

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Hasil yang di peroleh yaitu determinasi tanaman, rendemen, uji organoleptik, skrining uji senyawa fitokimia, uji kromatografi lapis tipis, dan uji aktivitas antibakteri.

1. Determinasi Tanaman

Daun rosella yang digunakan pada saat penelitian diambil dari Krajan I, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kecamatan. Borobudur, Kabupaten magelang, Jawa Tengah 56553 yang terletak di ketinggian 265 mdpl. 7° 36' 28' LS dan 110° 12' 13' BT. Determinasi daun rosella di lakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta pada tanggal 27 Mei 2022 dengan nomor: 161/Lab. Bio/B/IV/2022. Hasil dari determinasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Persiapan Sampel

a. Pembuatan Simplisia

Daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) dengan ukuran sedang yang masih segar, utuh yang tidak rusak dan berwarna hijau tidak ada yang layu sebanyak 4 kg di cuci bersih dengan air yang mengalir agar lebih bersih kemudian dipindahkan ke dalam ranjang. Setelah itu dilanjutkan pengeringan dengan menggunakan oven untuk meminimalisir hidupnya jamur pada daun rosella dan pengeringan dilakukan pada suhu 50°C. Simplisia yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan alat yaitu *grinder* hingga berbentuk serbuk. Hasil dari pengovenan yang sudah dikeringkan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Bobot Bahan Tanaman yang Digunakan Dalam Penelitian

No	Bahan tanaman	Bobot (gram)
1	Daun rosella segar	4.000 gram
2	Daun rosella kering	1.800 gram

Tabel 3 menunjukkan bahwa daun rosella yang masih segar sebesar 4 kg sedangkan untuk hasil yang sudah dikeringkan dengan jumlah sebesar 1,8 kg yang sudah di oven, selama lebih kurang 3 hari setelah tanaman kering di jadikan serbuk dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh yang artinya dalam 1 inci mesh terdapat lubang sebanyak 40.

b. Pembuatan ekstrak kental etanol daun rosella

Serbuk daun rosella diekstrak dengan menggunakan metode maserasi atau perendaman. Proses maserasi dilakukan dengan cara diambil serbuk daun rosella sebanyak 500 gram direndam dalam pelarut etanol 70 % dengan perbandingan (1:10 b/v) sebanyak 5 liter selama 3×24 jam dilakukan pengadukan tiap 6 jam, Pada hari ke-3 dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain mori diperoleh filtrat 1. Selanjutnya dilakukan remaserasi selama 1 hari yaitu suatu proses perendaman kembali daun rosella dengan pelarut yang baru, hasil ampas dari penyaringan direndam dengan pelarut etanol 70% yang baru dengan jumlah sebanyak setengah jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Pada hari ke-4 penyaringan kembali dengan menggunakan kain mori agar mendapatkan filtrate 2. Hasil dari nilai rendemen pada daun rosella yang telah di proses selama 4 hari dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Rosella

Berat simplisa (gram)	Berat ekstrak (gram)	Hasil rendemen ekstrak (% b/b)
500 gram	96,83 gram	19,366 %

Pada tabel 4 dapat diketahui bahwa sampel yang sudah menjadi serbuk ditimbang sebanyak 500 gram untuk di maserasi kemudian hasil yang telah di ekstrak kental didapatkan sebesar 96,83 gram untuk hasil

rendemen dengan nilai 19,366% . Hal tersebut menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi etanol dan semakin lama waktu ekstraksi maka akan meningkatkan rendemen ekstrak daun rosella.

3. Kontrol kualitas ekstrak etanol daun rosella

a. Hasil organoleptik

Ekstrak etanol daun rosella kental yang diperoleh dilakukan pengamatan secara organoleptik, dan yang diamati secara fisik dengan cara sederhana yaitu menggunakan indera manusia antara lain warna, tekstur, rasa, dan bau pada ekstrak etanol daun rosella. Hasil dari organoleptik yang dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Organoleptik (Dahlia et al., 2012)

Pengamatan	Ekstrak etanol daun Rosella	Literatur (Dahlia et al., 2012)
Warna	Kecoklatan	Kecoklatan
Tekstur	Kental	Kental
Rasa	Asam	Asam
Bau	Aromatik	Aromatik

Tabel 5 menunjukkan bahwa hasil uji organoleptik yang didapat untuk warna kecoklatan, tekstur kental, rasa asam, dan bau yang aromatik dengan hasil tersebut adanya persamaan antara peneliti sebelumnya (Samsuharto, 2008) dan tidak ada yang berbeda.

b. Hasil identifikasi senyawa fitokimia

Setelah melakukan uji organoleptik kemudian menguji senyawa fitokimia. Hal tersebut sangat penting dimana untuk mengetahui bahwa kandungan yang ada di dalam ekstrak etanol daun rosella. Hasil penapisan pada senyawa fitokimia yang telah diamati dengan menggunakan berbagai pelarut dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. . Hasil Penapisan Fitokimia

No	Uji fitokimia	Hasil	Literatur Putri, (2019)	Keterangan
1.	Alkaloid:			
	Pereaksi mayer	Terbentuk endapan endapan putih	Terbentuk endapan putih	Positif
	Pereaksi wagner	Terbentuk endapan warna coklat kemerahan	Terbentuk endapan coklat kemerahan	Positif
	Pereaksi dragendroff	Terbentuk endapan warna orange	Terbentuk endapan orange	Positif
2.	Flavanoid	Terbentuk warna merah menyala	Terbentuk warna merah menyala	Positif
3.	Saponin	Terbentuk busa	Terbentuk busa	Positif
4.	Tanin	Terbentuk warna hitam kehijauan	Terbentuk warna hitam kehijauan	Positif

Pada tabel 6 menunjukkan bahwa hasil dari pengujian alkaloid (pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendroff) menunjukkan hasil positif, pengujian pada flavonoid menunjukkan hasil yang positif, pengujian pada saponin menunjukkan hasil positif, dan pengujian pada tannin menunjukkan hasil positif. Berarti bahwa daun rosella terdapat adanya kandungan senyawa zat aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat.

c. Hasil pemisahan senyawa menggunakan metode KLT

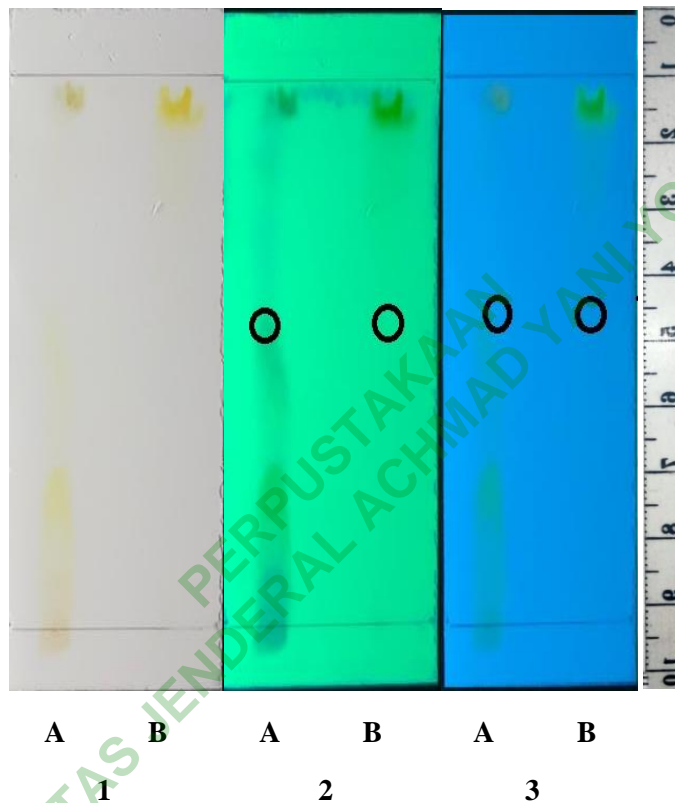
Identifikasi pemisahan senyawa secara kualitatif pada ekstrak etanol daun rosella dengan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Identifikasi pemisahan senyawa yaitu dengan cara menghitung nilai R_f (faktor retardasi). Pada penelitian dilakukan optimasi fase gerak sebanyak tiga kali dan diperoleh dengan hasil yang paling optimal sehingga hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Optimasi Beberapa Fase Gerak Pada KLT

No	Fase Gerak	Hasil
1.	Toluen: Aseton: Asam format (4:4:2)	Sampel konsentrasi 10% memisah dengan baik tetapi lama jenuhnya. Penyelesain: fase gerak di tambah menjadi 15 ml.
2.	Kloroform: Metanol: Asam Asetat Glasial (9: 1: 0,5)	Bercak sampel tidak ada yang sama dengan bercak standar kuarsetin dan untuk penjenuhan sangat lama. Penyelesain: konsentrasi sampel diturun kan menjadi 5% sedangkan kuarsetin 0,1%.
3.	Kloroform: Metanol: Asam Asetat Glasial (14:2:1)	Sampel ekstrak 5% dan kuarsetin 0,1% memisah dengan baik, dan terlihat bercak yang sama antara sampel dan kuarsetin.

Tabel 7 menunjukkan bahwa fase gerak Kloroform: Metanol: Asam Asetat Glasial (14:2:1) yang paling baik dalam mengidentifikasi pemisahan senyawa menggunakan metode KLT dan kedua sampel yaitu daun rosella dengan konsentrasi 5% sedangkan untuk standar kuarsetin pada konsentrasi 0,1% yang dimana dapat memisah dengan baik dan terlihat bercak pada kedua sampel.

Setelah didapat fase gerak yang baik plat silika Gel diamatai menggunakan lampu sinar tampak, sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm. Hasil uji KLT terhadap ekstrak etanol daun rosella dengan konsentrasi 5% dan standar kuarsetin pada konsentrasi 0,1% dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Pengamatan Hasil KLT Melalui Sinar Tampak dan Sinar UV

Keterangan :

- 1: Ekstrak etanol daun Rosella pada sinar tampak
- 2: Ekstrak etanol daun Rosella pada sinar UV 254 nm
- 3: Ekstrak etanol daun Rosella pada sinar UV 366 nm
- A: Sampel daun Rosella yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.
- B: Standar kuarsetin 0,1%

Pada gambar 5 menunjukkan bahwa terlihat adanya bercak pada plat silika gel yang sudah di semprot menggunakan larutan $AlCl_3$. Pada standar

kuarsetin jarak elusi lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol daun rosella.

Berdasarkan hasil yang telah diamati disinari tampak, sinar UV 254 mm dan sinar UV 366 . Dengan adanya bercak pada plat silika gel yang artinya memiliki senyawa flavanoid. Hasil uji KLT terhadap ekstrak etanol daun rosella dan standar kuarsetin dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil KLT

Sampel	Jarak elusi sampel (cm)	Sinar tampak	Sinar UV 254 (nm)	Sinar UV 366 (nm)	Nilai Rf	Menurut (Dahlia et al., 2012)
Ekstrak etanol daun Rosella	4,3 cm	Hijau tua	Hijau tua	Hijau	0,537	Hijau
Standar kuarsetin	4,5 cm	Kuning	Kuning	Kuning	0,562	Kuning

Pada tabel 8 dapat dilihat bahwa jarak elusi sampel ekstrak etanol daun rosella dengan nilai sebesar 4,3 cm sedangkan pada nilai Rf sebesar 0,537 dan standar kuarsetin dengan nilai jarak elusi sebesar 4,5 cm untuk nilai Rf sebesar 0,562. Setiap pengujian sinar UV warna yang dihasilkan sama dengan peneliti sebelumnya (Aprilia et al., 2015).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri dipersiapkan terlebih dahulu bahan dan alat yaitu dengan pembuatan media. Uji aktivitas antibakteri ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol terdiri dari dua yaitu positif yang menggunakan antibiotik Ampisilin 10 μ g dan kelompok kontrol negatif menggunakan akuades. Kelompok perlakuan larutan uji ekstrak etanol daun rosella pada konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.

Hasil pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan alat jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) dengan cara mengukur diameter zona hambat secara vertikal, horizontal, dan diagonal.

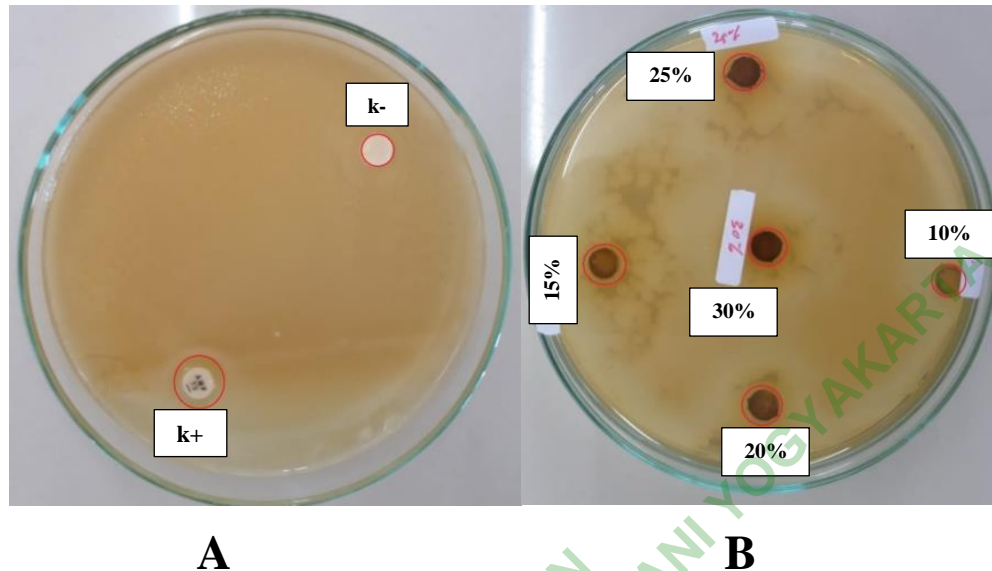
Rerata diameter zona hambat daun rosella terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Rerata Diameter Zona Hambat Daun Rosella Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*

Bakteri uji	Kelompok	Konsentrasi	Rerata \pm SD (mm)	Kekuatan daya hambat antibakteri
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ekstrak etanol daun Rosella	10 %	7,14 \pm 0,07	Sedang
		15 %	7,73 \pm 0,84	Sedang
		20 %	7,92 \pm 0,73	Sedang
		25 %	8,82 \pm 0,50	Sedang
		30 %	9,34 \pm 1,15	Sedang
	Kontrol positif (Ampisilin)	-	14,54 \pm 7,37	Kuat
	Kontrol negatif (Akuades)	-	0	Lemah
<i>Salmonella typhi</i>	Ekstrak etanol daun Rosella	10 %	7,17 \pm 0,80	Sedang
		15 %	7,48 \pm 0,56	Sedang
		20 %	8,03 \pm 1,25	Sedang
		25 %	8,86 \pm 1,52	Sedang
		30 %	8,97 \pm 1,57	Sedang
	Kontrol positif (Ampisilin)	-	23,91 \pm 1,87	Sangat kuat
	Kontrol negatif (Akuades)	-	0	Lemah

Pada tabel 9 dapat dilihat bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ekstrak etanol daun rosella pada konsentrasi 10% yang paling minimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan rata-rata 7,14 mm, Kemudian pada bakteri *Salmonella typhi* dengan menggunakan yang sama pada konsentrasi 10% yang paling optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan rata-rata 7,17 mm. Untuk kelompok kontrol positif diameter zona hambat lebih besar adalah pada bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 14,54 mm, *Salmonella typhi* dengan rata-rata sebesar 23,91 mm.

Kemudian hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun rosella kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada gambar 6.

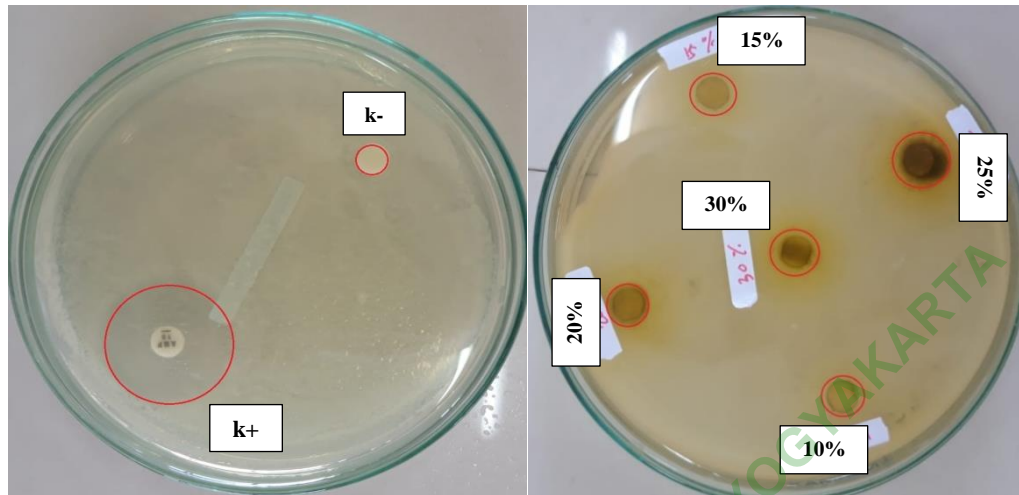


A **B**

Gambar 6. Kontrol Positif Antibiotik Ampisilin (A)
Serta Kontrol Negatif Akuades
Uji Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* (B)
Dengan Konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.

Pada gambar 6 untuk kelompok antibiotik ampisilin (A) terdapat adanya zona bening sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada ekstrak etanol daun rosella (B) yang paling minimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 10%. Dapat diketahui bahwa uji aktivitas hambatan ekstrak etanol daun rosella terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram kertas menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan terbentuknya daerah penghambatan berupa daerah zona bening di sekitar cakram uji dengan waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

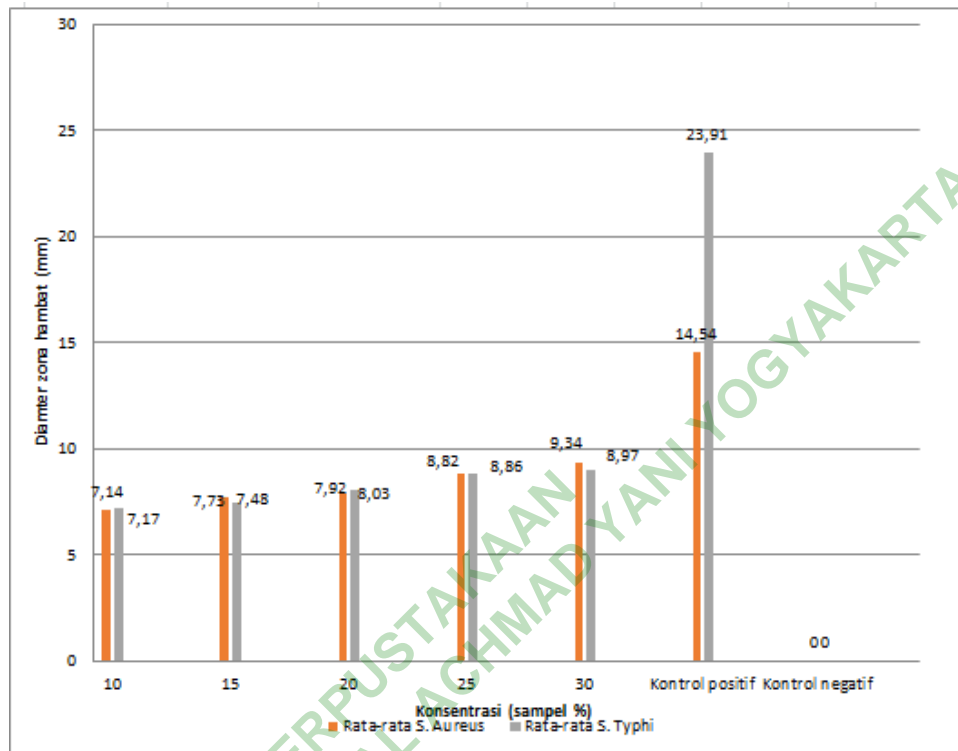
Sedangkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun rosella kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan dapat dilihat pada gambar 7.

**A****B**

Gambar 7. Kontrol Positif Antibiotik Ampisilin (A)
Serta Kontrol Negatif Akuades
Uji Aktivitas Antibakteri *Salmonella typhi* (B)
Dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.

Dapat dilihat pada gambar 7 dengan kelompok antibiotik ampisilin (A) terdapat ada nya zona bening sehingga dapat menghambat partumbuhan bakteri, sedangkan untuk ekstrak etanol daun rosella (B) yang paling minimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi 10%, Dapat diketahui bahwa uji aktivitas hambatan ekstrak etanol daun rosella dengan menggunakan metode difusi cakram kertas menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan terbentuknya daerah penghambatan berupa daerah zona bening di sekitar cakram uji dengan waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Penelitian ini dilakukan untuk mengukur rata-rata diameter zona hambat aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun rosella terhadap bakteri *Staphylococcus.aureus* dan *Salmonella typhi*. Dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Rata-Rata Diameter Zona Hambat Daun Rosella Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*

Dari gambar 8 hasil rata-rata diameter zona hambat secara keseluruhan dari ekstrak etanol daun rosella. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10%, konsentrasi hambat minimum adalah $(7,14 \pm 0,07)$ mm Sementara untuk bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi 10% data daerah penghambatan ekstrak etanol daun rosella secara keseluruhan, yang minimum adalah $(7,17 \pm 0,80)$ mm. Pada perlakuan kelompok kontrol positif bakteri *Staphylococcus aureus* dengan data rata-rata sebesar $(14,54 \pm 7,37)$ dengan kategori sedang, sedangkan pada bakteri *Salmonella typhi* sebesar $(23,91 \pm 1,87)$ menunjukkan kategori sangat kuat .

5. Analisis Data

Analisis data diameter zona hambat dilakukan secara statistik dengan Uji ANOVA Satu Jalur (*One-Way ANOVA*) untuk membandingkan variasi antar group menggunakan taraf signifikansi dengan nilai 95 % (α 0,05). Sebelum dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way ANOVA*, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 28. Berdasarkan hasil pengolahan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 28, uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol nilai Sig $>0,05$ yang berarti untuk pengujian terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Data yang diperoleh pada diameter zona hambat yang dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* dengan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 28, sebelum dilakukan pengujian *One-Way ANOVA*. Dilakukan terlebih dahulu uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* pada uji homogenitas ($p > 0,05$). Hasil data analisis yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil Analisis Data Menggunakan *One Way Anova* Pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Diameter zona hambat	Kelompok	Konsentrasi	Uji normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>)	Uji homogenitas	Uji <i>Kruskal Wallis</i>
<i>S. aureus</i>	Ektstrak etanol daun Rosella	10%	.000	.001	.024
		15%	.193		
		20%	.948		
		25%	.846		
		30%	.799		
	Kontrol positif (<i>Ampisilin</i>)	-	.005		

Keterangan:

H₀ : daun Rosella tidak dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*

H_a : daun Rosella dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*

Tabel 10 menunjukkan hasil yang diperoleh bahwa uji homogenitas diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan nilai Sig. 0,01 nilai tersebut tidak terdistribusi normal sehingga data tersebut tidak bisa dilanjutkan karena tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametik uji *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan hasil yang diperoleh dengan uji non parametik uji *Kruskal-Wallis* diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan nilai Sig. 0.24. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan atau H_a diterima dan H_0 ditolak, karena nilai yang diperoleh $>0,05$.

Sedangkan pada bakteri *Salmonella typhi*. Data yang diperoleh pada diameter zona hambat yang dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* dengan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 28. Dilakukan terlebih dahulu uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* pada uji homogenitas ($p > 0,05$). Hasil data analisis yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil Analisis Data Menggunakan *One Way Anova* Pada Bakteri *Salmonella typhi*

Diameter zona hambat	Kelompok	Konsentrasi	Uji normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>)	Uji homogenitas	Uji <i>Kruskal Wallis</i>
<i>Salmonella typhi</i>	Ektstrak etanol daun Rosella	10%	.808	.400	.076
		15%	.454		
		20%	.830		
		25%	.668		
		30%	.678		
	Kontrol positif (Ampisilin)	-	.390		

Keterangan:

H_0 : daun Rosella tidak dapat menghambat bakteri *Salmonella typhi*

H_a : daun Rosella dapat menghambat bakteri *Salmonella typhi*

Pada tabel 11 dapat dilihat bahwa Pengukuran uji homogenitas dan uji *One-Way* ANOVA dilakukan secara bersamaan. Diameter zona hambat terhadap bakteri *Salmonella typhi* Sig. 0,04 artinya data tersebut tidak terdistribusi normal. dan Sig 0,76 yang artinya diameter zona hambat terbentuk terhadap bakteri *Salmonella typhi* memiliki perbedaan aktivitas antibakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan atau H_a diterima dan H_0 ditolak, karena nilai yang diperoleh $>0,05$.

B. Pembahasan

Daun rosella adalah tanaman yang setiap bagiannya mengandung senyawa dan dapat dimanfaatkan sebagai obat, kandungan bahan aktif daun rosella antara lain sebagai aktivitas antibakteri, rasa nyeri, mengobati kaki pecah-pecah, luka bakar ringan, dan penyakit kulit seperti bisul. Senyawa yang berperan sebagai antibakteri di dalam daun rosella yaitu alkaloid, flavanoid, saponin, tanin dan polifenol (Samsuharto, 2008). Pada penelitian ini ekstrak etanol daun rosella mengandung senyawa tersebut.

1. Penyiapan sampel

Daun rosella diambil dari Krajan I, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majakdingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah 56553 yang terletak di ketinggian 265 mdpl. $7^{\circ} 36' 28'$ LS dan $110^{\circ} 12' 13'$ BT. Kemudian daun rosella dicuci dengan air yang mengalir dan dipindahkan ke dalam ranjang. Setelah itu pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C . Pengeringan dengan suhu tersebut dapat mengurangi kadar air pada daun rosella sampai batas dimana mikroorganisme dan enzim yang dapat menyebabkan pembusukan akan terhenti, dengan demikian bahan yang dikeringkan mempunyai waktu simpan yang lama. Kemudian, pengolahan daun rosella dijadikan serbuk menggunakan *grinder*. Bertujuan dibuat menjadi serbuk agar

memudahkan proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut dalam jaringan tumbuhan.

Ekstrak etanol daun rosella yang telah dijadikan serbuk untuk pembuatan ekstrak kental daun rosella menggunakan metode maserasi atau perendaman selama 3 hari dan remaserasi 1 hari . Maserasi yaitu cara mengekstraksi dengan merendam simplisia dalam pelarut pada suhu kamar, sehingga tidak terjadi kerusakan atau degradasi metabolit pada ekstrak (Agustina, dkk., 2017). Dilakukan remaserasi yaitu suatu proses perendaman kembali daun rosella dengan pelarut yang baru hasil ampas dari penyaringan direndam dengan pelarut. Serbuk daun rosella dimasukkan ke dalam sebuah toples kaca yang sebelumnya sudah dilapisi menggunakan lakban yang berwarna hitam dan disimpan ke tempat yang lebih gelap. Bertujuan disimpan di tempat yang gelap untuk menghindari reaksi yang dikatalisis serta mencegah terjadinya perubahan warna. Daun rosella direndam dengan pelarut etanol 70% , pemilihan pelarut etanol 70% sebagai ekstraksi dikarenakan adanya kemampuan yang lebih baik dalam menarik bahan aktif yang terdapat di dalam sampel dibandingkan dengan pelarut lainnya dan etanol memiliki sifat non toksik, serta mampu menarik senyawa yang lebih banyak pada simplisia (Baud et al., 2014).

2. Pengujian kontrol kualitas ekstrak etanol daun rosella

Setelah didapat ekstrak etanol daun rosella kental dilakukan pengamatan antara lain organoleptik, skrining fitokimia, pemisahan senyawa dengan metode KLT. Bertujuan untuk mengetahui dan memastikan bahwa daun rosella memiliki hasil yang sama pada penelitian sebelumnya.

a. Pengujian organoleptik

Ekstrak etanol daun rosella dilakukan pengamatan secara fisik dengan cara sederhana yaitu menggunakan indera manusia yang

diperoleh dalam pengamatan yaitu memiliki tekstur yang kental, berbau aromatik, berwarna kecoklatan, dan rasa yang asam.

b. Pengujian pada skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia yang meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, dan tanin. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi yang telah ditentukan. Hal yang mempengaruhi dalam proses ini yaitu pada saat pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Pelarut yang tidak sesuai memungkinkan senyawa aktif yang diinginkan tidak dapat tertarik secara baik dan sempurna (Agustina, dkk., 2017).

Pada senyawa alkaloid yang bersifat basa maka ditambahkan pelarut HCl 2 N berfungsi untuk menarik asam sehingga terbentuk garam dan akan terpisah dengan komponen-komponen lain, untuk hasil yang didapat adalah positif dimana menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki senyawa alkaloid (Sianipar & Siahaan, 2017). Senyawa pada flavanoid menggunakan pelarut etanol 70% karena bersifat polar sehingga akan terlarut pada pelarut polar, hasil yang didapat adalah positif dengan adanya warna merah menyalah akibat dari penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat (Alfaridz & Amalia, 2018). Pengujian pada senyawa saponin dilakukan penambahan air panas, bertujuan agar ekstrak lebih mudah larut pada saat penggojokan. Menunjukkan adanya kandungan saponin terbentuknya busa karena senyawa saponin memiliki glikosal yang bersifat polar dan non polar sehingga pada saat penggojokan akan terbentuk misel. Struktur misel yaitu gugus polar yang menghadap ke luar, sedangkan non polar menghadap ke dalam (Santosa et al., 2018). Pengujian senyawa tanin dengan penambahan FeCl_3 yang akan

bereaksi dengan gugus hidrosil sehingga terbentuk warna hitam kehijauan yang artinya tanin terkondensasi (Hidjrawan Yusi, 2018).

c. Pengujian pemisahan senyawa menggunakan metode KLT

Pemisahan dengan menggunakan metode KLT bertujuan untuk mengetahui nilai atau ukuran yang mana didapat berdasarkan posisi noda setiap zat terlarut pada plat kromatografi lapis tipis. Prinsip metode KLT adalah pemisahan komponen kimia berdasarkan fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) yang digunakan. Standar yang digunakan yaitu kuarsetin. Kuarsetin merupakan flavonol yang dapat ditemukan di dalam buah, sayur, dan daun. Flavonol adalah golongan dari flavanoid. Identifikasi pemisahan senyawa dianalisis dengan cara menghitung nilai R_f . Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform:metanol:asam asetat (14:2:1) karena untuk fase gerak ini dapat menghasilkan bercak pada ekstrak etanol daun rosella dan standar kuarsetin tidak terjadi *tailing*. Berdasarkan jarak elusi sampel dan nilai R_f diperoleh bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki nilai kesamaan pada standar kuarsetin, yang artinya bahwa daun rosella memiliki karakteristik yang sama pada standar kuarsetin.

3. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode Kirby-Bauer yaitu dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri pada media Mueller-Hinton Agar yang sudah memadat kemudian suspensi bakteri diratakan menggunakan batang L. Menurut peneliti sebelumnya Utomo et al., (2018) MHA digunakan karena mengandung nutrisi yang sesuai untuk kultur bakteri. Selain itu MHA bersifat netral, dan tidak mempengaruhi prosedur uji antibakteri. Ketebalan media MHA dalam cawan petri juga diseragamkan dengan cara menyamakan volume yang digunakan. Selanjutnya *disk* yang direndam terlebih dahulu kurang lebih lima menit, bertujuan agar zat yang ada diekstrak melekat pada *disk* selanjutnya

diletakkan di atas media. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun rosella dengan variasi konsentrasi yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%. Adapun sebagai pembanding yang digunakan yaitu kontrol positif (Ampisilin) dan kontrol negatif (akuades). Penelitian Putri et al., (2019) melaporkan bahwa semakin kecil konsentrasi maka akan semakin rendah zona hambat yang ditemukan. Tujuan dari pembuatan seri konsentrasi ini adalah untuk melihat perbedaan dari zona hambat yang dihasilkan oleh jenis konsentrasi yang berbeda.

Sedangkan untuk kontrol positif (ampisilin) menunjukkan bahwa terdapat zona bening pada cawan petri dan hasil yang diperoleh lebih baik dibandingkan ekstrak etanol daun rosella (Radji, 2011). Pemilihan antibiotik Ampisilin karena mampu menghambat sintesis dinding sel mikroba, menghambat enzim transeptidase, menyebabkan tidak terjadinya biosintesis sel dan merupakan antibiotik berspektrum luas yang efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Akbar & Budiarti, 2016). Pada kontrol negatif menggunakan akuades untuk menentukan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan karena pelarut, melainkan dari senyawa zat aktif yang terkandung pada sampel.

Zona bening/zona hambat yang sudah terbentuk dapat diukur dengan menggunakan alat jangka sorong dengan tiga kali pengukuran dari sisi yang berbeda yaitu horizontal, vertikal, dan diagonal. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* penelitian ini sesuai yang dilakukan oleh Samsuharto (2008), melaporkan bahwa terdapat zona hambat yang terbentuk pada ekstrak etanol daun rosella pada pelarut etanol 70 %

memberikan luas daerah hambatan 8,33 mm (50 %); 11 mm (75 %); 16 mm (100 %).

Selain itu juga ekstrak etanol daun rosella mengandung senyawa saponin, flavanoid, dan tanin yang memiliki efek sebagai antibakteri. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Putri et al., (2019), dan Samsuharto (2008), bahwa flavanoid, saponin, dan tanin memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa flavanoid sebagai antibakteri yang dapat menyebabkan rusaknya permeabilitas dinding sel, lisosom dan mitokondria (Alfaridz & Amalia, 2018). Senyawa pada saponin bekerja menurunkan tegangan permukaan dimana mengakibatkan senyawa intraseluler menjadi keluar dan terjadinya kebocoran sel (Santosa et al., 2018). Mekanisme kerja tanin adalah kemampuannya untuk berkontraksi sel, mengakibatkan kerusakan membran dan gangguan permeabilitas sel yang mencegah penetrasi nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri, yang menyebabkan kematian pada sel (Hidjrawan Yusi, 2018).

Berdasarkan hasil penelitian bahwa nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu konsentrasi minimal zat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam dan tidak tumbuh koloni bakteri yang diketahui dengan cara mengamati koloni bakteri yang tumbuh (Lolongan et al., 2016).

Pada penelitian Lolongan et al., (2016), menunjukkan bahwa pada ekstrak daun pacar air terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutan*. Dengan konsentrasi 3,125% telah terjadi penurunan nilai absorbansi, kemudian pada konsentrasi 1,56% terjadi kenaikan nilai absorbansi hingga konsentrasi paling akhir 0,39%. Pada konsentrasi 3,125% terjadi penurunan dan diikuti konsentrasi 6,25%-100% terjadi penurunan, sehingga konsentrasi 3,125% ditetapkan sebagai kadar hambat minimum

Sedangkan pada penelitian ini yang menggunakan ekstrak daun rosella dengan konsentrasi yang paling minimum dalam menghambat

pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yakni konsentrasi 10% dengan diameter zona hambat masing-masing 7,14 mm dan 7,17 mm. Kontrol positif Ampisilin terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* masing-masing 14,5 mm dan 23,86 mm. pada konsentrasi 10% ini termasuk kategori sedang untuk sampel ekstrak etanol daun rosella. Pada kontrol positif termasuk kategori sangat kuat (Putri et al., 2019).

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Salmonella typhi*) pada konsentrasi ekstrak memiliki sifat dan karakteristik yang berbeda dalam merespon bahan antibakteri. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri beberapa lapisan peptidoglikan yaitu membentuk struktur yang tebal dan kaku serta dengan mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan pada dinding sel bakteri Gram negatif hanya terdiri dari satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan. Dinding sel pada bakteri Gram negatif hanya mengandung lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat dikarenakan hanya memiliki sejumlah kecil peptidoglikan, oleh karena itu dinding sel bakteri gram negatif lebih rentan terhadap getaran fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya (Kumakauw et al., 2020). Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun rosella lebih kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dari pada pertumbuhan bakteri Gram negatif. Senyawa flavanoid, saponin dan tanin diketahui bersifat polar sehingga senyawa tersebut akan mudah menembus lapisan peptidoglikan pada lapisan lipid. Hal ini dikarenakan zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan dengan bakteri *Salmonella typhi* (Kumakauw et al., 2020).

Untuk mendukung hasil penelitian ini maka dilakukan uji analisis *One Way ANOVA* tujuan dilakukan analisis adalah untuk membedakan rata-rata antar kelompok dari suatu percobaan yang memiliki sampel lebih dari 2 kelompok. Sebelum dilakukan uji *One-Way ANOVA*, harus melakukan uji normalitas dan homogen. Uji normalitas dilakukan dengan cara *Shapiro Wilk*, sedangkan pada uji homogenitas dilakukan secara bersamaan dengan *One-Way ANOVA*. Hasil data dikatakan normal apabila memiliki nilai yang signifikan $>0,05$. Pada penelitian ini nilai normalitas zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* menunjukkan nilai $>0,05$, sehingga data tersebut dapat dikatakan normal.

Hasil data yang dikatakan homogen yaitu memiliki nilai yang signifikan $>0,05$. Pada penelitian ini diperoleh nilai homogen yang diperoleh pada bakteri *Staphylococcus aureus* Sig. 0,01 dan bakteri *Salmonella typhi* Sig. 0,04 yang artinya homogen. Kemudian dilakukan uji *One-Way ANOVA*, apabila nilai yang diperoleh $<0,05$ maka terdapat perbedaan (H_0) sedangkan pada nilai yang diterima (H_a), jika nilai yang diperoleh $>0,05$ maka tidak ada perbedaan atau H_0 diterima dan H_a ditolak. Pada penelitian hasil uji *One-Way ANOVA* memiliki nilai signifikan $>0,05$ yang artinya terdapat perbedaan antar konsentrasi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.