

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

Penelitian berbasis pemanfaatan bahan alam sebagai bahan obat tradisional sudah banyak dilakukan. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan yaitu tanaman gayam. Krisna *et al.*, (2014) dalam jurnalnya menyatakan bahwa ekstrak daun gayam menunjukkan isolat steroid bersifat antioksidan terhadap difenilpikril hidrazil (DPPH) dengan nilai IC_{50} sebesar 4 ppm. Selain daunnya, ekstrak etanol kulit batang gayam juga mengandung nilai aktivitas antioksidan IC_{50} sebesar 1 ppm (Anastasia, 2015), biji gayam dapat dimanfaatkan sebagai tepung gayam dalam pembuatan bahan pangan (Angkih, 2018) dan batang pohon gayam dapat dijadikan agen senyawa antimakan pengganti pestisida (Sukadana, 2020).

Penelitian mengenai aktivitas antibakteri tanaman bahan alam dengan metode difusi sumuran telah banyak dilakukan. Metode sumuran termasuk metode difusi yang dilakukan dengan cara membuat lubang pada media agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji, kemudian diisi sampel yang akan diuji (Pelczar & Chan, 2006). Salah satu pengujian aktivitas antibakteri metode difusi sumuran yaitu menentukan antibakteri kulit kayu manis dengan ekstraksi yang berbeda terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang dilakukan oleh Nisa (2014). Hasilnya menunjukkan diameter zona hambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* >12 mm yaitu ekstraksi infundasi dan dekoksi pada *Escherichia coli* sebesar 23 mm dan 19,2 mm, *Staphylococcus aureus* sebesar 22,5 mm dan 17,5 mm.

Uji aktivitas antibakteri metode sumuran juga telah dilakukan oleh Febrianasari (2018) antibakteri daun kirinyu (*Chromolaena odorata*) terhadap *S.aureus*, konsentrasi yang digunakan 15%, 30%, 45%, 60% dan 100% serta *Eritromycin* sebagai kontrol positif dan akuades steril sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan zona hambat, dengan konsentrasi 100% merupakan konsentrasi paling baik dalam membentuk zona hambat dengan diameter 7.47 mm. Muljono *et al.*, (2016) menggunakan kontrol positif *ciproflaxin* 50 µg/50 µl dan kontrol negatif larutan CMC 1%. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak polar daun mayana jantan (*Coleus atropurpureus benth*) dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40% dan 20% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp.* dengan rerata masing-masing yaitu 12,8 mm, 11,17 mm, 8,67 mm, 3,17 mm dan 2 mm sedangkan *Pseudomonas sp* dengan masing-masing rerata diameter zona hambat yaitu 12,17 mm, 10,67 mm, 9,5 mm, 7,17 mm dan 5,17 mm.

Pemilihan metode dalam penelitian ini menggunakan metode sumuran. Nurhayati *et al.*, (2020) membandingkan aktivitas antibakteri Starter Yogurt terhadap bakteri *Staphylacoccus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode sumuran dengan cakram. Konsentrasi yang digunakan 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% dengan kontrol positif *Chloramphenicol*. Hasil aktivitas antibakteri terhadap *Staphylacoccus aureus* yang dihasilkan starter yogurt berkisar pada 1,18 – 1,35 menggunakan metode cakram sedangkan menggunakan metode sumuran berkisar pada 1,33 – 1,54. Aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* yang dihasilkan starter yogurt berkisar pada 0,75 – 0,90 menggunakan metode cakram

sedangkan menggunakan metode sumuran berkisar pada 1,03 – 1,21. Metode sumuran dinilai lebih mudah diterapkan dan juga lebih mudah untuk mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri tidak hanya beraktivitas di permukaan agar tetapi sampai ke bawah, sehingga daya hambat yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan metode cakram.

Trisia (2018) mengevaluasi antibakteri ekstrak etanol daun Kalanduyung pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan *amoxicillin* sebagai kontrol positif dan dimetil sulfoksida 10% sebagai kontrol negatif. Namun dalam penelitian tersebut tidak dijelaskan berapa konsentrasi dari *amoxicillin* yang digunakan. Antibiotik hasil sintesis kimia dalam konsentrasi kecil mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Siddiq (2018) menyebutkan bahwa antibiotik 100 ppm *chloramphenicol* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Disisi lain, 100 ppm turunan *amoxicillin*, *amoxicillin* dan kontrol negatif tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *salmonella typhi*. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa setiap jenis antibiotik hanya dapat menghambat bakteri tertentu. *Amoxicillin* dapat menghasilkan daya hambat diuji pada jenis bakteri yang berbeda. *Amoxicillin* sensitif dapat menghambat bakteri *Staphylacoccus aureus* pada konsentasi 30 ppm dengan daya hambat 14 mm (Mardiah, 2017). Nurfadhilah (2019) juga menyebutkan bahwa *amoxicillin* 20 µg dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan daya hambat sebesar 14,5 mm. Hal ini didukung dengan Sitorus (2018) yang menyatakan bahwa antibiotik *amoxicillin* dengan konsentrasi 1000 µg/ml dapat menghasilkan zona hambat bakteri *Staphylacoccus aureus*

sebesar 14,43 mm, dan *amoxicillin* dengan konsentrasi 1500 µg/ml terhadap bakteri *Escherichia coli* menghasilkan zona hambat sebesar 14,08 mm.

Husodo (2021) telah melakukan penelitian terkait uji antioksidan dan antibakteri ekstrak metanol kulit batang gayam terhadap bakteri *Propionibacterium acne*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sobrinus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang gayam memiliki kandungan senyawa flavonoid, saponin, tanin, karotenoid dan kumarin, serta menghasilkan antioksidan sebesar 47,82% pada 100 ppm terhadap DPPH dengan nilai IC₅₀ sebesar 117. Uji antibakteri kulit batang gayam dengan konsentrasi 500, 250, dan 125 µg/well menghasilkan diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acne* sebesar 9 mm, 9 mm dan 9 mm, terhadap bakteri *Escherichia coli* sebesar 10 mm, 11 mm, dan 12 mm terhadap bakteri *Streptococcus sobrinus* rata-rata sebesar 0 mm.

Penelitian terkait antibakteri daun gayam masih belum banyak dilakukan. Sehingga belum ada batas ketentuan konsentrasi optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylacoccus aureus* dan *Escherichia coli*. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji antibakteri dengan variasi konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Hal ini dilakukan untuk mengukur kemampuan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gayam dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylacoccus aureus*.

B. Landasan Teori

1. Tanaman Gayam (*Inocarpus fagiferus*)

Pohon gayam atau *Inocarpus fagiferus* termasuk pohon berkayu dengan kulit batang keriput. Tinggi pohon dapat mencapai 20 m dengan diameter batang hingga 4-6 m, ranting pohon berbentuk spiral dan cabang sekunder berbentuk jaringan cabang dalam kanopi yang padat sehingga pohon gayam dapat dijadikan sebagai pohon peneduh. Daun gayam berbentuk sederhana, lonjong berwarna hijau gelap dan kasar saat disentuh, panjang daun sekitar 15-30 cm dengan lebar 8-14 cm dengan ujung daun agak meruncing. Gayam memiliki bunga berukuran kecil yang tersusun dari 5 mahkota bunga, berbau harum dan berwarna putih kekuningan, biasa ditemukan dibagian pucuk cabang dan ranting pohon (Falanruw, 2015). Buah gayam (*Inocarpus fagiferus*) berjenis seperti polong dan berbentuk ginjal tak pecah dengan kulit buah yang keras. Buah gayam memiliki satu biji berbentuk gepeng. Ketika mentah kulit buah berwarna hijau dan menjadi kuning kecoklatan apabila sudah masak. Buah gayam biasanya dikonsumsi sebagai makanan ringan dengan cara dikupas dari kulitnya kemudian direbus (Angkih, 2018). Klasifikasi tanaman gayam sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatopyta
Kelas	: Dikotiledon
Ordo	: Rosales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Inocarpus</i>
Spesies	: <i>Inocarpus fagiferus</i> Forst (Allaby, 2012).

Lestari *et al.*,(2018) menyebutkan tanaman gayam mengandung berbagai senyawa kimia antara lain steroid, fenol, karbohidrat, flavonoid, lemak, protein,

dan serat. Senyawa-senyawa tersebut terdistribusi ke seluruh bagian tanaman gayam dari kulit batang, daun, sampai biji/buah tanaman gayam. Santi (2015) menyatakan kulit batang pohon gayam mengandung senyawa fenol. Anastasia (2016) menambahkan kulit batang gayam juga mengandung senyawa flavonoid dan dapat berpotensi sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 1 ppm. Menurut Sukadana (2020) batang gayam terdapat senyawa yaitu senyawa flavonoid golongan *flavonolpyrogallol*, senyawa golongan triterpenoid *soyasaponin I*, senyawa *sucrose 2,3,3',4', 6-pentaacetate*, dan senyawa dengan berat molekul 685,2555 g/mol. Krisna *et al.*, (2014) juga melaporkan bahwa daun tanaman gayam mengandung senyawa steroid dan berpotensi sebagai antioksidan, yang dibuktikan dengan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan isolat steroid pada daun gayam memberikan nilai IC_{50} pada konsentrasi 4 ppm. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Latayada *et al.*, (2016) yang menyebutkan bahwa tanaman gayam diketahui dapat memiliki zat antioksidan dalam menangkal radikal bebas pada DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 83,64% pada 500 ppm terhadap DPPH.

Wawo (2011) menyatakan biji gayam (*Inocarpus fagiferus*) mengandung karbohidrat, protein, kadar air, lemak, abu dan serat kasar. Hasil penelitian Epriliati (2002), tentang komposisi kimia biji dan sifat fungsional pati gayam didapat hasil bahwa biji gayam memiliki kandungan nutrisi yang baik dan memiliki manfaat yang bagus buat kesehatan. Kandungan gizi pada gayam yaitu karbohidrat 76,74%, protein 11,66%, lipid 8,21%, abu 3,39% dan biji gayam memiliki keseimbangan nutrisi yang meliputi mineral, lemak, protein.



Gambar 2.1 Daun Gayam
(Dokumen Pribadi)

2. Metabolit Sekunder

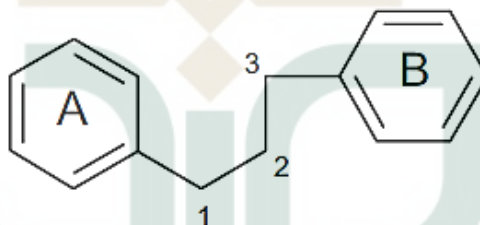
Walton dan Brown (1999) mengelompokkan senyawa bahan alam berdasarkan perannya dalam metabolisme menjadi 2 jenis, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan senyawa utama yang bertugas menjadi prekursor (senyawa pembangun) dalam membentuk senyawa yang lebih kompleks. Setiap makhluk hidup umumnya menggunakan metabolit primer untuk beraktivitas (Sastrohamidjojo, 1996).

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu organisme (tumbuhan, mikrobia, atau hewan) melalui biosintesis. Senyawa ini dapat bersifat farmakologi dan biologi, sehingga dalam farmasi umumnya digunakan sebagai kandidat obat untuk meminimalkan toksisitas (Saifudin, 2014). Contoh senyawa metabolit sekunder antara lain : alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, triterpenoid dan steroid (Harborne, 2003).

Flavonoid merupakan zat dengan pigmen warna merah, biru, ungu dan sebagian berwarna kuning dalam tumbuhan. Senyawa ini termasuk ke dalam golongan fenol yang paling banyak ditemukan di alam. Senyawa flavonoid biasanya ditemukan pada semua bagian tumbuhan tinggi seperti bunga, daun,

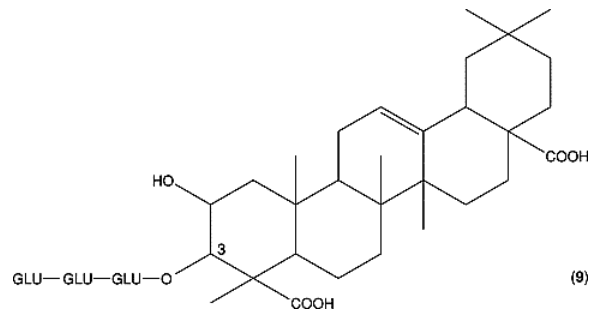
kayu, kulit kayu, dan akar sebagai glikosida oleh hidrolisis asam. Senyawa ini umumnya dapat dideteksi berdasarkan serapan didaerah tampak maupun UV karena mengandung gugus karbonil yang berkonjugasi dengan cincin benzena (Arifin, 1986).

Middleton *et al.*, (1992) menyebutkan bahwa flavonoid bersifat antiinflamasi, antialergi, antimikroba, antivirus, dan antikanker. Nuria *et al.*, (2009) menambahkan mekanisme flavonoid dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks ekstraseluler dengan protein terlarut yang dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan pelepasan senyawa intraseluler. Struktur flavonoid disajikan dalam Gambar 2.2.



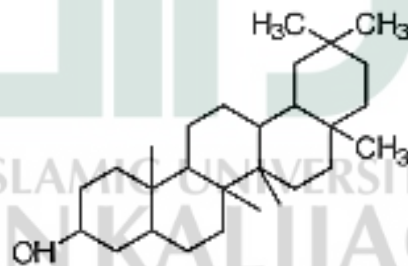
Gambar 2.2 Struktur flavonoid

Saponin merupakan suatu golongan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar yang dapat larut dalam air dan memiliki struktur yang dapat berikatan dengan karbohidrat. Senyawa saponin didalamnya terdapat 25 jenis aktivitas biologis sehingga menjadikannya salah satu jenis kandidat obat yang dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi (Rijai, 2012). Nuria *et al.*, (2009) menambahkan mekanisme kerja saponin sebagai anti-bakteri adalah untuk mengurangi tegangan permukaan yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas atau kebocoran sel, dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Struktur saponin dapat dilihat pada Gambar 2.3.



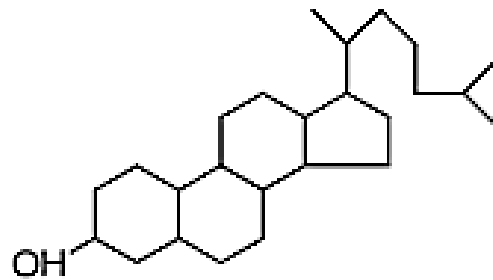
Gambar 2.3 Struktur saponin

Terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bebas dan tidak terikat dengan senyawa lainnya, biasa ditemukan dalam bentuk glikosida (Sastrohamidjojo, 1996). Menurut Ahmed *et. al.*, (1995) triterpenoid merupakan senyawa turunan dari terpenoid yang dapat berfungsi sebagai antibakteri, antifungal, insektisida dan antivirus. Aktivitas anti-bakteri terpenoid diperkirakan melibatkan pemecahan membran oleh komponen lipofilik (Bobbarala, 2012). Struktur senyawa triterpenoid dapat dilihat pada Gambar 2.4.



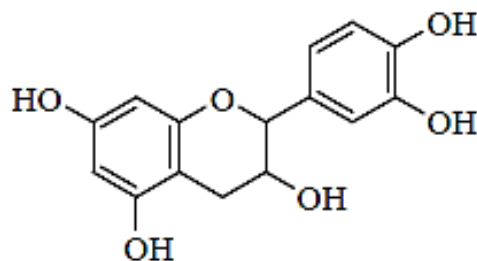
Gambar 2.4 Struktur triterpenoid

Steroid merupakan senyawa turunan dari hidrokarbon 1,2-*Siklopentenoperhidrofenantrena*. Steroid umumnya terdapat dalam tumbuhan baik tingkat tinggi maupun rendah dan ditemukan dalam bentuk sterol. Senyawa ini memiliki berbagai jenis, tercatat sekitar 150 jenis steroid telah dicatat dalam dunia medis sebagai obat. Biasanya steroid dimanfaatkan sebagai obat dan kontrasepsi (Suryelita., 2017). Struktur senyawa steroid dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur steroid

Tanin merupakan suatu senyawa golongan fenol yang terbentuk dari gugus hidroksi dan beberapa gugus karboksil yang dapat membangun kompleks kuat efektif dengan protein dan beberapa makromolekul (Su & Horvat, 1981). Tanin dapat dengan mudah ditemukan di semua bagian tumbuhan (kulit kayu, buah, daun dan akar). Hagerman *et al.*, (1998) menyatakan mekanisme tanin dibuat dengan kondensasi turunan flavan yang di teruskan ke jaringan kayu dari tanaman lainnya, selain itu tanin juga dapat dibuat dengan proses polimerisasi unit kuinon. Menurut Risnasari (2002) tanin memiliki sifat larut dalam air, metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lain, bakteriostatik, fungistatik dan merupakan racun. Tanin memiliki aktivitas anti bakteri terkait dengan kemampuannya untuk mengaktifkan adhesi sel mikroba dan menonaktifkan enzim, dan mengganggu transpor protein di lapisan dalam sel (Cowan, 1999). Struktur tanin dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur tanin

3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder secara kualitatif. Senyawa metabolit sekunder terdapat berbagai macam di suatu tanaman bahan alam. Senyawa tersebut perlu diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang dapat memberikan ciri khusus dari setiap golongan senyawa metabolit sekunder (Harborne, 2003). Berbagai metode identifikasi senyawa metabolit sekunder antara lain :

a. Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

Identifikasi adanya senyawa golongan flavonoid dalam suatu sampel yaitu dengan menambahkan pereaksi $AlCl_3$. Adanya senyawa flavonoid pada suatu sampel ditunjukkan oleh munculnya warna kuning (Marpaung & Wahyuni, 2018).

b. Identifikasi Senyawa Golongan Saponin

Saponin merupakan suatu senyawa glikosida yang memiliki kemampuan dalam menghemolisis darah merah. Saponin memiliki sifat mirip sabun apabila dikocok dapat menimbulkan busa. Berdasarkan penelitian Marliana *et al.*, (2005) metode pengujian senyawa saponin menggunakan metode Forth, dimana sampel ditambahkan akuades dan dikocok kuat selama 1 menit. Reaksi positif yang dihasilkan yaitu terbentuknya busa selama 30 detik.

c. Identifikasi Senyawa Golongan Steroid/Triterpenoid

Pengujian senyawa golongan steroid dan triterpenoid menggunakan pereaksi *Liebermann-Bunchar*d. Hasil reaksi positif steroid akan ditandai dengan munculnya warna merah-ungu, sedangkan triterpenoid akan berwarna hijau-biru (Nurrohmah, 2015).

d. Identifikasi Senyawa Golongan Tanin

Metode pengujian senyawa golongan tanin dilakukan dengan menambahkan pereaksi Besi (III) klorida FeCl_3 . Reaksi positif adanya senyawa tanin ditandai dengan warna hijau kehitaman (Sriwahyuni, 2010).

4. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu teknik pemisahan komponen kimia dari campurannya menggunakan pelarut organik yang sesuai. Prinsip ekstraksi didasarkan pada perbedaan distribusi antara zat terlarut diantara dua pelarut yang saling bercampur. Metode ekstraksi yang tepat ditentukan oleh tekstur kandungan air bahan-bahan yang diekstrak dan senyawa yang akan diisolasi. Ekstrak adalah sediaan pekat yang dihasilkan dari ekstraksi senyawa zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang ditetapkan (Inayatullah, 2012). Proses ekstraksi dapat dihentikan ketika sudah mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Langkah selanjutnya pelarut dipisahkan dari sampel melalui penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan untuk mengisolasi senyawa tunggal, oleh karena itu ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Makhriani, 2014). Jenis - jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut:

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang

sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan apabila sudah mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kekurangan metode maserasi ini adalah membutuhkan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang, serta beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil atau tidak tahan panas. Pemilihan metode maserasi dilakukan karena senyawa uji yang terdapat dalam sampel merupakan golongan flavonoid yang tidak tahan panas dan juga metode ini dapat menghasilkan ekstrak dalam jumlah banyak (Pratiwi, 2009).

b. Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel selalu dialiri oleh pelarut baru. Kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Makhriani, 2014).

c. Soxhlet

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas

labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu refluks. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus menerus berada pada titik didih (Makhriani, 2014).

Menurut Julianto dan Harjanti (2017), pelarut sangat mempengaruhi ekstraksi. Pemilihan pelarut dipengaruhi oleh beberapa faktor:

- 1) Selektivitas : Pelarut dapat melarutkan zat yang akan diekstrak dengan cepat dan sempurna.
- 2) Titik didih pelarut : Pelarut harus mempunyai titik didih yang cukup rendah sehingga pelarut mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu tinggi pada proses pemurnian dan jika diuapkan tidak tertinggal dalam minyak.
- 3) Memiliki harga yang murah
- 4) Tidak mudah terbakar
- 5) Tidak boleh larut dalam air

Berdasarkan kriteria tersebut tidak ada pelarut mutlak yang ideal dengan syarat di atas, untuk itu perlu memilih pelarut yang lebih mendekati beberapa sifat diatas, selain mempertimbangkan tujuan ekonomis juga harus memikirkan efisiensi pelarut. Etanol merupakan senyawa yang bersifat polar dan merupakan pelarut yang universal dimana mampu untuk mengekstrak metabolit sekunder baik yang bersifat polar atau non polar (Saifudin, 2014).

5. Metode Uji Aktivitas Antibakteri

Menurut Choma *et al.*, (2010) metode uji aktivitas antibakteri digunakan untuk menguji adanya aktivitas antimikroba dibagi dalam 3 metode, yaitu metode difusi, dilusi dan bioautografi. Metode dilusi termasuk dalam metode kuantitatif karena dapat menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), sedangkan metode difusi dan bioautografi termasuk dalam metode kualitatif karena hanya dapat menentukan ada atau tidaknya aktivitas antimikroba dalam suatu senyawa dalam sampel. Adapun perbedaan metode difusi, dilusi dan autobiografi adalah sebagai berikut :

a. Metode Difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode ini dibagi menjadi 3 cara yaitu metode parit, cakram kertas, dan *hole plate* (sumuran).

1) Metode Cakram Kertas

Pada metode ini digunakan kertas cakram saring (*paper disc*) untuk menampung zat antimikroba. Metode cakram kertas dilakukan dengan cara menempatkan kertas cakram saring yang mengandung senyawa uji pada permukaan Agar yang sudah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 18-24 jam. Penentuan aktivitas antimikroba diukur berdasarkan kemampuan senyawa uji dalam berdifusi ke medium Agar (Kusmayati, 2007).

Uji difusi disk (*disk diffusion test*) dilakukan dengan cara mengukur zona bening, yaitu daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri

yang terbentuk pada masa inkubasi yang terdapat disekeliling zat antimikroba. Jika dihasilkan semakin banyak zona bening yang terbentuk maka semakin besar pula kemampuan senyawa dalam menghambat aktivitas bakteri (Inayatullah, 2012).

2) Metode *Hole Plate* (Sumuran)

Prosedur metode sumuran dilakukan dengan cara suatu permukaan Agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dibuat lubang untuk diisi dengan bakteri uji. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu diamati ada atau tidaknya zona hambatan yang terdapat disekeliling lubang (Inayatullah, 2012).

3) Metode Parit

Metode parit dilakukan dengan cara suatu media Agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dibuat parit yang telah diisi zat antimikroba, Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Hasil yang didapatkan diamati ada atau tidaknya zona hambatan yang terbentuk di sekitar parit (Inayatullah, 2012).

b. Metode Dilusi

Menurut Choma *et al.*, (2010) metode dilusi termasuk dalam metode kuantitatif karena dapat menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari suatu bahan uji terhadap mikroba. Prinsip dasar dilusi bahan antibakteri uji diencerkan hingga didapatkan beberapa konsentrasi. Metode dilusi dibagi menjadi 2, yaitu metode dilusi cair dan dilusi padat. Pada metode dilusi padat setiap konsentrasi obat dihomogenkan dengan media agar kemudian ditanami bakteri.

Sedangkan pada metode dilusi cair setiap konsentrasi obat diberi suspensi mikroba dalam media. Pertumbuhan mikroorganisme ditunjukkan dengan adanya kekeruhan dalam sumur/lubang.

c. Metode Bioautografi

Metode bioautografi merupakan metode yang sederhana dan dapat digunakan untuk melihat ada atau tidaknya bercak pada kromatogram hasil KLT yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri, antiviral, antifungi (Pratiwi S. T., 2008). Kusumaningtyas *et al.*, (2008) menyebutkan metode ini memiliki berperan dalam mendeteksi zat aktif, mendeteksi golongan senyawa, kontrol uji kualitas antimikorba dan mencari antibakteri atau kapang baru.

6. Bakteri *Eschecheria coli*

House *et al.*, (2009) menyebutkan bakteri *Eschecheria coli* merupakan salah satu bakteri Gram negatif. Bakteri ini memiliki bentuk beragam dari kokus hingga membentuk ukuran *filamentous* dan tidak terdapat spora. Sel bakteri *Escherichia coli* bisa terdapat dalam jumlah tunggal ataupun berpasangan dan dalam rantai pendek. Bakteri *Escherichia coli* jika terdapat berlebihan didalam tubuh dapat bersifat patogen seperti dapat menyebabkan penyakit diare dan menghasilkan racun yang dapat melemahkan dinding usus kecil. *Escherichia coli* merupakan golongan bakteri yang dapat bertahan hidup pada nilai pH 5,5-8 dan memiliki suhu optimum sekitar 15-45°C. Bakteri ini memiliki suhu optimum pertumbuhan 37°C dan umumnya tidak berkapsul (Hamdana, 2017). Taksonomi *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Divisio : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : **Escherichia coli** (Todar, 2008).

Bakteri *Escherichia coli* memiliki ukuran 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm dapat tumbuh pada medium nutrisi sederhana dan bersifat anaerob fakultatif. Pada umumnya *Escherichia coli* menetap dalam di lumen usus inang tetapi apabila usus dalam keadaan lemah atau sistem gastrointestinal terganggu maka bakteri normal non-patogenik dapat berubah menjadi bakteri yang dapat menyebabkan infeksi (Rachmawati, 2016).

7. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri Gram-positif yang berbentuk kokus dan memiliki ukuran 0,8-1,0 μm . Koloni bakteri berwarna kuning, tidak bergerak, tidak berkapsul, membentuk spora dan memiliki dinding sel yang mengandung peptidoglikan dan asam teikoat. Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada suhu 37°C dan biasanya ditemukan pada kulit, selaput lendir, luka, nanah dan bisul. Bakteri ini digolongkan termasuk bakteri patogen dan menyebabkan infeksi yang dapat menyebar/menular karena kemampuannya yang dapat berkembang biak dan meluas pada jaringan (Jawetz, 1996). Berdasarkan taksonominya, bakteri *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi : Protophyta
 Kelas : Schizomycetes
 Bangsa : Eubacteriales
 Suku : Micrococcaceae
 Marga : *Staphylococcus*
 Jenis : **Staphylococcus aureus** (Brooks, 2007).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada organ jaringan, terutama pada kulit. Umumnya bakteri ini mudah tumbuh pada kulit yang meradang, infeksi kulit dan lainnya (Schulman, 1994).

8. Mekanisme Kerja Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerja antibakteri dibagi menjadi 5 macam, yaitu :

a. Menghalangi metabolisme sel mikroba

Sel memiliki ratusan enzim yang berbeda-beda di dalamnya. Suatu penghambat akan mengganggu jalannya metabolisme sel dengan cara menyerang enzim. PABA (Asam *p*-aminobenzoat) yang terdapat dalam reaksi akan berkompetisi dengan sulfonamid (zat kimia yang digunakan untuk mengobati penyakit menular atau mencegah penyakit) karena bentuk molekul PABA dan sulfonamid yang hampir sama sehingga dapat menghambat terjadinya sintesis asam folat. Asam folat berfungsi sebagai koenzim dalam sintesis purin dan pirimidin. Jika pembentukan asam folat terganggu, maka tidak ada koenzim yang dapat bekerja. Hal ini berpengaruh mengakibatkan aktivitas metabolisme seluler terganggu. (Inayatullah, 2012).

b. Menghalangi permeabilitas membran sel

Membran sitoplasma berfungsi memelihara bahan-bahan tertentu di dalam sel dan mengkoordinasi aliran bahan-bahan yang masuk dan keluar sel. Antibakteri akan bekerja dengan merusak dinding sel terlebih dahulu kemudian merusak membran sel bakteri, sehingga hal ini mengakibatkan perubahan permeabilitas membran plasma sel mikroorganisme (Niswah, 2014).

c. Menghambat sintesis atau merusak asam nukleat

Protein, RNA, dan DNA merupakan bagian yang penting pada kehidupan sel dan apabila rusak dapat berakibat pada kerusakan total sel. Suatu antibakteri dapat menghambat sintesis atau merusak asam nukleat dengan dilakukan penghambatan pada proses transkripsi dan replikasi suatu mikroorganisme (Inayatullah, 2012).

d. Mengganggu sintesis dinding sel

Suatu bakteri memiliki dinding sel yang berfungsi melindungi membran protoplasma dibawahnya serta mempertahankan bentuk bakteri. Perusakan dinding sel bakteri dilakukan dengan cara menghancurkan lapisan peptidoglikan yang berada pada dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif (Niswah, 2014).

e. Mengganggu sintesis protein

Antibakteri bekerja dengan cara mendenaturasikan protein dan asam nukleat sel hingga hancur tanpa bisa diperbaiki kembali. Salah satu antibakteri yang bekerja dengan mendenaturasikan protein dan menghancurkan membran sel yaitu senyawa fenolat (Inayatullah, 2012).

C. Hipotesis Penelitian

Daun gayam mengandung triterpenoid, flavonoid, dan steroid (Aditya, 2011) serta mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, dan saponin (Rohama & Zainudin, 2021). Batang gayam memiliki senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tanin, karotenoid dan kumarin (Husodo., 2021). Berdasarkan penelitian tersebut diduga daun gayam pada penelitian ini mengandung senyawa

metabolit sekunder yang sama seperti flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid.

Husodo (2021) mempelajari uji antibakteri ekstrak metanol kulit batang gayam terhadap bakteri *Propionibacterium acne*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sobrinus* menggunakan konsentrasi 500, 250, dan 125 $\mu\text{g/well}$ dan menghasilkan diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acne* sebesar 9 mm, 9 mm, 9 mm, terhadap bakteri *Escherichia coli* sebesar 10 mm, 11 mm, dan 12 mm dan terhadap bakteri *Streptococcus sobrinus* rata-rata sebesar 0 mm. Penelitian ini menggunakan salah satu bakteri yang sama yaitu *Escherichia coli*. Uji antibakteri daun gayam pada bakteri *Escherichia coli* diduga menghasilkan diameter zona hambat ± 11 mm dan pada bakteri *Staphylacoccus aureus* diduga memiliki diameter zona hambat $\pm 0-12$ mm.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan pada bulan September-November 2021. Proses ekstraksi sampel daun gayam dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi STF Muhammadiyah Cirebon. Proses determinasi tanaman dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium MIPA IAIN Syekh Nurjati Cirebon. Sedangkan proses uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi UPT LABKESDA Kota Cirebon.

B. Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Tabung reaksi, mikropipet, bunsen, korek api, ose, spatula besi, cawan petri, jangka sorong, rak tabung, timbangan, autoklaf, baki, swab kapas, kain kassa, kertas buram, kain flanel, *stopwatch*, kompor, penangas air, erlenmeyer, inkubator, jangka sorong, besi pelubang, label, alat tulis, kamera, tisu, pinset, alkohol.

C. Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Media NA (*nutrient agar*), ekstrak daun gayam, NaCl steril 0,9%, akuades, pelarut etanol 96%, bakteri *Escherichia coli*, bakteri *Staphylacoccus aureus*, larutan 0,5 Mc Farland, amoxicillin, kloroform, CH₃COOH anhidrat, H₂SO₄ pekat, pereaksi FeCl₃ 0,1 %, dan pereaksi AlCl₃ 0,1%.

D. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Untuk memastikan kebenaran simplisia yang digunakan dalam penelitian ini, maka dilakukan determinasi di Laboratorium MIPA IAIN Syekh Nurjati Cirebon (Lampiran 1).

2. Preparasi Sampel

Sebanyak 1400 gram daun gayam segar terlebih dahulu dicuci bersih dan dipotong-potong menjadi bagian kecil, kemudian dikeringkan dengan oven dengan suhu 40 °C selama 24 jam.

3. Ekstraksi Sampel

Sebanyak 200 gram daun direndam dengan 2 liter pelarut etanol 96% selama 5x24 jam dengan pengadukan setiap hari selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dengan residu. Kemudian hasil filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C dan dipanaskan dengan penangas air dengan suhu 60 °C sambil diaduk hingga diperoleh ekstrak kental yang akan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

4. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak etanol daun gayam ditambahkan 20 ml akuades, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu ditambahkan 5 ml larutan $AlCl_3$ 0,1%. Diamati perubahan yang terjadi. Hasil reaksi positif akan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning/jingga.

b. Uji Triterpenoid/Steroid

Satu ml ekstrak ditambahkan 2 ml kloroform lalu dikocok. Kemudian filtrat ditambahkan CH_3COOH anhidrat dan H_2SO_4 sebanyak masing-masing 2 tetes. Hasil reaksi positif akan menunjukkan perubahan warna menjadi merah-ungu (steroid), apabila berubah warna menjadi biru-hijau (triterpenoid).

c. Uji Saponin

Satu ml ekstrak ditambahkan akuades kemudian dikocok selama 1 menit. Diamati perubahan warna yang terjadi. Reaksi positif akan menunjukkan terbentuknya buih stabil selama 30 detik.

d. Uji Tanin

Satu ml ekstrak ditambahkan pereaksi FeCl_3 0,1%. Reaksi positif akan menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman/kuning.

5. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas. Kemudian alat dan bahan disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

6. Pembuatan Stok Variabel Konsentrasi

Stok konsentrasi ekstrak daun gayam dilakukan variasi konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% dengan cara 1 gram, 2 gram, 3 gram dan 4 gram ekstrak ditambahkan masing-masing dengan 5 ml pelarut etanol 96%. Kontrol negatif menggunakan etanol 96% dan kontrol positif menggunakan *amoxicillin*, sehingga seluruhnya berjumlah 6 variabel.

7. Pembuatan Media

Sebanyak 5 gram NA ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan akuades sebanyak 250 ml, lalu dipanaskan sambil diaduk hingga semua bahan larut sempurna, kemudian dimasukkan ke erlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm.

8. Reculture Bakteri

Pembuatan stok bakteri dilakukan dengan tujuan memperbanyak dan meremajakan bakteri dengan cara menginokulasi 1 ose biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylacoccus aureus* ke dalam media NA, kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.

9. Uji Aktivitas Antibakteri

Satu ose masing-masing bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylacoccus aureus* ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 6 ml NaCl 0,9%, kemudian dihomogenkan dan kekeruhannya distandarisasi dengan larutan 0,5 Mc Farland. Suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylacoccus aureus* ditambahkan sebanyak 0,25 ml ke cawan petri dilanjutkan dengan penambahan 15-20 ml media NA. Setelah itu cawan digoyangkan searah angka 8 dan didiamkan hingga media memadat. Selanjutnya media di lubangi dengan besi yang sudah dipanaskan. Jumlah lubang yang dibuat berukuran diameter 0,6 cm. Lubang sumuran kemudian diisi dengan sampel sebanyak 20 µL. Selanjutnya dibiarkan berdifusi selama 1 jam. Setelah itu, media diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Keesokan harinya diukur diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi adalah membandingkan suatu tumbuhan dengan tumbuhan lain yang sudah ada sebelumnya (dicocokkan atau dipersamakan), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti (Suroso, 2019). Determinasi dilakukan untuk mengidentifikasi sampel tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian (Yulianti, 2015). Daun gayam telah dilakukan di Laboratorium MIPA IAIN Syekh Nurjati Cirebon. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah *Inocarpus fagiferus* (Lampiran 1).

B. Hasil Ekstraksi Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun gayam. Kriteria pengambilan sampel didasarkan pada daun gayam segar berwarna hijau yang diambil pada tangkai ke 3 dan 4 dari ujung paling atas. Daun gayam sebanyak 1400 gram dibersihkan dan dipotong menjadi bagian kecil untuk memudahkan pengeringan merata ke setiap daun. Proses pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dalam sampel. Pengeringan dilakukan selama 24 jam pada suhu 40°C, karena pada suhu $\leq 50^\circ\text{C}$ merupakan suhu optimal dari ekstraksi senyawa metabolit sekunder yang tidak tahan panas seperti flavonoid, saponin dan steroid/triterpenoid (Yuliantari, 2017). Lamanya proses pengeringan bergantung pada luas permukaan bahan, kecepatan aliran udara, perbedaan suhu sekitar, dan kelembaban udara. Dalam hal ini daun gayam memiliki struktur daun yang tebal sehingga memerlukan waktu pengeringan lebih lama (Yusuf, 2017). Proses

pengeringan menghasilkan total 385,17 gram daun gayam kering. Selanjutnya Sebanyak 200 gram daun gayam kering dimaserasi dengan 2 liter etanol (1 : 10) selama 5x24 jam. Pengerjaan metode maserasi yang lama dan keadaan yang diam selama maserasi memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi (Istiqomah, 2013). Setelah itu ekstrak disaring dan hasil filtratnya diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan dipanaskan menggunakan penangas air dengan suhu 60 °C hingga dihasilkan ekstrak kental. Ekstrak daun gayam dipanaskan dalam penangas air bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi dengan memanfaatkan kenaikan suhu. Proses pengadukan dilakukan agar ekstrak menjadi homogen dan mempercepat penguapan pelarut (Adijuwono, 1992).

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi untuk meminimalisir adanya panas pada ekstrak yang dapat menyebabkan kandungan senyawa dalam sampel terdekomposisi. Prinsip kerja dari metode maserasi berdasarkan kepolaran pelarut dan senyawa. Pelarut non polar akan menarik senyawa yang bersifat non polar dan pelarut polar akan menarik senyawa yang bersifat polar dari simplisia. Penarikan senyawa pada proses maserasi terjadi secara difusi. Pelarut akan masuk ke dalam sel simplisia dan menarik senyawa sehingga menyebabkan konsentrasi larutan di dalam sel menjadi lebih tinggi dari pada di luar sel, akibatnya senyawa yang ada di dalam sel akan terdesak keluar. Hal ini terus terjadi hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara senyawa di dalam sel dan di luar sel (Sari & Nursanty, 2018).

Pemilihan pelarut etanol 96% didasarkan pada kesamaan sifat kepolaran senyawa yang terkandung di dalam sampel (Anastasia, 2015). Etanol yang bersifat polar dapat melarutkan senyawa-senyawa yang polar maupun non-polar seperti tanin, flavonoid, fenol dan minyak atsiri (Jie, 2018). Berdasarkan penelitian sebelumnya Inayah (2019) melakukan uji antioksidan daun gayam menggunakan 2 pelarut yaitu metanol 96% dan etanol 96%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol 96% menghasilkan kadar total flavonoid tertinggi sebesar 3,2894 mg QE/g dan nilai antioksidan tertinggi daun gayam pada konsentrasi 7µg/mL. Oleh karena itu etanol 96% dinilai mampu menarik senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel daun gayam. Proses ekstraksi maserasi menghasilkan ekstrak kental etanol sebanyak 17,90 gr dengan rendemen 8,95%.



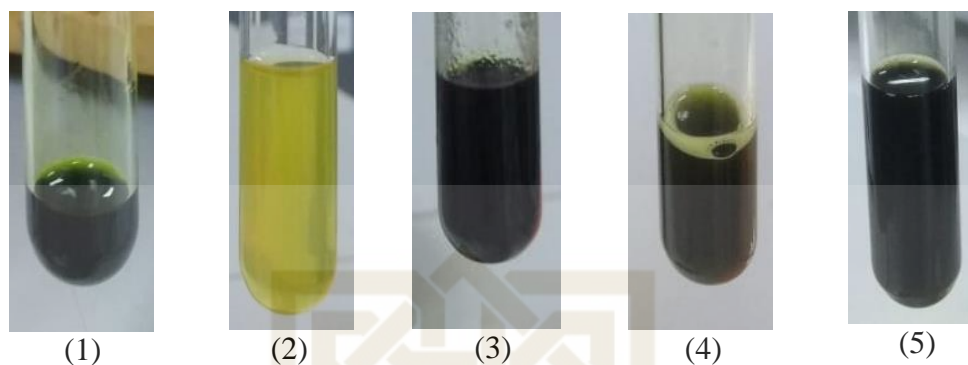
Gambar 4.1 Hasil ekstraksi daun gayam

C. Hasil Skrining Fitokimia

Tabel 4.1 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Gayam

Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Flavonoid	Akuades, AlCl ₃ 0,1%	+	Larutan berwarna kuning
Steroid/triterpenoid	Kloroform,	-	Larutan berwarna merah-ungu (steroid)
	CH ₃ COOH anhidrat, H ₂ SO ₄ pekat	+	Larutan berwarna hijau pekat (triterpenoid)
Saponin	Akuades	+	Terbentuk buih stabil
Tanin	FeCl ₃ 0,1%	+	Larutan berwarna hijau

kehitaman

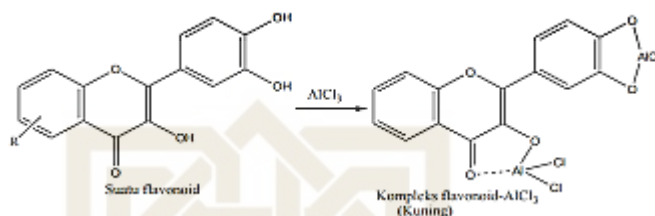


Gambar 4.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gayam
Keterangan : (1) Ekstrak etanol daun gayam (2) Uji flavonoid (3) Uji steroid/triterpenoid (4) Uji saponin (5) Uji tanin

Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa daun gayam memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Aditya (2011) dan Rohama & Zainudin (2021) yang menyatakan bahwa daun gayam memiliki senyawa metabolit sekunder triterpenoid, flavonoid, golongan steroid, alkaloid, terpenoid, dan saponin. Dalam penelitian ini senyawa steroid menghasilkan reaksi negatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan kandungan fitokimia dalam daun gayam diduga karena berbagai faktor seperti perbedaan pelarut, bagian tanaman yang digunakan, jenis tanaman gayam, dan tempat tumbuh maupun lingkungan (Suganyadevi, 2013).

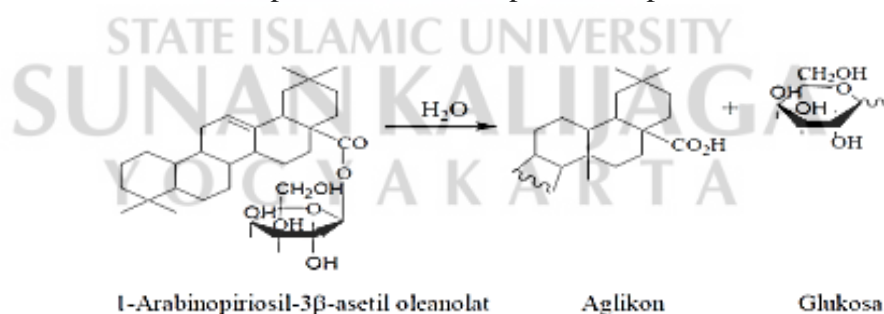
Pada pengujian senyawa flavonoid terjadi perubahan warna menjadi kuning. Hal ini disebabkan karena adanya ikatan antara flavonoid dengan $AlCl_3$ membentuk ikatan kompleks berwarna kuning. Mekanisme reaksi ini didasarkan pada adanya gugus keton C-4 dan gugus hidroksil C-5 atau C-3 kelompok flavonol atau flavon yang berikatan dengan Alumunium klorida sehingga

mengakibatkan perubahan warna kuning dan menghasilkan kompleks asam labil dengan gugus orto-dihidroksil dalam cincin A atau B flavonoid (Fernandes, 2012). Berikut reaksi flavonoid dengan AlCl_3 dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Reaksi Flavonoid dengan pereaksi AlCl_3

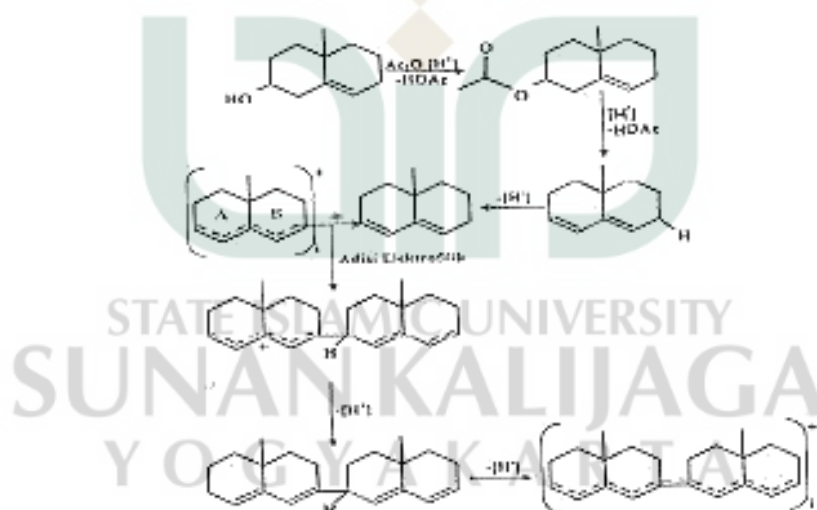
Penentuan uji saponin dengan menggunakan akuades dan dikocok menghasilkan busa menyerupai sabun. Hal ini disebabkan karena saponin terdiri dari gugus hidrofobik dan hidrofilik. Ketika dikocok, gugus hidrofobik akan membentuk ikatan dengan udara, sedangkan gugus hidrofilik akan membentuk dengan air. Reaksi yang terjadi yaitu saponin berupa glikosida akan terhidrolisis dalam air sehingga membentuk glukosa dan senyawa lain (Marliana, 2005). Berikut reaksi hidrolisis saponin dalam air dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Reaksi hidrolisis saponin dalam air

Identifikasi senyawa triterpenoid/steroid pada daun gayam menggunakan pereaksi Liebermann Burchard (anhidrit asetat- H_2SO_4 pekat) menghasilkan reaksi positif triterpenoid dan negatif steroid. Hal ini karena warna larutan yang

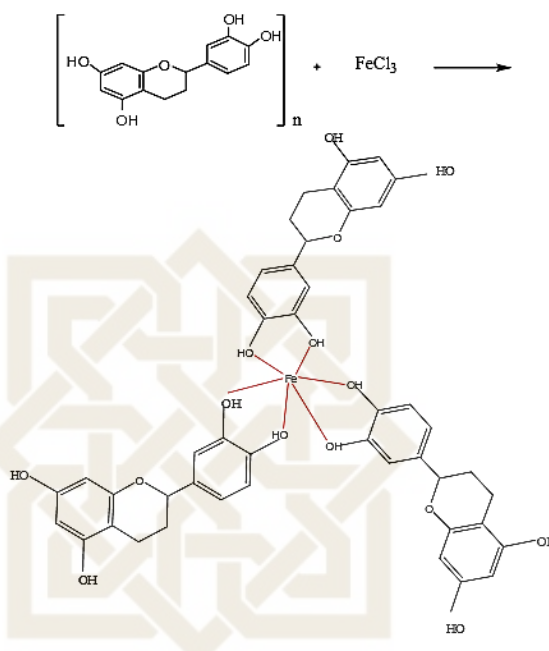
dihasilkan hijau pekat dan tidak terdapat perubahan warna merah-ungu yang menandakan adanya senyawa steroid. Mekanisme uji steroid/triterpenoid adalah dengan hilangnya H_2O dan pembentukan dengan karbokation. Reaksi pertama yaitu terjadi proses pembentukan gugus hidroksil menjadi gugus asetil dengan menggunakan asam asetat anhidrida. Kemudian gugus asetil melepaskan diri sehingga terjadi ikatan rangkap. Lalu ikatan rangkap berpindah karena hilangnya ikatan hidrogen beserta elektronnya. Selanjutnya senyawa yang berperan sebagai elektrofil/karbokation mengalami resonansi, sehingga mengakibatkan terjadinya adisi elektrofilik dan hilangnya gugus hidrogen beserta elektronnya. Hal tersebut mengakibatkan senyawa mengalami perpanjangan konjugasi (Siadi, 2012). Mekanisme reaksi steroid/triterpenoid dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi Steroid/triterpenoid dalam *Liebermann Burchard*

Hasil pengujian dari senyawa tanin menggunakan pereaksi Besi (III) klorida $FeCl_3$ menghasilkan reaksi positif warna hijau kehitaman. Hal ini disebabkan karena adanya ikatan tanin dengan Fe^{3+} akan membentuk ikatan

kompleks berwarna hijau kehitaman (Sriwahyuni, 2010). Reaksi tanin dan Besi (III) klorida dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Reaksi Tanin dan FeCl_3

D. Hasil Uji Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran merupakan proses uji antibakteri dengan cara melubangi media yang berisi bakteri kemudian diisi dengan sampel. Metode sumuran dipilih karena dinilai lebih mudah diterapkan dan juga lebih mudah untuk mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri tidak hanya beraktivitas di permukaan agar tetapi sampai ke bawah sehingga zona hambat yang dihasilkan lebih besar (Nurhayati, 2020). Bakteri yang digunakan yaitu bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggoreskan satu ose bakteri ke media NA padat ke dalam tabung

reaksi. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri baru yang segar dan siap digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan memasukkan satu ose hasil kultur bakteri ke dalam tabung reaksi yang sudah diberi NaCl 0,9%. Kemudian suspensi bakteri distandarisasi kekeruhannya dengan larutan *Mc. Farland* agar memenuhi syarat kepekaan jumlah bakteri yaitu $10^5 - 10^8$ /ml (Inayatullah, 2012).

Kontrol negatif yang digunakan yaitu pelarut etanol 96%. Menurut Natheer, *et al* (2012) menyebutkan bahwa kontrol negatif yang dapat digunakan harus sama dengan pelarut ekstrak, agar memastikan bahwa pelarut tidak mempengaruhi hasil dari aktivitas antibakteri ekstrak. Dalam hal ini maka kontrol negatif yang digunakan yaitu etanol 96%. Hasil zona hambat dari kontrol negatif terhadap kedua bakteri uji adalah 0 mm, yang membuktikan bahwa pelarut etanol 96% tidak mempengaruhi hasil uji antibakteri ekstrak.

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah *amoxicillin* 100 ppm. *Amoxicillin* merupakan antibiotik dengan spektrum luas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif dan positif. *Amoxicillin* dikatakan sensitif apabila zona hambatnya adalah ≥ 14 mm, dan resisten apabila zona hambatnya ≤ 11 mm, maka dapat dikatakan antibiotik tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri (resisten) (Mardiah, 2017). Hasil diameter zona hambat *amoxicillin* terhadap kedua bakteri uji yakni *Escherichia coli* sebesar 17,05 mm sedangkan *Staphylococcus aureus* sebesar 14,13 mm. Hal ini menunjukkan bahwa *amoxicillin* bersifat sensitif terhadap kedua bakteri uji.

Tabel 4.2 Klasifikasi Aktivitas antibakteri (Navarro, 2003)

Diameter Zona Hambat	Sifat Antibakteri
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
>10-20 mm	Kuat
>20-30 mm	Sangat kuat

Tabel 4.3 Zona Hambat Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gayam terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)			
	I	II	III	Rata-rata
Konsentrasi 20%	4,10	4,43	3,05	3,86
Konsentrasi 40%	4,43	5,25	4,17	4,62
Konsentrasi 60%	7,42	8,08	8,90	8,13
Konsentrasi 80%	8,92	8,38	9,05	8,78
Kontrol positif (<i>amoxicillin</i>)	14,82	13,73	13,85	14,13
Kontrol negatif (etanol 96%)	0	0	0	0

Keterangan : **I** = pengulangan pertama, **II** = pengulangan kedua, **III** = pengulangan ketiga

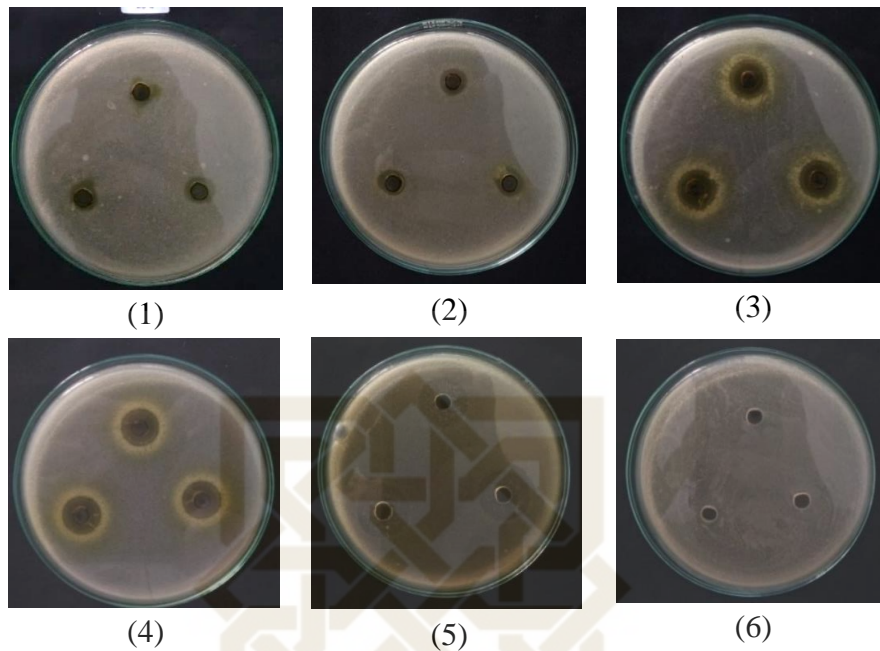
Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gayam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada Tabel 4.3 menunjukkan rata-rata zona hambat berkisar antara 3-9 mm, sehingga dapat disimpulkan bahwa sifat antibakteri yang dihasilkan termasuk lemah-sedang. Diperoleh zona hambat konsentrasi 80% dan 60% sebesar 8,78 mm dan 8,13 mm, sehingga daya hambat antibakteri bersifat sedang. Zona hambat konsentrasi 20% dan 40% menghasilkan sebesar 3,86 mm dan 4,62 daya hambat antibakteri bersifat lemah.

Tabel 4.4 Zona Hambat Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gayam terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)			
	I	II	III	Rata-rata
Konsentrasi 20%	1,62	1,43	1,42	1,49
Konsentrasi 40%	3,07	3,03	3,32	3,14
Konsentrasi 60%	6,08	5,23	4,63	5,31
Konsentrasi 80%	3,5	3,6	4,73	3,94
Kontrol positif (<i>amoxicillin</i>)	17,77	15,93	17,45	17,05
Kontrol negatif (etanol 96%)	0	0	0	0

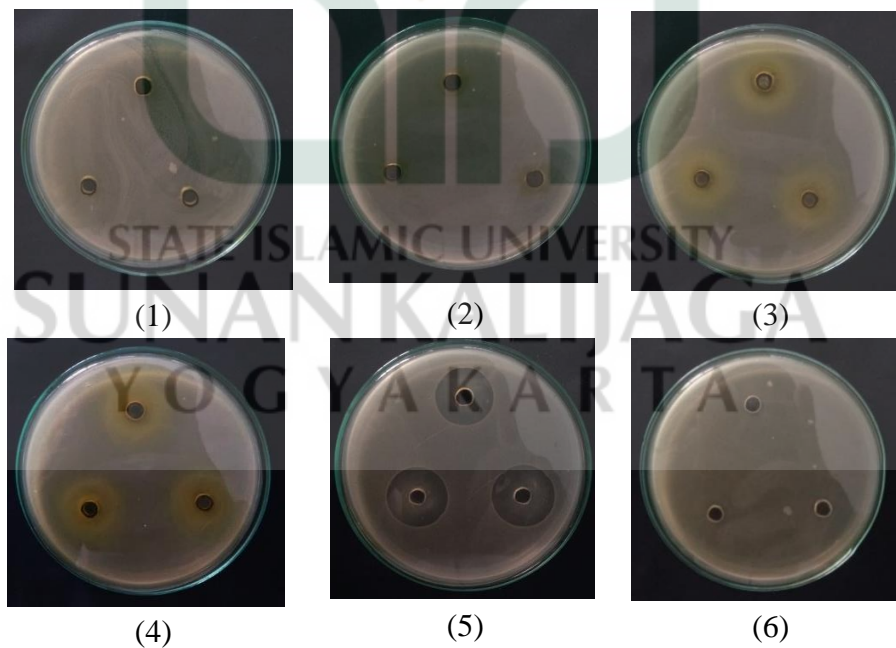
Keterangan : **I** = pengulangan pertama, **II** = pengulangan kedua, **III** = pengulangan ketiga

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gayam terhadap bakteri *Escherichia coli* seperti pada Tabel 4.4 menunjukkan rata-rata zona hambat berkisar antara 1-6 mm, sehingga daya hambat antibakteri yang dihasilkan termasuk lemah-sedang. Konsentrasi ekstrak 60% menghasilkan zona hambat tertinggi sebesar 5,31 mm bersifat sedang, sedangkan konsentrasi 20%, 40% dan 80% menghasilkan zona hambat sebesar 1,49 mm, 3,14 mm, dan 3,94 mm daya hambat antibakteri bersifat lemah. Hasil dari diameter zona hambat dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gayam terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Keterangan: (1) Konsentrasi 20% (2) Konsentrasi 40% (3) Konsentrasi 60% (4) Konsentrasi 80% (5) Kontrol (+) *amoxicillin* (6) Kontrol (-) etanol 96%



Gambar 4.8 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gayam terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Keterangan : (1) konsentrasi 20% (2) Konsentrasi 40% (3) Konsentrasi 60% (4) Konsentrasi 80% (5) Kontrol (+) *amoxicillin* (6) Kontrol (-) etanol 96%

Berdasarkan Gambar 4.7 dan 4.8 menunjukkan bahwa ekstrak daun gayam memiliki daya hambat yang lebih kecil terhadap kedua jenis bakteri dibandingkan dengan kontrol positif *amoxicillin* sebagai antibiotik bakteri uji. Hal ini karena antibiotik berasal dari mikroorganisme atau zat hasil sintesis kimia. Mujiasih (2001) menyatakan bahwa antibiotik yang sebagian atau seluruhnya berasal dari sintesis kimia mampu membunuh atau menghambat suatu mikroorganisme meskipun antibiotik dalam konsentrasi rendah.

Penelitian ini dibandingkan dengan penelitian sebelumnya memiliki perbedaan terletak pada bagian tumbuhan yang digunakan. Husodo (2021) menggunakan bagian kulit batang gayam, sedangkan pada penelitian ini menggunakan daun gayam. Kulit batang gayam dan daun gayam memiliki sifat antibakteri yang berbeda. Ekstrak kulit batang gayam memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* yang lebih besar dengan zona hambat terbesar 12 mm bersifat kuat, sedangkan ekstrak daun gayam pada bakteri *Escherichia coli* memiliki zona hambat terbesar 5,31 mm bersifat sedang. Hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan bagian tumbuhan yang digunakan sehingga menghasilkan zona hambat yang berbeda. Walaupun bagian tumbuhan berasal dari jenis tanaman dan senyawa metabolit sekunder yang sama, bukan berarti efektivitas antibakteri akan sama. Hal ini dikarenakan tiap senyawa bioaktif pada setiap bagian tumbuhan memiliki kadar yang berbeda. Tinggi rendahnya kadar pada senyawa bioaktif biasanya akan berbanding lurus dengan kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini

membuktikan bahwa ekstrak kulit batang gayam memiliki kadar senyawa bioaktif lebih besar daripada daun gayam (Amalia, 2021).

Fadhmi (2015) menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka zona hambat yang terbentuk akan semakin besar dan daya hambatnya semakin kuat dalam melawan pertumbuhan bakteri. Hal ini sesuai dengan hasil percobaan ekstrak etanol daun gayam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, namun tidak terbukti terhadap bakteri *Escherichia coli*. Ekstrak dengan konsentrasi 80% mengalami penurunan daya hambat dibandingkan dengan konsentrasi 60% pada bakteri *Escherichia coli*. Hal serupa dialami oleh Ningtyas (2012) yang mengakibatkan zona hambat tidak selalu berbanding lurus dengan konsentrasi. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor. Menurut Lingga *et al.*, (2015) terbentuknya zona hambat sangat bergantung oleh jumlah bahan antibakteri, daya larut antibakteri ke media, koefisien difusi, dan efektivitas bakteri tersebut. Fenomena tersebut telah diteliti oleh Richardson dalam Ningtyas (2012) yang memperoleh hasil bahwa jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri berbeda memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada lama waktu tertentu.

Hasil pengukuran daya hambat pada Gambar 4.7 dan 4.8 menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun gayam lebih besar dan lebih sensitif terhadap bakteri *S.aureus* daripada *E.coli*. Hal ini mungkin dikarenakan oleh perbedaan dinding sel dimana lapisan dinding *E.coli* lebih kompleks daripada *S.aureus* sehingga sulit ditembus oleh zat antibakteri (Natheer, 2012).

Zona hambat antibakteri dalam suatu bahan alam dapat dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder. Semakin tinggi kadar senyawa metabolit sekunder

akan menghasilkan zona hambat yang semakin besar. Setiap senyawa metabolit sekunder memiliki mekanisme kerja antibakteri yang berbeda. (Harborne, 2003). Menurut Cowan *et al.*, (1999) tanin memiliki aktivitas anti bakteri terkait dengan kemampuannya untuk mengaktifkan adhesi sel mikroba dan menonaktifkan enzim, serta mengganggu transpor protein di lapisan dalam sel. Mekanisme kerja tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel yang mengakibatkan sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan mengalami kematian. (Arlofa, 2015).

Menurut Estrela *et al.*, (1995) mekanisme flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan cara gugus hidroksil pada senyawa flavonoid mengakibatkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya menimbulkan efek toksik terhadap bakteri. Nuria *et al.*, (2009) menambahkan mekanisme flavonoid dengan membentuk senyawa kompleks ekstraseluler dengan protein terlarut yang dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan pelepasan senyawa intraseluler.

Aktivitas antibakteri terpenoid diperkirakan melibatkan pemecahan membran oleh komponen lipofilik (Bobbarala, 2012). Mekanisme triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan purin pada membran luar sel bakteri membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya purin. Rusaknya purin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas membran sel bakteri yang akan

mengakibatkan sel bakteri kekurangan nutrisi dan akan menghambat pertumbuhan bakteri atau mengalami kematian (Arlofa, 2015).

Nuria *et al.*, (2009) menyatakan mekanisme kerja saponin sebagai anti-bakteri adalah untuk mengurangi tegangan permukaan yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas atau kebocoran sel, dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Apabila berbagai komponen sel penting keluar dari dalam sel dapat menyebabkan terjadinya penurunan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel sehingga pertumbuhan sel bakteri terhambat dan menyebabkan kematian sel (Fahrunisaa., 2015).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun gayam memiliki senyawa metabolit sekunder flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin. Belum terdapat literatur terkait dari kandungan kadar fenolik daun gayam, sehingga ketentuan kadar fenolik terbesar belum dapat dipastikan. Berdasarkan prosedur penelitian yang sudah dilakukan, dari ke-4 senyawa tersebut diduga tanin memiliki potensi aktivitas antibakteri terbesar. Hal ini karena senyawa flavonoid, saponin dan triterpenoid telah melewati pemanasan dalam penangas air dengan suhu 60°C yang dapat membuat kandungan senyawa berkurang. Senyawa metabolit sekunder flavonoid, triterpenoid dan saponin lebih termolabil dibandingkan dengan tanin. Senyawa tanin pada proses pemanasan dengan suhu yang tinggi tidak mengalami dekomposisi. Menurut Ismarani (2012), salah satu sifat kimia tanin adalah larut dalam air, sehingga apabila dilarutkan dalam air panas akan menyebabkan kelarutannya semakin besar dan meningkat. Muhammad *et al.* (2015) menambahkan bahwa pada suhu tinggi menyebabkan inaktivasi

enzim katekol oksidase dan sedikit reaksi enzimatik, sehingga kandungan tanin meningkat. Faktor lain yang dapat memengaruhi kandungan senyawa fenolik yakni waktu ekstraksi. Sari *et al.*, (2015) menyatakan bahwa waktu ekstraksi juga dapat memengaruhi kadar fenolik karena waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat meningkatkan peluang adanya reaksi oksidasi senyawa fenolik akibat paparan oksigen yang semakin lama dapat menurunkan jumlah total fenolik terekstrak. Oleh karena itu, senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri terbesar yaitu senyawa tanin.