

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **1. Identifikasi**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah identifikasi latoh yang dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologis yang ada pada alga yang diteliti dengan ciri morfologis alga sesuai literatur, memastikan ciri makroskopis dan mikroskopis, mengetahui kebenaran bahan yang diambil, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan alga lain. Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### **2. Pengambilan bahan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah latoh yang diperoleh dari tambak budidaya latoh di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan, pada bulan Mei 2019. Pengambilan latoh adalah berdasarkan latoh yang berusia 1 bulan, masih segar berwarna hijau, tidak layu dan tidak pecah serta terbebas dari hama. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari, karena pada pagi hari proses fotosintesis dari latoh berlangsung dengan sempurna sehingga diharapkan dapat diperoleh komponen kimia yang maksimal dari sampel tersebut. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

#### **3. Preparasi latoh**

Latoh dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa kotoran, partikel pasir dan debris. Pencucian terakhir menggunakan air suling dan dikeringkan dengan cara dianginkan pada tempat yang teduh untuk menghindari kontak langsung terhadap sinar matahari agar menjaga kandungan senyawa kimia yang ada di dalam latoh tidak mengalami kerusakan. Latoh yang sudah dikeringan dengan cara dianginkan kemudian dipotong menjadi bagian yang kecil untuk selanjutnya dihaluskan menggunakan *blender*. Hal ini bertujuan untuk

memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut saat ekstraksi. Setelah dihaluskan masih terdapat banyak kandungan air yang tersisa pada latoh, oleh karna itu air yang tersisa dibiarkan menguap dengan cara meletakkan latoh yang sudah halus pada nampan yang memiliki bidang lebar dan ditutupi kain gelap kemudian didiamkan selama kurang lebih 24 jam sampai air menguap.

#### 4. Pembuatan ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan maserasi. Metode ini bertujuan untuk menyari kandungan zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan dan paling sederhana pengerjaannya serta cepat dilakukan. Etanol 96% digunakan sebagai larutan penyari karena sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai perbandingan, disamping itu etanol memiliki titik didih rendah sehingga mudah dan cepat diuapkan (Depkes 1986). Hasil rendemen ekstrak terhadap bobot latoh yang dihaluskan dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Rendemen ekstrak latoh**

No.	Bobot latoh (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1	2000	205	10,25%

Latoh dimerasi selama 3 hari dengan sesekali penggojokan berulang-ulang. Penggojokan dilakukan agar larutan yang konsentrasi tinggi terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Setelah 3 hari, maserat disaring dengan menggunakan kain flanel kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental, dari 2000 gram latoh yang telah dihaluskan diperoleh berat ekstrak 205 gram. Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan efisiensi dan efektivitas pada proses ekstraksi. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Besar kecilnya

rendemen ekstrak juga menunjukkan banyaknya komponen aktif yang terkandung di dalam ekstrak (Permawati 2008).

### 5. Penetapan kadar air ekstrak latoh

Ekstrak latoh sebanyak 10 g, diukur kadar airnya dengan alat *Sterling Bidwell* menggunakan pelarut toluen. Persyaratan kadar air ekstrak yaitu kurang dari 10%. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluen karena toluen memiliki berat jenis lebih kecil dan titik didih yang lebih besar daripada air dan tidak bercampur dengan air. Pada umumnya ekstrak memiliki kadar air  $\pm$  8 - 10% (Depkes 1986), dimana dengan jumlah kadar air tersebut kerusakan ekstrak dapat ditekan baik dalam pengolahan maupun waktu penyimpanan. Hasil penetapan kadar air di dalam ekstrak latoh dapat dilihat pada tabel 2 dan perhitungan presentase kadar air ekstrak latoh dapat dilihat pada lampiran 5.

**Tabel 2. Hasil penetapan kadar air ekstrak latoh**

No	Berat awal (Gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	10	0,8	8,0
2	10	0,9	9,0
3	10	0,8	8,0
Rata-rata $\pm$ SD		0,83	8,3 $\pm$ 0,057

### 6. Pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak latoh dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil uji bebas etanol ekstrak latoh**

No.	Hasil	Pustaka
1	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester

Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak latoh positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester setelah dilakukan pemanasan dengan penambahan asam asetat dan asam sulfat pekat. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak latoh adalah untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, serta mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Kurniawati 2015).

## 7. Identifikasi senyawa dalam ekstrak latoh dengan reaksi kimia

Ekstrak latoh yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung didalamnya. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak latoh menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa flavonoid, tannin, saponin, terpenoid dan alkaloid yang diduga mempunyai aktifitas antibakteri..

Skrining fitokimia yang dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid dalam sampel latoh yaitu dengan cara penambahan HCl dan logam Mg untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam senyawa flavonoid sehingga terbentuk warna merah tua jingga pada senyawa tersebut.

**Tabel 4. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol latoh**

Kandungan Kimia	Hasil Penelitian	Interpretasi Hasil	Pustaka
Flavonoid	Warna merah tua jingga pada lapisan amil alkohol	+	Warna merah tua jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1995)
Tanin	Warna hijau kebiruan	+	Terbentuk warna hijau kehitaman(Depkes 1995)
Saponin	Buih tinggi 1-10 cm	+	Buih tinggi 1-10 cm (Depkes 1995)
Terpenoid	Ekstrak + Liebermann-Buchard + asetat anhidrida 0,5 ml + HCL 2 ml	+	Terbentuk larutan dengan warna merah, jingga, atau ungu (Depkes 1995)
Steroid	Ekstrak + Liebermann-Buchard + asetat anhidrida 0,5 ml + HCL 2 ml	-	Terbentuk larutan dengan warna biru (Depkes 1995)
Alkaloid	Terbentuk endapan putih atau kuning (ekstrak+reagen mayer 2 tetes)	+	Terbentuk endapan putih (Depkes 1995)
	Terbentuk warna coklat sampai hitam (Ekstrak + Reagen Dragendorff 2 tetes)	+	Endapan berwarna coklat sampai hitam (Depkes 1995)

**Keterangan**  
+ : ada senyawa  
- : tidak ada senyawa

Identifikasi alkaloid menggunakan pereaksi Mayer yang mengandung merkuri klorida dan kalium iodida. Prinsip dari reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya peran atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi tersebut sehingga membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam.

Identifikasi dilakukan selanjutnya adalah saponin. Hasil yang diperoleh bahwa ekstrak latoh positif mengandung saponin. Saponin bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut seperti air dan saponin juga bersifat non polar karena memiliki gugus hidrofob yaitu aglikon (sapogenin). Busa yang dihasilkan pada uji saponin disebabkan karena adanya glikosida yang dapat membentuk busa dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.

Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode Lieberman-Bouchard menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna menjadi merah kecoklatan untuk steroid dan coklat-ungu untuk triterpenoid. Hal ini didasari kemampuan triterpen dan steroid membentuk warna dengan  $H_2SO_4$  dalam pelarut asetat anhidrida. Perbedaan warna yang disebabkan karena perbedaan gugus atom C4.

Uji fitokimia senyawa tannin dengan menambahkan ekstrak etanol latoh dengan larutan  $FeCl_3$  menunjukkan hasil positif. Uji Fitokimia menggunakan  $FeCl_3$  dapat menunjukkan adanya gugus fenol, apabila terdapat senyawa fenol, maka dimungkinkan juga terdapat tanin, karena tanin merupakan senyawa polifenol. Perubahan warna hijau kehitaman terjadi akibat pembentukan senyawa komplek antara tanin dengan  $FeCl_3$  (Agustina *et al.* 2017; Ikalinus *et al.* 2015).

Hasil uji identifikasi ekstrak etanol latoh dapat dilihat pada lampiran 6.

## 8. Proses fraksinasi

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan suatu senyawa berdasarkan tingkat kepolarnya. Pemilihan pelarut yang mempunyai perbedaan polaritas akan mempengaruhi golongan senyawa yang tersari. Fraksinasi diperoleh dari ekstrak latoh yang telah dimaserasi, fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yaitu pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-heksan, pelarut semi polar adalah etil asetat, dan pelarut polar yaitu air. Proses fraksinasi dimulai

dengan melarutkan ekstrak kedalam beberapa bagian air, kemudian ditambah *n*-heksan untuk diesktraksi cair – cair. Hasil ekstraksi cair – cair didapatkan fraksi *n*-heksan yang merupakan senyawa non polar, residu hasil ekstraksi kemudian difraksinasi lagi dengan menambahkan pelarut etil asetat untuk memisahkan senyawa semi polar dan yang terakhir dari hasil ekstraksi dianggap sebagai fraksi air yang merupakan senyawa polar. Rendemen bobot fraksi terhadap bobot ekstrak latoh dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Rendemen fraksinasi ekstrak latoh**

Bobot ekstrak	Jenis Fraksi	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
90	<i>n</i> -heksan	18,51	20,57
	Etil asetat	25,265	28,07
	Air	45,032	50,04

Berdasarkan tabel 5 dapat diketahui rendemen fraksi *n*-heksan sebesar 20,57%, fraksi etil asetat sebesar 28,07%, dan fraksi air sebesar 50,04%. Rendemen fraksi air yang didapatkan lebih besar daripada fraksi *n*-heksan dan etil asetat. Hal tersebut membuktikan bahwa latoh mengandung senyawa polar yang lebih banyak. Perbedaan tiap fraksi diakibatkan karena kemampuan dari masing – masing pelarut dalam menyerap suatu senyawa yang berbeda. Fraksi *n*-heksan dan etil asetat dengan organoleptis hijau tua, berbentuk kental, dan berbau khas dan organoleptis fraksi air warna hijau, berbentuk kental dan berbau khas. Warna hijau pada ketiga jenis fraksi disebabkan adanya klorofil yang tersari karena pelarut-pelarut pada proses fraksinasi akan menghancurkan membran sel dan akan melarutkan pigmen yang terkandung dalam bahan (Ernawati 2007). Perhitungan hasil fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air latoh dapat dilihat pada lampiran 7.

## **9. Identifikasi senyawa dalam fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air latoh**

Fraksi latoh yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung didalamnya. Senyawa tersari dengan masing-masing pelarut berdasarkan kepolarannya. Pelarut *n*-heksan akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar, etil asetat akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat semi polar dan air akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat polar.

**Tabel 6. Hasil identifikasi senyawa fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air latoth**

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil		
		Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Flavonoid	terbentuk warna merah tua jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1995)	warna merah tua jingga pada lapisan amil alkohol (+)	warna merah tua jingga pada lapisan amil alkohol (+)	merah tua jingga pada lapisan amil alkohol (+)
Tanin	terbentuk warna hijau kehitaman(Depkes 1995)	warna kuning transparan (-)	warna hijau kehitaman (+)	warna hijau kehitaman (+)
Saponin	buih tinggi 1-10 cm (Depkes 1995)	tidak terdapat buih (-)	terdapat buih tinggi 1-10cm (+)	terdapat buih tinggi 1-10cm (+)
Terpenoid	terbentuk larutan dengan warna merah, jingga, atau ungu (Depkes 1995)	terbentuk larutan berwarna ungu kehitaman (+)	terbentuk larutan berwarna putih kekuningan (-)	terbentuk larutan berwarna putih kekuningan (-)
Steroid	Terbentuk larutan dengan warna biru (Depkes 1995)	terbentuk larutan berwarna ungu kehitaman (-)	terbentuk larutan berwarna putih kekuningan (-)	terbentuk larutan berwarna putih kekuningan (-)
Alkaloid	Terbentuk endapan putih (Depkes 1995)	tidak terbentuk endapan putih (-)	terbentuk endapan putih (+)	terbentuk endapan putih (-)

Tabel di atas menunjukkan bahwa senyawa flavonoid tersari dalam pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air yang memiliki kepolaran berbeda-beda. Andersen dan Markham (2006) menyebutkan bahwa flavonoid terbagi menjadi flavonoid yang kurang polar yang dapat terekstraksi dengan pelarut nonpolar seperti *n*-heksan yaitu flavonoid polimetoksi dan dengan pelarut semipolar seperti kloroform, dietil eter, etil asetat dan diklorometan diantaranya: isoflavon, flavanon, flavon temetilasi dan flavonol. Flavonoid yang bersifat polar dapat diekstraksi dengan pelarut polar seperti alkohol atau campuran alkohol-air yaitu flavonoid glikosida.

Tanin terdapat pada fraksi etil asetat dan air karena tanin cenderung polar sehingga pada proses ekstrak tanin lebih banyak larut dalam air dibandingkan pelarut etil asetat. Pelarut air dapat mengekstrak senyawa tanin secara optimal, diduga karena besarnya konstanta dielektrik dari air yang dapat mengekstrak

senyawa tanin. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya tentang ekstrak rumput laut coklat, yang menyatakan kadar tanin adalah senyawa yang cenderung polar sehingga ekstraksi dengan pelarut polar, seperti metanol dan etanol, akan mengekstrak tanin secara optimal, karena besarnya konstanta dielektrik dari etanol dan methanol (Septiana 2012).

Saponin terdapat pada fraksi etil asetat dan air. Hal ini disebabkan karena saponin bersifat polar karena adanya glikosida dan bersifat semipolar karena memiliki gugus hidrofob (sapogenin).

Terpenoid hanya terdapat pada fraksi *n*-heksan karena terpen terdiri dari banyak molekul hidrokarbon sehingga memiliki polaritas yang rendah dan membuat terpen bersifat sangat nonpolar sehingga terpen dapat diekstraksi menggunakan pelarut organik yang sangat nonpolar seperti *n*-heksan (Jiang *et al.* 2017).

Alkaloid hanya terdapat pada fraksi etil asetat latoh karena alkaloid mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol, dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar (Simaremare 2014).

## **10. Pembuatan suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922**

Bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam biakan murni diambil masing-masing satu sampai dua Ose kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar McFarland 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada lampiran 11.

## **11. Identifikasi bakteri uji**

**9.1 Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan media selektif endo agar.** *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media Endo Agar sebagai media selektif dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian menunjukkan terbentuknya koloni berwarna merah dengan kilap logam (*Metalic Sheen*) yang disebabkan bakteri dapat memiliki

kemampuan untuk memfermentasikan glukosa dan laktosa (Rahayu dan Gumilar 2017). Media endo agar mengandung  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan basic fuchsin yang bereaksi membentuk leucofuchsin yang selanjutnya akan bereaksi dengan aldehid hasil fermentasi laktosa oleh bakteri *Escherichia coli* menghasilkan warna kilap logam. Hasil identifikasi koloni dapat dilihat pada lampiran 11.

**9.2 Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram.** Berdasarkan hasil pengamatan pada mikroskop diketahui bahwa bakteri uji termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram memperlihatkan bahwa *Escherichia coli* berbentuk batang pendek berwarna merah muda hal ini disebabkan karena *Escherichia coli* memiliki komposisi dinding sel mengandung lipopolisakarida yang lebih banyak dibandingkan bakteri kelompok Gram positif sehingga bakteri tersebut tidak mempertahankan zat kristal violet, namun saat diwarnai dengan safranin bakteri tersebut akan mempertahankan warna safranin menjadi warna merah muda. Hasil gambar identifikasi secara mikroskopis dapat dilihat pada lampiran 12.

**9.3 Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara biokimia.** Identifikasi menggunakan media KIA bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar adanya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif jika lereng berwarna merah ditulis (K), bagian dasar berwarna kuning ditulis (A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media ditulis (G), sulfid positif dengan terbentuknya warna hitam pada media ditulis (S+), hasil positif juga dapat dituliskan A/AGS- yang artinya bakteri uji menunjukkan sifat asam yang ditunjukkan dengan warna kuning pada permukaan atas tabung reaksi dan kuning terdapat ruang kosong (berisi gas) pada permukaan bawah tabung reaksi, dan tidak ada sulfida yang ditunjukkan dengan tidak ada warna hitam pada bakteri uji di tabung reaksi. Uji KIA ini digunakan sebagai penguat dalam identifikasi bakteri (Arini & Wulandari 2017).

Tes motil menggunakan perbenihan semi solid SIM media menunjukkan hasil --+. Media SIM dapat digunakan untuk mengetahui pembentukan  $\text{H}_2\text{S}$ , indol dan motilitas pada biakan berumur 48 jam. Uji indol bertujuan mengidentifikasi

kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophanase. Produksi indol di dalam media dimungkinkan karena adanya tryptophan. Tryptophan adalah asam amino esensial, yang teroksidasi oleh beberapa bakteri yang mengakibatkan pembentukan indol, asam piruvat, dan amonia. Hasil uji Indol pada bakteri *Escherichia coli* adalah positif yang ditunjukkan adanya cincin merah pada bagian atas, hal ini disebabkan karena indol bereaksi dengan aldehid.

Uji LIA hasil yang didapatkan adalah K/KS-. Tanda K/KS- artinya bakteri menunjukkan sifat alkali yang ditunjukkan dengan warna ungu pada permukaan atas dan permukaan bawah tabung reaksi, dan tidak ada sulfida yang ditunjukkan dengan tidak ada warna hitam pada bakteri uji di tabung reaksi.

Uji sitrat bertujuan mendeteksi kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru. Hasil pengamatan untuk uji sitrat adalah negatif pada *Escherichia coli* yang ditujukan tidak adanya perubahan warna pada media uji sitrat. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon di lingkungan. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 13.

## **12. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi**

### **10.1 Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi.**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi latoh terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi bertujuan untuk mengetahui diameter daya hambat di sekitar area cakram yang dinyatakan dalam milimeter (mm), daerah yang jernih di sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia dari ekstrak maupun fraksi latoh memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian antibakteri dengan tingkatan konsentrasi yang berbeda bertujuan untuk melihat pengaruh setiap konsentrasi ekstrak dan fraksi pada bakteri yang diujikan. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air latoh dilakukan

dengan metode cakram yang memiliki beberapa kelebihan yaitu cepat, mudah dan murah karena tidak memerlukan alat khusus. Pengujian pendahuluan yang dilakukan untuk menentukan metode yang akan dipilih untuk memulai penelitian ini juga menjadi dasar pemilihan metode difusi cakram. Tujuan dilakukan uji aktivitas antibakteri adalah untuk melihat kemampuan ekstrak latoh dan berbagai fraksi yaitu fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi latoh terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 7 dan perhitungan diameter hambat dapat dilihat pada lampiran 16.

**Tabel 7. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi latoh dengan metode difusi**

<b>Sampel</b>	<b>Konsentrasi</b>	<b>Diameter hambat (mm)</b>			<b>Rata-rata (mm)</b>
		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	
Ekstrak latoh	30%	17	17,5	16	16,83 ± 0,763
	20%	15	16,5	15,5	15,66 ± 0,763
	10%	8	9,5	9,5	9 ± 0,86
Fraksi <i>n</i> -heksan	30%	19	17,5	19	18,25 ± 1,154
	20%	12	11,5	12	12 ± 0
	10%	8	6,5	8	7,5 ± 0,866
Fraksi etil asetat	30%	12	11,5	12	11,83 ± 0,288
	20%	7	6,5	6,5	6,66 ± 0,288
	10%	5,5	6	6,5	6 ± 0,5
Fraksi air	30%	13	13,5	12,5	13 ± 0,5
	20%	12,5	12	10,5	11,66 ± 1,04
	10%	7	5	5	6 ± 0
Siprofloxasin	5µg	18	18,66	18,33	18,33 ± 0,33
DMSO	5%	0	0	0	0

**Keterangan**      **Siprofloxasin : kontrol positif**  
**DMSO**      **: kontrol negatif**

Pengamatan daya hambat ekstrak dan fraksi terhadap bakteri tersebut memperlihatkan adanya pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi yang diberikan, Menurut Ajizah, (2004) Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka zona hambat yang dihasilkan juga semakin besar. Perbedaan daya hambat juga

disebabkan oleh perbedaan sensitivitas organisme, mekanisme dan kesinergisan kerja antara senyawa aktif di dalam ekstrak (Silawati 2018).

Terdapat perbedaan yang cukup signifikan antara diameter hambat yang dihasilkan pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Etcherla dan Rao (2014) yang menunjukkan hasil diameter hambat ekstrak latoh terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 10, 30 dan 50% berturut-turut adalah 22, 24 dan 24 mm. Perbedaan kemampuan ekstrak dan fraksi dalam menghambat bakteri uji diduga karena adanya perbedaan konsentrasi kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak dan fraksi serta sifat resistensi bakteri terhadap senyawa antibakteri. Hal ini didukung oleh pernyataan Susanti *et al.* (2011) bahwa bentuk dan besarnya perubahan atau kerusakan sel dipengaruhi oleh jenis senyawa antibakteri, jenis bakteri, dan konsentrasi yang digunakan. Hal ini juga dijelaskan oleh Jawetz *et al.* (2013) bahwa perbedaan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya aktivitas antimikroba ekstrak, konsentrasi senyawa antibakteri, jenis bakteri, jumlah bakteri, ukuran inokulum, aktivitas metabolik bakteri, dan kondisi lingkungan meliputi suhu, pH, waktu inkubasi dan komponen medium.

Diameter hambat yang yang dihasilkan dapat terlihat namun tidak bening, hal ini dinamakan zona iradikal. Yulianti *et al.* (2011) dalam Rochmawati (2015) menyebutkan bahwa antibakteri dibedakan juga berdasarkan kemampuannya dalam menekan pertumbuhan atau membunuh bakteri, yaitu antibakteri yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan bakteri uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan bakteri uji tetapi pertumbuhan bakteri tersebut lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh. Hal ini juga didukung oleh pernyataan Ritmaleny *et al.*, (2013) jika zona hambatan yang terbentuk akibat adanya aktivitas antibakteri, yaitu zona iradikal maka dapat disimpulkan bahwa antibakteri tersebut bersifat bakteriostatik, sedangkan ketika aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona radikal, maka antibakteri tersebut bersifat bakterisida. Antibakteri yang bersifat bakterisida merupakan antibakteri yang mampu membunuh sel bakteri, sedangkan

bakteriostatik merupakan antibakteri yang hanya mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri, tetapi tidak bisa membunuh bakteri atau tidak bersifat bakterisid (Rahayu, 2010).

Uji difusi menggunakan pelarut DMSO 5% sebagai pelarut ekstrak dan fraksi digunakan sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan, bahwa pelarut DMSO 5% tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri. Selain itu, pelarut ini mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, nonpolar dan semipolar. Hal ini juga telah dibuktikan oleh Reapinam (2007) dalam Katrin *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa hasil diameter penghambatan DMSO 5% terhadap bakteri-bakteri ujinya adalah nol, sehingga pelarut ini merupakan pelarut ekstrak yang baik karena tidak memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan bakteri.

Hasil uji difusi pada tabel di atas selanjutnya diuji kebenarannya dengan cara analisis statistik menggunakan uji SPSS *One Way ANOVA*. Uji ini dilakukan untuk membandingkan sampel yaitu ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air latoh dalam konsentrasi masing-masing 10%, 20%, 30% serta antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *one-sample Kolmogorov smirnov* menunjukkan nilai signifikansi  $0,532 > 0,05$ . Data tersebut menunjukkan bahwa  $H_0$  diterima yang berarti bahwa data yang diuji terdistribusi normal. Data yang terdistribusi normal dapat dilanjutkan dengan ANOVA. Hasil uji ANOVA diameter hambat *Escherichia coli* ATCC 25922 didapatkan hasil  $F=122.940$  dengan probabilitas  $0,000 > 0,05$  yang artinya sediaan uji menunjukkan adanya perbedaan nyata pada penghambatan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922.

Data yang diperoleh pada Tukey Test menunjukkan tanda (\*) pada kolom *mean difference* yang berarti hasil diameter hambat ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air latoh menunjukkan perbedaan yang signifikan. Tabel *homogenous subsets* digunakan untuk melihat grup *subsets* mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak signifikan dari sampel yang ada. Berdasarkan hasil yang tertera pada tabel *homogenous subsets* dapat

disimpulkan bahwa sampel teraktif adalah fraksi *n*-heksan konsentrasi 30% dengan diameter rata-rata 18,25 mm.

### 10.2 Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi.

Pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan dengan metode dilusi cair dari fraksi teraktif latoh dengan konsentrasi 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875, 0,9375, 0,468, 0,234, 0,117%, kontrol positif (suspensi bakteri), dan kontrol negatif (fraksi teraktif). Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan pada tabung reaksi, kemudian digoreskan pada media agar. Uji dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif. Konsentrasi yang digunakan pada uji dilusi ini dinaikkan konsentrasi awalnya menjadi 60% karena pada uji difusi zona hambat yang didapatkan pada konsentrasi 10, 20 dan 30% adalah zona iradikal yaitu masih adanya pertumbuhan bakteri uji tetapi pertumbuhan bakteri tersebut lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu dilakukan uji dilusi dari konsentrasi 60% agar nilai KBM dapat ditentukan.

**Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi latoh dengan metode dilusi**

Sampel	Konsentrasi	Media BHI			Media Endo Agar		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
Fraksi <i>n</i> -heksan	60%	keruh	keruh	keruh	-	-	-
	30%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	15%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	7,50%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	3,75%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	1,88%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	0,94%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	0,47%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	0,23%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
	0,12%	keruh	keruh	keruh	+	+	+
Kontrol (+)	$1,5 \times 10^8$ CFU/ml	keruh	keruh	keruh	+	+	+
Kontrol (-)	60%	keruh	keruh	keruh	-	-	-

Tabung pengenceran dilusi setelah diinkubasi pada media BHI menunjukkan hasil yang keruh sehingga KHM tidak dapat ditentukan, sehingga

dilanjutkan dengan penentuan KBM yaitu dengan menggoreskan masing-masing hasil inkubasi tabung dilusi pada media selektif endo agar, fungsinya adalah untuk melihat pada konsentrasi berapa bakteri tidak tumbuh lagi atau dengan kata lain untuk menentukan konsentrasi yang bersifat bakterisidal.

Hasil menunjukkan bahwa nilai KBM terdapat pada konsentrasi 60% ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada kuadran konsentrasi fraksi *n*-heksan 60% di media endo agar.

Fraksi *n*-heksan latoh yang merupakan fraksi paling efektif mengandung flavonoid dan terpenoid yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme triterpenoid sebagai antibakteri melibatkan kerusakan membran oleh senyawa lipofilik dengan melisikkan membran sel dan melarutkan fosfolipid, dan berinteraksinya gugus hidroksil dengan gugus karbonil dan protein membran sel bakteri sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya sedangkan mekanisme flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Kedua senyawa tersebut saling bersinergi dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang merupakan bakteri Gram negatif dengan dinding sel nya yang tebal.

Fraksi air mengandung senyawa flavonoid, tannin dan saponin sedangkan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, tannin, saponin dan alkaloid. Fraksi air memiliki daya hambat yang lebih rendah dari fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat karena kadar metabolit sekunder aktif yang terekstrak ke dalam pelarut rendah sehingga daya hambat lebih kecil. Fraksi *n*-heksan juga memiliki daya hambat yang lebih besar daripada ekstrak etanol latoh. Hal ini dikarenakan etanol merupakan pelarut universal sehingga di dalam ekstrak latoh masih banyak terkandung senyawa lain seperti protein, karbohidrat, lemak dan senyawa lainnya yang sebagian besar tidak aktif sebagai antibakteri sehingga aktifitasnya kurang maksimal. Senyawa alkaloid bersifat antibakteri, diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Saponin memiliki molekul yang dapat menarik air atau hidrofilik dan molekul yang dapat

melarutkan lemak atau lipofilik sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan hancurnya bakteri dan tannin dengan aktivitasnya sebagai pengkelat.