

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. DETERMINASI TANAMAN

Hasil determinasi sampel uji yang dilakukan di Laboratorium Farmasi UAD didapat bahwa sampel yang digunakan adalah buah pedada (*Sonneartia caseolaris*). Dengan hasil determinasi seperti yang tertera pada lampiran 1.

B. PENYIAPAN BAHAN

Sebanyak 5 kg buah pedada dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam dan didapatkan simplisia kering sebanyak 2,5 kg dengan susut pengeringan simplisia 50%. Tujuan dilakukan penutupan dengan kain hitam selama pengeringan buah adalah untuk menghindari kontak langsung antara buah pedada dengan sinar matahari langsung sehingga kerusakan komponen-komponen yang ada di dalam buah pedada dapat dikurangi. Kain hitam juga bersifat menyerap panas sehingga proses dengan penutupan dengan menggunakan kain hitam tidak akan mengganggu proses pengeringan, namun untuk mencapai kadar air yang benar-benar kering waktu pengeringannya menjadi lebih lama yaitu 8 hari, sedangkan yang tidak ditutupi kain hitam hanya 5 hari (Anggraini *et al* 2007). kemudian dihaluskan sehingga diperoleh serbuk halus 2 kg.

C. EKTRAKSI

Proses ekstraksi buah pedada menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode pemisahan senyawa dengan cara perendaman menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan. Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena selain murah dan mudah dilakukan, dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel

akibat perbedaan tekanan antar di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut (Lenny, 2006). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Pemilihan etanol 96% dikarenakan senyawa-senyawa antibakteri seperti flavonoid yang terkandung didalam buah pedada bersifat polar maka harus digunakan pelarut yang bersifat polar. Serbuk buah pedada di ekstrak sebanyak 1 kg : 7 L etanol 96% (1:7). Suhu yang digunakan adalah suhu ruangan tanpa terpapar cahaya matahari langsung dengan waktu maserasi selama 5 x 24 jam. Setelah proses maserasi dilakukan ekstrak etanol buah pedada disaring menggunakan kertas *Whatman* no 1 dan didapatkan hasil 6 L ekstrak etanol buah pedada. Selanjutnya dilakukan evaporasi , evaporasi adalah proses perubahan molekul di dalam keadaan cair (contohnya air) dengan spontan menjadi gas (contohnya uap air). Proses ini adalah kebalikan dari kondensasi. Umumnya penguapan dapat dilihat dari lenyapnya cairan secara berangsur-angsur ketika terpapar pada gas dengan volume signifikan. Evaporasi dilakukan bertujuan untuk memisahkan pelarut dengan ekstraknya dan didapatkan ekstrak kental sebanyak 66.1 gram. Ekstrak yang dihasilkan dari buah pedada beraroma khas buah pedada dan berwarna coklat (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Karakteristik ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*)

Karakteristik ekstrak	Hasil
Rendemen	6.61 %
Warna	Coklat
Rasa	Asam
Bau	Wangi khas buah pedada, menyengat

D. PENETAPAN KADAR ETANOL

Pada penetapan kadar etanol digunakan metode destilasi, tujuan dilakukannya penetapan kadar alkohol adalah untuk memastikan bahwa kadar etanol yang digunakan tidak mengganggu hasil uji aktifitas antibakteri. Prinsip metode destilasi adalah memisahkan senyawa dari suatu campuran yang memiliki perbedaan titik didih dari zat-zat cair dalam campuran tersebut, senyawa dengan titik didih terendah akan menguap terlebih dahulu. Cara ini sesuai untuk penetapan sebagian besar ekstrak cair dan tingtura dengan kapasitas labu destilasi yang cukup dan kecepatan destilasi diatur sehingga diperoleh destilasi yang jernih. Bahan yang ditetapkan kadar etanolnya adalah ekstrak kental buah pedada, sebanyak 25 mL ekstrak kental dimasukkan ke dalam labu didih sebelum dipanaskan ditambahkan air suling sebanyak 25 mL. Penambahan air suling bertujuan agar pada saat etanol yang terkandung dalam ekstrak semuanya telah menguap labu didih tidak kosong apabila kosong kemungkinan labu didih akan retak akibat pemanasan.

Ketika proses penguapan, bagian atas labu didih ditutup untuk mencegah keluarnya uap etanol. Suhu pada saat destilasi dijaga dan tidak melebihi titik didih etanol yaitu 78°C agar etanol tidak terlalu cepat menguap yang dapat menyebabkan etanol habis tanpa sempat terkondensasi atau mengembun. Alasan lain yaitu agar air yang terdapat pada campuran tidak ikut menguap dan bercampur dengan destilat sehingga kemurniannya terjaga. Oleh sebab itu suhu saat destilasi harus benar-benar dijaga agar zat dapat dimurnikan sesuai dengan titik didihnya. Suhu akan naik dengan cepat dan konstan pada suhu mendekati titik didih tersebut sehingga akhirnya akan mendapatkan destilat yang lebih murni (Day & Underwood 1994).

Ketika etanol menguap ke atas akan menuju kondensor kemudian akan didinginkan sampai terkondensasi menjadi cairan kembali lalu mengalir dan

ditampung pada labu destilat. Destilasi dilakukan kurang lebih 5 jam. Sambil menunggu destilat tertampung, dilakukan penimbangan piknometer kosong (W_0) yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol kemudian dikeringkan. Kemudian timbang lagi piknometer yang berisi air suling (W_1) ditimbang sebanyak 3 kali. Penimbangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk menghitung setiap penimbangan. Setelah ditimbang, air suling pada piknometer dibuang. Setelah selesai destilasi, destilat yang diperoleh diukur volumenya. Destilat yang diperoleh dimasukkan ke dalam piknometer yang telah dikeringkan tadi dan ditambahkan air suling sampai tanda batas 25 ml sesuai dengan jumlah air suling yang telah ditimbang tadi. Adapun hasil penimbangan bahan dan hasil perhitungan tertera pada lampiran 2.

Berdasarkan tabel Daftar Bobot Jenis dan Kadar Etanol pada Farmakope Indonesia Edisi Ketiga halaman 823, pada bobot jenis 0,9935 kadar etanol sebesar 4,48% v/v atau setara 36,3 g/L, Di wilayah 0-50 g/L etanol tidak memberikan efek menghambat/membunuh bakteri *Escherichia coli*, melainkan pada konsentrasi yang lebih tinggi (Sawada and Nakamura 1996).

E. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI

Sterilisasi alat meliputi alat-alat kaca seperti beker gelas, gelas ukur, Erlenmeyer, dan tabung reaksi, cawan petri dibungkus dalam kertas HVS. Kemudian alat-alat tersebut dimasukkan kedalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Prinsip kerja *autoclave* yaitu mikroba akan mengalami denaturasi dan koagulasi yang menyebabkan mikroba tersebut mati. Ose sebelum digunakan disterilkan menggunakan cara pemijaran. Ose dicelupkan dahulu dalam alkohol, kemudian dibakar menggunakan api lampu spiritus sampai batang jarum dari ujung sampai pangkal berpijar.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode sumuran yaitu dengan membuat lubang pada media nutrient agar yang telah padat dan ditambahkan suspensi bakteri dengan cara disebar dioles dengan menggunakan kapas lidi steril. Setelah lubang terbentuk kemudian dimasukkan ekstrak yang telah dibuat dengan masing-masing konsentrasi. Pada metode sumuran terjadi proses osmolaritas karena konsentrasi ekstrak lebih tinggi jika dibandingkan dengan metode difusi disk, karena setiap lubang diisi dengan konsentrasi ekstrak maka osmolaritas terjadi lebih menyeluruh dan lebih homogen serta konsentrasi ekstrak lebih tinggi untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Jawetz *et al* 2001).

Uji ekstrak dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 80%, 60%, 40%, 20%, untuk mengetahui kadar hambat dari ekstrak buah pedada digunakan DMSO sebagai kontrol negatif dan kotrimoksazol sebagai kontrol positif. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak buah pedada dapat memberi efek antibakteri yang paling efektif dengan ditandai adanya zona hambat.

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri yaitu media nutrient agar yang merupakan salah satu media umum yang digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji biasa dari air, *sewage* (air limbah), produk pangan, untuk membawa stok kultur, untuk pertumbuhan sampel uji pada bakteri, dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni.

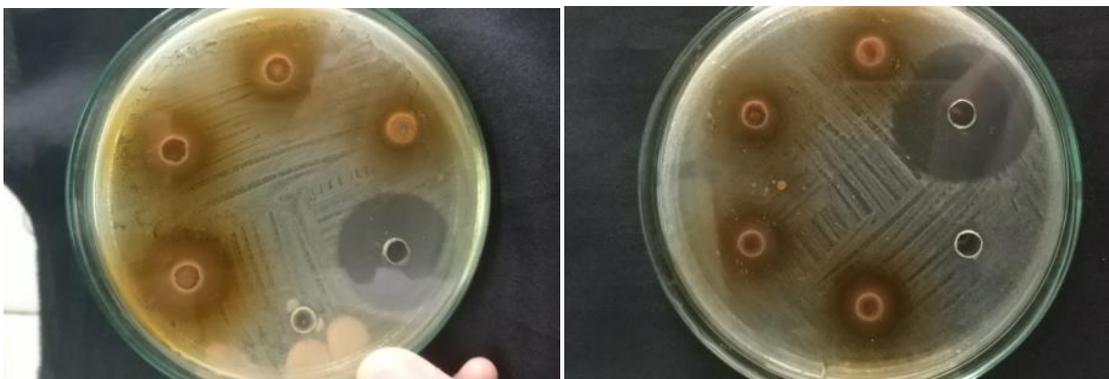
Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) digunakan beberapa konsentrasi yaitu (20%, 40%, 60%, 80%) dengan metode yang digunakan adalah metode sumuran dengan tiga kali replikasi. Pengamatan terbentuknya zona hambat dilakukan setelah 24 jam. Apabila ekstrak memiliki aktivitas antibakteri maka akan terbentuk daerah jernih di sekitar lubang sumuran. Setelah 24 jam, hasil yang didapatkan pada ekstrak buah pedada menunjukkan tidak

terdapat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada ketiga media agar, yang ditunjukkan dengan terbentuknya daerah jernih di sekitar lubang sumuran. Pada media agar yang diamati, ternyata menunjukkan kemampuan hambat yang berbeda disetiap konsentrasi, diameter zona hambat ekstrak buah pedada dapat dilihat pada tabel (4.4).

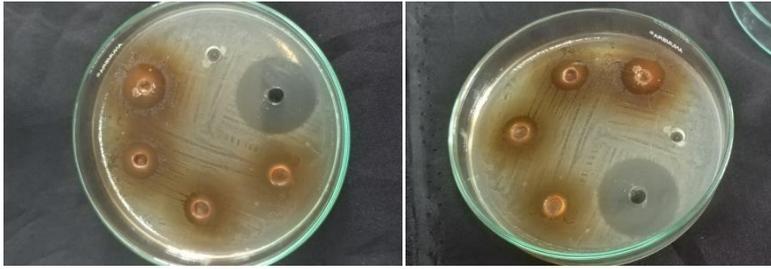
Tabel 4.4 Diameter zona hambat ekstrak buah pedada terhadap bakteri *E.Coli*

Konsentrasi	Ulangan (mm)			Rata-rata(mm)	± SD
	I	II	III		
80%	18.6	16.6	17.6	17.6	± 1,000
60%	14.3	13.6	14.6	14.1	± 0,513
40%	12	11.3	12.3	11.8	± 0,513
20%	10	10	10.6	10.2	± 0,346
K (-)	0	0	0	0	± 0
K (+)	28	28	28	28	± 0

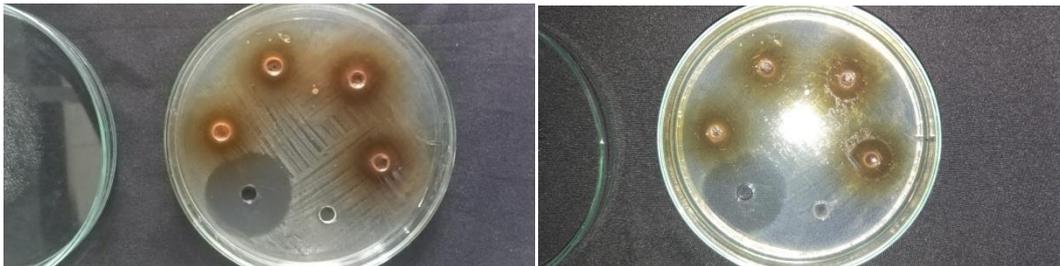
Keterangan : Tiap lubang dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali.



Gambar 4.1. Zona hambat ekstrak buah pedada terhadap *Escherichia coli* perlakuan I



Gambar 4.2. Zona hambat ekstrak pedada terhadap *Escherichia coli* perlakuan II



Gambar 4.3 Zona hambat ekstrak pedada terhadap *Escherichia coli* perlakuan III

Setelah dilakukan penelitian terhadap ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) terhadap bakteri *Escherichia coli* diperoleh hasil bahwa ekstrak buah pedada mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri dengan melihat adanya zona hambat ekstrak yang ditunjukkan melalui tidak tumbuhnya bakteri di sekeliling ekstrak yang terlihat jernih berbeda dengan bagian yang telah ditumbuhi bakteri.

Hasil pada tabel (4.4) menunjukkan bahwa adanya perbedaan daerah hambat yang terbentuk pada masing-masing perlakuan, dimana dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Rata-rata daerah hambat tersebut menunjukkan bahwa adanya perubahan yang terjadi terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dari zat aktif dalam ekstrak buah pedada yang digunakan sebagai sampel. Pada perlakuan kontrol positif dengan menggunakan kotrimoksazol, memperlihatkan rata-rata zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan sampel uji. Dalam tabel (4.4) perlakuan dengan konsentrasi 0% (kontrol negatif) yang menggunakan DMSO steril menunjukkan bahwa kontrol tidak memperlihatkan adanya zona hambat yang terbentuk, ini terjadi karena DMSO

merupakan senyawa netral yang tidak mengandung racun ataupun zat-zat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri *Escherichia coli*.

Berdasarkan pada gambar 1,2,3 menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah (20%) masih memiliki daya hambat yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat. Terbentuknya zona hambat seperti yang digambarkan dalam gambar perlakuan (1,2,3) menunjukkan bahwa ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona hambat terbentuk dimulai pada konsentrasi 20% rata-ratanya adalah sebesar 10.2 mm, kemudian diameter rata-rata konsentrasi 40% yaitu 11.8 mm, dan diameter rata-rata konsentrasi 60% yaitu 14.1 mm, kemudian konsentrasi 80% dengan rata-rata yaitu 17,6 mm sedangkan perlakuan kontrol positif dengan menggunakan cara sumuran yang berisi larutan Kotrimoksazol, zona hambat yang terbentuk sebesar 28 mm, maka ekstrak buah pedada pada besaran konsentrasi 80% memiliki nilai rata-rata paling tinggi dibandingkan ketiga konsentrasi lainnya, sedangkan nilai rata-rata terendah adalah pada besaran 20%.

Flavonoid adalah senyawa penting dalam produk alami, pada dasarnya flavonoid termasuk kedalam kelas metabolit sekunder yang memiliki banyak sekali keuntungan, efek biokimia dan antioksidan yang terkait dengan berbagai penyakit kangker, penyakit Alzheimer, aterosklerosis, dll. Flavonoid juga dikenal sebagai inhibitor kuat untuk beberapa enzim seperti *xanthine oxidase (XO)*, *cyclo-oxygenase (COX)*, *lipxygenase* dan *phosphoinositide 3 kinase*. Flavonoid memiliki beberapa subgrup, yang termasuk didalamnya *chalcones*, *flavone*, *flavonols*, dan *isoflavone*. Flavonoid memainkan berbagai aktivitas biologis pada tanaman. Flavonoid sudah lama diketahui sebagai yang bertanggung jawab untuk warna dan aroma bunga. Flavonoid melindungi tanaman dari berbagai biotik dan tekanan abiotik dan bertindak

sebagai filter UV . Flavonoid juga memiliki aktivitas biologis antara lain sebagai *antioxidan*, *hepatoprotective*, *antibacterial*, *anti-inflamantory*, *anticancer*, dan *antiviral* (Hayashi *et al* 1998). Mekanisme antibakteri flavonoid berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak, kestabilan dinding sel dan membran plasma terganggu kemudian pada akhirnya bakteri mengalami lisis (Rinawati 2011).

Alkaloid ditemukan dalam bakteri, jamur, tumbuhan dan hewan, meskipun distribusinya dalam setiap spesies sangat terbatas. Alkaloid terdapat pada lebih dari 300 famili tanaman, dan senyawa khusus terbatas pada famili tertentu (misalnya *hyoscyamine* yang terdapat pada *Solanaceae*). Alkaloid dapat terjadi di bagian mana pun dari tanaman , meskipun komponen spesifik mungkin terbatas pada bagian tertentu (misalnya kina yang terdapat dalam kulit pohon chinchona) (Cushnie *et al* 2014). Alkaloid secara umum paling tidak mengandung satu buah atom nitrogen yang merupakan bagian dari cincin heterosiklik yang bersifat basa. Mekanisme aksi antibakteri telah diteliti untuk alkaloid golongan *indolizidine*, *isoquinoline*, *quinolone*, *agelasine* dan kelas *polyamine*. Di kelas indolizidin, telah dijelaskan bahwa alkaloid bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat, karena menghambat enzim dihidrofolat reduktase di dalam sel (Rao & Venkatachalam 1999). Di kelas isoquinolon, mekanisme aksi antibakteri telah di jelaskan, studi dengan isoquinolin dan benzophenanthridine dan protoberberine menjelaskan bahwa alkaloid bertindak dengan nmengganggu cincin-Z dan menghambat sel divisi, bukti pendukung menjelaskan alkaloid memiliki aktivitas anti bakteri dalam menghambat FtsZ (Beuria *et al* 2005), menghambat aktvasi GTPase (Domadia *et al* 2008), menghambat pembentukan cincin- Z dan menginduksi pemanjangan sel (Boborek *et al* 2010).

Luteolin merupakan senyawa alami yang termasuk golongan flavonoid yang ditemukan secara luas di dunia tumbuhan, hasil penelitian menunjukkan luteolin juga terdapat dalam buah pedada (Sadhu *et al* 2005). Luteolin adalah polifenol yang berperan penting dalam mempertahankan tanaman melawan mikroorganisme, serangga, dan radiasi UV (Harbone & Williams 2000). Merupakan kelompok flavonoid, luteolin memiliki struktur C6-C3-C6 dan memiliki dua cincin benzen, dan cincin ketiga yang mengandung oksigen, Luteolin juga memiliki gugus hidroksil. Seperti pada flavonoid lain, luteolin sering diglikolisasi pada tanaman, dan glikosida dihidrolisis untuk membebaskan luteolin selama penyerapan. Beberapa porsi luteolin dikonversi menjadi glukoronida ketika melewati mukosa usus. Luteolin stabil terhadap panas dan hilangnya luteolin akibat pemanasan relatif rendah (Lin *et al* 2008). Penelitian menunjukkan bahwa Luteolin dapat mempengaruhi permeabilitas membran bakteri (*Staphylococcus aureus*), tetapi tidak merusak integritas membran secara langsung. Setelah diberikan dengan luteolin selama 16 jam, kandungan total protein menurun menjadi 64,54% jumlah DNA dan RNA berkurang masing-masing menjadi 48,44% dan 39,35%. Aktivitas DNA topoisomerase I dan II dihambat sepenuhnya oleh 1,6 mg/ml luteolin. Mekanisme aksi antibakteri luteolin adalah dapat menghambat aktivitas DNA topoisomerase I dan II, yang mengakibatkan beberapa penurunan sintesis asam nukleat dan protein (Wang & Xie 2010).

F. ANALISIS DATA

Pada penelitian ini digunakan analisis data menggunakan program SPSS. Hasil dari data uji normalitas memiliki nilai $<0,05$, maka data tidak terdistribusi normal sehingga menggunakan uji analisis statistik *Kruskal Wallis*. Hasil uji analisis statistik *Kruskal Wallis* dikatakan ada perbedaan jika nilai signifikannya lebih kecil dari ($P<0,05$).

Tabel 4.5. Hasil uji normalitas

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi 80 %	.175	3	.	1.000	3	1.000
Konsentrasi 60 %	.269	3	.	.949	3	0.567
Konsentrasi 40 %	.269	3	.	.949	3	0.567
Konsentrasi 20 %	.385	3	.	.750	3	0.000

Tabel 4.6. Hasil uji *Kruskal wallis*

	DZI
Chi-Square	16.734
df	5
Asymp. Sig.	0.005

Hasil dari analisis data menggunakan *Kruskal wallis* menunjukkan bahwa data tersebut mempunyai perbedaan nyata diameter zona hambatnya ($P < 0,05$). Hasil pada percobaan dapat dilihat pada tabel **Tabel 4.6** menunjukkan bahwa pada zona hambat dengan konsentrasi 80% memiliki diameter yang paling besar dari konsentrasi yang lainnya. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasinya maka semakin besar juga diameter zona hambatnya, sedangkan pada konsentrasi 20% didapatkan diameter zona hambat paling kecil.