

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tumbuhan

Identifikasi yang dilakukan pada sampel penelitian ini ditujukan untuk memperoleh keaslian identitas dari tanaman yang digunakan. Determinasi tanaman kunyit hitam dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 03 April 2023 dengan nomor pendaftaran 0298/S.Tb./IV/2023 yang dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Hasil dari determinasi tanaman yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Devisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Curcuma</i>
Sinonim	: <i>Curcuma kuchoor</i> Royle
Species	: <i>Curcuma caesia</i> Roxb

2. Persiapan Sampel dan Ekstraksi

Didapatkan rendemen yang dihasilkan dari perhitungan bobot ekstrak kental dibagi bobot simplisia awal dikali 100% yaitu sebesar 10,68%.

3. Skrining Fitokimia

Hasil dari skrining fitokimia ekstrak etanol rimpang kunyit hitam didapatkan hasil bahwa masing-masing ekstrak etanol rimpang kunyit hitam mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Uji Skrining Fitokimia

No.	Skrining Fitokimia	Hasil	Keterangan literatur (Udayani <i>et al.</i> , 2013)	
1.	Flavonoid Mg + Amil Alkohol + Etanol	+	Warna merah, jingga atau kuning	
2.	Saponin	-	Terbentuknya busa	
3.	Tannin	+	Warna hitam atau biru	
4.	Triterpenoid & steroid	+	Steroid ditunjukkan dengan adanya warna hijau, triterpenoid ditunjukkan dengan adanya warna ungu	
5.	Alkaloid	Mayer	+	Endapan putih dan endapan coklat kemerahan
		Wagner	+	Endapan putih dan endapan coklat kemerahan
		Dragendroff	+	Endapan putih dan endapan coklat kemerahan

Keterangan :

(+) = mengandung golongan senyawa uji

(-) = tidak mengandung golongan senyawa uji

4. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit hitam mengandung flavonoid. Untuk mempertegas adanya kandungan flavonoid didalam ekstrak etanol rimpang kunyit hitam, dilakukan analisis uji KLT dengan menggunakan kuersetin sebagai pembanding.

a. Optimasi fase gerak

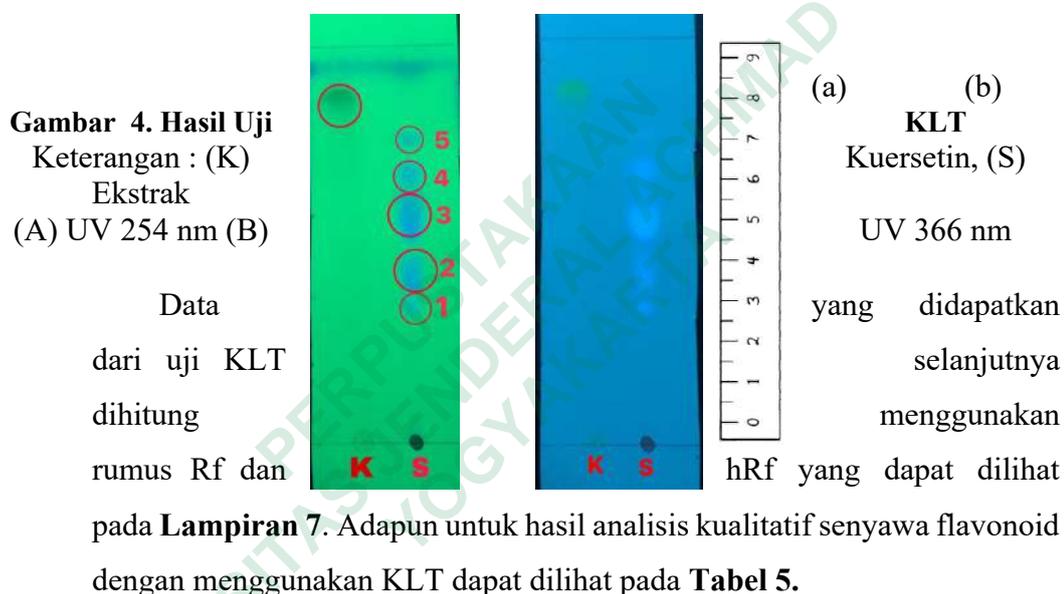
Optimasi fase gerak dilakukan untuk mengetahui pemisahan analit secara tepat. Beberapa fase gerak yang telah diuji menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil optimasi fase gerak pada ekstrak etanol rimpang kunyit hitam menggunakan pelarut etanol 70% dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Optimasi Fase Gerak Uji KLT

No.	Fase gerak	Hasil
1.	n-butanol : asam asetat glasial : air (8 : 1 : 1)	Kuersetin terelusi namun bercak sampel tidak terlihat
2.	n-heksan : etil asetat (2 : 8)	Kuersetin dan samper terelusi dan timbuk bercak

b. Uji KLT pada sampel

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak yang dipilih adalah n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 2 : 8. Hasil uji KLT pada ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Tabel 5. Hasil Analisis Kualitatif Senyawa Flavonoid

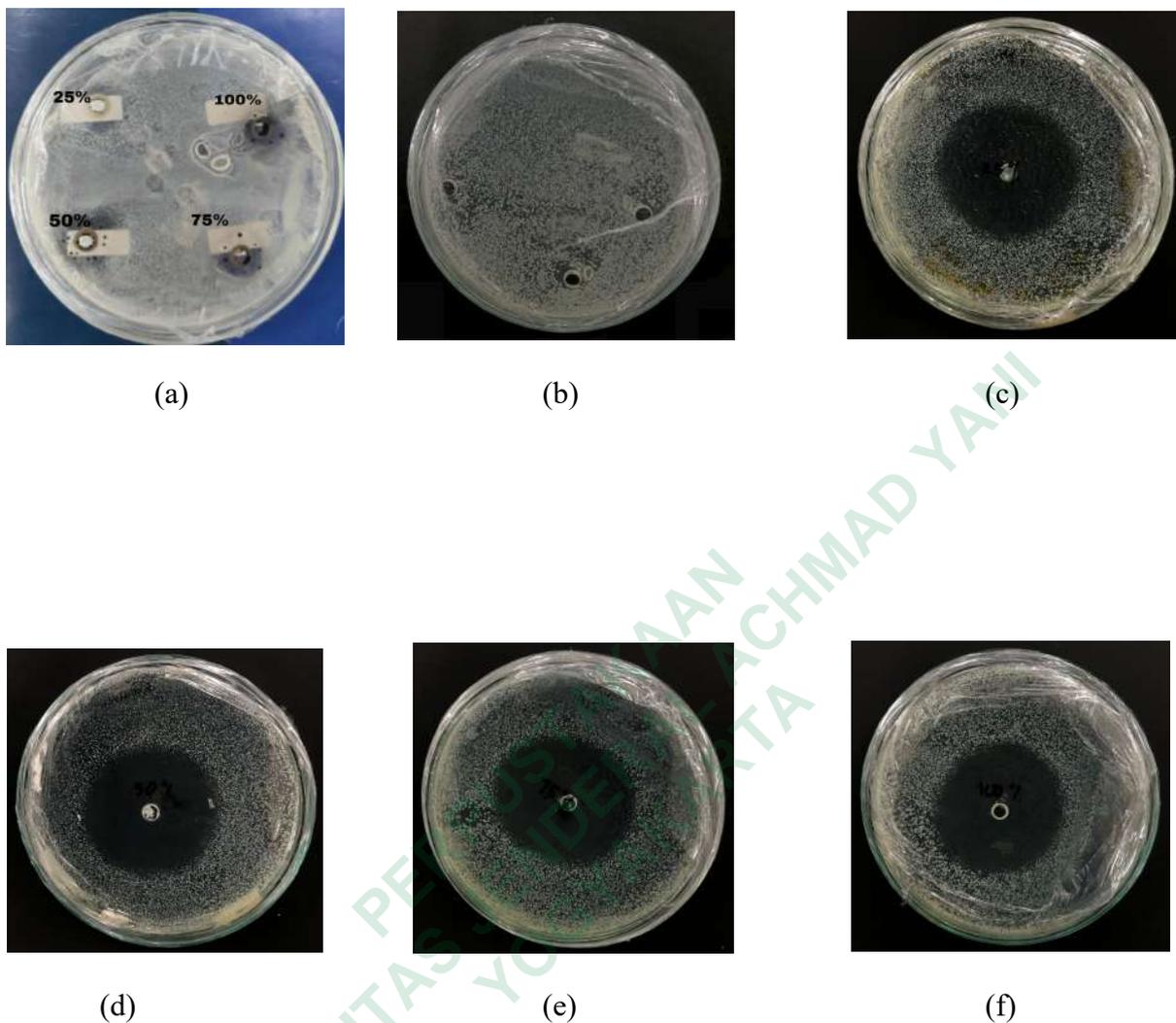
Sampel	Bercak (cm)	Rf (cm)	hRf (cm)
Kuersetin	7	0,875	87,5
Ekstrak	1. 2,9 2. 3,8 3. 4,9 4. 0,7 5. 0,837	1. 0,362 2. 0,475 3. 0,612 4. 0,7 5. 0,837	1. 36,2 2. 47,5 3. 61,2 4. 70 5. 83,7

5. Pengujian Daya Hambat Antibakteri

Pada uji daya hambat antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dilakukan dengan metode sumuran yang dihitung zona hambatnya disekeliling sumuran. Ekstrak sampel dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Kontrol positif yang digunakan adalah sediaan obat kloramfenikol yang dibuat dalam larutan dengan beberapa konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100% sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 70%. Data uji daya hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang didapatkan dari perhitungan 3 arah (horizontal, vertikal, dan diagonal) selanjutnya dihitung menggunakan rumus zona hambat seperti pada **Lampiran 12**. Hasil uji daya hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Uji Daya Hambat Pada Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Konsentrasi	Rata-rata (mm)	Klasifikasi
25%	12,122	Kuat
50%	12,444	Kuat
75%	12,611	Kuat
100%	14,388	Kuat
K+ 25%	39,833	Sangat kuat
K+ 50%	42,989	Sangat kuat
K+ 75%	42,478	Sangat kuat
K+ 100%	42,011	Sangat kuat
K-	4,067	Kurang



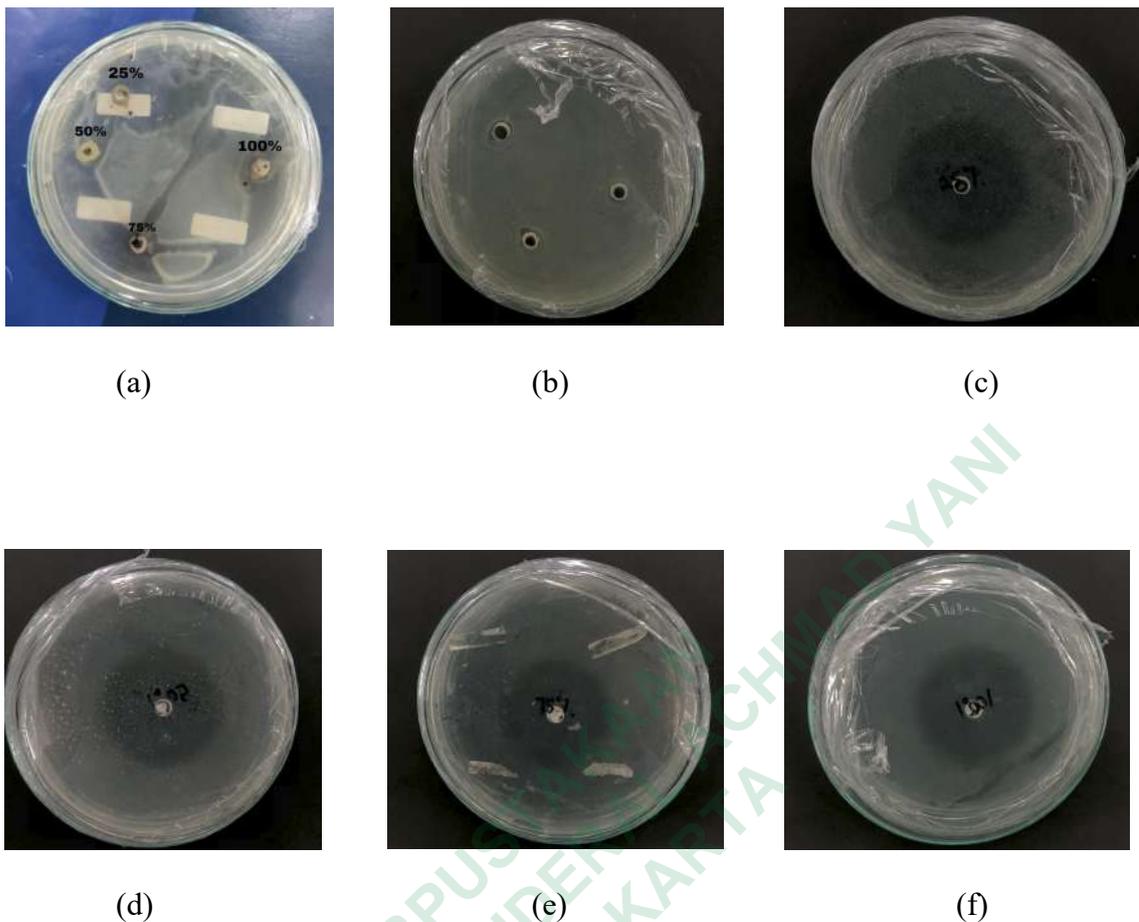
Gambar 5. Diameter Zona Hambat Pada Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

(a) Sampel ekstrak etanol rimpang kunyit hitam konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% (b) kontrol negatif etanol 70% (c) kontrol positif kloramfenikol konsentrasi 25% (d) kontrol positif kloramfenikol 50% (e) kontrol positif kloramfenikol 75% (f) kontrol positif kloramfenikol 100%.

Data uji daya hambat pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang didapatkan dari perhitungan 3 arah (horizontal, vertikal, dan diagonal) selanjutnya dihitung menggunakan rumus zona hambat seperti pada **Lampiran 12**. Hasil uji daya hambat pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25923 dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Uji Daya Hambat Pada Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Konsentrasi	Rata-rata (mm)	Klasifikasi
25%	11,722	Kuat
50%	12,666	Kuat
75%	14,333	Kuat
100%	16,111	Kuat
K+ 25%	36,889	Sangat kuat
K+ 50%	40,000	Sangat kuat
K+ 75%	34,900	Sangat kuat
K+ 100%	33,778	Sangat kuat
K-	5,944	Sedang



Gambar 6. Diameter Zona Hambat Pada Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922
 (a) Sampel ekstrak etanol rimpang kunyit hitam konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% (b) kontrol negatif etanol 70% (c) kontrol positif kloramfenikol konsentrasi 25% (d) kontrol positif kloramfenikol 50% (e) kontrol positif kloramfenikol 75% (f) kontrol positif kloramfenikol 100%.

6. Analisis Data

Data yang didapat selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS versi 29. Dilakukan uji ini untuk melihat perbedaan diantara konsentrasi dari setiap bakteri uji. Hasil analisis data statistik dapat dilihat pada **Tabel 8** dan **Tabel 9**.

**Tabel 8. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Bakteri
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>One Way</i> ANOVA	Uji <i>Post Hoc</i>
25%	0,454			11,3333
50%	0,987			12,0333
75%	0,065	0,594	0,680	12,6000
100%	0,127			14,3333

**Tabel 9. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Bakteri
Escherichia coli ATCC 25922**

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>One Way</i> ANOVA	Uji <i>Post Hoc</i>
25%	0,303			10,07
50%	0,119			11,77
75%	0,290	0,314	0,197	12,20
100%	0,157			16,10

Tujuan dilakukannya analisis ini adalah untuk membandingkan konsentrasi dari masing-masing bakteri uji. Uji yang pertama dilakukan yaitu *shapiro wilk*. Uji *Shapiro wilk* adalah metode uji normalitas yang efektif untuk sampel yang berjumlah kecil dan kurang dari 50. Data terdistribusi normal apabila nilai sig $>0,05$. Dari tabel diatas didapatkan nilai yang normal pada masing-masing bakteri uji karena nilai yang didapat $>0,05$.

Dilakukan uji selanjutnya yaitu homogenitas dengan uji *Levene's*. Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data variable mempunyai distribusi homogen atau tidak. Model data dapat dikatakan homogenitas apabila nilai probabilitas $>0,05$ dan sebaliknya. Nilai yang didapat yaitu 0,314

dan 0,594 maka menunjukkan bahwa kedua data zona hambat bakteri yang didapatkan adalah homogen.

Setelah didapatkan hasil yang normal dan homogen, dilakukan uji *One Way ANOVA*. Uji ini dilakukan untuk melihat apakah data yang didapat signifikan atau tidak. Data dikatakan signifikan apabila nilai probabilitas $>0,05$. Dari hasil yang didapatkan pada kedua bakteri nilai tidak berbeda signifikan. Hasil yang didapat pada uji one way ANOVA adalah 0,197 dan 0,680. Selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* sebagai uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison*) menggunakan uji *Tukey*. Dari hasil yang didapatkan, hasil berada pada kolom yang sama maka ini dapat dikatakan dua kelompok perlakuan tersebut memiliki efek yang sama.

B. Pembahasan

Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini sebesar 10,68% yang mana sesuai dengan syarat rendemen yaitu lebih dari 10% (Badriyah *et al.*, n.d.). Pada penelitian ini selanjutnya dilakukan skrining fitokimia yaitu uji flavonoid, saponin, tannin, triterpenoid/steroid dan alkaloid. Uji yang dilakukan pertama kali adalah uji flavonoid. Dilakukan dengan cara menambahkan magnesium, amil alkohol dan etanol 70%. Hasil yang berwarna kuning menunjukkan positif mengandung flavonoid. Flavonoid pada rimpang kunyit hitam diduga menjadi aktivitas antibakteri dengan cara mengkomplekskan dinding bakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Nyoman & Udayani, n.d.).

Uji saponin dilakukan dengan menambahkan air panas pada sampel yang akan diuji. Terbentuk buih pada larutan uji setelah dicampurkan air panas dan ditunggu beberapa detik. Namun, pada saat penambahan HCl buih yang sudah terbentuk tadi hilang. Harusnya buih yang dihasilkan pada pengujian ini bersifat stabil. Pada uji saponin yang telah dilakukan, sampel dinyatakan negatif mengandung saponin karena tidak muncul buih pada saat dilakukan penambahan HCl 1 N. Penambahan HCl bertujuan untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Susanty *et al.*, 2014).

Uji tannin dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 2 tetes. Terjadi perubahan warna menjadi kehitaman yang berarti sampel tersebut mengandung tannin. Tujuan penambahan FeCl_3 untuk menentukan apakah kunyit hitam mengandung gugus fenol. Adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna biru kehitaman setelah ditambahkan FeCl_3 .

Uji positif steroid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi hijau-biru kehitaman, sementara uji triterpenoid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi merah atau merah-keunguan. Penambahan asam sulfat pekat bertujuan untuk menghidrolisis air yang akan bereaksi dengan turunan asetil membentuk cincin merah keunguan maupun hijau sampai biru. Pada uji yang telah dilakukan, pewarnaan yang muncul adalah merah keunguan, ini menunjukkan bahwa sampel positif mengandung triterpenoid (Susanty *et al.*, 2014).

Pada uji alkaloid sejumlah ekstrak ditambah dengan beberapa tetes HCl 1% dengan tujuan untuk menarik alkaloid dari dalam simplisia. Alkaloid bersifat basa sehingga dengan penambahan HCl akan terbentuknya garam. Kemudian dilakukan reaksi pengendapan dengan menggunakan tiga pereaksi. Untuk pereaksi wagner terdapat hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat, sedangkan untuk penambahan reaksi mayer didapatkan hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Untuk pereaksi dragendroff didapatkan hasil positif dengan adanya endapan jingga.

Untuk memperkuat adanya kandungan senyawa flavonoid didalam kunyit hitam maka penulis melakukan uji kromatografi lapis tipis. KLT mempunyai prinsip kerja memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Dimana fase diam yang digunakan adalah plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan.

Plat silika gel yang digunakan pada penelitian ini yaitu G60 F₂₅₄ merupakan plat yang sudah jadi diperdagangkan. Sampel dan standar pembanding yang telah ditotolkan selanjutnya dielusi dalam bejana kromatografi. Proses ini dikenal sebagai proses pengembangan. Proses pengembangan sampel tadi dilakukan secara mekanik, yaitu pelarut bergerak dari bawah plat dan berjalan perlahan naik untuk membawa bercak(Nyoman Yuliani & Widiayati Djou, n.d.). Digunakan kuersetin

sebagai pembanding. Hasil menunjukkan terdapat perbedaan RF pada sampel dan standar pembanding.

Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam yang kental, diencerkan sebanyak 50.000 ppm dan standar pembanding dengan konsentrasi 0,1%. Masing-masing dilakukan 3 kali penotolan. Fase gerak yang pertama digunakan yaitu n-butanol : asam asetat glasial : air dengan perbandingan 8:1:1 dijenuhkan selama 1 jam. Setelah dibaca dibawah sinar UV dengan Panjang gelombang 254 nm dan 365 nm, menunjukkan hasil yaitu standar pembanding (kuersetin) terelusi dengan baik namun pada sampel, bercak tidak muncul. Dikarenakan hasil dari percobaan fase gerak yang pertama tidak sesuai, maka dilakukan optimasi pada fase gerak. Fase gerak yang selanjutnya adalah n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 2:8. Penotolan dilakukan sebanyak 3 kali pada standar pembanding, dan 5 kali pada sampel. Hasilnya menunjukkan sampel dan kuersetin terelusi. Noda sampel yang muncul hampir sejajar dengan noda standar pembanding. Artinya pada sampel mengandung senyawa flavonoid. Pada pengamatan yang dilakukan sampel memiliki warna bercak yang mirip dengan kuersetin maka dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid tersebut adalah senyawa flavonoid dengan karakteristik seperti kuersetin (Kunti Mulangsri & Zulfa, 2020). Terdapat 5 noda pada uji KLT ini. Banyaknya noda yang muncul sejalan dengan banyaknya senyawa turunan dari flavonoid (Nurmalasari *et al.*, n.d.). Noda yang timbul pada plat, berhubungan dengan tingkat kepolaran senyawa turunan flavonoid. Hal tersebut dapat dilihat melalui nilai Rf. Nilai Rf yang baik antara 0,2-0,8. Senyawa yang memiliki nilai Rf lebih besar mempunyai arti kepolaran yang rendah. Nilai Rf yang lebih kecil berarti kepolarannya lebih besar (Gandjar & Rohmah, 2007). Hal ini dikarenakan fase diam yang bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan dalam fase diam, sehingga akan menghasilkan nilai Rf yang rendah. Nilai Rf yang terlalu tinggi, maka akan mengurangi kepolaran dari eluen tersebut (Kemendikbud, 2018).

Setelah dilakukan uji KLT, dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Tujuan dilakukannya uji ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol rimpang kunyit hitam memiliki aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri

dilakukan dengan metode sumuran. Metode ini dilakukan dengan cara membuat lubang yang tegak lurus pada agar padat yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah lubang menyesuaikan dengan tujuan penelitian dan konsentrasi yang digunakan. Kemudian lubang yang telah dibuat diisi dengan larutan sampel yang akan diuji. Selanjutnya diamati pertumbuhan bakteri disekeliling lubang (Nurhayati *et al.*, 2020).

Larutan sampel dibuat menjadi 4 konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Untuk kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol dan kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 70%. Hasil daya hambat bakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening pada sekitar sumuran. Zona bening yang terbentuk menandakan adanya aktivitas penghambatan dari sampel terhadap bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk pada sekitar sumuran diukur menggunakan jangka sorong (skala mm) dengan 3 arah pengukuran yaitu horizontal, vertikal dan diagonal. Dilakukannya pengukuran 3 arah ini karena lingkaran yang terbentuk tidak sempurna. Konsentrasi hambat minimum dilakukan untuk penentuan nilai zona hambat bakteri pada sampel. Penentuan konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit hitam sangat berpengaruh terhadap terbentuknya zona hambat yang dihasilkan oleh kedua bakteri uji. Semakin rendah konsentrasi yang diberikan maka semakin kecil diameter zona hambat yang terbentuk, karena semakin kecil konsentrasi maka zat aktif yang terlarut pada ekstrak etanol rimpang kunyit hitam semakin sedikit pula. Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, maka semakin luas pula diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil rata-rata zona hambat dapat dilihat pada **tabel 6** dan **tabel 7**. Dapat dilihat dari tabel tersebut bahwa konsentrasi hambat minimum pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 sudah muncul pada konsentrasi 25%.

Menurut Desire (2016), bakteri gram negatif lebih efektif membentuk diameter zona hambat dibandingkan bakteri gram positif. Perbedaan aktivitas antibakteri dari masing-masing bakteri uji dikarenakan adanya perbedaan struktur dinding sel bakteri pada kedua jenis bakteri. Bakteri *Escherichia coli* memiliki kandungan peptidoglikan lebih sedikit dan kandungan lipid lebih banyak.

Banyaknya kandungan lipid pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menyebabkan ekstrak air pada kunyit hitam tidak mudah menyerap.

Kontrol positif yang digunakan adalah larutan kloramfenikol yang dibuat dari sediaan obat kloramfenikol 250 mg. Pada hasil kontrol positif, nilai tertinggi berada di konsentrasi 50%. Ini kemungkinan terjadi karena larutan kloramfenikol pada konsentrasi 75% dan 100% tidak larut sempurna, sehingga pada saat dimasukkan ke dalam sumuran ada beberapa obat yang mengendap di dalam mikropipet.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA