

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.)

Determinasi tanaman daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi daun stevia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran dari sampel yang diambil, untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta kemungkinan terjadinya pecampuran bahan dengan tumbuhan yang lainnya.

Hasil determinasi daun stevia menurut menurut Backer C.A. dan Brink R.C.B.(1965): *Flora of Java* : 1b - 2b - 3b - 4b - 12b - 13b - 14b - 17b - 18b - 19b - 20b - 21b - 22b - 23b - 24b - 25b - 26b - 27b - 799a. Familia 166. Astersceae. 1b - 3a - 4b - 5b - 23b - 28a - 29b. 11. *Stevia sp.* Foto determinasi tanaman dapat dilihat di lampiran 1.

2. Pembuatan simplisia dan serbuk daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.)

Daun stevia basah sebanyak 10,3 kg yang dikeringkan, diperoleh persentase bobot kering terhadap bobot basah. Pengeringan daun stevia bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam bahan sehingga dengan pengeringan yang maksimal dapat mencegah terjadi kerusakan bahan oleh bakteri dan jamur. Bahan yang telah kering juga dapat mempermudah dalam pembuatan serbuk. Hasil rendemen setelah pengeringan 10,3 kg daun basah stevia adalah sebesar 50,97%, artinya setelah melalui proses pengeringan daun stevia kehilangan berat sebesar 49,03%. Hasil persentase rendemen dapat dilihat pada tabel 1. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada lampiran 15.

Hasil persentase rendemen dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun stevia

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen % (b/v)
10300 gram	5250 gram	50,97%

Daun basah stevia setelah di oven didapatkan bobot kering sebanyak 5250 gram, daun kering stevia diserbuk diperoleh bobot sebanyak 3050 gram. Hasil rendemen setelah penyerbukan 5250 gram daun kering stevia sebesar 58,10% , artinya setelah melalui proses penyerbukan daun stevia kehilangan berat sebesar 41,90%. Hasil persentase rendemen bobot serbuk dapat dilihat pada tabel 2. Perhitungan persentase bobot kering terhadap serbuk dapat dilihat pada lampiran 16.

Tabel 2. Persentase bobot daun kering terhadap bobot serbuk daun stevia

Bobot kering (gram)	Bobot serbuk (gram)	Rendemen % (b/v)
5250	3050 gram	58,10%

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia

Replikasi	Berat awal serbuk (gram)	Kadar lembab (%)
1	2,00	7%
2	2,00	6%
3	2,00	7%
Rata-rata =		6,67%

Penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia dengan alat *moisture balance*. Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui persentase senyawa yang menghilang selama proses pemanasan, tidak hanya menggambarkan air yang hilang tetapi juga senyawa menguap lain yang hilang (Handayani *et al.* 2017). Hasil penetapan susut pengeringan pada tabel 3 diperoleh 6,67%, yang menunjukkan kadar air dan senyawa yang menguap dalam serbuk stevia setelah proses pemanasan pada suhu 105°C sebesar 6,67%. Hasil susut pengeringan memenuhi syarat syarat yang ditetapkan yaitu tidak lebih dari 10%. Perhitungan penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia dapat dilihat pada lampiran 17.

Pada replikasi ke dua didapatkan nilai 6%, yang berbeda pada hasil replikasi satu dan tiga. Hal ini disebabkan karena alat *moisture balance* dan lempeng yang digunakan kualitasnya kurang memadai. Pada saat melakukan susut pengeringan replikasi ke 2 alat tidak menunjukkan persen kadar susut pengeringan pada waktu 30 menit lebih sehingga dilakukan pengulangan pada replikasi ke 2 dan didapatkan hasil yang berbeda.

4. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun stevia

Penetapan kadar air pada penelitian dilakukan dengan metode destilasi toluen. Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui kualitas serbuk dalam penyimpanannya dan merupakan penanganan terbaik bagi suatu serbuk dan ekstrak untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur. Semakin sedikit kadar air yang diperoleh semakin sedikit pula kemungkinan serbuk terkontaminasi oleh pertumbuhan jamur. Syarat penetapan kadar air adalah tidak lebih dari 10%. Toluен bisa menarik air, sehingga harus dijenuhkan dengan air terlebih dahulu sehingga pada saat proses destilasi toluen tidak lagi menarik air dari serbuk daun stevia (Handayani *et al.* 2017).

Tabel 4. Penetapan kadar air serbuk daun stevia

Replikasi	Bobot serbuk (gram)	Volum air (mL)	Kadar air (%)
1	20,00	1	5,00
2	20,00	1	5,00
3	20,00	1,4	7,00
Rata-rata			5,67

Penetapan kadar air serbuk daun stevia diperoleh hasil 5,67%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan air dalam serbuk daun stevia sebesar 5,67%. Hasil didapatkan memenuhi syarat standar yaitu tidak lebih dari 10%. Pada replikasi ke 3 diperoleh hasil yang berbeda dengan replikasi 1 dan 2. Hal ini disebabkan karena pada saat pengovenan labu destilasi masih terdapat sisa air, alat belum kering secara keseluruhan sehingga dapat mempengaruhi hasil volum air yang diperoleh. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun stevia dapat dilihat pada lampiran 18.

Tabel 5. Penetapan kadar air ekstrak daun stevia

Replikasi	Bobot ekstrak (gram)	Volum air (mL)	Kadar air (%)
1	20,00	1,4	7,00
2	20,00	1,6	8,00
3	20,00	1,4	7,00
Rata-rata			7,33

Penetapan kadar air ekstrak daun stevia diperoleh hasil 7,33%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan air yang terkandung dalam ekstrak sebesar 7,33%. Hasil memenuhi syarat standar yaitu tidak lebih dari 10%. Pada replikasi ke 2

diperoleh hasil yang berbeda dengan replikasi 1 dan 3. Hal ini disebabkan karena pada saat pengovenan labu destilasi masih terdapat sisa air, alat belum kering secara keseluruhan sehingga dapat mempengaruhi hasil volum air yang diperoleh. Perhitungan penetapan kadar air ekstrak daun stevia dapat dilihat pada lampiran 18.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun stevia

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Serbuk daun stevia setelah memenuhi syarat susut pengeringan dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Persentase rendemen ekstrak daun stevia dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Rendemen ekstrak daun stevia

Bobot serbuk	Bobot ekstrak	Rendemen ekstrak (%b/v)
600 gram	180 gram	30%

Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstrak etanol daun stevia sebanyak 30%, artinya senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun stevia sebesar 30%. Perhitungan hasil pembuatan ekstrak etanol daun stevia dapat dilihat pada lampiran 19.

6. Uji bebas etanol ekstrak etanol daun stevia

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia telah bebas dari etanol 70% yaitu ditandai dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari etanol pada ekstrak.

Tabel 7. Uji bebas etanol ekstrak daun stevia

Uji bebas etanol	Hasil uji
Ekstrak etanol daun stevia + CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄ pekat, dipanaskan	tidak tercium bau ester yang khas

Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun stevia untuk membebaskan ekstrak dari etanol dan mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Adanya pelarut etanol yang tertinggal di dalam ekstrak dapat mengakibatkan bakteri terbunuh bukan oleh ekstrak, tetapi oleh sisa pelarut etanol yang tertinggal. Foto hasil uji bebas ekstrak etanol daun stevia dapat dilihat pada lampiran 6.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun stevia

Ekstrak etanol daun stevia yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia. Identifikasi kandungan yang terdapat dalam daun stevia bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat didalam daun stevia tersebut. Senyawa yang terkandung didalam daun stevia adalah flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan steroid. Hasil identifikasi kandungan kimia daun stevia dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil Ekstrak dan Interpretasi data
Flavonoid	Warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	Warna jingga pada lapisan amil alkohol (+)
Alkaloid	Terbentuk endapan berwarna coklat sampai jingga dengan dragendroff. Terbentuk endapan berwarna merah kecoklatan dengan wagner. Tebentuk endapan warna putih kekuningan denan mayer (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	Terbentuk endapan jingga dengan dragendroff Tebentuk endapan warna putih kekuningan denan mayer Terbentuk endapan berwarna merah kecoklatan dengan wagner (+)
Steroid dan Triterpen	Pada triterpen batas kedua larutan terdapat cicin warna merah kecoklatan atau ungu dan steroid terdapat lapisan atas berwarna hijau (Fitriyani <i>et al.</i> 2011)	Triterpenoid, pada batas kedua larutan terdapat cicin warna merah kecoklatan (+) Steroid, lapisan atas berwarna hijau (+)
Saponin	Masih terbentuk busa setelah penetesan HCl (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	Terbentuk busa setelah penetesan HCl (+)
Tanin	Perubahan warna menjadi hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin katekol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	Warna hijau kehitaman (+)

Keterangan : (+) = ada senyawa yang diuji
(-) = tidak ada senyawa yang diuji

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun stevia menggunakan tabung reaksi, hasil dapat dilihat pada lampiran 7. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid dan steroid. Kandungan senyawa yang ada didalam ekstrak etanol diperkirakan mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

8. Hasil fraksi ekstrak etanol daun stevia

Hasil ekstrak yang didapatkan dari maserasi difraksi dengan 3 pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda. Tujuan fraksinasi yaitu untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Pelarut nonpolar yaitu *n*-heksan, pelarut semi polar adalah etil asetat, dan air adalah sebagai pelarut polar yang kemudian dilakukan fraksinasi. Berdasarkan hasil perhitungan persentase rata-rata rendemen fraksi *n*-heksan daun stevia adalah 8,062%, etil asetat 10,39%, dan air 75,61%. Hasil rendemen persentase fraksi daun stevia dapat dilihat pada tabel 9. Hasil perhitungan persentase rendemen fraksi dapat dilihat pada lampiran 20.

Tabel 9. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air daun stevia

Bobot ekstrak (gram)	Fraksi <i>n</i> -heksan (gram)	Rendemen (%)	Fraksi etil asetat (gram)	Rendemen (%)	Fraksi air (gram)	Rendemen (%)
10	0,783	7,83%	1,038	10,38%	7,675	76,75%
10	0,827	8,27%	1,026	10,26%	7,538	75,38%
10	0,842	8,42%	1,049	10,49%	7,519	75,19%
10	0,795	7,95%	1,035	10,35%	7,471	74,71%
10	0,784	0,784%	1,047	10,47%	7,601	17,01%
Rata-rata		8,062%		10,39%		75,61%

9. Pembuatan suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam biakan murni diambil satu sampai dua jarum ose, kemudian dimasukkan secara aseptis dalam tabung reaksi steril yang berisi 10 mL media *Brian Heart Infusion* (BHI). Suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi disesuaikan dengan *Mc Farland* 0,5. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada lampiran 9.

10. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

10.1 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pengujian ini dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tersebut termasuk golongan Gram negatif atau positif. Identifikasi *Streptococcus*

mutans ATCC 25175 dengan pewarnaan Gram membuktikan bahwa bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 merupakan bakteri Gram positif. Hasil pengamatan dengan melakukan pewarnaan Gram pada mikroskop tampak berwarna ungu, berbentuk bulat dan membentuk rantai. Bakteri Gram positif *Streptococcus mutans* ATCC 25175 memiliki peptidoglikan yang lebih tebal daripada Gram negatif, sehingga pada pewarnaan Gram bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dapat mempertahankan warna ungu dari Gram A (Kristal violet) (Aroza *et al.* 2017).

Bakteri gram positif mempunyai ciri dinding sel dengan peptidoglikon yang lebih tebal sehingga penyerapan warna dari cat kristal violet yang terserap dalam sel akan bertahan walaupun dilakukan pencucian menggunakan cat peluntur yang diharapkan dapat melunturkan cat warna pertama. Dengan bertahannya cat warna kristal violet yang berwarna ungu ini di dalam sel bakteri maka cat gram D (safranin) sebagai cat lanjutan tidak akan bisa terserap lagi, sehingga warna sel akan tetap berwarna seperti warna cat yang dipakai pertama yaitu cat kristal violet (Ibrahim *et al.* 2015). Hasil identifikasi mikroskopis bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 10.

10.2 Uji makroskopis pada media MSA. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dilakukan dengan media *Manitol Salt Agar* (MSA). Warna merah pada media MSA berubah menjadi kuning setelah ditusuk dengan biakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dari pengujian ini menunjukkan bahwa bakteri uji benar *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan adanya perubahan warna merah menjadi kuning pada media MSA disebabkan karena bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mampu memfermentasi manitol. Hal ini terjadi saat menfermentasi manitol bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 melepaskan asam sehingga mengubah pH disekitar media MSA, ditunjukkan dengan adanya perubahan warna indikator *phenol red* dari merah menjadi kuning (Dewi 2013). Hasil penelitian dapat dilihat pada lampiran 11.

10.3 Uji makroskopis pada media agar darah. Pengujian pada media agar darah dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri *Streptococcus 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 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya koloni bakteri bewarna putih dengan tepian koloni bewarna hijau. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri bersifat alfa hemolisis disebabkan reduksi zat besi dalam hemoglobin, menjadikan koloni bewarna hijau dalam agar darah. Hasil penelitian dapat dilihat pada lampiran 11.

10.4 Uji katalase. Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil biakan murni *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diletakkan pada obyek glass, kemudian ditetesi dengan H₂O₂ 3%. Uji ini yang membedakan antara bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dan *Staphylococcus aureus*. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara apabila bakteri mempunyai enzim katalase yang mampu memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 terjadi katalase negatif yang berarti tidak terbentuk gelembung udara ketika ditambah H₂O₂ 3%. Hal ini disebabkan karena *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tidak mempunyai enzim katalase yang mampu menghidrolisis hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi molekul air dan oksigen (O₂) sehingga tidak berbentuk buih (Rochmanah dan Dewi 2015). Hasil gambar identifikasi secara katalase biokimia dapat dilihat pada lampiran 11.

10.5 Uji koagulase. Uji koagulase menggunakan plasma darah yang ditambah dengan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil positif apabila terbentuk gumpalan, hasil identifikasi pada penelitian ini menunjukkan terjadinya gumpalan. Hasil menunjukkan bahwa bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 uji koagulasenya positif karena mempunyai enzim koagulase yang mampu menggumpalkan plasma dengan terjadi perubahan plasma darah yang terdenaturasi oleh bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 sehingga terbentuk gumpalan berwarna putih. Enzim koagulase bekerja mengubah

fibrinogen menjadi fibrin sehingga dapat menggumpalkan plasma darah (Sanu *et al.* 2015). Hasil gambar identifikasi secara koagulase biokimia dapat dilihat pada lampiran 11.

11 Hasil Pengujian aktivitas antibakteri daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) secara difusi

Metode difusi mempunyai keuntungan yaitu untuk mengetahui senyawa yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Kelemahan dari metode difusi adalah tidak bisa mengetahui pada kadar berapa membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri.

Hasil dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun stevia diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan metode difusi. Konsentrasi yang digunakan yaitu 40%, 20%, 10% dari masing-masing ekstrak dan fraksi. Kontrol positif menggunakan ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan DMSO 5%. Berdasarkan hasil dari pengujian yang telah dilakukan bahwa DMSO 5% tidak memiliki daya hambat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Kekeruhan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan standard *Mc Farland* 0,5. Metode difusi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode disk cakram daya hambat yang terbentuk berupa zona jernih di sekitar daerah disk dalam ukuran mm.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air menunjukkan memiliki daya hambat pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona jernih yang mengelilingi daerah disk cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi dapat dilihat pada tabel. Foto hasil metode difusi dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 metode difusi

Konsentrasi	Sampel	Diameter Hambat (mm)			
		1	2	3	Rata-rata ± SD
40%	Ekstrak etanol	13,50	13	13,50	13,33 ± 0,29
	n-Heksan	12	12,75	12,50	12,42 ± 0,38
	Etil asetat	16,50	16	16,50	16,33 ± 0,29
	Air	10	10,50	10,50	10,33 ± 0,29
20%	Ekstrak etanol	12	12,50	12	12,17 ± 0,29
	n-Heksan	10,50	10,50	10,25	10,42 ± 0,14
	Etil asetat	15,50	14,50	15	15,00 ± 0,50
	Air	9	9	9,50	9,17 ± 0,29
10%	Ekstrak etanol	10,50	10	10	10,17 ± 0,29
	n-Heksan	8,5	7	7,75	7,75 ± 0,75
	Etil asetat	12,5	12,5	12,75	12,58 ± 0,14
	Air	8,25	8,50	8	8,25 ± 0,25
Kontrol (+) Ciprofloxacin 5 µg		20	20,5	20	20,17 ± 0,28
Kontrol (-) DMSO 5%		-	-	-	-

Fraksi dan ekstrak etanol daun stevia pada konsentrasi 40% memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dari pada konsentrasi 20% dan 10%. Berdasarkan tabel 10 hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dibandingkan ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi air daun stevia. Hasil rata-rata diameter zona hambat fraksi etil asetat dengan masing-masing konsentrasi yaitu 40%, 20% dan 10% adalah 16,33 mm, 15 mm, dan 12,58 mm.

Kontrol positif (ciprofloxacin) terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter zona hambat paling besar dengan rata-rata yaitu 20,17 mm. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi menggunakan kontrol negatif DMSO 5% yang dalam pengujian ini tidak aktif dalam menghambat bakteri uji.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan statistik Analisis of Varian (ANOVA) one way. ANOVA one way digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA one way adalah konsentrasi 40%, 20%, 10% dari fraksi n-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun stevia. Kontrol positif dan kontrol negatif

juga diikutsertakan dalam analisis ANOVA *one way*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, ekstrak etanol serta kontrol positif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sampel Kolmogorove-Sminov* diperoleh signifikan $0,546 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal dan hasil uji *Test of Homogeneity of Variances* diproleh hasil $0,220 > 0,05$ maka data tersebut termasuk homogen sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh $F = 554,677$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Berdasarkan tabel Tukey dan Bonferroni test terdapat tanda * pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Apabila tidak terdapat tanda * maka diameter hambat aktivitas antibakteri tidak signifikan artinya tidak memiliki perbedaan. Hasil analisis Tukey test dan Bonferroni test dapat dilihat pada lampiran 26.

Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 10 subset, tabel ini bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda signifikan. Subset 1 terdapat kontrol negatif dan subset 2 sampai 7 terdapat sediaan uji dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Subset 8 hanya terdapat fraksi etil asetat 20%, Subset 9 hanya terdapat fraksi etil asetat 40%, sehingga diketahui bahwa fraksi etil asetat 40% merupakan fraksi paling aktif. Diameter hambat konsentrasi 40% lebih besar disbanding 20%. Subset 10 terdapat kontrol positif, yang mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri terdiri dalam satu tabel dan zona hambatnya paling besar. Hal ini berbeda dengan sediaan uji yang termasuk dalam satu subset tidak mempunyai beda secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Test *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 26.

Berdasarkan tabel 10 dan analisis data dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat 40% merupakan fraksi teraktif dilihat dari besarnya daya hambat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yaitu 16,33 mm dibandingkan ekstrak etanol

daun stevia, fraksi *n*-heksan dan air. Kekuatan daya antibakteri menjadi empat kategori yaitu menghambat lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (>20 mm) (Rahmah *et al.* 2017). Rata-rata daya hambat pada fraksi etil asetat 40% adalah 16,33 mm berarti termasuk kategori kuat dalam menghambat bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175, hal ini dikarenakan etil asetat mampu menarik senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan dengan fraksi yang lain. Etil asetat dapat melarutkan senyawa golongan alkaloid, aglikon, monoglikosida, terpenoid, dan steroid (Mardiyaniingsih dan Resmi 2014). Penelitian Heni *et al.* (2015) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mampu menarik golongan senyawa flavonoid, saponin dan polifenol. Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi non polar. Senyawa yang terkandung didalam etil asetat berdasarkan hasil uji KLT pada penelitian ini adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Senyawa tersebut memiliki mekanisme penghambatan terhadap antibakteri sehingga fraksi etil asetat bekerja secara optimum dalam penghambatan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Hasil uji KLT menunjukkan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Flavonoid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang biasanya ditemukan didalam jaringan tanaman. Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel bakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Bontjura *et al.* 2015).

Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Ernawati dan Kumala 2015). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki kemampuan menginaktifkan adhesin sel mikroba juga

menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ngajow *et al.* 2013).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, mengikat membran sitoplasma, mengganggu dan mengurangi kestabilan. Proses ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. (Ngajow 2013).

12 Hasil Identifikasi Fraksi Teraktif dengan KLT

Fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 adalah fraksi etil asetat. Analisis senyawa kimia pada fraksi etil asetat dari daun stevia dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sebelum dilakukan identifikasi senyawa menggunakan KLT terlebih dahulu dilakukan skrining fitokimia kualitatif menggunakan uji tabung. Hasil dari skrining fitokimia kualitatif menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan hasil positif terhadap flavonoid, alkaloid, saponin, steroid dan tanin. Identifikasi secara KLT diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm. Hasil yang diperoleh diamati warna noda fraksi etil asetat dan pembanding, serta dihitung nilai Rfnya. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat dengan KLT dapat dilihat pada tabel 10 dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 23.

Tabel 11. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat secara KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV 254 Setelah disemprot	UV 366 Setelah disemprot	Pereaksi Semprot	Pustaka Setelah disemprot pada UV 366	Ket
Rutin	0,47	Meredam	Kuning	Sitroborat	Kuning	
Fraksi etil asetat	0,47	Meredam	Kuning			+

Hasil identifikasi flavonoid dengan KLT diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm sebelum disemprot dan sesudah disemprot dengan sitroborat. Sinar tampak pada bercak fraksi etil asetat dan baku setelah disemprot berwarna kuning setelah

disemprot pada UV 366 nm. Pada UV 254 nm bercak memberikan warna peredaman. Noda pada UV 366 nm sebelum disemprot berfluoresensi biru, setelah disemprot dengan sitroborat bewarna kuning yang menunjukkan hasil positif flavonoid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) dengan pembanding rutin. Terdapat 7 bercak fraksi etil asetat, namun ada satu bercak yang sejajar dengan pembanding yang mempunyai nilai yang sama dengan nilai Rf 0,47. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid secara KLT dinyatakan positif. Dilihat dari nilai Rf bercak antara baku pembanding dengan bercak fraksi etil asetat memiliki bercak yang sejajar dan nilai yang sama.

Tabel 12. Hasil identifikasi Alkaloid fraksi etil asetat secara KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV 254 Setelah disemprot	UV 366 Setelah disemprot	Pereaksi Semprot	Pustaka Setelah disemprot pada UV 366	Ket
Papaverin	0,71	Meredam	Biru tua	Dragendrof	Biru	
Fraksi etil asetat	0,71	Meredam	Biru tua			+

Hasil identifikasi alkaloid dengan KLT diamati pada UV 254 nm dan UV nm 366 sebelum disemprot dan sesudah disemprot dengan dragendrof. Lempeng KLT kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan Dragendrof. Pada sinar tampak setelah disemprot noda fraksi etil asetat bewarna coklat . Noda fraksi etil asetat terlihat peredaman pada UV 254 nm dan sebelum disemprot pada UV 366 nm bercak berwarna biru tua, dengan pereaksi semprot memberikan noda fraksi etil asetat bewarna biru tua pada UV 366 nm, hasil ini menunjukkan hasil positif alkaloid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase gerak etil asetat : methanol : (90:9:1) dengan pembanding papaverin. Terdapat bercak fraksi etil asetat sebanyak lima bercak, namun ada satu bercak yang sejajar dengan pembanding mempunyai nilai yang sama dengan nilai Rf 0,71. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid secara KLT dinyatakan positif. Dilihat dari nilai Rf bercak antara baku pembanding dengan bercak fraksi etil asetat memiliki nilai yang sama.

Tabel 13. Hasil identifikasi tanin fraksi etil asetat secara KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV 254 Setelah disemprot	UV 366 Setelah disemprot	Pereaksi Semprot	Pustaka Setelah disemprot pada UV 366	Ket
Asam galat	0,67	Meredam	Lembayung	FeCl ₃	berwana lembayung	
Fraksi etil asetat	0,67	Meredam	Lembayung	FeCl ₃		+

Hasil identifikasi tanin dengan KLT diamati pada UV 254 dan UV 366 sebelum disemprot dan sesudah disemprot dengan FeCl₃. Lempeng KLT kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan FeCl₃. Bercak pada sinar tampak setelah disemprot memberikan warna, pada bercak baku berwana hitam dan bercak fraksi etil asetat berwana hijau. Pada UV 254 bercak tetap berwana meredam, sedangkan pada UV 366 bercak berwana lembayung. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4: 1:5) dengan pembanding asam galat. Terdapat lima bercak fraksi etil asetat, namun ada satu bercak yang sejajar dengan pembanding mempunyai nilai yang sama dengan nilai Rf 0,67. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa tanin secara KLT dinyatakan positif. Dilihat dari nilai Rf bercak antara baku pembanding dengan bercak fraksi etil asetat memiliki nilai yang sama.

Tabel 14. Hasil identifikasi saponin fraksi etil asetat secara KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV 254 Setelah disemprot	UV 366 Setelah disemprot	Pereaksi Semprot	Pustaka Setelah disemprot pada UV 366	Ket
Glisirisin	0,8	Meredam	-	<i>Lieberman Bouchardat</i>	Berwana biru	
Fraksi etil asetat	0,8	Meredam	Biru tua			+

Hasil identifikasi saponin dengan KLT diamati pada UV 254 dan UV366 sebelum disemprot dan sesudah disemprot dengan *Lieberman Bouchardat*. Pada sinar tampak noda fraksi etil asetat berwana hijau, pada UV 254 bercak tetap berwana meredam, sedangkan pada UV 366 biru tua. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : methanol : air (6:3:1) dengan pembanding glisirisin. Terdapat enam bercak fraksi etil asetat, namun ada satu bercak yang sejajar dengan baku pembanding mempunyai nilai yang sama dengan nilai Rf 0,8. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa saponin secara KLT

dinyatakan positif. Dilihat dari nilai Rf bercak antara baku pembanding dengan bercak fraksi etil asetat memiliki nilai yang sama

Tabel 15. Hasil identifikasi steroid fraksi etil asetat secara KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV 254 Setelah disemprot	UV 366 Setelah disemprot	Pereaksi Semprot	Pustaka Setelah disemprot pada UV 366	Ket
Stigmasterol	0,55	Meredam	Biru	<i>Lieberman Bouchardat</i>	Biru	
Fraksi etil asetat	-	-	-			-

Hasil identifikasi steroid dengan KLT diamati pada UV 254 dan UV 366 sebelum disemprot dan sesudah disemprot dengan *Lieberman Bouchardat*. Lempeng KLT kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan *Lieberman Bouchardat*, namun pada bercak fraksi etil asetat tidak ada yang sejajar dengan bercak baku pembanding. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (6:4) dengan pembanding stigmasterol. Pada UV 254 nm memberikan warna peredaman, pada UV 366 nm noda baku berfluoresensi biru setelah penyemprotan. Bercak baku pembanding stigmasterol mempunyai nilai Rf 0,55. Fraksi etil asetat menghasilkan 8 bercak, namun bercak tidak ada yang sejajar dengan bercak baku pembanding. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa steroid yang terkandung pada fraksi etil asetat secara KLT dinyatakan negatif karena dapat dilihat dari nilai Rf bercak antara sampel dengan baku pembanding tidak sama, pada fraksi etil asetat tidak ada bercak yang sama dengan baku stigmasterol.

13 Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) secara dilusi

Hasil fraksinasi ekstrak etanol yaitu fraksi yang paling aktif dari daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menggunakan metode dilusi untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) yaitu konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara

seluruh tabung diinokulasikan secara goresan pada media agar darah untuk masing-masing bakteri uji. Pengujian aktivitas fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun stevia dilakukan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan konsentrasi larutan masing-masing kontrol (-), 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625 %; 0,3125 %; 0,1563 %; 0,078% dan kontrol (+).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sulit diamati karena fraksi uji yang terlalu pekat, sehingga tidak dapat diamati jernih atau keruhnya larutan uji. Dilakukan goresan pada media agar darah. Tujuannya supaya terlihat Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada fraksi yang diuji. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari fraksi yang bersifat antibakteri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi larutan dari tabung uji pada media agar darah dalam cawan petri steril. Konsentrasi bunuh minimum ditentukan pada medium agar darah dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih efektif dibandingkan senyawa didalam fraksi *n*-heksan dan fraksi air daun stevia dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat daun stevia adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Berdasarkan tabel 16 diatas hasil dari penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 40% dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan Konsentrasi Bunuh Minimum 5%. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif (etil asetat 40%) dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 16. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun stevia terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat 40%		
	I	II	III
kontrol (-)	-	-	-
40%	-	-	-
20%	-	-	-
10%	-	-	-
5%	-	-	-
2,5%	+	+	+
1,25%	+	+	+
0,625%	+	+	+
0,3125%	+	+	+
0,1563%	+	+	+
0,078 %	+	+	+
kontrol (+)	+	+	+

Keterangan
 (+): ada pertumbuhan bakteri
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol (-): fraksi etil
 Kontrol (+) : suspensi bakteri

Fraksi etil asetat konsentrasi 40% adalah fraksi yang paling aktif. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih optimum dibandingkan senyawa didalam fraksi *n*-heksan dan fraksi air daun stevia dalam menghambat pertumbuhan bakteri, dilihat dari hasil uji identifikasi kandungan senyawa secara KLT, sehingga diduga aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat daun stevia adalah flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin.