

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian**

##### **1. Determinasi Tanaman Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)**

Sebelum rimpang kunyit hitam digunakan untuk penelitian, dilakukan determinasi tanaman terlebih dahulu yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan.. Hasil dari determinasi menyatakan bahwa simplisia yang digunakan adalah rimpang kunyit hitam dengan spesies *Curcuma caesia* Roxb.

##### **2. Penyiapan Sampel**

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

Rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang tidak kusut dan segar, berwarna hitam keunguan yang diambil dari desa Pino, RT.1/RW.8, Bendo, Pojok, Kecamatan Mojogedang, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah (-7,5589627, 111,0202437).

###### **b. Pengolahan sampel**

Rimpang kunyit hitam diambil sebanyak 1500 gram dan dijadikan serbuk yang diperoleh sebanyak 300 gram.

###### **c. Pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)**

Metode ekstraksi yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dengan cara maserasi. Proses maserasi dilakukan selama 6 hari. Adapun gambar proses maserasi dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 7. Proses maserasi**

Hasil dari ekstrak kental dilakukan penimbangan dan diperoleh berat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam 48,42 gram dan hasil perhitungan rendemen adalah 16,14 %. Adapun tabel hasil rendemen ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil rendemen ekstrak etanol rimpang kunyit hitam**

Berat simplisia	Berat ekstrak	Hasil rendemen Ekstrak	Syarat nilai rendemen menurut (Wardaningrum <i>et al.</i> , 2019)
300 gram	48,42 gram	16,14 %	>10%

### 3. Kontrol Kualitas Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

#### a. Hasil organoleptik

Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam yang diperoleh kemudian dilakukan pengamatan organoleptik. Hasil organoleptik dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil organoleptik**

Deskripsi	Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam	Referensi (Handayani <i>et al.</i> , 2023)
Bentuk	Kental	Semi Padat
Bau	Menyengat	Khas Kunyit
Warna	Hitam keunguan	Coklat Kehitaman
Rasa	Pahit	Pahit

b. Hasil Uji Fitokimia

Setelah uji organoleptik ekstrak etanol rimpang kunyit hitam kemudian dilakukan uji fitokimia. Uji fitokimia meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan triterpenoid. Hal tersebut sangat penting untuk mengetahui kandungan yang ada di dalam ekstrak rimpang kunyit hitam sebagai larutan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil Uji Fitokimia**

Uji	Pereaksi	Hasil yang diperoleh Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam	Hasil menurut (Kartini <i>et al.</i> , 2024)	Ket
Alkaloid	Mayer	Terbentuk endapan coklat kemerahan	Terbentuk endapan putih	-
	Wagner	Terbentuk endapan merah kecoklatan	Terbentuk endapan merah kecoklatan	+
	Dragendorff	Terbentuk endapan merah	Terbentuk endapan jingga / merah	+
Flavonoid	Serbuk Mg + HCL pekat	Terbentuk warna merah	Terbentuk warna merah, kuning, jingga	+
Saponin	HCL	Terdapat busa	Terdapat busa	+
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 10%	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman atau biru kehitaman	+
Steroid Triterpenoid	CH <sub>3</sub> COOH + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Terbentuk warna merah	Terbentuk warna hijau dan warna merah atau ungu	+

Keterangan : (+) = Mengandung Senyawa Uji

(-) = Tidak Mengandung Senyawa Uji

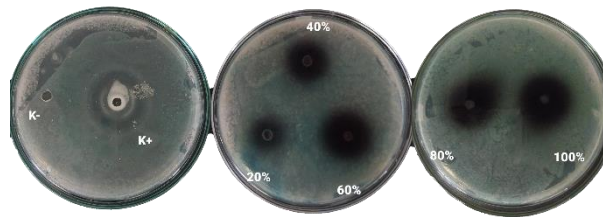
#### 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran. Hasil pengamatan dilakukan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Hasil yang diperoleh yaitu pada konsentrasi 20% dan 40% memiliki nilai kekuatan daya kuat, konsentrasi 60%,80%, dan 100% memiliki nilai kekuatan data sangat kuat, dan untuk kontrol positif (*clindamycin* 0,03%) memiliki kekuatan daya sangat kuat sedangkan kontrol negatif (DMSO 10%) memiliki kekuatan daya sangat lemah. Perolehan data rata-rata diameter zona hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Hasil rerata diameter zona hambat**

Kelompok	Konsentrasi (%)	Rerata $\pm$ SD (mm)	Kekuatan daya antibakteri
Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam	20	14,04 $\pm$ 0,29	Kuat
	40	16,82 $\pm$ 0,96	Kuat
	60	21,66 $\pm$ 0,39	Sangat kuat
	80	23,00 $\pm$ 0,48	Sangat kuat
	100	26,67 $\pm$ 1,26	Sangat kuat
Kontrol positif ( <i>Clindamycin</i> )	0,03	31,02 $\pm$ 1,42	Sangat kuat
Kontrol negatif (DMSO)	10	0	Lemah

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* kemudian dicatat baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol, seperti terlihat pada Gambar 8.



**Gambar 8. Uji aktivitas antibakteri pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* oleh ekstrak etanol rimpang kunyit hitam konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% serta kontrol positif *clindamycin* 0,03% dan DMSO 10%.**

## 5. Analisis Data

Analisis pengolahan data diameter zona hambat menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 27. Data uji normalitas yang diperoleh yaitu 20% (0,228); 40% (0,897); 60% (0,930); 80% (0,667); 100% (0,829) Sig > 0,05 maka data ini terdistribusi normal. Namun, uji homogenitas memperoleh hasil 0,001 Sig < 0,005 menandakan data yang diperoleh tidak homogen. Hasil pengolahan data menggunakan SPSS versi 27 dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7. Hasil pengolahan data menggunakan SPSS versi 27**

Kelompok	Konsentrasi (%)	Uji normalitas ( <i>Shapiro-Wilk</i> )	Uji homogenitas
Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam	20	.228 N	.001 TH
	40	.897 N	
	60	.930 N	
	80	.667 N	
	100	.829 N	
Kontrol positif ( <i>Clindamycin</i> )	0,03	.665 N	

Keterangan : N (data normal), TH (tidak normal).

Berdasarkan tabel hasil pengolahan data dapat diinterpretasikan pada Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*) adalah data diuji normalitasnya dengan metode *Shapiro-Wilk* pada setiap konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dan kontrol positif (*clindamycin*). Nilai signifikansi untuk semua konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, 100%) serta kontrol positif adalah  $> 0,05$  (0,228 - 0,930), yang menunjukkan bahwa data berdistribusi normal (ditandai dengan "N"). Untuk Uji Homogenitas adalah Uji homogenitas dilakukan untuk mengevaluasi kesamaan variansi data di seluruh kelompok. Hasil menunjukkan nilai signifikansi = 0,001, yang  $< 0,005$ , sehingga data dinyatakan tidak homogen (ditandai dengan "TH"). Sehingga dapat disimpulkan bahwa data dari semua konsentrasi dan kontrol positif memiliki distribusi normal berdasarkan uji *Shapiro-Wilk*, namun data tidak memenuhi asumsi homogenitas variansi berdasarkan hasil uji homogenitas (Sig.  $< 0,005$ ). Oleh karena itu, untuk analisis statistik selanjutnya, kemungkinan perlu menggunakan uji non-parametrik karena asumsi homogenitas tidak terpenuhi.

## **B. Pembahasan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia Roxb*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi sumuran. Pembuatan simplisia diawali dengan pengambilan sampel sebanyak 1500 gram (Amini *et al.*, 2019). Rimpang kunyit hitam kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan 3x24 jam dan remaserasi dilakukan selama 2x24 jam yang mana terdapat perubahan waktu pada remaserasi menjadi 3x24 jam dikarenakan terdapat kendala pada laboratorium. Metode maserasi dipilih dalam penelitian karena cara pengerjaan dan peralatannya yang sederhana, tidak menggunakan pemanasan sehingga dapat mencegah terjadinya penguraian senyawa yang terkandung dalam sampel akibat pengaruh suhu dan senyawa yang tidak tahan pemanasan (Wendersteyt *et al.*, 2021). Maserasi dilakukan menggunakan pelarut etanol 70%. Menurut Afifah *et al* (2023) etanol 70% digunakan sebagai pelarut karena etanol 70% adalah pelarut polar, dapat mengekstraksi atau memisahkan berbagai macam senyawa, dari yang polar hingga yang non polar. Sifat kepolaran antara pelarut dan zat aktif yang terkandung dalam ekstrak maka semakin banyak komponen zat aktif

yang dapat diekstrak dan meningkatnya rendemen ekstrak yang diperoleh (Guna *et al.*, 2020).

Proses pemisahan antara filtrat dan residu disaring menggunakan kain mori. Setelah diperoleh ekstrak etanol dari proses maserasi kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan kompor listrik dengan suhu 100°C untuk penguapan pelarut sehingga didapatkan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam. Berdasarkan hasil yang diperoleh berat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam adalah 48,42 gram dengan nilai rendemen, yaitu 16,14%. Perhitungan rendemen ekstrak dikatakan baik apabila nilai rendemen ekstrak yang diperoleh lebih dari 10% (Wardaningrum *et al.*, 2019).

Uji fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi secara kualitatif golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol rimpang kunyit hitam menggunakan beberapa penambahan pereaksi dan hasilnya dibandingkan dengan teori. Apabila hasil identifikasi senyawa yang diperoleh menunjukkan hasil positif atau sama dengan teori maka dalam ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dinyatakan memiliki kandungan senyawa tersebut. Uji fitokimia dari senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang positif mengandung senyawa uji. Senyawa alkaloid bekerja dengan menghambat biosintesis asam nukleat pada jamur, sehingga menyebabkan jamur tidak dapat berkembang (Adegoke dan Adebayo-tayo, 2009). Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan pelepasan senyawa intraseluler (Nuria *et al.*, 2009). Senyawa flavonoid bekerja dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri (Triyani *et al.*, 2021). Senyawa tanin bekerja dengan cara memasuki dinding bakteri yang telah lisis akibat senyawa saponin dan flavonoid, sehingga menyebabkan senyawa tanin mengkoagulasi protoplasma sel bakteri (Karlina *et al.*, 2013). Mekanisme kerja triterpenoid dengan cara bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri (Retnowati *dkk.*, 2011). Sehingga ekstrak rimpang kunyit hitam juga memiliki aktivitas antibakteri sebagaimana *clindamycin* menghambat sintesa protein bakteri

yang diperlukan oleh bakteri untuk memperbanyak diri sehingga terjadilah aktivitas antibakteri.

Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian daya hambat menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas antibakteri. Pemilihan metode difusi sumuran karena pada proses sumuran terjadi proses osmolaritas (proses pengukuran konsentrasi zat terlarut) terjadi secara menyeluruh dan lebih homogen dan lebih kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Media yang digunakan pada penelitian ini untuk uji zona hambat adalah media *Nutrient Agar* (NA) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA) karena mempunyai sifat yang netral, maka tidak menimbulkan pengaruh terhadap prosedur uji antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang paling efektif dalam menghambat bakteri. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi 1 x 24 jam untuk mengetahui apakah ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) memiliki sifat antibakteri yaitu bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan bakterisida (membunuh bakteri) (Radji, 2010).

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) menggunakan variasi konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Maksud dari adanya variasi konsentrasi adalah mengetahui perbedaan kemampuan hambat dari berbagai konsentrasi ekstrak. Hasil diameter zona hambat yang didapat selaras dengan teori yang menyebutkan bahwa daya antibakteri suatu zat akan semakin tinggi apabila konsentrasi suatu zat tersebut semakin tinggi, dikarenakan semakin tinggi konsentrasi berarti kandungan metabolit sekundernya semakin banyak (Pelczar dkk., 1988). Penggunaan DMSO 10% sebagai kontrol negatif yaitu pelarut ekstrak tidak memperlihatkan adanya aktivitas antibakteri, terlihat dari tidak terdapatnya daerah hambat di permukaan media. Ini membuktikan bahwa DMSO 10%, sebagai pelarut ekstrak tidak mempengaruhi pertumbuhan bakteri, yang berarti zona hambat hasil uji antibakteri hanya berasal dari ekstrak tanpa pengaruh dari pelarut DMSO. Selain kontrol negatif, ada pula kontrol positif sebagai pembanding yang menunjukkan adanya

zona hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Clindamycin* termasuk antibiotik golongan linkosamid dan merupakan turunan linkomisin dengan sedikit modifikasi pada molekulnya, yaitu adanya pergantian gugus hidroksi dengan atom klor pada molekul asal (Junaidi, 2019) Mekanismenya adalah melalui penghambatan sintesa protein bakteri dengan mengikat subunit ribosom 50s dan mencegah terbentuknya rantai peptida yang panjang. *Clindamycin* diindikasikan untuk melawan bakteri penyebab kulit, sehingga dapat digunakan untuk melawan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Daya antibakteri yang dilakukan dalam penelitian Ardiansyah (2005) bahwa diameter zona hambat  $\leq 5$  mm dikategorikan lemah, 6-10 mm dikategorikan sedang, 11-20 mm dikategorikan kuat, dan  $\geq 21$  mm dikategorikan sangat kuat.

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan masa inkubasi 1 x 24 jam terlihat memiliki zona bening pada area sumuran, hal ini ditandai dengan adanya aktivitas antibakteri yang terbentuk. Hasil pengukuran zona hambat yang diperoleh terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) variasi konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% masing masing variasi konsentrasi ekstrak memiliki diameter zona hambat dengan rata rata pada konsentrasi 20% sebesar 14,04 mm dan 40% sebesar 16,82 mm dengan kategori kuat. Pada konsentrasi 60% sebesar 21,66 mm; 80% sebesar 23,00 mm; dan 100% sebesar 26,67 mm dengan kategori zona hambat sangat kuat. Untuk kontrol positif menggunakan *clindamycin* diperoleh hasil zona hambat dengan rata rata 31,02 mm dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10% tidak menghasilkan zona hambat. Dari hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian Surjowardojo dkk (2015) bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin besar zona hambat yang dihasilkan, karena semakin banyak komponen zat aktif yang terkandung. Diameter zona hambat pada kontrol positif (*Clindamycin* 0,03%) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 10%, sedangkan pada DMSO 10% tidak terbentuk diameter zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Data perolehan zona hambat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam beberapa variasi konsentrasi beserta kontrol dilakukan analisa statistik menggunakan program SPSS *Statistics 27.0*. Normalitas data diuji dengan uji *Saphiro-Wilk*, setelahnya diperoleh 20% (0,228); 40% (0,897); 60% (0,930); 80% (0,667); 100% (0,829) Sig > 0,05 maka data dalam penelitian ini terdistribusi normal. Namun, uji homogenitas memperoleh hasil 0,001 Sig < 0,005 menandakan data yang diperoleh tidak homogen. Uji statistik dengan analisis varians masih memberikan hasil yang akurat walaupun data tidak terdistribusi homogen. Dengan demikian, uji statistik dapat dilakukan dengan ANOVA satu arah. Setelah pengujian, muncul nilai signifikansi yaitu <0,001 Sig < 0,005, menandakan H0 ditolak dan H1 diterima, berarti terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan dari nilai diameter daerah hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* antar kelompok perlakuan. Berikutnya, untuk mendapati kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan tersebut, uji dilanjutkan dengan uji *post-hoc*.

Uji *post-hoc* dilaksanakan menggunakan uji *Scheffe*. Uji *Scheffe* yaitu untuk membandingkan kelompok yang banyak anggota perkelompoknya berbeda (Ruseffendi, 1993). Pada uji antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif, seluruhnya (konsentrasi 20%-100%) memiliki nilai signifikansi < 0,05. Maka aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit hitam setara dengan kontrol positif.