

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa tanaman yang digunakan sebagai bahan uji merupakan tanaman yang benar. Hasil determinasi yang diterima dari Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar daun alpukat (*Persea americana* Mill.) seperti yang tercantum pada surat hasil determinasi (Lampiran 1).

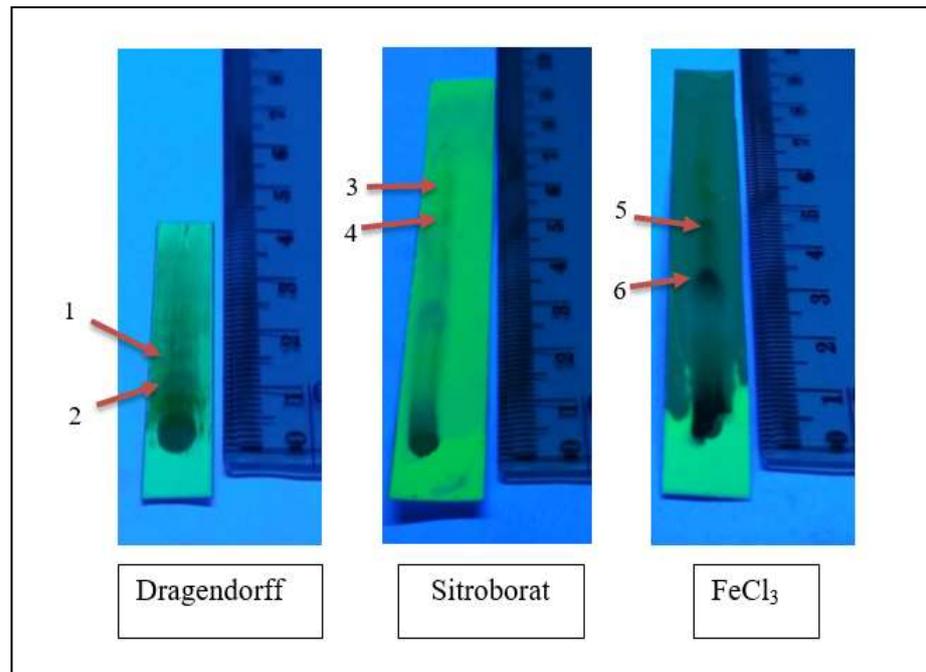
2. Pembuatan Ekstrak Etanolik

Ekstrak etanol dibuat dengan metode ekstraksi maserasi, dimana maserasi merupakan metode ekstraksi dingin dengan cara merendam satu bagian serbuk ke dalam beberapa bagian penyari. Pada penelitian ini sebanyak 1 kg serbuk halus daun alpukat yang didapatkan dari hasil pengayakan dengan pengayak sebesar 80 mesh drendam ke dalam 7 bagian etanol 70%. Etanol 70% digunakan sebagai larutan penyari karena pelarut ini merupakan pelarut organik yang bersifat universal sehingga dapat menarik sebagian besar senyawa metabolit yang bersifat polar hingga non-polar. Maserasi dilakukan di dalam sebuah bejana dan didiamkan pada suhu ruang selama tiga hari dengan dilakukan

pengadukan berkala agar kontak antara serbuk dan penyari merata. Selanjutnya, hasil maserasi tersebut disaring ke dalam Erlenmeyer dan sisa residu kembali di re-maserasi hingga perbandingan serbuk dan penyari mencapai 1:10 selama 2 hari. Ekstrak cair hasil proses ekstraksi kemudian di evaporasi untuk mengentalkan ekstrak dan mengurangi kandungan alkohol yang masih berada di dalam ekstrak. Hasil evaporasi kembali diuapkan di atas penangas air hingga membentuk ekstrak kental etanol daun alpukat berwarna hitam dengan berat 51,36 gram.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi Etanol

Uji KLT pada penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid, tanin dan flavonoid. Fase diam yang digunakan yakni silika gel GF₂₅₄ dengan panjang lempeng 3x10 cm. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksan dan etilasetat dengan perbandingan 1:2. Sebelum dilakukan penotolan pada lempeng silika, fraksi dilarutkan dengan pelarutnya, kemudian ditotolkan pada fase diam dengan jarak 1 cm dari tepi bawah lempeng silika gel. Hasil uji KLT fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat bisa dilihat pada (gambar 5).



Gambar 1. Hasil Uji penyemprotan Kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengamatan di bawah sinar UV 254. Penyemprotan dragendroff untuk alkaloid. (1) dan (2) plot coklat. Penyemprotan sitroborat untuk flavonoid. (3) dan (4) plot kuning. Penyemprotan FeCl_3 untuk tanin. (5) dan (6) plot ungu kehitaman.

Pereaksi dragendroff digunakan untuk melihat kandungan senyawa alkaloid yang terdapat pada fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat. Alkaloid akan memberikan warna coklat atau jingga ketika disemprot dengan dragendroff. Hasil penelitian menunjukkan adanya warna jingga pada sinar tampak, warna jingga kecokelatan pada sinar UV 254, dan tidak nampak pada sinar UV 366 dengan nilai Rf sebesar 0,342 dan 0,571. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam fraksi tersebut terkandung senyawa alkaloid.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Winadi (2016) tanin akan memberikan bercak berwarna biru atau ungu kehitaman jika disemprot dengan FeCl_3 . Hasil pengamatan menunjukkan adanya warna

ungu kehitaman pada sinar tampak, warna ungu kehitaman pada sinar UV 254, dan tidak nampak pada sinar UV 366 dengan nilai Rf sebesar 0,387 dan 0,5. Hal ini menyatakan bahwa di dalam fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat mengandung senyawa tanin.

Analisis flavonoid dilakukan dengan pereaksi sitroborat dan akan menghasilkan bercak berwarna kuning kemerahan dan flourensi kuning pada UV 366. Hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan adanya warna kuning pada sinar tampak, warna kuning pada sinar UV 254 dan tidak nampak pada sinar UV 366 dengan nilai Rf 0,6 dan 0,687. Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi uji mengandung senyawa flavonoid.

Tabel 1. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis

| Jenis Uji | Sinar tampak | UV | | Rf | Ket |
|-------------------|----------------|-------------------|-----|----------------|---------------|
| | | 254 | 366 | | |
| Dragendroff | Jingga | Jingga kecoklatan | - | 0,342 0,571 | Alkaloid (+) |
| FeCl ₃ | Ungu kehitaman | Ungu kehitaman | - | 0,387 0,5 | Tannin (+) |
| Sitroborat | kuning | Kuning | - | 0,6 0,687 | Flavonoid (+) |

4. Fraksinasi Daun Alpukat

Fraksinasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode partisi cair-cair. Tujuan dari proses ini adalah untuk memisahkan senyawa tanin dan flavonoid yang memiliki sifat seperti etanol agar terpisah dari senyawa lainnya. Prinsip fraksinasi adalah pemisahan

senyawa dengan peningkatan polaritas, maka digunakan pelarut *n*-heksan dan pelarut etanol 96% pada penelitian ini karena kedua pelarut organik tersebut memiliki sifat yang berbeda sehingga saat kedua pelarut tersebut disatukan dapat memberikan dua lapisan yang saling memisah. Lapisan atas yang berwarna hijau gelap merupakan fraksi *n*-heksan, sedangkan lapisan gelap yang berada dibawahnya merupakan fraksi etanol dan bagian paling bawah adalah residu atau pengotor yang masih terkandung di dalam ekstrak. Adanya lapisan tidak bercampur yang terbentuk diakibatkan oleh adanya perbedaan masa jenis dari kedua pelarut tersebut dimana, pelarut dengan masa jenis yang besar akan berada pada bagian bawah corong pisah. Fraksi *n*-heksan yang terbentuk ditampung ke dalam erlenmeyer dan fraksi etanolik yang tersisa difraksikan kembali dengan *n*-heksan 50 ml sebanyak 3 kali tiap 50 ml ekstrak cair etanol 96%. Hasil fraksinasi yang didapatkan adalah fraksi *n*-heksan 5,18 gram dengan rendemen 10,36% dan fraksi etanol 39,64 gram dengan persen rendemen 89,64%.

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji potensi antibakteri dilakukan pada fraksi etanol menggunakan metode kertas cakram (*Kirby-bauer*). Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah fraksi tersebut berpotensi menghambat aktivitas bakteri *Shigella dysenteriae*. Fraksi etanol dibuat kadar seri konsentrasi dengan berbagai variasi yaitu 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Masing-masing konsentrasi

ekstrak etanolik tersebut dilakukan replikasi pengujian antibakteri sebanyak 3x.

Data yang diperoleh dari metode cakram kertas adalah ukuran zona hambat dengan cara mengukur diameter kejernihan yang dihasilkan oleh tiap-tiap konsentrasi fraksi. Semua hasil yang didapatkan dibandingkan dengan hasil kontrol positif dan kontrol negatif.

Berdasarkan hasil pengamatan, pada fraksi polar menggunakan pelarut polar yaitu etanol menunjukkan zona hambat pada semua konsentrasi, mulai dari konsentrasi 12,5 % hingga 100%. Zona hambat terbesar pada fraksi etanol ditunjukkan pada cawan petri dengan konsentrasi 100% dengan rata-rata 12,33 mm. Sedangkan daya hambat terkecil terdapat pada cawan petri dengan konsentrasi 12,5% yang memiliki rata-rata 6,67 mm. Dari hasil tersebut didapatkan nilai DZI fraksi etanol berada pada konsentrasi 12,5% (tabel 2).

Tabel 2. Tabel Hasil Pengamatan Uji Antibakteri

| Perlakuan | Diameter Zona Hambat (mm) | | | | | |
|-------------|---------------------------|-------|-------|-------|-----------------|-----------------|
| | Kadar (%) | | | | Kontrol Positif | Kontrol Negatif |
| | 100 | 50 | 25 | 12,5 | | |
| Replikasi 1 | 14 | 10 | 8 | 7 | 30 | - |
| Replikasi 2 | 12 | 10 | 7 | 7 | 28 | - |
| Replikasi 3 | 11 | 11 | 8 | 6 | 26 | - |
| Rata-rata | 12,33 | 10,33 | 7,67 | 6,67 | 28 | - |
| S. Deviasi | 1,528 | 0,577 | 0,577 | 0,577 | 2 | - |

Hasil penelitian kemudian dilakukan perbandingan terhadap kontrol positif yaitu siprofloksasin dan kontrol negatif yaitu aquades

steril. Pengujian kontrol positif dan negatif dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali guna menjaga reliabilitas hasil. Hasil pengamatan terhadap kontrol positif dan negatif (tabel 2).

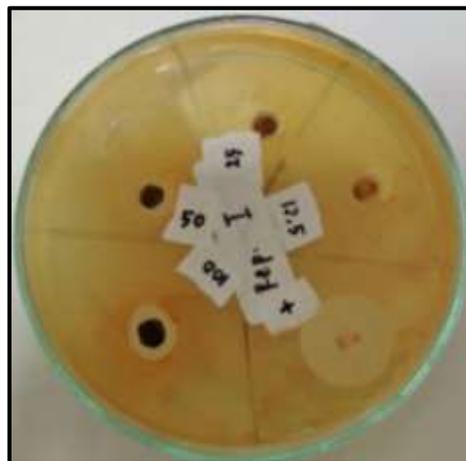
Siprofloksasin mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. dengan zona hambat rata-rata sebesar 28 mm dan aquades steril sebagai kontrol negatif tidak mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* (tabel 2). Hal ini membuktikan bahwa aquades steril yang menjadi pelarut dari pembuatan seri konsentrasi fraksi tidak berpengaruh dalam peran penghambatan bakteri oleh fraksi etanol daun alpukat.

Uji statistik efektivitas fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* menggunakan aplikasi SPSS 24. Data penelitian yang dilakukan pada penelitian ini terdiri lebih dari 2 kelompok dan berpasangan sehingga uji kebermaknaan menggunakan *One way ANOVA*. Pada Uji *One way ANOVA* ada dua syarat yang harus terpenuhi yaitu, data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ dan variasi data normal dengan nilai $p > 0,05$.

Berdasarkan uji statistik ANOVA untuk uji normalitas distribusi data, didapatkan hasil data terdistribusi normal dengan nilai p sebesar 0,285 ($P > 0,05$). Dari hasil uji deskriptif diketahui bahwa rata-rata nilai DZI dari yang terkecil hingga yang terbesar berturut-turut adalah konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, dan 100% (Lampiran 4). Varian data

normal dan nilai signifikansi ANOVA $< 0,05$ (Lampiran 4). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak, sehingga diperlukan analisis lanjutan dengan Tukey HSD.

Kesimpulan dari hasil uji lanjutan dengan Tukey HSD tersebut menyatakan bahwa, efek antibakteri tiap konsentrasi fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat memiliki perbedaan zona hambat yang signifikan dari tiap seri kadar. Perbedaan yang paling signifikan terlihat diantara konsentrasi 12,5%, 25%, dan 100%. Sehingga dapat ditarik kesimpulan, bahwa kadar minimum fraksi etanol yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri yaitu pada konsentrasi 12,5% sedangkan konsentrasi maksimum yang mampu menghambat bakteri *Shigella dysenteriae* yaitu 100%.



Gambar 2. Hasil Uji Antibakteri

B. Pembahasan

Indonesia yang beriklim tropis menyebabkan tanahnya subur sehingga banyak jenis tumbuhan yang dapat tumbuh. Diantara berbagai jenis tumbuhan tersebut, beberapa jenis tumbuhan memiliki khasiat sebagai obat, seperti daun

alpukat. Daun alpukat berkhasiat menghambat pertumbuhan bakteri. Munculnya kasus resistensi antibiotika dalam penanganan infeksi akibat bakteri membuat masyarakat mencari alternatif lain sebagai pengobatan, salah satunya adalah daun alpukat.

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dan untuk mengetahui diameter zona hambat terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dari seri konsentrasi kadar fraksi uji.

Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman guna menetapkan kebenaran sampel yang akan di uji. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kekeliruan pada hasil akhir penelitian serta menyatakan keaslian dari sampel uji. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium biologi dan farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan hasil, sampel yang di uji benar-benar merupakan daun tanaman alpukat (*Persea americana* Mill.) (Lampiran 1).

Tahap kedua adalah proses pembuatan serbuk daun alpukat untuk proses ekstraksi. Daun alpukat yang telah dikumpulkan dan dipilih dibersihkan dari zat pengotor. Daun yang sudah terpilih dicuci dengan air mengalir. Pencucian dengan air mengalir bertujuan membersihkan debu dan zat pengotor yang masih menempel pada daun agar kualitas sampel terjaga. Selanjutnya, daun dirajang kecil-kecil dan dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Pengeringan dilakukan untuk menghilangkan

kadar air dalam sampel agar tidak merusak senyawa yang terkandung dalam sampel dan mencegah pembusukan selama proses penyimpanan. Sedangkan kain hitam yang menutupi daun bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa kimia yang terkandung dalam daun alpukat (*Persea americana* Mill.). Pengeringan di bawah sinar matahari dilakukan selama satu minggu dan dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 8 jam. Proses pengeringan dihentikan ketika daun sudah berwarna coklat merata dan mudah untuk dihancurkan. Daun-daun kering tersebut kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 80 mesh. Fungsi dari penghalusan dan pengayakan adalah agar didapatkan butiran-butiran serbuk yang memiliki diameter sama sehingga mampu memperluas kontak permukaan antara bahan pelarut dan sampel serta memaksimalkan kelarutan senyawa yang terdapat pada sampel dalam proses ekstraksi.

Ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 3 hari dan remaserasi selama 2 hari. Pelarut etanol dipilih karena etanol adalah pelarut yang bersifat polar, sehingga mampu menarik keluar senyawa yang memiliki tingkat polaritas rendah hingga tinggi dalam sel. Pelarut ini merupakan pelarut universal yang sering digunakan dan berharga murah serta mudah untuk didapatkan. Sifat polar membuat etanol mampu bercampur dengan air pada segala perbandingan, selektif untuk menghasilkan jumlah optimal dari senyawa

yang diinginkan, dan panas yang diperlukan untuk proses pemekatan lebih sedikit.

Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan menggunakan 1000 gram serbuk daun alpukat yang direndam dalam 7 liter pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:7 b/v, kemudian di remaserasi dengan penambahan total 3 liter hingga didapatkan perbandingan 1:10 b/v. Banyaknya hasil yang diperoleh dari proses maserasi dipengaruhi dengan besarnya perbandingan antara serbuk simplisia dan cairan penyari, dimana semakin besar perbandingannya maka hasil yang didapatkan akan semakin banyak. Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan secara berulang-ulang dengan tujuan untuk memudahkan pelarut untuk melarutkan senyawa yang terkandung di dalam sel simplisia. Keadaan diam selama proses maserasi dapat menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif dari dalam sel menuju keluar sel sehingga proses keseimbangan konsentrasi antara luar dan dalam sel menjadi lama. Setelah proses maserasi selesai, hasil yang didapatkan dievaporasi. Proses ini dilakukan pada *rotary evaporator* dengan kecepatan 100 rpm dan suhu 60°C, selanjutnya dikentalkan lagi di atas penangas air pada suhu yang sama. Proses pengentalan ini bertujuan agar pelarut yang terkandung di dalam ekstrak hilang dan konsentrasi larutan menjadi lebih tinggi. Hasil akhir berupa ekstrak kental etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill.) ditimbang dan didapatkan hasil 51,36 gram berwarna hitam pekat.

Ekstrak etanolik daun alpukat difraksinasi dengan pelarut etanol 96% dan *n*-heksan dengan metode cair-cair (*liquid extraction*). Pelarut *n*-heksan berperan sebagai fraksi non-polar. Fraksinasi ini dilakukan untuk memisahkan senyawa tanin dan flavonoid dari senyawa golongan lain yang terkandung dalam daun alpukat. Tanin merupakan senyawa polar. Karena senyawa ini bersifat polar, maka senyawa ini akan terikat oleh pelarut etanol yang bersifat polar. Senyawa flavonoid yang bersifat semipolar juga akan terikat pada pelarut etanol yang bersifat polar. Proses ini direplikasi sebanyak 3 kali dan dari hasil yang didapatkan untuk fraksi etanol sebanyak 35,82 gram dan fraksi *n*-heksan sebanyak 2,18 gram.

Pembuatan larutan sampel dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5% menggunakan aquades steril sebagai pelarut untuk melarutkan kembali fraksi *n*-heksan. Metode yang digunakan adalah metode Kirby-Bauer dengan hasil berupa nilai DZI pada masing-masing konsentrasi tiap fraksi dan melihat kadar terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

Metode Kirby-Bauer yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini dipilih karena mampu untuk menentukan sensitifitas bakteri patogen baik bakteri bersifat aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba. Prinsipnya sederhana, yaitu dengan menginokulasikan cawan petri berisi agar TSA dengan bakteri uji yaitu *Shigella dysenteriae*. Kertas cakram yang mengandung sejumlah agen antimikroba akan berdifusi ke dalam media agar saat kontak di

permukaan media, dan akan menghambat pertumbuhan bakteri pada masa inkubasi sehingga menghasilkan zona inhibisi di sekitar kertas cakram.

Zona hambat yang terbentuk dari fraksi menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Sigella dysenteriae*. paling besar pada fraksi etanol yaitu pada kadar 100% dengan zona hambatan terbesar dari ketiga replikasi yaitu 14 mm dan terkecil pada kadar 12,5% sebesar 6 mm. Diduga, hal ini terjadi karena di dalam fraksi etanol terdapat senyawa alkaloid, flavonoid, dan tanin yang bertanggung jawab sebagai agen antibakteri.

Sebagai pembanding, kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah siprofloksasin. Siprofloksasin adalah antibiotik golongan kuinolon kelompok fluorokuinolon yang bekerja dengan menghambat enzim topoisomerase II (DNA *gyrase*) dan topoisomerase IV pada bakteri. Siprofloksasin merupakan antibiotik dengan spektrum luas yang efektif digunakan dalam terapi infeksi saluran kemih, infeksi saluran napas maupun infeksi saluran pencernaan, namun penggunaan dalam waktu panjang dapat menimbulkan resistensi (Sari, 2013).

Hasil penelitian membuktikan bahwa daun alpukat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan hasil pengamatan dari fraksi etanol memiliki efek yang sama dengan antibiotik siprofloksasin. Nilai zona hambat yang terbentuk dari hasil replikasi adalah sebesar 30 mm. Menurut *Performance Standard for Antimicrobial* (2012) dalam Rahmah (2015) menyatakan, antibiotik siprofloksasin dinyatakan sensitif terhadap bakteri *Enterobacteriaceae* apabila memiliki DZI >21 mm,

sedang 16-20 mm, dan resisten <15 mm. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa siprofloksasin termasuk dalam kategori sensitif dalam menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*. Nilai diameter hambatan pada fraksi etanol daun alpukat lebih rendah dari antibiotik siprofloksasin disebabkan karena siprofloksasin merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak merupakan campuran senyawa walaupun telah dilakukan fraksinasi.

Analisis kualitatif dilakukan terhadap hasil fraksinasi yang telah diperoleh menggunakan metode pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa alkaloid, tanin, dan flavonoid dalam masing-masing fraksi karena ketiga senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas sebagai agen antibakteri. Analisis ketiga senyawa tersebut menggunakan fase diam dan fase gerak yang sama yaitu fase diam silika gel GF₂₅₄ nm, sedangkan fase gerak menggunakan *n*-heksan dan etilasetat 1 : 2, perbedaannya terdapat pada pereaksi semprot yang digunakan.

Menurut Akiyama, dkk (2001) dalam Farida, dkk (2010) keaktifan biologis dari senyawa alkaloid disebabkan karena adanya gugus basa yang mengandung nitrogen. Adanya gugus basa ini apabila mengalami kontak dengan bakteri akan bereaksi dengan senyawa-senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan juga DNA bakteri yang merupakan penyusun utama inti sel yang merupakan pusat pengaturan segala kegiatan sel. Reaksi ini terjadi karena secara kimia suatu senyawa yang bersifat basa akan bereaksi dengan senyawa asam dalam hal ini adalah asam amino karena sebagian besar asam amino telah bereaksi dengan gugus basa dari senyawa

alkaloid. Perubahan susunan asam amino ini jelas akan merubah keseimbangan genetic pada asam DNA sehingga DNA bakteri akan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA pada inti sel bakteri akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel, sehingga akan terjadi kerusakan sel. Kerusakan sel menyebabkan sel-sel bakteri tidak mampu melakukan metabolisme sehingga akan mengalami lisis (hancur).

Menurut Di Carlo, dkk. (1999) dan Estrela, dkk. (1995) dalam Sabir (2005) menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

Tanin memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam meninaktifkan bakteri dengan memanfaatkan perbedaan polaritas Antara lipid dengan gugus hidroksil. Apabila sel bakteri semakin banyak mengandung lipid maka dibutuhkan konsentrasi yang tinggi untuk membuat bakteri tersebut lisis (Siregar dkk, 2012).