merah dari indikator *Phenol Red* 1% menjadi warna kuning dan terbentuk gas pada tabung durham, sedangkan pada media LB tidak terjadi fermentasi karbohidrat menjadi asam organik ditandai dengan tidak adanya perubahan warna merah dari indikator *Phenol Red* 1% menjadi warna kuning serta tidak terbentuk gas yang ditandai dengan tidak adanya ruang kosong pada tabung durham. Perubahan warna merah menjadi kuning pada reaksi asimilasi dan fermentasi. Gas yang terbentuk dalam tabung durham menunjukkan adanya reaksi fermentasi, jamur tumbuh pada glukosa dan maltosa, menghasilkan asam pada sukrosa, dan tidak terjadi proses fermentasi serta asimilasi pada medium laktosa. *Candida albicans* ATCC 10231 tidak bisa melakukan metabolisme pada medium laktosa, hal ini terjadi karena laktosa memiliki struktur yang kompleks sehingga harus dipecah dulu menjadi glukosa dan galaktosa. *Candida albicans*

ATCC 10231 merupakan organisme anaerob fakultatif yang mampu melakukan metabolisme sel pada suasana anaerob dan aerob. Proses fermentasi jamur ini juga dapat dilakukan dalam suasana anaerob dan aerob.

Karbohidrat yang berada dalam larutan gula digunakan untuk metabolisme sel dengan cara mengubahnya menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dalam suasana aerob. Suasana aerob hasil fermentasi jamur menghasilkan persediaan bahan bakar yang dipergunakan dalam proses oksidasi dan pernafasan (Tjampakasari 2006).

## **11. Pengujian aktivitas antijamur *Candida albicans* ATCC 10231**

**11.1. Hasil pengujian aktivitas antijamur secara difusi.** Tujuan uji aktivitas antijamur secara difusi yaitu untuk skrining aktivitas antijamur dari ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dalam menghambat pertumbuhan biakan jamur uji. Besarnya zona hambat yang terbentuk dapat menentukan fraksi yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231. Larutan stok dibuat dalam tiga konsentrasi yaitu 4; 2; 1%. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% dan kontrol positif yang digunakan adalah fluconazole 0,2%. Kontrol positif digunakan sebagai standar untuk melihat dan membandingkan kemampuan penghambatan ekstrak dan fraksi bunga alamanda.

Pengujian aktivitas antijamur secara difusi dilakukan dengan cara larutan stok berisi ekstrak dan fraksi bunga alamanda ditetaskan di atas cakram disk berukuran 6 mm sebanyak 25 µL, Suspensi jamur yang digunakan disetarakan dengan standar Mc farland 0,5 yang setara dengan 1~5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml dan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Area jernih yang terbentuk disekitar cakram disk yang tidak ditumbuhi jamur menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, dan fraksi air bunga alamanda memiliki daya hambat terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. Hasil diameter hambat pengujian aktivitas antibakteri bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Diameter hambat uji aktivitas antijamur bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi**

<b>Sampel</b>	<b>Konsentrasi</b>	<b>Diameter zona hambat (mm)</b>	<b>Rata-rata ± SD</b>
---------------	--------------------	----------------------------------	-----------------------

	(%)	Replikasi			
		I	II	III	
Ekstrak	4	15	14,25	14,75	14,67±1,77
	2	12,75	14	13	13,25±0,66
	1	12,75	13	12,25	12,67±0,38
Fraksi petroleum eter	4	13	12	12,75	12,58±0,52
	2	12	12,75	12	12,25±0,43
	1	11	10	10,75	10,58±0,52
Fraksi kloroform	4	14	14,5	14	14,17±0,29
	2	13	13,75	12	12,92±0,88
	1	11	11,25	12	11,42±0,52
Fraksi air	4	18,25	18	18,75	18,33±0,38
	2	16	16,75	17	16,58±0,52
	1	15	15	15,75	15,25±0,43
Fluconazole	0,2	27	26,45	26,5	26,65±0,30
DMSO	5	0	0	0	0±0,00

Hasil uji aktivitas antijamur fraksi-fraksi dan ekstrak bunga alamanda menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, dan fraksi air memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. Hasil pada tabel 10 dapat dilihat bahwa fraksi air 4% mempunyai daya hambat yang paling besar terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya. Hasil rata-rata diameter daya hambat fraksi air konsentrasi 4%; 2%; dan 1% berturut-turut adalah 18,33; 16,58; dan 15,25mm, sedangkan flukonazole sebagai kontrol positif mempunyai rata-rata diameter daya hambat sebesar 26,65mm. Kontrol negatif yaitu DMSO 5% yang tidak mempunyai daya hambat terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 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 bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi dapat dilihat pada lampiran 13.

Analisis data menggunakan *Analisis of Varians* ( ANOVA ) *Two Way*. Hasil uji dengan *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh signifikansi  $0,076 > 0,05$  ( $H_0$  diterima), maka dapat disimpulkan data terdistribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan uji *Analisis of Varians* ( ANOVA ) *Two Way*. Penggunaan metode ANOVA *Two Way* bertujuan untuk membandingkan perbedaan diameter hambat dari tiap konsentrasi antara ekstrak, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, fraksi air, kontrol positif, dan kontrol negatif. Nilai probabilitas *Levene Statistic* adalah 0,162

> 0,05 yang artinya keempat sampel memiliki varian yang sama (homogen). Hasil signifikansi dari data perbedaan yang nyata dalam nilai diameter zona hambat. Hasil tabel *Tukey* HSD terdapat tanda \* pada *Mean Difference* yang menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antijamur 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 6 Subset, kelompok yang berada pada 1 subset yang sama menunjukkan perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Fraksi air terdapat pada subset 5 yang paling dekat dengan subset 6 yaitu kontrol positif fluconazole, yang artinya bahwa fraksi air merupakan fraksi teraktif dari pada fraksi lainnya, namun tidak lebih aktif dari kontrol positif fluconazole. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov*, *Levene Statistic* dan ANOVA dapat dilihat pada lampiran 19.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa fraksi air 4% mempunyai aktivitas terbesar dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231 dan mempunyai perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lain. Fraksi air lebih banyak menarik senyawa polar yang terkandung dalam ekstrak etanol bunga alamanda seperti tanin, saponin dan flavonoid, golongan senyawa tersebut merupakan golongan senyawa yang berkhasiat sebagai antijamur, hal tersebut mengakibatkan fraksi air menjadi fraksi teraktif dan membentuk daya hambat paling besar dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya.

Berdasarkan penelitian Joselin *et al.* (2012) pelarut air mampu menarik golongan senyawa flavonoid dalam jumlah yang banyak pada bunga alamanda. Mekanisme flavonoid adalah dengan mendenaturasi protein sel dan merusak sel dengan melisiskan dinding sel jamur karena flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein membran yang menyebabkan perubahan permeabilitas sel dan hilangnya kandungan isi sel dalam sitoplasma (Filho *et al.* 2016). Mekanisme kerja tanin sebagai antijamur dengan cara menghambat biosintesis ergosterol yang merupakan sterol utama pengusuh membran sel jamur. Sterol merupakan struktur sekaligus komponen regulator yang terdapat pada membran sel eukariotik dan diduga berperan dalam permeabilitas membran sel jamur (Hong *et al.* 2011).

Mekanisme kerja saponin sebagai antijamur adalah dengan membentuk kompleks dengan sterol dalam membran sel, sehingga menyebabkan pori-pori kehilangan integritas dan terjadi kebocoran sel yang mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Mert 2006).

Ekstrak etanol bunga alamanda hampir mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam bunga alamanda, tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara optimum sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dibandingkan fraksi air. Fraksi petroleum eter dan fraksi kloroform memiliki daya hambat lebih kecil dibandingkan fraksi air, hal tersebut kemungkinan dikarenakan fraksi petroleum eter dan fraksi kloroform tidak banyak menarik senyawa yang aktif sebagai antijamur. Berdasarkan penelitian Joselin *et al.* (2012) pelarut petroleum eter hanya mampu menarik senyawa terpenoid dan steroid dalam jumlah kecil, sehingga aktivitas antijamur relatif kecil, sedangkan untuk pelarut kloroform mampu menarik senyawa kumarin, fitosterol dan karbohidrat dari bunga alamanda.

**11.2. Hasil pengujian aktivitas antijamur secara dilusi.** Pengujian aktivitas antijamur secara dilusi bertujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil uji difusi menunjukkan bahwa fraksi air merupakan fraksi yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Candida albicans* ATCC 10231 sehingga dilanjutkan dengan metode dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam uji dilusi untuk mendapatkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125% serta kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri *Candida albicans* ATCC 10231 yang sudah diencerkan (1:100) dan kontrol negatif menggunakan fraksi air dengan konsentrasi tertinggi tanpa penambahan suspensi jamur. Hasil penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum dari fraksi teraktif air terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10. Hasil penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif air terhadap *Candida albicans* ATCC 10231**

No	Konsentrasi (%)	Fraksi air Replikasi
----	-----------------	-------------------------

		I	II	III
1	4	-	-	-
2	2	-	-	-
3	1	-	-	-
4	0,5	-	-	-
5	0,25	+	+	+
6	0,125	+	+	+
7	K(+)	+	+	+
8	K(-)	-	-	-

Keterangan : (+) : ada pertumbuhan jamur

(-) : tidak ada pertumbuhan jamur

K(+): Suspensi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

K(-) : fraksi air konsentrasi 4% tanpa penambahan suspensi jamur

Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih, akan tetapi pada saat uji dilusi ini sulit untuk diamati karena fraksi yang digunakan terlihat pekat sehingga perlu dilakukan pengamatan pada media SGA untuk masing-masing tabung. Penetapan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* ATCC 10231 pada media SGA. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh pertumbuhan jamur uji. Nilai KBM diperoleh pada konsentrasi 0,5% yang merupakan konsentrasi terendah dari fraksi air bunga alamanda yang dapat membunuh pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231. Gambar hasil pengujian aktivitas antijamur dari fraksi air bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 14.

## 12. Identifikasi fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi golongan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran golongan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi teraktif. Identifikasi kandungan senyawa kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi air karena fraksi ini mempunyai aktivitas antijamur paling tinggi terhadap *Candida albicans* ATCC 10231.

**12.1. Hasil identifikasi flavonoid.** Identifikasi golongan senyawa flavonoid dengan KLT dikatakan positif jika pada penyemprotan dengan pereaksi sitoborat menunjukkan warna kuning atau kuning kecoklatan. Pada sinar UV<sub>254</sub>

mengalami peredaman, pada sinar UV<sub>366</sub> akan berfluorosensi kuning, biru atau ungu, dan terlihat kuning tanpa pereaksi (Harborne 2006).

**Tabel 11. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT**

Sampel	Rf	Hasil		Pereaksi semprot sitoborat	Pustaka	Ket
		UV 254nm	UV 366nm			
Ekstrak	0,14 0,22 0,26 0,36 0,52	Peredaman	Fluorosensi biru	Kuning kecoklatan	UV 254 nm terjadi peredaman; UV 366 nm berfluorosensi kuning, biru atau ungu; penyemprotan sitoborat warna kuning atau kuning kecoklatan (Harborne 2006).	(+)
Fraksi	0,12 0,20 0,24 0,52	Peredaman	Fluorosensi biru	Kuning kecoklatan		
Baku (Rutin)	0,52	Peredaman	Fluorosensi biru	Kuning kecoklatan		

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif bunga alamanda menunjukkan bahwa fraksi kloroform positif mengandung senyawa flavonoid, hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning kecoklatan setelah penyemprotan dengan sitoborat, berwarna biru dibawa UV<sub>366</sub>, dan nilai Rf yang dihasilkan ekstrak serta fraksi air sebesar 0,14 sama seperti baku rutin. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 18.

Golongan flavonoid digambarkan sebagai deretan senyawa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> artinya, kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C<sub>6</sub> (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Sifat fisika dan kimia flavonoid antara lain larut dalam air, sedangkan dalam bentuk glikosida yang termetilasi larut dalam eter, sebagai glikosida dan aglikon senyawa flavonoid tidak larut dalam petroleum eter sehingga glikosida hanya dapat ditarik dengan pelarut organik yang bersifat polar (Heinrich *et al.* 2005). Bunga alamanda mengandung beberapa senyawa golongan flavonoid yaitu kuersetin, rutin dan epikatekin (Vera 2019). Mekanisme flavonoid adalah dengan mendenaturasi protein sel dan merusak sel dengan melisiskan dinding sel jamur karena flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein membran yang menyebabkan perubahan permeabilitas sel dan hilangnya kandungan isi sel dalam sitoplasma (Filho *et al.* 2016).

**12.2. Hasil identifikasi senyawa tanin.** Identifikasi senyawa tanin dengan KLT dikatakan positif jika dibawah UV<sub>254</sub> berwarna hijau gelap, di bawah UV<sub>366</sub> ungu kehitaman dan menggunakan pereaksi FeCl<sub>3</sub> berwarna hitam (Harborne 2006).

**Tabel 12. Hasil identifikasi tanin secara KLT**

Sampel	Rf	Hasil			Pustaka	Ket
		UV 254nm	UV 366nm	Pereaksi semprot FeCl <sub>3</sub>		
Ekstrak	0,36 0,38 0,84 0,86 0,98	Peredaman	Fluorosensi ungu kehitaman	Hitam	UV 254nm berwarna hijau gelap; UV 366nm berwarna ungu kehitaman; penyemprotan FeCl <sub>3</sub> warna hitam (Harbone 2006).	(+)
Fraksi	0,42 0,84	Peredaman	Fluorosensi ungu kehitaman	Hitam		
Baku (Asam galat)	0,84	Peredaman	Fluorosensi ungu kehitaman	Hitam		

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif dalam bunga alamanda menunjukkan bahwa fraksi air mengandung senyawa tanin, Hal ini ditunjukkan dengan bercak berwarna hitam setelah penyemprotan dengan FeCl<sub>3</sub>, berwarna ungu kehitaman di bawah UV<sub>366</sub>, dan nilai Rf yang dihasilkan ekstrak serta fraksi air sebesar 0,84 sama seperti baku asam galat. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 18.

Tanin merupakan senyawa yang bersifat fenol yang mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Tanin secara kimia merupakan zat kompleks, biasanya terdapat sebagai campuran polifenol yang sukar dipisahkan karena tidak dapat dikristalkan. Tanin terhidrolisis menjadi senyawa amorf, higroskopis, berwarna coklat kuning. Tanin adalah senyawa yang larut air, tidak larut dalam pelarut organik non polar. Asam galat merupakan senyawa golongan tanin yang terkandung dalam bunga alamanda (Vera 2019). Mekanisme kerja tanin sebagai antijamur dengan cara menghambat biosintesis ergosterol yang merupakan sterol utama pengusuh membran sel jamur. Sterol merupakan struktur sekaligus komponen regulator yang terdapat pada membran sel eukariotik dan diduga berperan dalam permeabilitas membran sel jamur (Hong *et al.* 2011).

**12.3. Hasil identifikasi senyawa saponin.** Identifikasi senyawa saponin dengan KLT dikatakan positif dengan penyemprotan anisaldehyd asam sulfat akan membentuk bercak biru, violet atau kadang-kadang kekuningan bila diamati visual (Harborne 2006).

**Tabel 13. Hasil identifikasi saponin secara KLT**

Sampel	Rf	Hasil			Pustaka	Ket
		UV 254nm	UV 366nm	Pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat		
Ekstrak	0,36 0,44 0,54 0,96	Peredaman	Fluorosensi biru muda	Violet	Penyemprotan anisaldehyd asam sulfat membentuk bercak biru, violet atau kadang-kadang kekuningan (Harbone 2006).	(+)
Fraksi	0,32 0,42 0,50 0,96	Peredaman	Fluorosensi biru muda	Violet		
Baku (Saponin)	0,96	Peredaman	Fluorosensi biru muda	Violet		

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif dalam bunga alamanda menunjukkan bahwa fraksi air mengandung senyawa saponin, Hal ini ditunjukkan dengan bercak violet setelah penyemprotan dengan anisaldehyd asam sulfat, dan nilai Rf yang dihasilkan ekstrak serta fraksi air sebesar 0,96 sama seperti baku saponin. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 18.

Saponin merupakan metabolit sekunder yang ada pada tanaman, saponin disimpan dalam sel-sel tanaman, dapat menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah dan beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Penyarian saponin ini akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antijamur jika menggunakan pelarut polar (Harborne 2006). Mekanisme kerja saponin sebagai antijamur adalah dengan membentuk kompleks dengan sterol dalam membran sel, sehingga menyebabkan pori-pori kehilangan integritas dan terjadi kebocoran sel yang mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Mert 2006).

**12.4. Hasil identifikasi senyawa steroid.** Identifikasi senyawa steroid dengan KLT dikatakan positif setelah disemprot pereaksi *Lieberman Bouchardat*

kemudian dipanaskan dengan suhu 105°C selama 3-5 menit membentuk bercak warna merah ungu atau ungu (Harborne 2006).

**Tabel 14. Hasil identifikasi steroid secara KLT**

Sampel	Rf	Hasil		Pereaksi semprot <i>Lieberman</i> <i>Bouchardat</i>	Pustaka	Ket
		UV 254nm	UV 366nm			
Ekstrak	0,26 0,58 0,60 0,62 0,84 0,94	Peredaman	Fluorosensi biru muda	Ungu	Penyemprotan <i>Lieberman</i> <i>Bouchardat</i> membentuk bercak merah ungu atau ungu (Harbone 2006).	(-)
Fraksi	0,18 0,62	-	-	-		
Baku (Stigmasterol)	0,84	Peredaman	Fluorosensi biru muda	Ungu		

Hasil uji KLT pada fraksi teraktif dalam bunga alamanda menunjukkan bahwa fraksi air tidak mengandung senyawa steroid, Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya bercak pada fraksi air yang memiliki Rf yang sama seperti baku stigmasterol. Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 18.

