

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil**

##### **1. Determinasi tanaman rosella ( *Hibiscus sabdariffa* L )**

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan. Berdasarkan surat keterangan nomor 16/1/Lab.Bio/B/IV/2022 dari kepala Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan menunjukkan bahwa hasil determinasi tersebut menunjukkan tanaman tersebut adalah *Hibiscus sabdariffa* L. Daun rosella dikeringkan dengan oven pada suhu 50<sup>0</sup> C di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.

##### **2. Persiapan sampel**

###### **a. Pengambilan sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa daun rosella yang segar, tidak rusak, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, diambil dari nomor urut 2 sampai 5 dari atas. Daun rosella diambil dari Krajan 1, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah, terletak di ketinggian 265 pl 7<sup>0</sup> 36' 28'' LS dan 110<sup>0</sup> 12' 13'' BT . Proses Panen dilakukan pada pagi hari, karena untuk menghindari kerusakan senyawa yang terkandung dalam daun akibat terkena cahaya matahari, pada pagi hari daun rosella masih segar.

###### **b. Pengolahan simplisia**

Sebanyak 4 kg daun rosella yang telah dibersihkan dengan air mengalir kemudian ditiriskan, tujuan dicuci menggunakan air mengalir agar kotoran dan pestisida tidak menempel kembali ke simplisia. Setelah itu, daun rosella dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup> C. Menurut Depkes RI (1995) dalam penelitian Minda Warnis (2020) pada umumnya suhu untuk mengeringkan bahan simplisia berada pada kisaran 30<sup>0</sup>-90<sup>0</sup> C, dalam penelitian tersebut membuktikan

bahwa proses pengeringan pada suhu 50<sup>0</sup> C dapat menghasilkan simplisia yang memenuhi kriteria standar mutu yaitu kadar air akhir dibawah 10%. Tujuan pengeringan menggunakan oven karena untuk mengurangi kontaminasi jamur akibat suhu yang kurang stabil. Daun rosella yang telah kering sebanyak 1800 gram dihaluskan dengan menggunakan grinder, dan dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan 40 mesh, serbuk yang diperoleh sebanyak 500 gram.

c. Pembuatan ekstrak daun rosella ( *Hibiscus sabdariffa* L )

Metode ekstraksi simplisia daun rosella dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, ekstraksi dilakukan selama 3 hari dan dilakukan remaserasi selama 1 hari, selama proses maserasi dilakukan pengadukan setiap 12 jam sekali. Serbuk daun rosella sebanyak 500 gram direndam dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml atau dengan perbandingan 1:10 (b/v) dalam toples kaca yang telah ditutup dengan lakban, agar terhindar dari cahaya dan disimpan pada ruangan gelap. Pada hari ketiga, penyaringan dilakukan dengan menggunakan kain mori, sehingga diperoleh filtrat 1 dan residu 1. Filtrat 1 ditampung dalam wadah kaca, sedangkan residu 1 diremaserasi selama 1 hari untuk menarik kembali zat yang tertinggal selama maserasi utama. Hasil remaserasi disaring menggunakan kain mori untuk mendapatkan filtrat 2, filtrat 1 dan 2 campurkan menjadi satu dan kemudian dipekatkan. Pemekatan filtrat dilakukan dengan penguapan menggunakan alat-alat yaitu wajan dan kompor listrik, selama pemekatan dilakukan pengadukan menggunakan spatula kayu. Hasil ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 96,83 gram. Selanjutnya dihitung nilai rendemen dari ekstrak etanol daun rosella untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang didapatkan pada saat proses maserasi. Hasil perhitungan rendemen yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil perhitungan rendemen**

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

Dilihat dari tabel 3, ekstrak etanol daun rosella yang berasal dari mempunyai hasil rendemen sebesar 19,366%. Hasil tersebut telah memenuhi persyaratan, yaitu rendemen tidak kurang dari 10%.

### 3. Kontrol kualitas ekstrak etanol daun rosella

#### a. Uji organoleptik

Tujuan dilakukan uji organoleptik untuk mengetahui bahwa daun rosella memiliki hasil yang sama dengan peneliti sebelumnya. Uji organoleptik dilakukan dengan mengamati berupa warna, tekstur serta bau sediaan secara visual. Hasil dari uji organoleptik dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun rosella**

	Pengamatan	Ekstrak etanol daun rosella	Hasil positif (Dahlia et al., 2012)
Organoleptik	Warna	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman
	Tekstur	Kental	Kental
	Bau	Khas	Khas

Tabel 4 menunjukkan hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun rosella menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella berwarna coklat kehitaman, bertekstur kental dan berbau khas yang mana hasil tersebut sesuai dengan penelitian terdahulu.

#### b. Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui zat metabolit sekunder yang tersari dari ekstrak etanol daun rosella, dengan tujuan agar senyawa metabolit sekunder benar-benar memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji fitokimia yang dilakukan dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun rosella**

Uji fitokimia	Hasil yang diperoleh	Hasil positif menurut (A'yun & Laily, 2015)	Keterangan
Alkaloid : Pereaksi Mayer	Terbentuk endapan putih	Terbentuk endapan putih	Positif
Perekasi Wagner	Terbentuk endapan merah kecoklatan	Terbentuk endapan merah kecoklatan	Positif
Pereaksi Dragendroff	Terbentuk endapan jingga	Terbentuk endapan jingga	Positif
Flavonoid	Terbentuk endapan merah tua atau hitam kemerahan	Terbentuk endapan merah tua atau hitam kemerahan	positif
Saponin	Terbentuk buih yang stabil	Terbentuk buih yang stabil	Positif
Tanin	Terbentuk warna biru tua atau hitam	Terbentuk warna biru tua atau hitam	Positif

Tabel 5 menunjukkan hasil uji fitokimia yang dilakukan pada ekstrak etanol daun rosella menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

c. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji kualitatif senyawa golongan flavonoid ekstrak etanol daun rosella dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang berada di dalam ekstrak tersebut yang berperan sebagai antibakteri. Selanjutnya dilakukan optimasi fase gerak terlebih dahulu sebelum dilakukan uji KLT, yang bertujuan untuk menentukan fase gerak yang paling optimum digunakan untuk menganalisis kandungan zat aktif pada ekstrak. Berdasarkan hasil optimasi, fase gerak yang dapat mendeteksi kandungan flavonoid pada ekstrak daun rosella dan kuersetin adalah kloroform:metanol:asam asetat dengan perbandingan 14:2:1, karena pada volume tersebut dapat menghasilkan bercak bulat yang tidak tailing. Uji KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF254, fase diam plat silika yang berukuran 10 x 4 cm

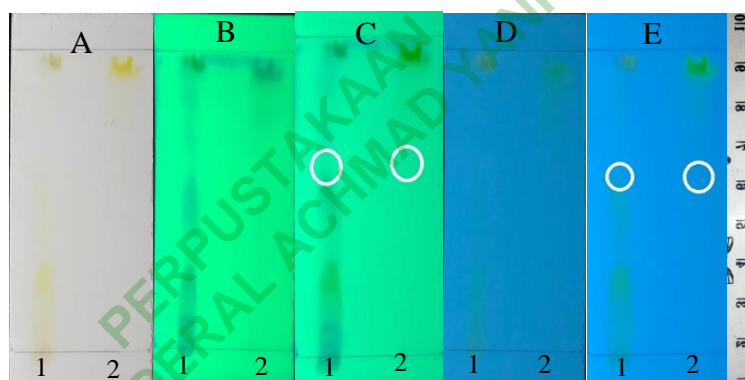
diberi garis atas dan bawah masing-masih 1 cm dilakukan aktivasi terlebih dahulu dengan cara dipanaskan di dalam oven dengan suhu 110<sup>0</sup> C selama 30 menit, yang bertujuan untuk menguapkan air yang ada pada plat sehingga daya serapnya dapat menjadi maksimal. Fase gerak dilakukan penjenjuran terlebih dahulu untuk menyesuaikan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan untuk menghasilkan pemisahan yang optimal (Dewi et al., 2018). Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 5% dan konsentrasi kuersetin adalah 0,1%. Hasil optimasi dapat dilihat pada tabel 6.

**Tabel 6. Optimasi fase gerak**

No	Fase gerak	Perbandingan	Hasil
1.	toluene:aseton:asam format	4:4:2	Fase gerak tidak jenuh Penyelesaian : volume nya dinaikan dengan perbandingan 6:6:3
2.	Toluene:aseton:asam format	6:6:3	Fase gerak lama jenuh dan konsentrasi sampel 10% dengan penotolan 3 kali dan standar kuersetin 0,1% dengan penotolan 3 kali terjadi tailing Penyelesaian : fase gerak dinaikan dengan perbandingan 8:8:4
3.	Toluene:aseton: asam format	8:8:4	Konsentrasi sampel 10% dengan penotolan 2 kali dan standar kuersetin 0,1% dengan penotolan 2 kali terjadi tailing Penyelesaian : perubahan fase gerak, menggunakan kloroform:metanol:asam asetat (9:1:0,5)
4.	Kloroform:metanol:asam asetat	9:1:0,5	Sampel konsentrasi 10% dengan penotolan 2 kali dan standar kuersetin 0,1% dengan penotolan 2 kali terjadi tailing Penyelesaian : fase gerak dinaikan dengan perbandingan (14:2:1)
5	Kloroform:metanol:asam asetat	14:2:1	Sampel konsentrasi 5% dengan penotolan 2 kali dan standar kuersetin 0,1% dengan penotolan 2 kali naik dan terlihat bercak

Pada tabel 6 optimasi fase gerak yang mana dari hasil optimasi tersebut fase gerak yang digunakan yaitu kloroform:metanol:asam asetat dengan perbandingan (14:2:1), dengan konsentrasi sampel 5% dan standar kuersetin 0,1% yang mana masing-masing dilakukan 2 kali penotolan.

Pengamatan bercak sebelum disemprot dilakukan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengamatan perubahan spot setelah disemprot menggunakan pereaksi  $AlCl_3$  pada sinar tampak. Standar kuersetin digunakan sebagai pembanding dari ekstrak etanol daun rosella. Hasil pemisahan senyawa dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil uji KLT ekstrak etanol daun rosella dan standar kuersetin

Keterangan :

- A: Visualisasi sinar tampak
- B: Deteksi UV 254 sebelum disemprot  $AlCl_3$
- C: Deteksi UV 254 setelah disemprot  $AlCl_3$
- D: Deteksi UV 366 sebelum disemprot  $AlCl_3$
- E: Deteksi UV 366 setelah disemprot  $AlCl_3$
- 1: Ekstrak etanol daun rosella
- 2: Standar kuersetin

Hasil pemisahan senyawa yang diperoleh pada ekstrak etanol daun rosella dan standar kuersetin terdapat bercak noda. Jarak elusi sampel 5,9 cm dan standar kuersetin memiliki jarak elusi 6,1 cm. selanjutnya dilakukan perhitungan  $R_f$  (faktor retardasi). Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji 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	5,9 cm	Hijau tua	Hijau tua	hijau	0,737	Hijau
Standar kuersetin	6,1 cm	Kuning	Kuning	Kuning	0,762	Kuning

Tabel 7 menunjukkan bahwa uji pemisahan senyawa dengan metode KLT nilai Rf pada ekstrak etanol daun rosella diperoleh 0,737 dengan jarak elusi 5,9 cm, sedangkan pada standar kuersetin nilai Rf yang diperoleh 0,762 dengan jarak elusi 6,1 cm.

#### 4. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran dengan 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok kontrol yaitu kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol dengan konsentrasi 20% ; 40%; 60%; 80% ; 100% dan kontrol negatif menggunakan akuades. Kelompok perlakuan yaitu ekstrak etanol daun rosella dengan konsentrasi 20% ; 40% ; 60% ; 80% ; 100%. Pembuatan sumuran dilakukan dengan membuat lobang pada media MHA dengan menggunakan ujung *cork borer* yang berukuran 6 mm yang telah disterilkan.

Hasil pengamatan dilakukan dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk atau zona bening yang berada disekitar sumuran, dengan menggunakan jangka sorong yang bersatuan milimeter (mm). Pengukuran dilakukan secara horizontal, vertikal dan diagonal. Hasil uji aktivitas rerata diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil rerata diameter zona hambat ekstrak daun rosella terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*

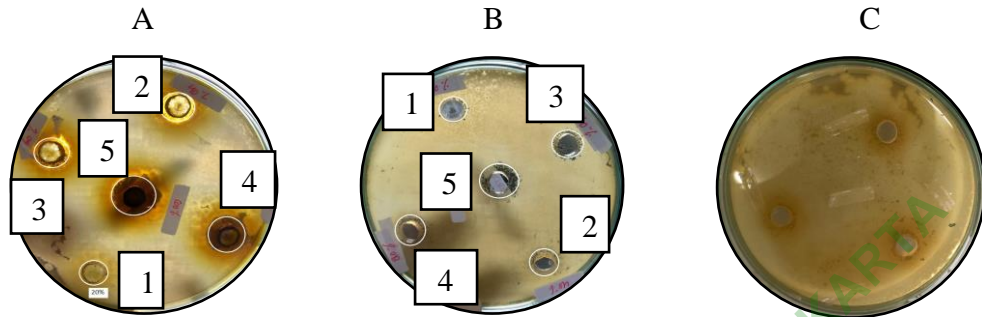
Bakteri uji	kelompok	Konsentrasi	Rerata $\pm$ SD (mm)	Kekuatan daya
<i>S. aureus</i>	Ekstrak etanol daun rosella	20%	8,23 $\pm$ 0,88	Sedang
		40%	10,45 $\pm$ 2,49	Sedang

Bakteri uji	kelompok	Konsentrasi	Rerata ± SD (mm)	Kekuatan daya
<i>S. typhi</i>		60%	10,48 ± 1,62	Sedang
		80%	13,20 ± 3,47	Kuat
		100%	15,43 ± 1,74	Kuat
	Kontrol positif (kloramfenikol)	20%	9,16 ± 2,06	Sedang
		40%	10,33 ± 1,51	Sedang
		60%	10,85 ± 1,25	Sedang
		80%	11,24 ± 0,46	Kuat
		100%	13,22 ± 3,11	Kuat
	Kontrol negatif (akuades)	-	0	Lemah
	Ekstrak etanol daun rosella	20%	9,63 ± 1,66	Sedang
		40%	10,67 ± 1,67	Sedang
		60%	10,77 ± 1,19	Sedang
		80%	12,78 ± 1,83	Kuat
		100%	13,97 ± 0,53	Kuat
		Kontrol positif (kloramfenikol)	20%	8,74 ± 0,86
40%			9,26 ± 1,25	Sedang
60%			10,90 ± 1,47	Sedang
80%			11,28 ± 0,86	Kuat
100%			12,03 ± 1,17	Kuat
Kontrol negatif (akuades)	-	0	Lemah	

Tabel 8 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki aktivitas antibakteri yang ditandai terdapatnya zona bening pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda. Diameter zona hambat paling rendah ditunjukkan oleh ekstrak etanol daun rosella dan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* pada konsentrasi 20%, sedangkan diameter zona hambat paling tinggi yaitu pada konsentrasi 100%.



Hasil uji berupa zona bening pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*, dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Uji aktivitas antibakteri *S.aureus*

Keterangan:

A: ekstrak etanol daun rosella terhadap bakteri *S. aureus*

B: kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus*

C: akuades terhadap bakteri *S. aureus*

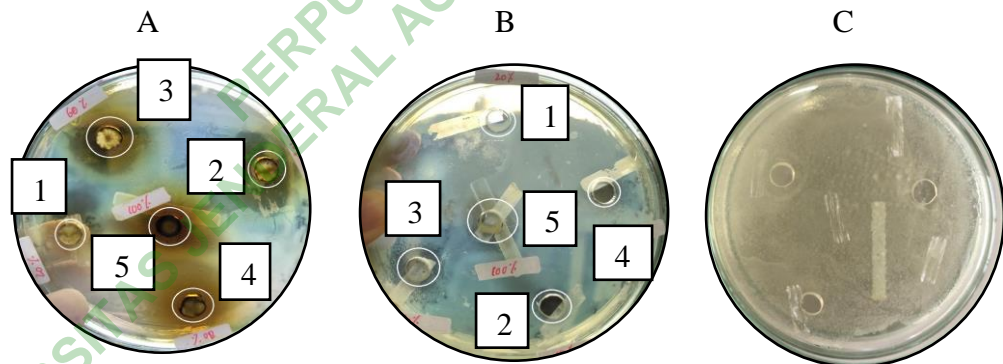
1: konsentrasi 20%

2: konsentrasi 40%

3: konsentrasi 60%

4: konsentrasi 80%

5: konsentrasi 100%



Gambar 7. Uji aktivitas antibakteri *S.typhi*

Keterangan:

A: ekstrak etanol daun rosella terhadap bakteri *S. typhi*

B: kloramfenikol terhadap bakteri *S. typhi*

C: akuades terhadap bakteri *S. typhi*

1: konsentrasi 20%

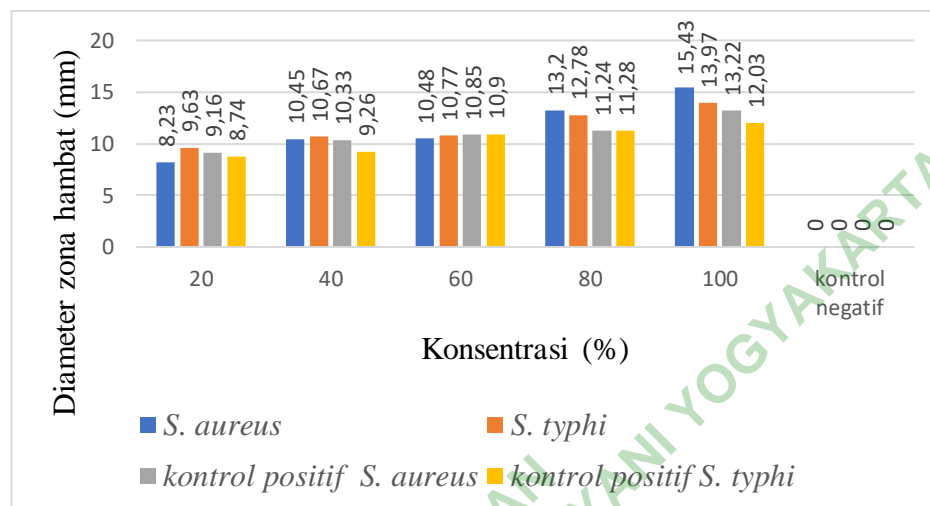
2: konsentrasi 40%

3: konsentrasi 60%

4: konsentrasi 80%

5: konsentrasi 100%

Dari hasil data rerata diameter zona hambat dalam bentuk grafik batang menunjukkan adanya zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan pada bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* dapat dilihat dari gambar 8.



Gambar 8. Diameter zona hambat bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*

Dari gambar 8 hasil rerata diameter zona hambat diatas menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun rosella dan kloramfenikol maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, sementara pada akuades tidak terdapat diameter zona hambat pada bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*. Hal tersebut sama seperti penelitian Samsuharto & Sari (2008) semakin tinggi konsentrasi yang dipakai maka semakin besar zona hambat yang terbentuk, karena semakin banyak zat aktif yang terkandung pada ekstrak.

## 5. Analisis data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa diameter zona hambat dianalisis dengan uji *One-Way* ANOVA menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 28. Sebelum dilakukan uji *One-Way* ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas ( $p > 0,05$ ). Data analisis yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Hasil analisis statistik menggunakan SPSS versi 28**

Kelompok perlakuan	Konsent rasi (%)	Uji Normalitas ( <i>Shapiro-wilk</i> )		Uji homogenitas		<i>One-Way ANOVA</i>	
		<i>S.aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>
Ekstrak etanol daun rosella	20	.710	.455	.638	.626	.007	.006
	40	.857	.124				
	60	.416	.253				
	80	.005	.294				
	100	.688	.500				
K. positif (kloramfenikol )	20	.710	.455	.638	.626	.007	.006
	40	.857	.124				
	60	.416	.253				
	80	.005	.294				
	100	.688	.500				
K. negatif (akuades)	-	-	-				

Dari tabel 9, hasil yang diperoleh menunjukkan data terdistribusi normal dan memiliki variasi yang homogen dengan nilai yang didapat  $>0,05$ . Dari hasil uji *One-Way ANOVA* dari bakteri *S. aureus* mendapatkan nilai 0,007 dan bakteri *S. typhi* mendapatkan nilai 0,006. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan atau  $H_0$  diterima dan  $H_0$  ditolak, karena nilai yang diperoleh  $<0,05$

## B. Pembahasan

### 1. Persiapan sampel

Pada penelitian ini dilakukan pengujian antibakteri ekstrak etanol daun rosella (*Hisbiscus sabdariffa* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* dengan metode sumuran. Tahap penelitian dimulai dengan determinasi dan pengambilan sampel daun rosella yang segar, tidak rusak, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Hasil determinasi menunjukkan daun rosella masuk dalam *species Hisbiscus sabdariffa* L. Daun rosella diambil dari Krajan 1, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kec. Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah, terletak di ketinggian 265 pl 7<sup>0</sup> 36' 28'' LS dan 110<sup>0</sup> 12' 13'' BT. Kemudian, daun rosella dibersihkan dan dikeringkan hingga menjadi simplisia kering yang mudah diremas, simplisia kering dihaluskan dengan menggunakan grinder. Serbuk halus yang didapat kemudian diayak,

tujuan dibuat serbuk halus untuk mempermudah proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut dari dalam jaringan tumbuhan selama proses penyarian.

Proses penyarian untuk membuat ekstrak etanol daun rosella menggunakan metode maserasi. Proses maserasi adalah teknik ekstraksi yang sangat sederhana tanpa sistem pemanasan atau dikenal dengan ekstraksi dingin, sehingga dalam proses ini sampel dan pelarut tidak melalui proses pemanasan sehingga dapat digunakan pada senyawa yang tidak tahan panas (Badaring et al., 2020). Proses maserasi ini digunakan etanol 70% sebagai pelarut, menurut Snyder (1997) pada penelitian (Padmasari et al., 2013) pemilihan pelarut etanol 70% karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar, polar dan semi polar, harapannya menggunakan etanol 70% sebagai pelarut agar dapat menarik senyawa aktif yang terkandung dalam daun rosella. Filtrat hasil maserasi yang didapat kemudian dilakukan pengentalan, sehingga mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan sebanyak 96,83 gram, dengan nilai rendemen 19,366%. Menurut Nahor (2019) dalam penelitian (Rachmawaty et al., 2022) semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan dari suatu ekstraksi menandakan bahwa jumlah ekstrak yang dihasilkan juga semakin banyak. Semakin besarnya jumlah ekstrak yang dihasilkan menunjukkan bahwa semakin banyak zat-zat atau senyawa yang diperoleh, sehingga ekstrak tersebut baik untuk digunakan.

## **2. Kontrol kualitas ekstrak etanol daun rosella**

### **a) Uji organoleptik**

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat ekstrak etanol daun rosella secara fisik tekstur atau bentuk, warna dan bau. Berdasarkan data yang diperoleh ekstrak etanol daun rosella berwarna coklat kehitaman, tekstur kental dan berbau khas daun rosella.

### **b) Uji fitokimia**

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa yang ada pada ekstrak etanol daun rosella.

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak etanol daun rosella ke dalam 10 ml HCl sambil dipanaskan di atas *hotplate*. Setelah larut dibagi dalam 3 tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi dragendroff. Hasil yang didapat pada pereaksi dragendroff, yaitu positif adanya alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna jingga. Menurut sangi dkk (2014) dalam penelitian (Sulistyarini et al., 2019) jika suatu senyawa mengandung alkaloid, pengujian dengan pereaksi Dragendroff akan membentuk warna coklat orange atau jingga cepat, karena senyawa alkaloid tersebut akan berikatan dengan partikel tetraiodobismutat (III).

Pada tabung kedua ditambahkan pereaksi mayer, hasil yang didapat yaitu positif adanya alkaloid yang ditandai adanya endapan berwarna putih. Menurut Svehla (1990) dalam penelitian (Sulistyarini et al., 2019) senyawa alkaloid akan bekerja sama dengan partikel tetraiodomercurate (II) untuk membentuk senyawa kompleks dan mengendap. Hal ini dikarenakan partikel merkuri merupakan partikel logam berat yang dapat mengendapkan senyawa alkaloid basa.

Tabung ketiga ditambahkan pereaksi wagner, hasil yang diperoleh yaitu positif adanya alkaloid yang ditandai dengan adanya endapan berwarna merah kecoklatan. Dalam pembuatan reagen Wagner, iodin merespon dengan partikel  $I^-$  dari kalium iodida untuk membuat partikel  $I_3^-$  yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, partikel logam  $K^+$  akan membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan nitrogen pada alkaloid untuk membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Fungsi penambahan HCl dalam identifikasi alkaloid dimaksudkan untuk menarik kandungan alkaloid dalam ekstrak karena alkaloid bersifat basa, maka pada penambahan asam seperti HCl akan terbentuk garam, sehingga alkaloid akan terpisah dengan komponen-komponen lain dari sel tumbuhan yang ikut terekstrak dengan mendistribusikannya ke fase asam (Wullur et al., 2012)

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak etanol daun rosella dalam 5 ml etanol kemudian ditambahkan HCl dan 0,2 gram serbuk Mg. Menurut Sriwahyuni (2010) dalam penelitian (Ikalinus et al., 2015) flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol yang memiliki banyak gugus -OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini dengan mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang memiliki sifat polar, sehingga dapat terbentuk ikatan hidrogen. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella positif adanya kandungan flavonoid, karena terbentuk endapan hitam kemerahan. Digunakan etanol sebagai pelarut karena flavonoid bersifat polar sehingga akan mudah untuk larut. Tujuan penambahan logam Mg dan HCl untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga (Ergina, 2014).

Identifikasi saponin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak etanol daun rosella ke dalam air panas. Kemudian dikocok dengan kuat dan ditambahkan HCl. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella positif adanya kandungan saponin. Menurut Depkes (199) dalam penelitian (Sulistyarini et al., 2019) keberadaan saponin positif karena sampel yang diuji membentuk busa setinggi 1-10 cm, dengan selang waktu  $\pm 10$  menit. Menurut Harborne (1987) dalam penelitian (Sulistyarini et al., 2019) Penambahan HCl dapat membuat buih semakin stabil. Munculnya buih ini disebabkan karena senyawa saponin mengandung senyawa yang larut dalam air (*hidrofilik*) dan senyawa yang larut dalam pelarut nonpolar (*hidrofobik*) sebagai surfaktan yang dapat menurunkan tekanan permukaan.

Identifikasi tanin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak etanol daun rosella dalam 5 ml air panas. Kemudian ditambahkan FeCl<sub>3</sub> 1%. Dari hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella positif mengandung tanin, karena terbentuknya warna biru tua. Menurut Jones dan Kinghorn (2006); Robinson (1991) dalam penelitian (Sulistyarini et

al., 2019) tanin merupakan senyawa polar yang mana ketika ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  akan terjadi perubahan yang warna misalnya warna biru tua atau hijau kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa tanin.

c) Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Pemilihan metode KLT untuk pemisahan senyawa ekstrak daun rosella karena teknik analisis yang sederhana, hemat biaya, mudah dilakukan dan hanya dibutuhkan sedikit cuplikan sampel untuk analisisnya (Coskun, 2016). Prinsip kerja KLT yaitu adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Adsorpsi terjadi ketika larutan sampel ditotolkan ke fase diam menggunakan pipa kapiler, komponen-komponen dalam sampel akan teradsorpsi di dalam fase diam. Desorpsi adalah peristiwa ketika komponen yang teradsorpsi di fase diam didesak oleh fase gerak (eluen), terjadi persaingan antara eluen dan komponen untuk berikatan dengan fase diam. Elusi adalah peristiwa ketika komponen ikut terbawa oleh eluen (Husna & Mita, 2020). Kuersetin digunakan sebagai standar pebanding dari ekstrak etanol daun rosella. Kuersetin adalah flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Aminah et al., 2017).

Identifikasi pemisahan senyawa dianalisis dengan cara menghitung nilai  $R_f$ . Fase diam yang digunakan pada penelitian ini yaitu plat silika GF254 yang memiliki sifat relatif polar, mengandung silika dengan gipsum sebagai agen pengikat, dan indikator fluoresen yang dapat berfluoresensi (Husna & Mita, 2020). Plat silika GF254 yang berukuran 10 x 4 cm sebelum digunakan di oven terlebih dahulu pada suhu  $110^{\circ}$  selama 30 menit untuk meningkatkan daya serap plat dengan menghilangkan kandungan air yang terdapat dalam plat. Setelah dilakukan optimasi fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : metanol : asam asetat dengan perbandingan 14:2:1 (v/v), karena fase gerak tersebut menghasilkan kenaikan bercak pada ekstrak etanol daun rosella dan standar kersetin serta tidak tailing. Fase gerak yang digunakan adalah eluen semi-polar.

Selanjutnya, jika bagian sampel dapat larut dalam fase gerak dan tidak tertahan dalam fase diam, sehingga dapat diartikan senyawa pada sampel bersifat semi-polar.

Sebelum dilakukan pemisahan senyawa dari sampel ekstrak daun rosella, dilakukan penjenuhan terlebih dahulu. Penjenuhan dilakukan dengan memasukan kertas saring ke dalam fase gerak pada bejana, bejana ditutup menggunakan cawan petri. Penjenuhan dilakukan sampai kertas saring benar-benar basah. Tujuan dilakukan penjenuhan terlebih dahulu karena untuk mengoptimalkan proses pengembangan fase gerak, memperkecil penguapan pelarut dan menghasilkan bercak lebih bundar dan lebih baik. Pada saat dilakukannya penjenuhan sebaiknya bejana disimpan ditempat yang aman dan tidak mudah tergeser-geser sehingga dapat mencegah terjadinya ketidak jenuhan pelarut. Sampel dan kuersetin ditotolkan di atas plat kemudian dielusi. Setelah mencapai tanda batas, plat diangkat dan diangin-anginkan. Untuk memperjelas bercak pada plat, dilakukan penyemprotan dengan pereaksi  $AlCl_3$ .

Bercak pada plat kemudian dibaca dibawah sinar UV 254 dan 366 nm. Kemudian bercak yang terbentuk diukur dan dihitung nilai Rf nya. Nilai Rf pada ekstrak etanol daun rosella 0,737 dan nilai Rf standar kuersetin 0,762. Nilai Rf dan jarak elusi pada ekstrak etanol daun rosella yang diperoleh memiliki kemiripan terhadap nilai standar kuersetin, hal tersebut berarti ekstrak etanol daun rosella memiliki karakteristik yang mirip dengan kuersetin. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi nilai Rf meliputi sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, dan kejenuhan bejana KLT (Wulandari, 2011).

### **3. Uji aktivitas antibakteri**

Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol daun rosella terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media, peremajaan bakteri, pembuatan larutan *McFarland*, pembuatan suspensi bakteri, pembuatan larutan uji ekstrak etanol daun rosella dan pembuatan



larutan kloramfenikol sebagai kontrol positif. Larutan *McFarland* 0,5 terlebih dahulu dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm, tujuannya adalah untuk memastikan nilai absorbansi yang dibuat memiliki nilai absorbansi 0,08-0,1 (Sarosa et al., 2018). Nilai absorbansi standar *McFarland* 0,5 yang didapat pada penelitian yaitu 0,095, yang artinya sudah memenuhi syarat sebagai standar *McFarland*.

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri penelitian ini yaitu metode sumuran. Adapun alasan pemilihan metode tersebut lebih mudah dalam mengukur zona hambat yang terbentuk, karena bakteri beraktivitas tidak hanya dipermukaan atas media tetapi juga sampai ke bawah. Dalam penelitian ini terdiri dari 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan terdapat beberapa seri konsentrasi yaitu konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80% dan 100%. Kelompok kontrol positif menggunakan kloramfenikol dengan beberapa seri konsentrasi yaitu konsentrasi 20% ; 40% ; 60% ; 80% dan 100%, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades. Pemilihan kloramfenikol sebagai kontrol positif karena antibiotik kloramfenikol bersifat bakteristatik berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, sehingga dapat menghambat perlekatan asam amino pada bakteri yang menyebabkan pertumbuhan menjadi terhambat (Suciari et al., 2018).

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*. Penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh Samsuharto dan Sari (2008) dimana hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki aktivitas antibakteri dengan luas daerah hambatan rata-rata pada ekstrak etanol 70 % memberikan luas daerah hambatan 8,33 mm (50 %); 11 mm (75 %); 16 mm (100 %). Penelitian oleh Putri (2019), dimana pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rosella memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat pada pada konsentrasi 10% (12,4 mm); 20% ( 16,73 mm); 30% ( 21,86 mm). Pada kelompok perlakuan

ekstrak etanol daun rosella dan kelompok kontrol positif (kloramfenikol) pada konsentrasi 20% ; 40% dan 60% terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* dikategorikan memiliki kekuatan daya hambat sedang, sedangkan pada konsentrasi 80% dan 100% dikategorikan memiliki kekuatan daya hambat kuat. Semakin tinggi kadar konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi juga jumlah senyawa atau kandungan zat aktif yang terdapat pada setiap konsentrasi yang dapat menghambat bakteri, sehingga terbentuknya zona hambat yang sangat kuat (Haryati et al., 2017).

Menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2019) antibiotik kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* (gram positif) memiliki kriteria daya antibakteri dengan diameter zona hambat  $\leq 12$  mm dikategorikan resisten, 13-17 mm dikategorikan intermediet dan  $\geq 18$  mm dikategorikan sensitif, sedangkan terhadap bakteri *P. aeruginosa* (gram negatif) memiliki kriteria daya hambat antibakteri dengan diameter zona hambat  $\leq 12$  mm dikategorikan resisten, 13-19 mm dikategorikan intermediet dan  $\geq 20$  mm dikategorikan sensitif. Dari hasil penelitian kontrol positif kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 20% ; 40% ; 60% ; 80% dikategorikan resisten, sedangkan pada konsentrasi 100% dikategorikan intermediet (sedang). Untuk kontrol positif kloramfenikol terhadap bakteri *S. typhi* pada konsentrasi 20% ; 40% ; 60% ; 80% ; 100% dikategorikan resisten. Pada kontrol positif kloramfenikol dibuat seri konsentrasi, karena untuk melihat perbandingan antar konsentrasi dalam menghambat aktivitas bakteri. Pada penelitian ini kontrol positif kloramfenikol dibuat dalam konsentrasi 20mg/20ml sebagai larutan stok. Pada penelitian ini diameter zona hambat kelompok kontrol positif lebih kecil dari pada kelompok perlakuan. Hal tersebut dikarenakan pada pembuatan larutan serbuk kloramfenikol volume pelarut terlalu banyak, sehingga zat aktif yang larut terlalu cair. Kelompok kontrol negatif (akuades) tidak terdapat aktivitas antibakteri, karena tidak terbentuk zona hambat sehingga dikategorikan daya hambat lemah.

Diameter zona hambat bakteri *S. aureus* pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol memiliki nilai rerata paling besar pada konsentrasi 100%

yaitu 15,43 mm dan 13,22 mm. Pada kelompok kontrol konsentrasi 100% memiliki daya hambat yang setara dengan kelompok perlakuan konsentrasi 80%, sedangkan pada kelompok perlakuan konsentrasi 20% memiliki diameter lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol konsentrasi 20%. Diameter zona hambat bakteri *S. typhi* pada kelompok perlakuan konsentrasi 100% memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yaitu 13,97 mm dan 12,03 mm. Kelompok kontrol konsentrasi 100% memiliki diameter zona hambat setara dengan kelompok perlakuan konsentrasi 80%, sedangkan pada kelompok kontrol konsentrasi 20% memiliki diameter zona hambat lebih kecil dibanding kelompok perlakuan konsentrasi 20%.

Terdapat perbedaan antara rerata diameter zona hambat ekstrak etanol daun rosella terhadap bakteri bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*. Hal ini diduga karena terdapat perbedaan jenis bakteri uji. Bakteri Gram positif dan Gram negatif memiliki perbedaan struktur dinding sel. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang tebal (15-80 nm) berlapis tunggal, terdapat kandungan lipid yang rendah (1-4%), dan memiliki peptidoglikan sebagai lapisan tunggal serta terdapatnya asam teikoat, bakteri Gram positif tidak memiliki lipoprotein, lipopolisakarida. Sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang tipis (10-25 nm), berlapis tiga, memiliki lipopolisakarida, lipoprotein serta memiliki kandungan lipid yang tinggi (11-22%). Pada dinding sel bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan dalam lapisan kaku sebelah dalam dan tidak terdapat asam teikoat (Boleng, 2015).

Aktivitas antibakteri dapat dipengaruhi oleh sifat senyawa yang dimiliki antibakteri. Senyawa antibakteri bersifat polar dan non-polar, senyawa polar lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang dimiliki bakteri *S. aureus*, sedangkan senyawa non-polar mudah menembus lapisan lipid yang dimiliki bakteri *S. typhi*. Hal ini disebabkan karena *S. aureus* memiliki lapisan peptidoglikan bersifat polar dan *S. typhi* memiliki lapisan lipid yang bersifat non-polar. Ekstrak etanol daun rosella yang bersifat polar akan memiliki pengaruh besar terhadap zona hambat yang terbentuk pada bakteri *S. aureus* dibanding zona hambat pada bakteri *S. typhi*, karena memiliki lapisan

peptidoglikan yang bersifat polar. Berdasarkan hasil rerata pada bakteri *S. aureus* memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan hasil rerata pada bakteri *S. typhi*.

Menurut Jawet dkk (1996) dalam penelitian (Lestari et al., 2016) aktivitas antibakteri dapat dipengaruhi oleh 4 faktor, yaitu konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa metabolit, daya difusi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat. Ekstrak etanol daun rosella akan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara berdifusi ke media yang telah diberi bakteri uji. Tebal media dan diameter sumur (*well*) dapat mempengaruhi kecepatan senyawa metabolit untuk berdifusi. Selain itu, suspensi bakteri uji yang tidak merata pada media uji, sehingga ada bagian dari media MHA yang jumlah bakteri tumbuhnya tidak sama dengan bagian-bagian lainnya dan dapat juga suspensi yang disebarakan sudah merata, namun tidak tumbuh sempurna, sehingga menyebabkan terjadinya perbedaan efek antibakteri pada setiap uji (Suheri et al., 2015). Kekeruhan suspensi yang berbeda dengan standar *McFarland* juga dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri pada media. Hal tersebut dapat diatasi dengan dilakukan pengenceran terhadap *McFarland*.

Mekanisme kerja antibakteri senyawa alkaloid adalah dengan menghambat bagian penyusun peptidoglikan sel bakteri dengan tujuan agar lapisan dinding sel tidak tumbuh sempurna dan menyebabkan sel mati. Selain itu, alkaloid juga menghambat perkembangan pembentukan protein sehingga dapat menghambat pmetabolisme bakteri (Anggraini et al., 2019). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan memecah protein sehingga dapat merusak lapisan sel bakteri dan diikuti dengan masuknya senyawa intraseluler (Febrianasari, 2012). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan menurunkan tekanan permukaan, meningkatkan permeabilitas atau kebocoran sel dan membuat senyawa intraseluler keluar. Senyawa ini berdifusi melalui lapisan luar dan dinding sel yang halus, kemudian pada saat itu mengikat ke lapisan sitoplasma dan merusak sel. Tanin merupakan polimer dari senyawa fenol yang dapat menonaktifkan adhesi sel bakteri,

menonaktifkan enzim, dan memperlambat transport protein dilapisan dalam sel. Tanin juga dapat menyerang polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding selnya tidak terlalu bagus (Hridhya dan Kulandhaivel, 2017).

Dalam penelitian ini data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji *One-Way ANOVA* menggunakan program SPSS versi 28. Tujuan dilakukan analisis data *One-Way ANOVA* adalah untuk membedakan rata-rata antar kelompok dari suatu percobaan yang memiliki sampel lebih dari 2 kelompok. Sebelum dilakukan uji *One-Way ANOVA*, terlebih dahulu harus melakukan uji normalitas dan homogenitas, tujuannya untuk melihat bahwa data tersebut terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama (homogen). Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan *Shapiro Wilk*, sedangkan uji homogenitas dilakukan bersamaan dengan *One-Way ANOVA* pada program SPSS versi 28. Hasil data dikatakan normal apabila memiliki nilai signifikansi  $>0,05$ . Pada penelitian ini nilai normalitas bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* yang diperoleh lebih dari 0,05, sehingga data tersebut terdistribusi normal.

Hasil data dikatakan sama (homogen) apabila memiliki nilai signifikansi  $>0,05$ . Pada penelitian ini nilai homogenitas yang diperoleh pada bakteri *S. aureus* 0,638 dan bakteri *S. typhi* 0,626 yang artinya sama (homogen). Kemudian dilakukan uji *One-Way ANOVA*, jika nilai yang didapat  $< 0,05$  maka terdapat selisih atau  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diakui, jika nilai yang didapat  $> 0,05$ , tidak ada perbedaan atau  $H_0$  diakui dan  $H_a$  ditolak. Pada penelitian ini hasil uji *One-Way ANOVA* memiliki nilai signifikan  $<0,05$  yang artinya terdapat perbedaan antar konsentrasi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hal ini menyatakan bahwa penggunaan ekstrak daun rosella berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*.