

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil identifikasi Tanaman Alamanda

Identifikasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menyesuaikan ciri morfologi tanaman, dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Identifikasi dari tanaman alamanda (*A. Cathartica* L.) dilakukan di Fakultas Biologi Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Berdasarkan hasil identifikasi dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman alamanda (*A. Cathartica* L.) Keterangan identifikasi tanaman yang digunakan penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

#### B. Pengumpulan dan pengeringan sampel

Tanaman alamanda yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Nusukan, Banjarsari, Surakarta, Jawa Tengah pada bulan Juli 2019. Daun diambil dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna hijau pada daunnya dan bersih dari kotoran, mikroba serta ulat. Daun alamanda yang telah diambil kemudian dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran pada daun dengan dicuci dengan air bersih yang mengalir. Daun kemudian dirajang untuk mempercepat proses pengeringan, ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai kering. Data rendemen berat daun kering terhadap berat basah daun alamanda dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah**

Berat basah (g)	Berat kering (g)	Rendemen (%)b/b
4.400	1000	22,73

Daun alamanda sebanyak 4.400 g dalam kondisi basah dikeringkan pada suhu 50°C dan diperoleh 1.000 g daun kering (diperoleh rendemen 22,73%). Pengeringan harus dijaga pada suhu konstan 50°C dalam oven, karena bila suhunya terlalu tinggi maka kemungkinan terjadi kerusakan senyawa aktif dan bila suhu terlalu rendah maka pengeringan menjadi tidak sempurna dan waktu yang dibutuhkan untuk proses pengeringan semakin lama akibatnya terjadi proses pembusukan.

Pengeringan bertujuan untuk mencegah terjadinya kerusakan kandungan zat aktif yang ada dalam daun. Pengeringan juga dapat dilakukan untuk mengurangi kadar air, mencegah pertumbuhan jamur, dan memperpanjang waktu pemakaian sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Pengeringan juga mencegah kerusakan akibat penguraian zat aktif secara enzimatik seperti hidrolisis, oksidasi dan polimerisasi. Sebaiknya setelah dirajang langsung segera dikeringkan untuk menghindari naiknya aktivitas enzim dengan adanya air dalam simplisia.

### C. Pembuatan serbuk daun alamanda

Daun alamanda yang telah dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 48 jam kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomer 40. Hasil dari pembuatan serbuk dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering**

Berat kering (g)	Berat serbuk (g)	Rendemen (%) b/b
1.000	700	70

Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan dari partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif, tetapi ukuran partikel juga tidak boleh terlalu kecil sebab dikhawatirkan dapat terjadi suspensi pada proses maserasi dan saat penyaringan kemungkinan partikel yang terlalu kecil akan lolos dari kertas saring.

### D. Hasil penetapan susut pengeringan

Serbuk daun alamanda sebanyak 2 g, diukur susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai persen (%). Tujuannya untuk memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan susut pengeringan dari serbuk daun alamanda menunjukkan hasil persentase rata-rata daun alamanda sebesar 4,3 %. Nilai untuk susut pengeringan jika tidak dinyatakan lain adalah kurang dari 10% sehingga dapat disimpulkan bahwa susut pengeringan memenuhi persyaratan. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun alamanda dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun alamanda**

Serbuk	Penimbangan (g)	Sesudah (g)	Kandungan lembab (%)
	2,0	1,89	4,5
Daun alamanda	2,0	1,92	4,0
	2,0	1,88	4,5
Rata-rata	2,0	1,89	4,3

#### E. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun alamanda

Penetapan kadar air dalam penelitian ini menggunakan cara destilasi xylene, yaitu ekstrak ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam labu, kemudian dimasukkan lebih kurang 200 mL xylene yang sudah dijenuhkan ke dalam labu dan alat dihubungkan dan dilakukan destilasi sampai adanya pemisahan antara air dan xylene. Persentase rata-rata ekstrak daun alamanda sebesar 7%, nilai untuk penetapan kadar air daun alamanda jika tidak dinyatakan lain adalah kurang dari 10%, sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar air ekstrak daun alamanda memenuhi persyaratan. Persentase kadar air yang tinggi menyebabkan perubahan kerja enzim dan zat aktif sehingga dapat menurunkan mutu simplisia serta mudah ditumbuhi oleh mikroba (Gunawan & Mulyani 2004). Hasil penetapan kadar air ekstrak daun alamanda dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun alamanda**

Ekstrak	Penimbangan (g)	Volume air (mL)	Kadar air (%)
Daun alamanda	20,092	1,4	7
	20,128	1,3	6,5
	20,103	1,5	7,5
Rata-rata	20,108	1,4	7

#### F. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun alamanda

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi karena pengerjan dan peralatannya sederhana. Cara maserasi lebih menguntungkan untuk metabolit yang tidak tahan panas karena cara ini tanpa pemanasan sehingga tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari metabolit tersebut (Depkes 2000). Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan etanol 96%. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, dan klorofil (Depkes 2005), etanol juga dapat menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Voight 1994).

Serbuk dari simplisia daun alamanda ditimbang sebanyak 700 gram kemudian ditambahkan dengan etanol 96%. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup dengan menggunakan wadah gelap dan terhindar dari sinar matahari langsung. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun alamanda dapat dilihat tabel 5.

**Tabel 5. Rendemen ekstrak etanol daun alamanda**

Serbuk (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
700	176,934	25,27

Berdasarkan tabel 5 dapat dilihat bahwa persentase rendemen ekstrak etanol daun alamanda dari serbuk simplisia sebanyak 700 gram yang dilarutkan dengan pelarut etanol 96% didapatkan ekstrak kental 176,934 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 25,27 %. Hasil perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun alamanda dapat dilihat di lampiran 12.

### G. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun alamanda

Ekstrak kental daun alamanda dilakukan uji bebas etanol dengan cara esterifikasi alkohol.

**Tabel 6. Uji bebas etanol ekstrak daun alamanda**

Uji bebas etanol	Hasil Pengujian
5 tetes ekstrak pekat daun alamanda + 5 tetes asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) + 2 tetes asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ ), dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas

Tabel 6. Menunjukkan bahwa ekstrak daun alamanda sudah bebas etanol yang ditandai tidak terbentuknya bau ester yang khas dari reaksi esterifikasi yang dilakukan. Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak kental yang didapat sudah bebas dari pelarut etanol.

Pelarut etanol memiliki aktivitas sebagai antibakteri, sehingga jika pelarut etanol masih tertinggal pada ekstrak dapat mengakibatkan bakteri terbunuh bukan karena senyawa-senyawa yang ada di dalam ekstrak tetapi karena adanya aktivitas bakteri.

### H. Hasil fraksinasi ekstrak daun alamanda

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama lainnya berdasarkan kepolarannya. Jumlah

dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda-beda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar antara lain antosianin, tanin, saponin, glikosida dan gula, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar seperti minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, alkaloid, klorofil dan resin dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

Pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-heksana dan pelarut semi polar yang digunakan etil asetat sedangkan pelarut polar yang digunakan adalah air. Hasil penyarian dari ketiga pelarut tersebut yang akan digunakan dalam penelitian. Perhitungan persen rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun alamanda dapat dilihat pada lampiran 12. Data hasil dari pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun alamanda dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 7. Rendemen hasil fraksinasi daun alamanda**

Pelarut	Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	30	6,178	20,59
Etil asetat	30	3,092	10,30
Air	30	8,021	26,73

Hasil fraksinasi menunjukkan adanya perbedaan persen rendemen dengan bobot fraksi air yang memiliki persen rendemen paling besar diantara fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Perbedaan hasil fraksinasi dimungkinkan oleh adanya kepolaran dari masing-masing golongan senyawa kimia. Faktor lain yang dapat mempengaruhi persen rendemen fraksi adalah kemungkinan sebagian besar senyawa yang ada di dalam daun alamanda bersifat polar.

Total hasil fraksinasi adalah 57,62%, Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100%. Hasil tersebut menunjukkan fraksinasi yang tidak optimal dikarenakan prosedur larutan ekstrak langsung dengan air, seharusnya ditingkatkan kelarutannya terlebih dahulu menggunakan etanol sebanyak 10ml. Hal ini kemungkinan juga disebabkan oleh ekstrak daun alamanda yang banyak menempel pada wadah dan juga corong.

### I. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak daun alamanda

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk mengetahui kebenaran senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak daun alamanda yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antibiofilm. Identifikasi kandungan kimia daun alamanda menggunakan metode reaksi pengendapan. Hasil uji kandungan kimia ekstrak daun alamanda dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun alamanda**

Senyawa	Reagen	Pustaka	Interprestasi Hasil kstrak
Flavonoid	Shinoda	Reaksi positif bila timbul warna merah (Depkes RI 2005).	+ (merah)
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Reaksi positif bila menjadi warna biru tua, hijau, merah ungu (Robinson 1995).	+ (hijau kehitaman)
Alkaloid	Mayer dan Dragendorff	Terbentuk endapan merah sampai jingga pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada reagen Mayer (Robinson 1995).	+ (endapan merah dan putih)
Saponin	HCl	Reaksi positif bila terbentuk buih 1-10 cm, penambahan HCL 2N buih akan hilang (Depkes 2005).	+ (buih)

Keterangan : + : ada senyawa

- : tidak ada senyawa

Identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak daun alamanda (*A. Cathartica* L.) dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun alamanda dengan menggunakan tabung reaksi dengan pereaksi yang berbeda. Berdasarkan tabel 10 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun alamanda positif mengandung saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan terpenoid, dimana senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas antibakteri.

### J. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dengan kromatografi lapis tipis

Penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mendeteksi senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun alamanda. Penggunaan fase gerak sangat berpengaruh dalam metode ini, karena pemilihan fase gerak yang tepat dapat menghasilkan pemisahan senyawa yang baik. Hal ini berkaitan dengan senyawa yang akan terdeteksi. Sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm digunakan untuk menampakkan bercak yang gelap.

Sedangkan sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm digunakan untuk menampakkan bercak yang berfluoresensi sehingga pada pengamatan terlihat bercak berpendar (memancarkan cahaya). Hasil identifikasi dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada tabel 9 dan lampiran 9.

**Tabel 9. Hasil identifikasi senyawa ekstrak daun alamanda secara KLT.**

Pengujian	Rf	Fase gerak	Pereaksi semprot	Warna noda		Daftar pustaka
				UV 254	UV 366	
Flavonoid	A = 0,48	Asam	Uap	Berwarna biru	Ungu gelap	Biru, kuning (Marliana 2005).
	B = 0,46	Asetat	Amonia	Peredaman	Peredaman	
	C = 0,51	glasial : air		Berwana biru	Ungu gelap	
	D = 0,51	:butanol		Peredaman	Ungu gelap	
	E = 0,55	(1:5:4)		Berwana biru	Ungu gelap	
Steroid	A = 0,66	Kloroform	Liberman-	Berwarna biru	Berwarna ungu	Hijau biru (kristanti dkk 2008).
	B = 0,66	m:metanol	Buchard	Peredaman	Peredaman	
	C = 0,68	ol (9:1),		peredaman	Berwarna ungu	
	D = 0			Peredaman	Peredaman	
	E = 0,72			Berwana biru	Berwarna ungu	
Tanin	A = 0,91	metanol-	FeCl <sub>3</sub>	Berwarna hitam	Berwarna hitam	Hitam (Banu dan Nagarajan 2014).
	B = 0	air (6:4)		Peredaman	Peredaman	
	C = 0,91			Berwarna hitam	Berwarna hitam	
	D = 0,91			Berwarna hitam	Berwarna hitam	
	E = 0,93			Berwarna hitam	Berwarna hitam	
Alkaloid	A = 0,64	Kloroform	Anisaldehyd	Hijau	Ungu gelap	Kuning Hingga kecoklatan (Harborne 1996).
	B = 0,62	:metanol		Hijau	Ungu gelap	
	C = 0,62	(9,5:0,5)		Peredaman	Peredaman	
	D = 0,26			Peredaman	Peredaman	
	E = 0,71			ungu gelap	Ungu gelap	

Keterangan

A= ekstrak

B= fraksi *n*-heksana

C= fraksi etil

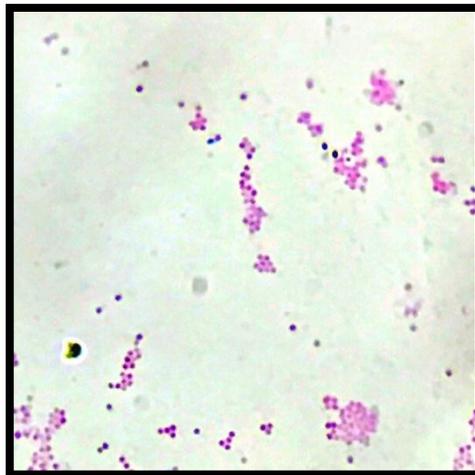
D= fraksi air

E= baku pembanding

## K. Hasil identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175

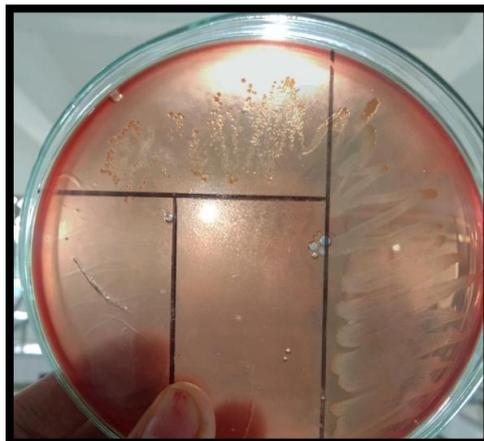
**1. Uji Identifikasi Mikroskopis.** Identifikasi mikroskopis *S. mutans* ATCC 25175 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui pengelompokan bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan 4 jenis reagen yaitu Gram A (Kristal Violet), Gram B (Iodine), Gram C (Alkohol) dan Gram D (Safranin). Hasil pengecatan Gram menunjukkan bahwa *S. mutans* ATCC 25175 termasuk bakteri Gram positif yang ditandai dengan dapat dipertahankannya warna ungu dari kristal violet sehingga pengamatan dengan mikroskop dapat dilihat bahwa bakteri berwarna ungu, berbentuk bulat dan berderet deret. Warna ungu pada bakteri Gram positif disebabkan karena dinding selnya terdiri dari satu lapisan peptidoglikan yang tebal dan permeabilitas dinding sel kurang, sehingga warna ungu dari kristal violet dapat terikat kuat karena menyempitnya pori

dinding sel akibat dekolorisasi oleh alkohol dan dinding sel tetap menahan warna ungu. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



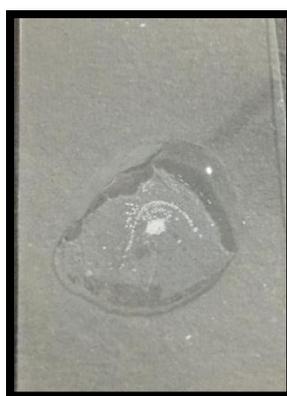
**Gambar 7.** Hasil pewarnaan Gram *S. mutans* ATCC 25175

**2. Uji Biokimia.** Uji biokimia bakteri *S. mutans* dilakukan dengan pengujian dengan media Agar darah (*Blood Agar*). Pengujian pada media agar darah dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri *S. mutans* ATCC 25175 pada media Agar darah kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil dari pengujian ini menunjukkan bahwa bakteri uji benar *S. mutans* ATCC 25175 dengan adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya koloni bakteri berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau. Warna koloni pada media agar darah menunjukkan bahwa *S. mutans* ATCC 25175 bersifat alfa hemolisis, ini disebabkan karena lisisnya sel darah merah disebabkan terjadinya reduksi hemoglobin menjadi methemoglobin. Ada tiga jenis hemolisis yaitu beta hemolisis, alfa hemolisis, dan gamma hemolisis. Beta hemolisis merupakan lisis lengkap sel darah merah dan hemoglobin. Alfa hemolisis mengacu pada lisis parsial atau lisis sebagian dari sel darah merah dan hemoglobin. Hal ini menghasilkan perubahan warna disekitar menjadi abu-abu kehijauan. Gamma hemolisis yaitu tidak terjadi hemolisis dimana tidak ada perubahan warna dalam media. Perbedaan jenis hemolisis disebabkan oleh produksi oksigen ketika pertumbuhan. Hasil dapat dilihat pada gambar 8 dan lampiran 7.



Gambar 8. Koloni pertumbuhan *S. mutans* ATCC 25175 pada media agar darah

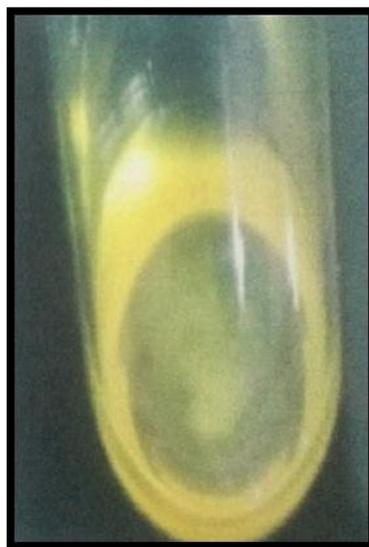
**3. Uji Katalase.** Uji katalase berguna untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 2 ose bakteri *S. mutans* ATCC 25175 pada objek glass kemudian ditambah dengan 1 tetes pereaksi  $H_2O_2$  hasil yang didapat yaitu tidak berbentuk buih (gelembung-gelembung udara). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji tersebut benar *S. mutans* ATCC 25175 karena bakteri *S. mutans* ATCC 25175 tidak memiliki enzim katalase sehingga tidak dapat menguraikan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air dan oksigen sehingga tidak berbentuk buih. Bakteri katalase negatif tidak memiliki enzim katalase yang menguraikan  $H_2O_2$ . Hasil dapat dilihat pada gambar 9 dan lampiran 7.



Gambar 9. Hasil uji katalase

**4. Uji Koagulase.** Uji koagulase bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dilakukan dengan memasukkan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 ke dalam plasma

sitrat kemudian diinkubasi selama 1-4 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati terbentuknya gumpalan sehingga ini menandakan bahwa bakteri uji tersebut adalah benar *S. mutans*. Hal ini disebabkan karena bakteri *S. mutans* dapat menghasilkan enzim koagulase yang menyebabkan fibrin dalam plasma menjadi membeku. Hasil dapat dilihat pada gambar 10 dan lampiran 7.



Gambar 10. Hasil uji koagulase *S. mutans* ATCC 25175

**L. Uji aktivitas antibiofilm fraksi dan ekstrak etanol daun alamanda (*A. cathartica* L.).**

**1. Penentuan panjang gelombang maksimum.** Tujuan dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum ini adalah untuk mengetahui panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimal dari biofilm *S. mutans*. Optimasi dilakukan selama 4 hari menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* dengan sampel suspensi bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dan dengan media BHIB. *Microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan ELISA, umumnya antara 400-750 nm. Beberapa microplate reader bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340-700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya untuk sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian. Panjang

gelombang yang digunakan untuk analisis adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi atau *Optical Density* maksimal. Panjang gelombang maksimal memiliki kepekaan maksimal karena terjadi perubahan absorbansi yang paling besar. Hasil optimasi panjang gelombang maksimal yang paling optimal adalah pada panjang gelombang 550nm dengan *Optical Density* 0,114, hasil pada panjang gelombang tersebut menunjukkan absorbansi tertinggi dari biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

**Tabel 10. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum**

NO	ABSORBANSI		
	490nm	550nm	630nm
1	0,098	0,275	0,189
2	0,081	0,119	0,104
3	0,118	0,170	0,156
4	0,044	0,060	0,070
5	0,046	0,053	0,060
6	0,039	0,052	0,049
7	0,056	0,071	0,066
Rata-rata	0,069	0,114	0,099

**2. Evaluasi pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.** Tujuan dilakukan optimasi waktu biofilm adalah untuk memastikan bakteri uji pada waktu inkubasi optimal dapat membentuk biofilm terbaik. Optimasi dilakukan pada panjang gelombang 550 nm sesuai dengan uji sebelumnya. Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dapat dilihat pada tabel dibawah.

**Tabel 11. Evaluasi pembentukan biofilm**

No	ABSORBANSI	
	HARI KE-1	HARI KE-4
1	0,101	0,275
2	0,132	0,119
3	0,088	0,170
4	0,094	0,060
5	0,111	0,053
6	0,105	0,052
7	0,097	0,071
Rata-rata	0,104	0,114

Pada tabel 11 terlihat *S. mutans* ATCC 25175 dapat membentuk biofilm yang baik dan paling optimal pada waktu inkubasi selama 4 hari dengan absorbansi 0,114. Pertama kali pembentukan biofilm dimulai ketika bakteri melekat pada kondisi permukaan melalui molekul organik. Tingkat perlekatan sel mikroba diatur oleh faktor seperti sifat permukaan, kondisi lapisan permukaan,

karakteristik dan hidrodinamika dari media cair, berbagai karakteristik permukaan sel mikroba, regulasi gen dan kuorum sensing (Mahami & Adu Gyamfi 2011). Dari hasil penelitian sebelumnya bahwa siklus pembentukan biofilm oleh bakteri *S. mutans* pada media glukosa dimulai pada dua jam pertama, yaitu tahap dimana bakteri planktonik mulai melekat pada permukaan alat atau lingkungan abiotik, kemudian dalam delapan jam berikutnya membentuk perlekatan yang bersifat menetap atau *irreversible*. Perlekatan ini akan mencapai *quorum sensing* dan membentuk mikrokoloni dengan mulai membentuk EPS sebagai matriksnya dalam waktu 14 jam. Mikrokoloni ini kemudian makin berkembang menjadi biofilm yang matang dan kokoh dengan struktur EPS-nya. Biofilm yang matang ini tercapai pembentukannya dalam waktu 1-4 hari setelah terjadi perlekatan bakteri (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

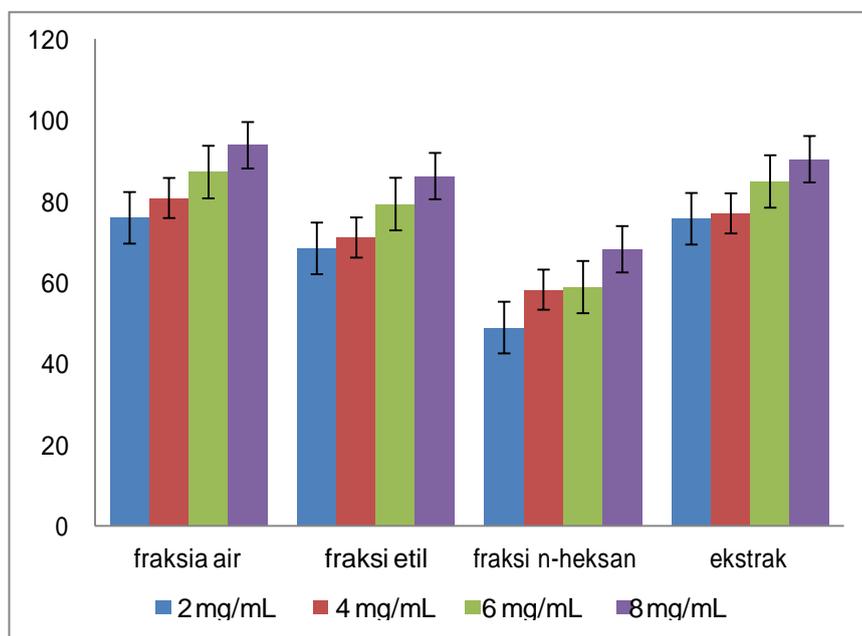
### **3. Uji aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.**

Diperoleh panjang gelombang maksimal dalam pembentukan biofilm *S. mutans*, maka dilanjutkan dengan uji aktivitas ekstrak dan fraksi terhadap penghambatan biofilm *S. mutans* dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (Absorbansi OD<sub>550</sub>) untuk mendapatkan persentase penghambatan biofilm *S. mutans*. Pengujian dilakukan dengan cara ekstrak dan fraksi dimasukkan secara bersamaan ke dalam tiap *well* dimasukkan media BHI sebanyak 60 µl, suspensi bakteri uji sebanyak 70 µl, ekstrak dan fraksi aktif daun alamanda 70 µl dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/mL Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari, waktu optimasi dilakukan sampai hari keempat karena dapat membentuk biofilm terbaik sesuai dengan hasil optimasi pembentukan biofilm terbaik pada uji pendahuluan sebelumnya. *Microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali, kemudian ditambahkan 200 µl larutan kristal violet 1% ke dalam tiap *well*. Penambahan kristal violet untuk memungkinkan identifikasi biofilm secara kuantitatif. Kristal violet merupakan pewarna dasar yang mengikat polisakarida dalam EPS oleh karena itu, kristal violet mewarnai sel-sel baik yang masih hidup maupun mati dan matriks biofilm. Kristal violet yang berada didalam wells kemudian dicuci dengan air mengalir, kristal violet akan melekat pada bagian yang terdapat biofilm sehingga berwarna ungu. Hasil perhitungan nilai OD

pada ekstrak dan fraksi daun alamanda dalam menghambat biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dapat dilihat pada lampiran 15. Berikut hasil uji aktivitas ekstrak dan fraksi daun alamanda terhadap penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 yang dinyatakan dalam persen penghambatan.

**Tabel 12. Hasil uji penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175**

Sampel uji	Rata-rata persen penghambatan biofilm pada konsentrasi (%) $\pm$ SD			
	2 mg/mL	4 mg/mL	6 mg/mL	8 mg/mL
Fraksi air	75,89 $\pm$ 10,51	80,73 $\pm$ 9,77	87,15 $\pm$ 11,20	93,74 $\pm$ 3,12
Fraksi etil asetat	68,28 $\pm$ 4,58	71,01 $\pm$ 2,50	79,2 $\pm$ 4,65	86,11 $\pm$ 3,36
Fraksi <i>n</i> -heksan	48,78 $\pm$ 12,58	58,12 $\pm$ 18,55	58,76 $\pm$ 8,58	68,09 $\pm$ 20,18
Ekstrak	75,58 $\pm$ 20,77	76,94 $\pm$ 8,83	84,83 $\pm$ 4,27	90,27 $\pm$ 4,40



**Gambar 11. Uji antibiofilm fraksi dan ekstrak dari ekstrak etanol daun alamanda terhadap *S. mutans* ATCC 25175**

Hasil uji aktivitas antibiofilm fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan ekstrak etanol daun alamanda sama-sama dapat menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Hasil menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan fraksi maka semakin tinggi persen penghambatan dan degradasi biofilm. Analisis statistik penghambatan biofilm diawali uji normalitas hasilnya menunjukkan data OD penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 terdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan uji homogenitas menunjukkan data OD penghambatan biofilm hasilnya homogen dengan nilai ( $P > 0,05$ ). Data dari hasil pengujian aktivitas antibiofilm dilakukan secara statistik Analisa of Varian

(ANOVA) *one way*, ANOVA *one way* digunakan untuk melihat perbedaan kemaknaan nilai OD sampel uji dengan kontrol negative pada *S. mutans* ATCC 25175, data antar sampel uji dikatakan berbeda signifikan bila  $p < 0,05$ . Nilai signifikansi antar setiap perlakuan menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada OD kelompok kontrol dengan OD ekstrak dan fraksi pada penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Hasil statistik penghambatan dapat dilihat pada lampiran 16. Ditentukan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak dan fraksi diatas dengan persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persen (%) penghambatan. Semakin besar nilai  $IC_{50}$  maka semakin kecil efektivitas dalam menghambat biofilm, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat biofilm sebanyak 50% semakin besar, begitu pula sebaliknya jika nilai  $IC_{50}$  kecil maka semakin besar efektivitas dalam menghambat biofilm.

**Tabel 13. Hasil  $IC_{50}$  biofilm *S. mutans* ATCC 25175**

Sampel	Regresi Linier	Nilai $IC_{50}$ (mg/ml)
Ekstrak	$Y=0,7139 + 0,0119X$	1,90
Fraksi air	$Y=0,8771 + 0,0367X$	1,65
Fraksi etil asetat	$Y=0,9006 + 0,0504X$	1,38
Fraksi <i>n</i> heksana	$Y=0,7469 + 0,0271X$	1,69

Hasil % penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 memberikan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,38 mg/ml pada fraksi etil asetat, 1,65 mg/ml pada fraksi air, 1,69 mg/ml pada fraksi *n*-heksana dan 1,90 mg/ml pada ekstrak etanol daun alamanda. Tabel diatas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai harga  $IC_{50}$  lebih kecil dibanding fraksi air, fraksi *n*-heksana, dan ekstrak daun alamanda, artinya fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibiofilm lebih besar dibanding fraksi dan ekstrak daun alamanda dengan konsentrasi 1,38 mg/ml.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi dimana ekstrak dan fraksi dapat menghambat 50% pembentukan biofilm. Nilai  $IC_{50}$  sering digunakan untuk uji penghambatan pembentukan biofilm. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin efektif pula sampel tersebut dalam menghambat pembentukan biofilm. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  dapat dilihat pada lampiran 15.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam penghambatan pembentukan biofilm terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dibandingkan ekstrak etanol daun alamanda, fraksi *n*-heksana dan air. Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih

kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar oleh sebab itu fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa antibakteri yang berpotensi sebagai antibiofilm yakni flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin. Hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan menghasilkan nilai  $IC_{50}$  paling kecil serta teraktif dibandingkan fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Senyawa tanin dan flavonoid berpotensi dapat menghambat *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD* yang menjadi salah satu faktor pembentukan biofilm (Lee *et al.* 2013). Penghambatan ekspresi gen *ica* ini menyebabkan tanin dan flavonoid juga dapat menghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri, dimana adhesi merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm (Nuryastuti 2010). Kemampuan penghambatan biofilm dari suatu senyawa terkait dengan kemampuan penetrasi senyawa tersebut ke dalam biofilm yang terbentuk, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri. Selain itu, kemampuan senyawa dalam mendegradasi biofilm adalah menghilangkan EPS pada biofilm yang sudah terbentuk (Ardani *et al.* 2010).

Penelitian Vikram, *et al.* (2010) dan Taganna, *et al.* (2011) menunjukkan bahwa flavonoid dan tanin dapat menghambat *quorum sensing* pada 6 bakteri *C. violaceum*, *E. coli O157:H7* dan *V. harveyi*. *Quorum sensing* atau komunikasi antar sel merupakan faktor yang berpengaruh dalam proses pembentukan biofilm (Yarwood, *et al.* 2004). Selain itu, tanin dan flavonoid merupakan golongan polifenol yang dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan cara mereduksi sifat hidrofobik bakteri yang menjadi faktor penting dalam adhesi sel bakteri ke substrat (Jagani *et al.* 2008 ; Okada *et al.* 2008).