

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

##### 1. Identifikasi Tanaman

Determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *J. curcas* (*Jatropha curcas* L) yang termasuk dalam suku *Euphorbiaceae*. (Lampiran 1)

##### 2. Pembuatan Ekstrak

Daun *J. curcas* yang digunakan untuk penelitian diambil dari daerah Wirosari, Grobogan, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2015. Daun *J. curcas* disortir, dicuci bersih dan dikeringkan dengan sinar matahari dan ditutup kain hitam selama 3-4 hari. Simplisia kering yang didapat kemudian diblender untuk meningkatkan luas permukaan bahan baku. Serbuk yang dihasilkan berwarna hijau kecoklatan. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50<sup>0</sup> C agar senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun *J. curcas* tidak ikut menguap. Dari proses ekstraksi didapatkan ekstrak sebanyak 21 gram untuk pelarut etilasetat dengan ekstrak kental berwarna hijau pekat dan 9 gram untuk pelarut *n*-heksan dengan ekstrak kental berwarna hijau kekuningan. Hasil rendemen ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* bisa dilihat pada Tabel 2.

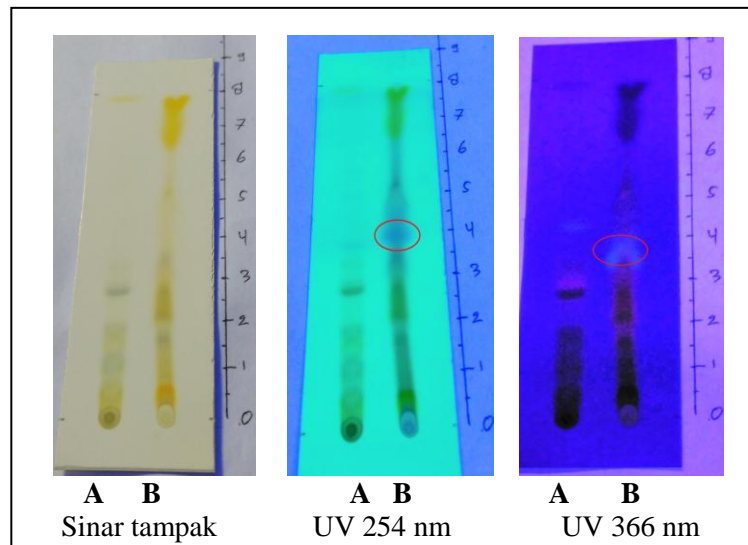
**Tabel 2.** Rendemen ekstrak

<b>Sampel</b>	<b>Rendemen ekstrak kering</b>
Daun daun <i>J. curcas</i> pelarut etilasetat	6%
Daun daun <i>J. curcas</i> pelarut <i>n</i> -heksan	3,6%

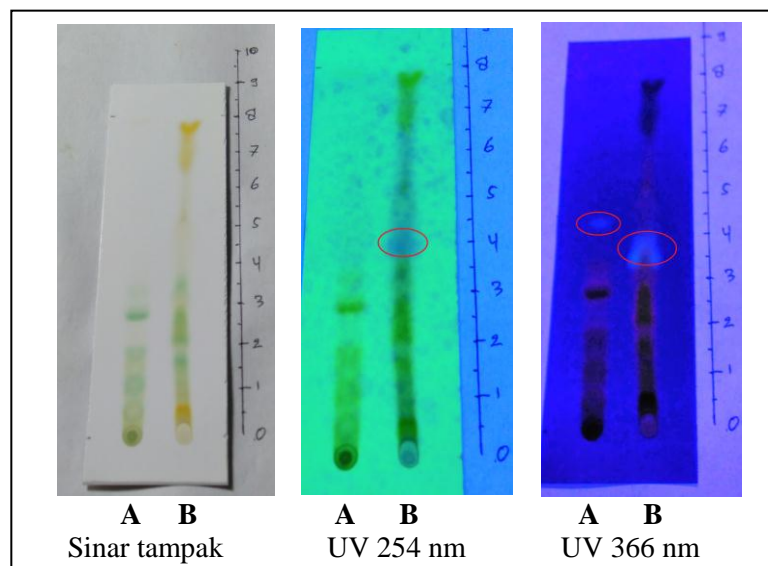
### 3. Kromatografi Lapis Tipis

Pada penelitian ini analisis dilakukan untuk memastikan adanya kandungan senyawa steroid yang terdapat dalam daun *J. curcas* secara kualitatif. Analisis kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dilakukan dengan menggunakan fase diam silika GF<sub>254</sub> dan fase gerak *n*-heksan dan etilasetat (7:3) v/v. Totalan ekstrak *n*-heksan dan etilasetat daun *J. curcas* pada plat silika menggunakan pipa kapiler. Untuk mengidentifikasi senyawa golongan steroid pada ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* digunakan pereaksi semprot 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan anhidridaasetat (Mittal, 2013).

Bercak yang dihasilkan pada KLT lalu dideteksi dengan sinar tampak, sinar UV<sub>254</sub>, dan UV<sub>366</sub>. Agar bercak pada lempeng KLT terlihat jelas dan menentukan senyawa yang terkandung pada ekstrak tanaman dapat digunakan beberapa larutan pereaksi semprot (Depkes RI, 1987). Hasil uji KLT pada ekstrak *n*-heksan dan etilasetat daun *J. curcas* terhadap kandungan steroid ditunjukkan pada Gambar 6 dan 7. Hasil R<sub>f</sub> KLT dapat dilihat pada Tabel 3.



**Gambar 1.** Profil kromatogram steroid sebelum penyemprotan  
(A) Ekstrak etilasetat, (B) ekstrak *n*-heksan



**Gambar 2.** Profil Kromatogram steroid setelah penyemprotan  
(A) Ekstrak etilasetat, (B) ekstrak *n*-heksan

**Tabel 3.** Nilai Rf Steroid ekstrak *n*-heksan dan etilasetat daun *J. curcas*

Bercak	Rf	Warna Hasil Kromatografi Lapis Tipis		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,52	-	-	0,52
2	0,50	-	0,50	0,50

Pada pengukuran menggunakan lampu UV 254 nm bercak menunjukkan warna ungu, sedangkan pada pengukuran lampu 366 bercak berfluoresensi. Bercak pada ekstrak etilasetat menunjukkan Rf 0,52 dan pada *n*-heksan 0,50. Selanjutnya dilakukan penyemprotan dengan pereaksi *Liebermann-Burcard*. Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm terlihat warna ungu dan di bawah sinar UV 366 nm terlihat bercak yang mengalami fluoresensi. Bercak pada ekstrak etilasetat menunjukkan Rf 0,52 dan pada *n*-heksan Rf 0,50.

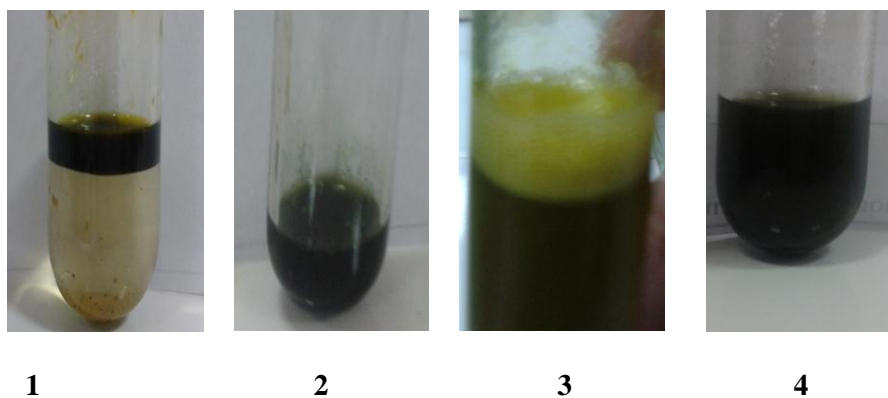
#### **4. Analisis Penapisan Fitokimia**

Komponen yang terdapat di dalam ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dianalisis golongan senyawanya dengan tes uji warna menggunakan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, tanin dan saponin. Penapisan fitokimia adalah metode analisis untuk menentukan jenis metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan karena sifatnya yang dapat bereaksi secara khas dengan pereaksi tertentu. Penapisan fitokimia dilakukan melalui serangkaian pengujian dengan menggunakan pereaksi tertentu.

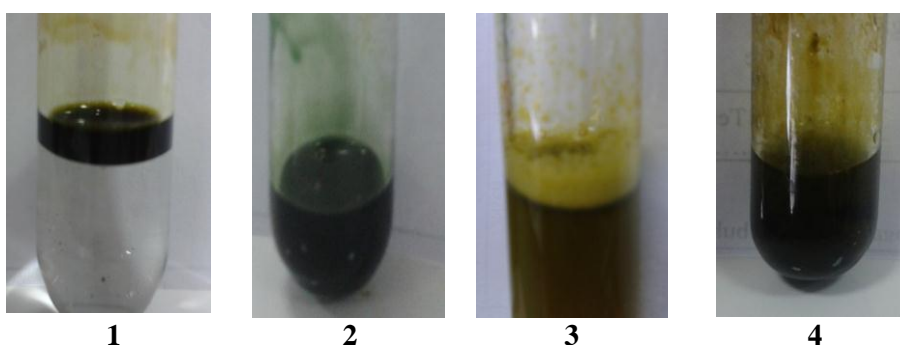
Menurut Moelyono (1996) analisis fitokimia merupakan bagian dari ilmu farmakognosi yang terdapat dalam tumbuhan atau hewan secara keseluruhan atau bagian-bagiannya termasuk cara isolasi dan pemisahannya. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 8, 9

**Tabel 4.** Hasil analisis penapisan fitokimia ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas*

Uji fitokimia	Pereaksi	Hasil uji ekstrak Etilasetat	Hasil uji ekstrak <i>n</i> -heksan
Alkaloid	Dragendroff	(+)	(-)
Steroid	anhidrida asetat- $H_2SO_4$	(+)	(+)
Saponin	air suling	(+)	(+)
Tanin	$FeCl_3$	(+)	(+)



**Gambar 3.** Penapisan Fitokimia ekstrak etilasetat daun *J. curcas* (1) Uji Alkaloid dengan pereaksi *Dragendorff* (2) Uji Steroid dengan pereaksi *Liberman Burcard* (3) Uji Saponin dengan air (4) Uji Tanin dengan  $FeCl_3$ .



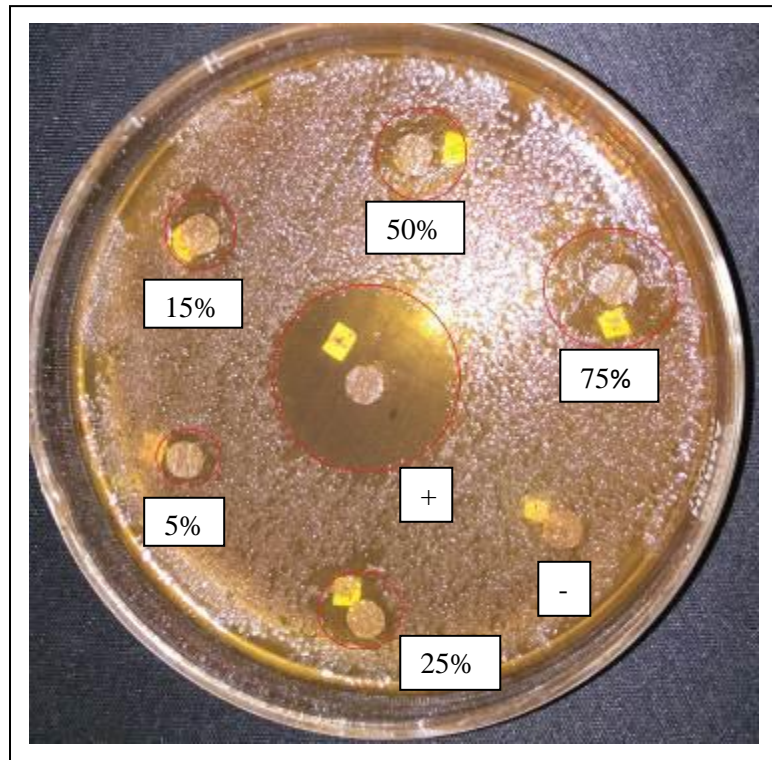
**Gambar 4.** Penapisan Fitokimia ekstrak *n*-heksan daun *J. curcas* Penapisan Fitokimia ekstrak etilasetat daun *J. curcas* (1) Uji Alkaloid dengan pereaksi *Dragendorff* (2) Uji Steroid dengan pereaksi *Liberman Burcard* (3) Uji Saponin dengan air (4) Uji Tanin dengan  $FeCl_3$ .

## 5. Uji aktifitas antibakteri

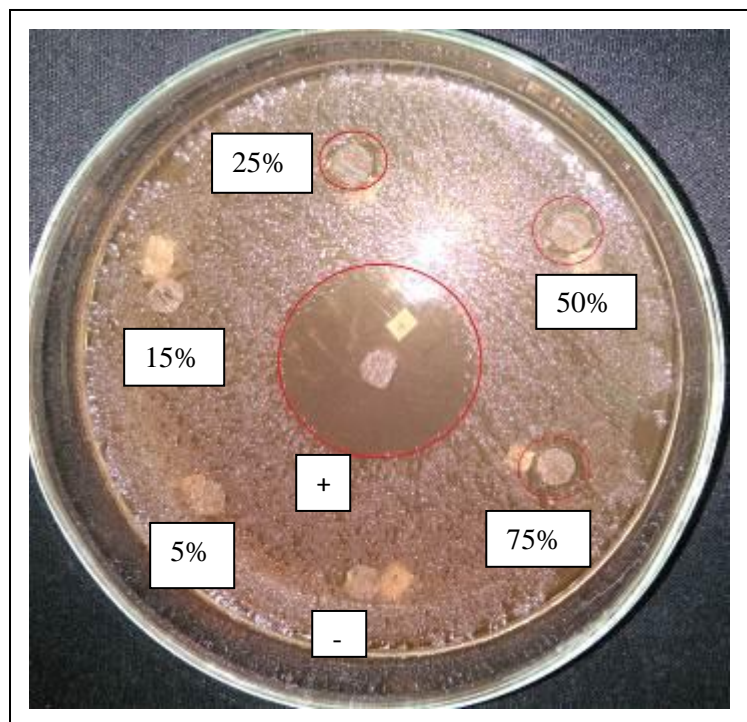
Uji aktivitas antibakteri ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dilakukan dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak yaitu 5%, 15%, 25%, 50%, dan 75%. Sebelumnya ekstrak ditambahkan dengan tween 80 10% agar bisa menyatu dengan air suling. Masing-masing variasi konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Metode yang digunakan untuk pengujian adalah metode difusi agar *Kirby Bauer*. Hasil pengujian aktivitas antibakteri bisa dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 9 & 10.

**Tabel 5.** Diameter zona hambat hasil pengujian

<b>Bahan uji</b>	<b>Konsentrasi</b>	<b>Diameter Zona Hambat (mm)</b>
Ekstrak etilasetat	5%	1.26
	15%	3
	25%	4.4
	50%	6.2
	75%	7.7
Ekstrak <i>n</i> -heksan	5%	0
	15%	0
	25%	1
	50%	2.26
	75%	3
Siprofloksasin	5 µg/ml	22.5
Air suling & tween 80		0



**Gambar 5.** Diameter zona inhibisi ekstrak etilasetat daun *J. curcas*



**Gambar 6.** Diameter zona inhibisi ekstrak *n*-heksan daun *J. curcas*

## **B. Pembahasan**

Langkah awal yang dilakukan pada penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel yang di uji yaitu dengan cara determinasi tanaman. Uji determinasi tanaman dimaksudkan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan sehingga tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan jenis sampel penelitian. Berdasarkan hasil uji determinasi tanaman, diperoleh informasi bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar daun *J. curcas* (*Jatropha curcas* L).

Untuk melakukan proses ekstraksi, daun *J. curcas* terlebih dahulu disortir untuk memisahkan daun yang tidak bagus dan muda. Selanjutnya daun *J. curcas* dikeringkan untuk menghilangkan kadar air pada sampel tumbuhan, agar kandungan senyawa yang diduga agen antibakteri tidak rusak oleh reaksi enzimatik dan juga mencegah terjadinya proses pembusukan selama proses penyimpanan (Katno, 2008). Setelah kering, simplisia dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk. Penyerbukan dimaksudkan untuk memperluas daerah penarikan senyawa kimia, sehingga pada saat proses ekstraksi kontak antara pelarut dan sampel lebih efektif dan senyawa dapat terdesak dengan optimal. Proses pembuatan serbuk simplisia dapat mempengaruhi kualitas ekstrak, sehingga harus dilakukan dengan hati-hati (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi menggunakan dua jenis pelarut yaitu etilasetat dan *n*-heksan. Karena prekursor dari pembentukan triterpenoid/steroid adalah kolesterol yang bersifat nonpolar (Harborne 1987), sehingga diduga triterpenoid/steroid dapat larut pada pelarut organik (nonpolar). Etilasetat mampu melarutkan beberapa



senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba seperti sterol dan terpenoid, saponin, tanin, flavanoid serta senyawa fenol (Oyi *et al.* 2007). Sedangkan *n*-heksan dipilih sebagai pelarut, karena *n*-heksana bersifat stabil dan mudah menguap, selektif dalam melarutkan zat dan akan melarutkan senyawa seperti lilin, lemak, dan terpenoid yang bersifat nonpolar (Houghton dan Raman, 1998).

Maserasi dilakukan selama 4 hari dan dilanjutkan dengan 2 hari remaserasi. Proses maserasi dengan pengulangan (remaserasi) akan lebih efisien dibandingkan dengan maserasi tunggal, hal ini terjadi karena ada kemungkinan sejumlah besar senyawa aktif dalam sampel masih tertinggal dari proses maserasi yang pertama sehingga hasil ekstraksi yang didapatkan optimal. Menurut Ditjen POM (2000) menyatakan bahwa proses ekstraksi suatu tanaman harus dilakukan secara berulang agar bisa mendapatkan kadar zat aktif yang maksimal sehingga dapat dicapai potensi terapi yang maksimal.

Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang berada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik, dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Darwis, 2000).

Proses ekstraksi dilakukan terhadap 350 gram serbuk simplia dengan pelarut etilasetat dan 250 gram dengan pelarut *n*-heksan dengan perbandingan (1:7 b/v). Menurut Voigh (1995) menyatakan bahwa semakin besar perbandingan antara serbuk simplisia dengan cairan pengestraksi, maka akan semakin banyak

hasil yang diperoleh dari proses maserasi tersebut. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan secara periodik yang dimaksudkan untuk memberi kemudahan pelarut untuk melarutkan senyawa yang terdapat dalam sel tanaman (Baraja, 2008).

Selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa steroid menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Analisis kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dilakukan dengan menggunakan fase diam GF<sub>254</sub> dan fase gerak menggunakan campuran *n*-heksan dan etilasetat (7:3). Campuran antara *n*-heksan dan etilasetat digunakan karena memberikan pemisahan yang baik (Heble *et al.*, 1968; Kaul and Staba, 1968).

Plat KLT disemprot dengan pereaksi *Lieberman-Burcard* dan dilihat di bawah lampu UV. Bila plat dilihat di bawah lampu UV bercak akan memberikan karakteristik fluoresensi dan nilai-nilai R<sub>f</sub> dibandingkan dengan masing-masing senyawa (Mittal, 2013). Hasilnya, di bawah lampu UV 366 nm bercak memberikan karakteristik fluoresensi. Terlihat bercak *n*-heksan berfluoresensi pada R<sub>f</sub> 0.50 dan R<sub>f</sub> 0.52 pada ekstrak etilasetat daun *J. curcas*. Berdasarkan R<sub>f</sub> yang terbentuk, ekstrak *n*-heksan dan ekstrak etilasetat mengandung senyawa steroid. Bercak pada ekstrak semakin terlihat jelas setelah dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi *Lieberman-Burcard*.

Ekstrak etilasetat, tidak menunjukkan adanya bercak pada pengamatan sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm sebelum penyemprotan pereaksi

*Lieberman-Burcard*. Namun bercak pada ekstrak etilasetat terlihat setelah dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi *Lieberman-Burcard* yang dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 366 nm, bercak terlihat berfluoresensi. Bercak ekstrak *n*-heksan menunjukkan warna ungu yang jelas dan berfluoresensi lebih jelas dan terang dibandingkan dengan bercak dari ekstrak etilasetat.

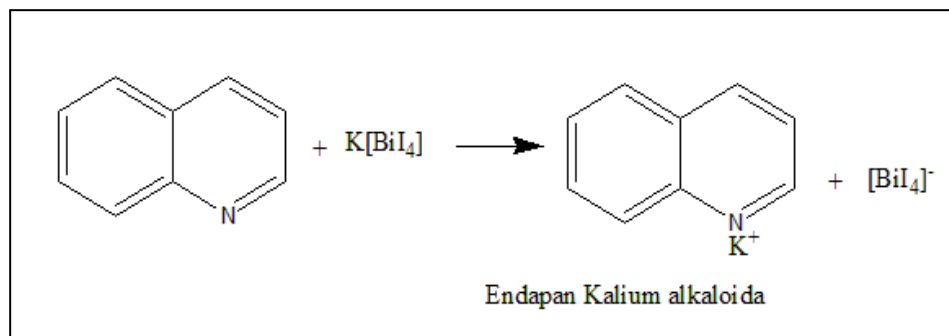
Prinsip reaksi dalam mekanisme uji steroid adalah kondensasi atau pelepasan H<sub>2</sub>O dan penggabungan dengan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi (Siadi, 2012).

Untuk mengetahui kandungan senyawa pada ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dilakukan analisis penapisan fitokimia. Cara ini digunakan untuk mendeteksi senyawa tumbuhan berdasarkan golongannya. Sebagai informasi awal dalam mengetahui senyawa kimia apa yang mempunyai aktivitas biologi dari suatu tanaman. Analisis penapisan fitokimia merupakan metode yang telah dikembangkan dapat mendeteksi adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, senyawa fenolat, tanin, saponin, kumarin, quinon, steroid/terpenoid (Teyler, 1988).

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas*. Pada uji keberadaan alkaloid, terlebih dahulu ekstrak dilarutkan dalam HCl. Alkaloid bersifat basa, sehingga penambahan HCl akan menyebabkan terbentuknya garam. Penambahan air suling bertujuan untuk melarutkan garam alkaloid dan pemanasan dilakukan untuk memecah alkaloid dengan asam klorida, sehingga diperoleh alkaloid yang bukan dari garamnya (Lilies & Nanik, 2012). Identifikasi alkaloid dilakukan dengan 2 pereaksi yaitu *Dragendorff* dan *Mayer*. Hasil uji dinyatakan mengandung alkaloid apabila ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* yang direaksikan dengan pereaksi *Dragendorff* ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat muda sampai kuning, sedangkan apabila direaksikan dengan pereaksi *Mayer* akan membentuk endapan putih.

Dari hasil penapisan fitokimia yang dilakukan hanya ekstrak etilasetat daun *J. curcas* yang direaksikan dengan pereaksi *Dragendorff* menghasilkan endapan berwarna coklat. Endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tanaman, tetapi sering kali kadar alkaloid dalam jaringan tumbuhan kurang dari 1% (Kristanti, *et al.*, 2008).

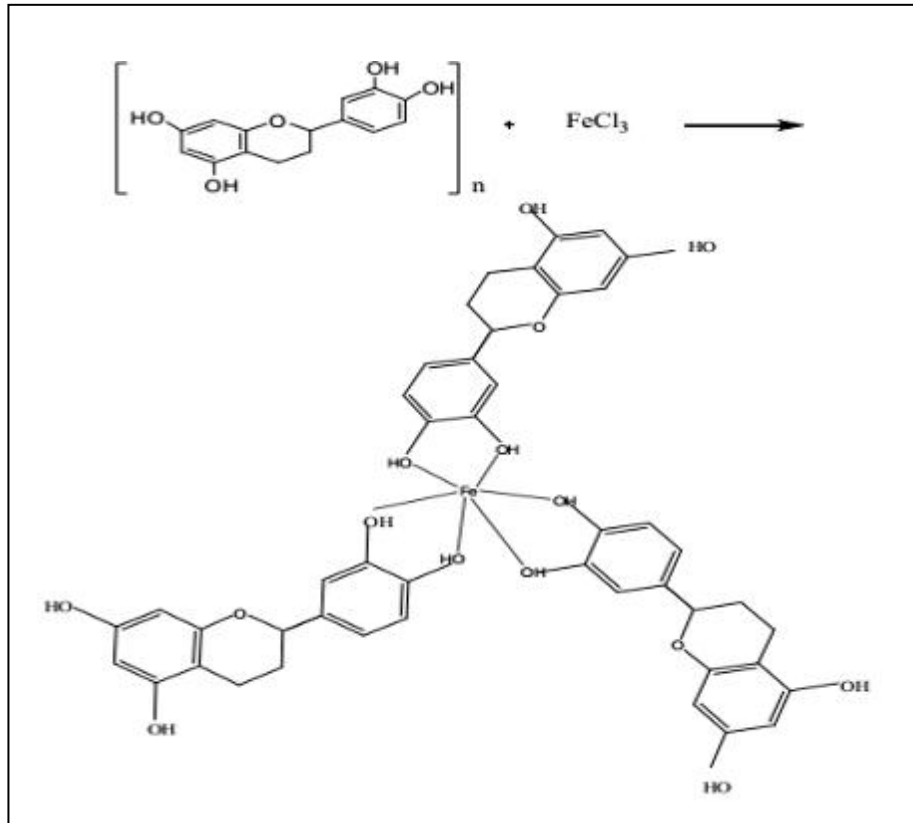
Pada uji alkaloid dengan pereaksi *Dragendorff*, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan  $K^+$  yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji *Dragendorff* ditunjukkan pada gambar berikut ini :



**Gambar 7.** Reaksi uji *Dragendorff*  
(Sumber: Miroslave, 1971)

Alkaloid dapat menghambat pembentukan peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel pada sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Siregar, 2012). Mekanisme lain alkaloid sebagai antibakteri yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Karou, 2005).

Pada percobaan identifikasi tanin menggunakan pereaksi besi (III) klorida. Hasil yang diperoleh pada ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* positif mengandung tanin dengan memberikan warna hijau kehitaman. Terjadinya pembentukan warna hijau ini karena terbentuknya senyawa kompleks antara logam Fe dan tanin. Senyawa kompleks terbentuk karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom nonlogam (Effendy, 2007). Terjadinya warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin galat sedang warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin katekol (Praptiwi, *et al.*, 2006). Pada penambahan larutan  $\text{FeCl}_3$  diperkirakan larutan ini bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  dipergunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol termasuk tanin (Robinson, 1995). Reaksi tanin dengan  $\text{FeCl}_3$  ditunjukkan pada gambar berikut :

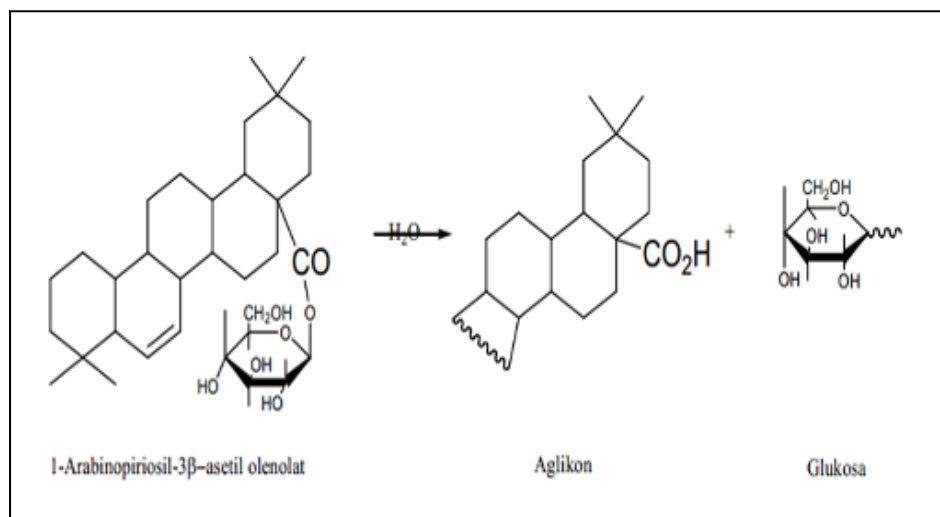


**Gambar 8.** Reaksi perkiraan tannin dengan  $\text{FeCl}_3$   
(Sumber: Soerya, *et al.*, 2005)

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, *et al.*, 2009)

Identifikasi adanya saponin menggunakan uji *Forth* menunjukkan ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* positif mengandung saponin dimana setelah dikocok busa stabil/bertahan selama 2-4 menit (Minhatun, *et al.*, 2014). Terbentuknya busa/buih dikarenakan senyawa saponin memiliki sifat fisik yang mudah larut dalam air dan akan menimbulkan busa ketika dikocok (Suharto, *et al.*, 2010). Timbulnya busa pada uji *Forth* menunjukkan adanya glikosida yang

mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana, *et al.*, 2005). Menurut Robinson (1995) senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolarnya menghadap ke dalam. Keadaan inilah yang tampak seperti busa. Reaksi pada uji saponin bisa dilihat pada gambar berikut :

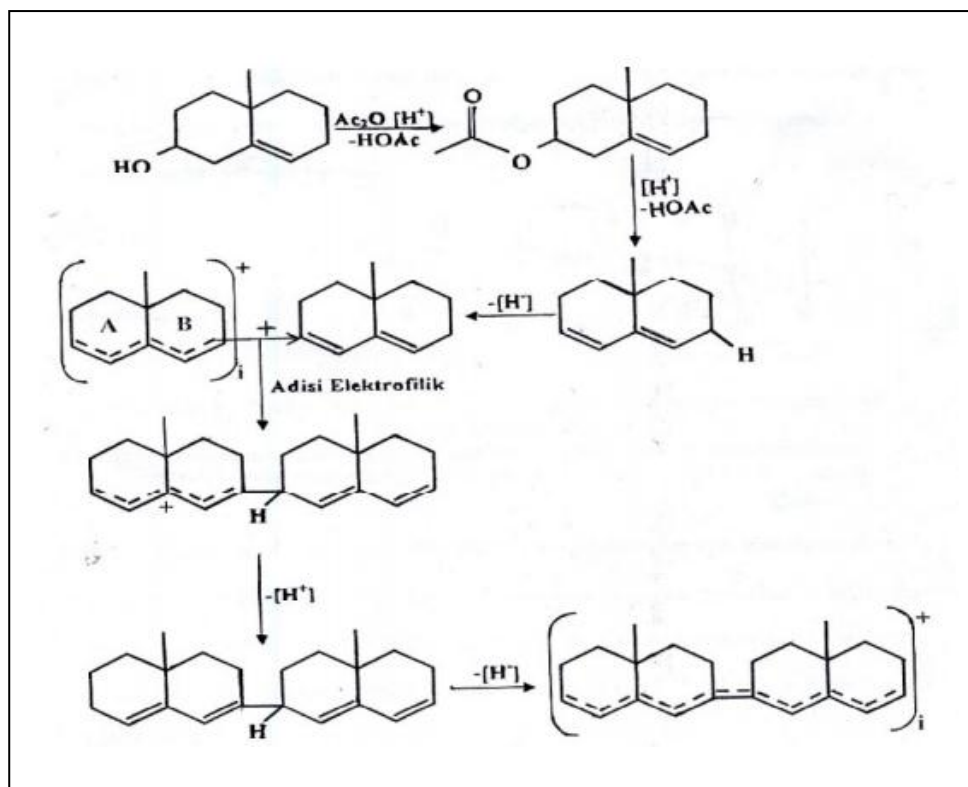


**Gambar 9.** Reaksi perkiraan uji Saponin  
(Sumber: Santos, *et al.*, 1979).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan kematian sel (Nuria, *et al.*, 2009).

Selanjutnya dilakukan penapisan untuk mendeteksi senyawa terpenoid dan steroid. Uji yang banyak digunakan untuk mengidentifikasi adanya triterpenoid

dan steroid adalah reaksi *Lieberman-Burchard* (anhidrida asetat- $H_2SO_4$  pekat) (Harborne, 1987). Hasil uji yang telah dilakukan menunjukkan ekstrak etilasetat dan *n*-heksan positif mengandung steroid. Karena adanya perubahan warna menjadi biru. Menurut Robinson (1995), ketika senyawa triterpenoid ditetesi pereaksi *Lieberman-Burchard* melalui dindingnya akan memberikan reaksi terbentuknya warna cincin kecoklatan, sedangkan steroid akan menghasilkan warna hijau kebiruan. Reaksi yang terjadi antara steroid dengan asam asetat anhidrat adalah reaksi asetilasi gugus OH pada steroid yang akan menghasilkan kompleks asetil steroid (Sriwahyuni, 2010).



**Gambar 10.** Reaksi *Lieberman-Burchard* Penapisan Fitokimia  
(Sumber : Siadi, 2012)



Salah satu golongan terpenoid yang berpotensi sebagai antimikroba adalah triterpenoid. Senyawa triterpenoid yang terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi adalah fitosterol yang terdiri dari sitosterol ( $\beta$ - sitosterol), stigmasterol, dan kampesterol. Menurut Duke (dalam Sumarni, 2008), daun jarak mengandung senyawa metabolit sekunder seperti  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol, 7-keto-  $\beta$ -sitosterol, isovitoksin dan viteksin.

Steroid telah dilaporkan memiliki sifat antibakteri (Okwu, 2001). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Mwime dan Damme (2011) menyatakan bahwa steroid yang merupakan golongan triterpenoid memiliki sifat antibiotik dan antifungi. Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri, 2013).

Senyawa kimia yang bermanfaat dari tumbuhan adalah hasil dari metabolit sekunder yang berupa alkaloid, steroida/terpenoida, flavonoid atau fenolik. Senyawa ini diantaranya berfungsi sebagai pelindung terhadap serangan atau gangguan yang ada disekitar, sebagai antibiotik dan juga sebagai antioksidan (Atmoko & Ma'ruf, 2009).

Pengujian antibakteri adalah teknik untuk mengukur berapa besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme (Dart, 1996). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dengan konsentrasi 5%, 15%, 25%, 50%, dan 75%. Dalam pembuatan larutan sampel dan variasi konsentrasi tersebut digunakan air suling. Sehingga perlu ditambah dengan 10% Tween 80. Tween 80 memiliki HLB 15 bersifat hidrofilik, sehingga dapat membantu kelarutan ekstrak

dengan air. Tujuan dibuat variasi konsentrasi untuk mengetahui perbedaan nilai diameter zona hambat antar perlakuan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Kirby-Bauer*. Metode *Kirby-Bauer* digunakan untuk menentukan sensitifitas bakteri patogen, baik yang aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba (Hudzicki, 2013). Pada penelitian ini, sebelum melakukan pengujian antibakteri, dilakukan pembuatan media *Mac Conkey* pada cawan petri yang selanjutnya diinokulasi dengan bakteri uji *Shigella flexneri ATCC 12022*. Penggunaan *Mac Conkey* sebagai media karena media ini spesifik terhadap bakteri gram negatif sehingga selain bakteri gram negatif tidak dapat berkembang (Hale & Keusch, 1996).

Untuk mengaplikasikan agen antibakteri digunakan cakram kertas yang mengandung sejumlah agen antibakteri yang dapat berdifusi ke dalam media agar ketika kontak dengan permukaan media. Selama inkubasi agen antibakteri berdifusi ke media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri, menghasilkan zona inhibisi disekitar cakram kertas (Rahmah, 2012). Cakram kertas yang telah diaplikasikan dengan masing-masing sampel selanjutnya akan mengabsorpsi air dari media agar dan agen antibakteri akan berdifusi ke dalam agar. Kecepatan difusi senyawa antibakteri dari sampel dalam agar tidak secepat keluarnya senyawa antibakteri dari cakram kertas karena tingkat difusi antibakteri dalam agar tergantung pada sifat difusi dan kelarutan antibakteri dalam media (Bauer, *et al.*, 1996).

Media yang telah diinokulasi dengan bakteri selanjutnya dilakukan aplikasi cakram kertas ke dalam media. Dan di inkubasi selama 24 jam untuk melihat zona hambat yang terbentuk. Selama inkubasi agen antibakteri berdifusi ke dalam media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri (Rahmah, 2012).

Penelitian aktivitas antibakteri ini digunakan kontrol positif dan negatif sebagai pembanding. Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol dari zat uji (ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dengan membandingkan diameter zona hambat yang terbentuk oleh zat uji dengan antibiotik. Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin 5 µg/ml. Siprofloksasin berguna dalam mengobati infeksi-infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Enterobacteriaceae* dan basil negatif yang lainnya (Mycek, 2001). Kontrol negatif yang digunakan campuran antara air suling dan tween 80, kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* sehingga dapat diketahui bahwa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah zat uji bukan pelarut.

Berdasarkan hasil pegujian aktivitas antibakteri siprofloksasin pada ketiga replikasi diketahui memiliki DZI rata-rata 22,5 mm. Menurut standar yang dimuat di *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antibiotik Siprofloksasin dikatakan sensitif apabila memiliki DZI lebih dari atau sama dengan 21 mm. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa antibiotik siprofloksasin yang digunakan masih dalam kategori sensitif. Mekanisme kerja Siprofloksasin sebagai antibakteri yaitu menghambat enzim DNA gyrase dan

mengganggu aktivitas lain yang terkait dengan DNA pada bakteri (Prescott, *et al.*, 2005).

Selain itu hasil pengujian ekstrak etilasetat dan *n*-heksan mempunyai diameter zona hambat tertinggi 7,7 mm. Menurut Tabel 1 apabila diameter zona hambat kurang dari 15 mm, dikatakan kedua ekstrak lemah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* ATCC 12022. Sehingga ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* tidak dapat digunakan sebagai rujukan pengobatan untuk infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Shigella flexneri*.

Windarwati (2011) melakukan penelitian tentang fraksi etilasetat dari ekstrak daun jarak dengan diameter penghambatan terhadap *S.aureus* 12,5 mm. Sedangkan berdasarkan penelitian yang saya lakukan, ekstrak etilasetat daun *J. curcas* menghambat bakteri *Shigella flexneri* ATCC 12022 dengan diameter tertinggi 7,7 mm. Meskipun kedua penelitian menunjukkan hasil diameter zona hambat dalam kategori lemah, namun fraksi etilasetat daun *J. curcas* mempunyai diameter zona hambat yang lebih tinggi dalam menghambat bakteri *S.aureus* dibandingkan ekstrak etilasetat daun *J. curcas* dalam menghambat *Shigella flexneri* ATCC 12022. Perbedaan diameter zona hambat pada kedua penelitian tersebut disebabkan karena bakteri uji yang digunakan berbeda. Pada penelitian ini, bakteri *Shigella flexneri* ATCC 12022 merupakan bakteri gram negatif sedangkan *S.aureus* merupakan bakteri gram positif. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etilasetat dan fraksi etilasetat lebih baik dalam menghambat bakteri gram positif.

Terlihatnya aktivitas penghambatan mikroba oleh suatu senyawa sangat dipengaruhi oleh konsentrasi bahan dan mikroba uji (Windarwati, 2011). Ketahanan suatu bakteri terhadap senyawa antibakteri berkaitan erat dengan struktur dinding selnya. Hasan, *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa senyawa aktif yang berasal dari tanaman sering menunjukkan aktivitas yang lebih baik terhadap bakteri gram positif tetapi tidak terhadap bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki *barrier* permeabilitas yang efektif. Adanya *barrier* permeabilitas inilah yang kemungkinan besar menyebabkan aktivitas antibakteri dari senyawa aktif ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* menjadi tidak cukup efektif.

Bakteri *Shigella flexneri* merupakan bakteri gram negatif, yang relatif lebih tahan terhadap senyawa antimikroba karena didukung oleh struktur ganda dinding selnya yang terdiri dari membran dalam dan membran luar. *Shigella flexneri* memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks yang terdiri atas beberapa komponen yaitu lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, membran luar yang mengandung molekul protein yang disebut porin, lipoprotein, dan lapisan dalam berupa lapisan peptidoglikan yang tipis dan fosfolipid (11-22%) (Brooks *et al.*, 2008).