

BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN

VI.1 Persiapan Bahan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi etanol 96% daun Murbei (*Morus cathayana*). Tanaman yang digunakan didapat dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan Bogor (Puslitbang Hutan). Determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan 2 bakteri uji yaitu bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* yang didapat dari Lab Mikrobiologi, Fakultas Farmasi ITB (Institut Teknologi Bandung) dan telah dilakukan uji penegasan bakteri. Hasil determinasi tanaman dan uji penegasan bakteri terlampir pada lampiran 1, 2 dan 3.

VI.2 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia yang dilakukan meliputi kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan dan parameter standar ekstrak yang dilakukan meliputi bobot jenis (BJ). Karakterisasi simplisia dan parameter standar ekstrak yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui mutu simplisia dan ekstrak yang digunakan dalam penelitian. Hasil dapat dilihat pada table VI.1

Penetapan kadar sari larut air dan etanol dapat menunjukkan jumlah senyawa yang dapat tersari dari kedua pelarut tersebut (air dan

etanol) pada suatu simplisia. Hasil pengujian menunjukkan kadar sari larut air sebesar 21,43% dan kadar sari larut etanol sebesar 8,03%. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa polar yang terlarut dalam air lebih besar dibandingkan dengan senyawa yang kurang polar yang dapat terlarut dalam etanol. Penetapan kadar abu total menunjukkan adanya kadungan mineral internal maupun eksternal dari tanaman segar hingga terbentuk simplisia. Kadar abu total menunjukkan mineral baik dari senyawa organik maupun anorganik secara internal atau eksternal sedangkan kadar abu tidak larut asam menunjukkan adanya pengotor eksternal seperti pengotor yang berasal dari pasir atau tanah. Hasil pengujian menunjukkan kadar abu total sebesar 10,70% dan kadar abu tidak larut asam sebesar 2,58%. Hal ini menunjukkan bahwa simplisia mengandung cukup banyak mineral dibandingkan pengotor eksternal.

Tabel VI.1
Hasil Karakterisasi Simplisia dan Parameter Standar Ekstrak
Etanol Daun Murbei (*Morus cathayana*)

Karakterisasi Simplisia/ Parameter Standar Ekstrak	Hasil (b/b)
Kadar Sari Larut Air	21,43 %
Kadar Sari Larut Etanol	8,03 %
Kadar Abu Total	10,70 %
Kadar Abu Tidak Larut Asam	2,58 %
Susut Pengeringan	6,36 %
Bobot Jenis (10% Ekstrak kental)	0,88

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui batas maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan. Kadar susut pengeringan yang didapat adalah 6,36%, yang menunjukkan bahwa senyawa yang hilang (menguap) pada saat

proses pengeringan sebanyak 6,36%. Penentuan BJ bertujuan untuk memberikan batasan besarnya massa per satuan volume. Hasil menunjukan nilai BJ 10% ekstrak kental adalah 0,88 b/b (Depkes RI, 1995)

VI.3 Persiapan Ekstrak

Untuk mendapatkan ekstrak daun Murbei dilakukan proses ekstraksi dengan cara maserasi. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi yaitu pengerjaannya yang mudah serta peralatan yang digunakan sederhana juga mencegah rusaknya senyawa termolabil. Ekstraksi bertujuan untuk melarutkan semua senyawa yang terkandung dalam sampel menggunakan pelarut yang sesuai. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi larutan zat aktif didalam sel dan diluar sel maka larutan terpekat didesak keluar. Proses ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan didalam dan diluar sel. (Depkes RI, 2000).

Tabel VI.2

Hasil Persentase Randemen Ekstrak dan Fraksi Etanol Daun Murbei (*Morus cathayana*)

Randemen	Hasil (%)
Ekstrak	11,10
Fraksi Air	52,35
Fraksi Etil Asetat	3,24
Fraksi N-Heksa	37,87

Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%, merupakan pelarut universal yang aman sehingga diharapkan dapat menarik senyawa polar, semipolar ataupun nonpolar. Ekstraksi dilakukan 3x24 jam dengan penggantian pelarut yang bertujuan untuk mencegah terjadinya kejenuhan pelarut. Ekstrak dipekatkan dengan rotary evaporator hingga menjadi ekstrak kental. Fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut air, etilasetat dan N-Heksa. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Didapat hasil randemen ekstrak, fraksi air, fraksi etilasetat dan fraksi n-heksa berturut turut adalah 11,10; 52,35; 3,24; 37,87%. Hasil randemen ekstrak dan fraksi daun murbei dapat dilihat pada table VI.2

VI.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia simplisia dan ekstrak bertujuan untuk memastikan kandungan senyawa yang terkandung dalam simplisia seperti metabolit sekunder dan memastikan bahwa proses ekstraksi dan pemekatan ekstrak hingga mendapatkan ekstrak kental tidak merusak senyawa yang terkandung dalam simplisia. Hasil skrining fitokimia simplisia dan ekstrak daun murbei menunjukkan hasil yang sama yaitu mengandung senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin, fenol steroid. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada table VI.3

Senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin, fenol dan steroid yang terkandung dalam ekstrak tersebut yang diyakini memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa tersebut memiliki mekanisme antibakteri yang berbeda beda. Senyawa golongan flavonoid bekerja dengan cara

menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membrane sel dan menghambat metabolisme energi. Senyawa golongan saponin dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Senyawa golongan Tanin bekerja dengan cara memprepitasi protein. Senyawa golongan fenol bekerja dengan cara mendenaturasi protein sel dan senyawa golongan steroid berhubungan dengan membrane lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang dapat menyebabkan kebocoran pada liposom (Rijayanti, 2014).

Tabel VI.3
Hasil Skrining Fitokimia Serbuk Simplisia dan Ekstrak Daun
Murbei (*Morus cathayana*)

Komponen Senyawa Uji	Hasil	
	Simplisia	Ekstrak
Flavonoid	+	+
Alkaloid	-	-
Saponin	+	+
Kuonon	-	-
Tanin	+	+
Fenol	+	+
Steroid	+	+
Triterpenoid	-	-

Ket : (+) = Terdeteksi senyawa uji; (-) = Tidak terdeteksi senyawa uji

VI.5 Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi daun Murbei (*Morus cathayana*)

Pengujian aktivitas antibakteri dan penentuan KHM ekstrak dan fraksi etanol daun murbei menggunakan Metode Difusi Cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etanol daun murbei (*Morus cathayana*) aktif terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. Hal ini dikarenakan ekstrak dan fraksi memiliki kandungan senyawa-

senyawa bioaktif sebagai agen antibakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

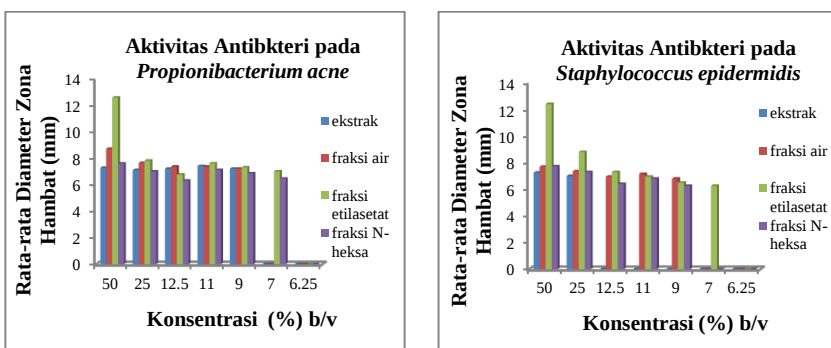
Pembuatan larutan uji pada penentuan KHM menggunakan pelarut API (Aqua Pro Injeksi) dan DMSO. Pembanding dalam pengujian ini menggunakan Klindamisin 0,5%. Klindamisin 0,5% memberikan aktivitas antibakteri yang baik pada kedua bakteri dengan rata-rata diameter zona hambat untuk *Propionibacterium acnes* adalah 15,40 mm dan *Staphylococcus epidermidis* adalah 24,8. Rata-rata diameter zona hambat klindamisin dapat dilihat pada table VI.4

Tabel VI.4
Rata-rata Diameter Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Etanol
Daun Murbei (*Morus cathayana*)

Bakteri	Perse n- tase (%)	Rata – rata diameter zona hambat (mm)				Klind a- misin 0,5%
		Ekstr ak	Frak si Air	Fraksi Etilaset at	Fraksi N- Heksa	
<i>Propionibacterium acnes</i>	50	7.27	8.7	12.57	7.6	15.40
	25	7.1	7.63	7.8	7	
	12.5	7.2	7.35	6.75	6.3	
	11	7.4	7.35	7.6	7.1	
	9	7.2*	7.2*	7.3	6.85	
	7	-	-	7*	6.45*	
	6.25	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	7.25	7.7	12.4	7.73	24.81
	25	7*	7.35	8.8	7.3	
	12.5	-	6.95	7.3	6.4	
	11	-	7.15	6.95	6.8	
	9	-	6.8*	6.5	6.25*	
	7	-	-	6.25*	-	
	6.25	-	-	-	-	

Ket : (-) tidak ada zona hambat; (*) KHM

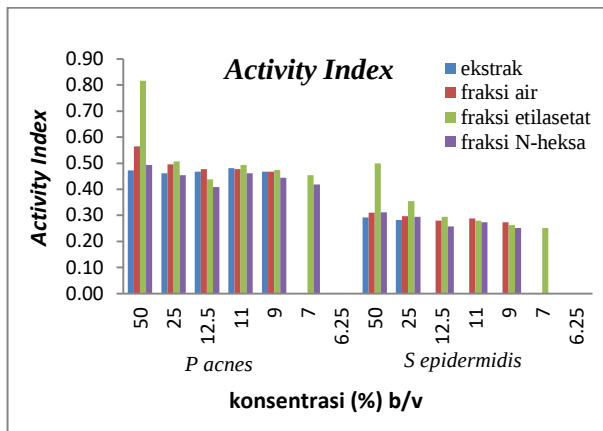
Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat dinyatakan dengan nilai KHM. KHM adalah konsentrasi terendah dari agen antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Nilai KHM senyawa antibakteri dari sampel berbeda-beda tergantung pada jenis bakteri dan senyawa antibakteri yang terkandung didalam sampelnya. Nilai KHM yang didapat dari bakteri *Propionibacterium acnes* adalah 9% untuk ekstrak dan fraksi air, 7% untuk fraksi etilasetat dan N-heksa. Nilai KHM yang didapat dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah 25% pada ekstrak, 9% pada fraksi air dan n-heksa dan 7% pada fraksi etilasetat.



Gambar VI.1
Grafik Aktivitas Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*

Secara keseluruhan, ekstrak dan fraksi etanol daun murbei aktif terhadap kedua bakteri uji dengan nilai KHM yang berbeda beda. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah senyawa aktif yang terkandung dari masing-masing sampel. Nilai KHM dan rata-rata zona hambat terhadap masing-masing bakteri dapat dilihat pada tabel VI.4 dan grafik uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada gambar VI.1

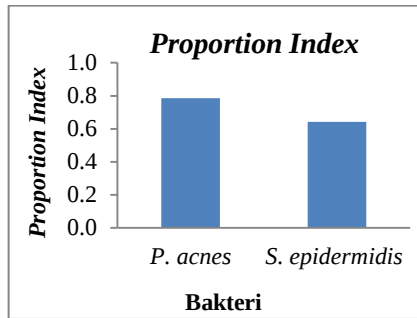
Diameter zona hambat yang didapat dari masing-masing sampel dibandingkan dengan diameter zona hambat standar. Tujuannya adalah untuk melihat nilai *activity index*. *Activity index* ini bertujuan untuk melihat sampel mana yang lebih aktif menghambat jika dibandingkan dengan sampel lainnya. Hasil menurut *activity index*, fraksi etilasetat memberikan nilai tertinggi yaitu 0,816 pada *P acnes* dan 0,500 pada *S epidermidis*. Untuk *propotion index*, bertujuan untuk melihat bakteri mana yang lebih sensitif jika dikontakkan dengan bahan uji. Hasil menurut *propotion index*, *propionibacterium acnes* memberikan nilai tertinggi yaitu 0,8. Dari kedua data tersebut, dipilihlah fraksi etilasetat dan bakteri *propionibacterium acnes* untuk digunakan pada penelitian lanjutan. Grafik *activity index* dan *propotion index* dapat dilihat pada gambar VI.2 dan VI.3



Gambar VI.2
Grafik Activity index

Penelitian lebih lanjut untuk mengkaji pengaruh pemberian bahan uji terhadap bakteri uji yaitu dengan uji morfologi dinding sel bakteri

dan kebocoran membran sel bakteri. Sesuai dengan hasil *activity index* dan *propotion index*, bahan uji yang digunakan adalah fraksi etilasetat dan bakteri uji yang digunakan adalah *propionibacterium acne*. Perhitungan *activiy index* dan *propotion index* dapat dilihat pada lampiran 12



Gambar VI.3
Grafik *Proportion index*

Uji kebocoran membrane sel bakteri menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian ini bertujuan untuk melihat adanya kebocoran asam nukleat dan protein dari membran sel bakteri. Pada pengujian ini, absorbansi yang terukur pada panjang gelombang 260nm menunjukkan adanya kebocoran asam nukleat dan jika terukur pada panjang gelombang 280nm menunjukkan adanya kebocoran protein. Menurut gilbert (1984) diacu dari (Miksusanti *et al.*, 2008) senyawa yang memberikan serapan pada panjang gelombang 260nm adalah RNA dan DNA, sedangkan pada panjang gelombang 280nm diidentifikasi sebagai protein.

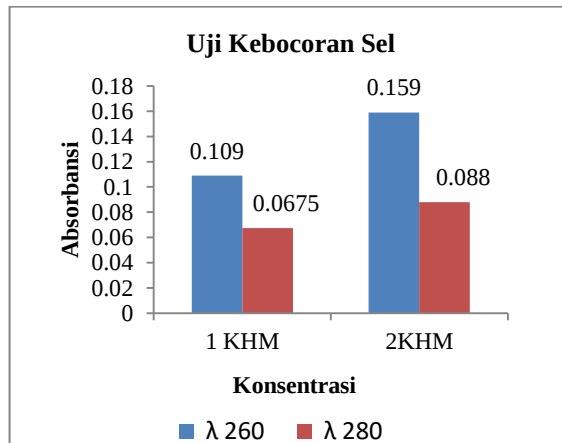
Hasil pengujian menunjukkan adanya absorbansi yang terukur pada kedua panjang gelombang. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat

asam nukleat dan protein yang dikeluarkan oleh sel bakteri. Keluarnya asam nukleat dan protein menandakan bahwa sel mengalami kebocoran akibat rusaknya membrane sel atau terjadinya gangguan permeabilitas membrane sel (Naufalin, 2014). Absorbansi yang terukur pada pengujian kebocoran sel dapat dilihat pada table VI.5. Pengukuran pada dua konsentrasi yang berbeda yaitu 7% dan 14% menunjukkan adanya perbedaan nilai absorbansi yang terukur, dimana semakin tinggi konsentrasi bahan uji yang diberikan, semakin tinggi pula absorbansinya. Peningkatan absorbansi ini menunjukkan adanya peningkatan senyawa (asam nukleat dan protein) yang dikeluarkan oleh membrane sel bakteri.

Absorbansi yang terukur pada panjang gelombang 260nm lebih tinggi jika dibandingkan dengan panjang gelombang 280nm. Peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 260nm juga lebih tinggi dibandingkan pada panjang gelombang 280nm, yang artinya lebih besar kebocoran asam nukleat (DNA dan RNA) yang merupakan materi genetiknya. Hal ini berpengaruh pada proses pembelahan selnya (Naufalin, 2014). Proses pembelahan sel bakteri yang terganggu dapat menyebabkan pula terganggunya pertumbuhan sel bakteri, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Diduga, fraksi etilasetat 14% bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri. Grafik hasil uji kebocoran sel dapat dilihat pada gambar VI.4 dan absorbansi yang terukur dapat dilihat pada lampiran 13

Uji morfologi dinding sel bakteri dilakukan di pusat penelitian dan pengembangan geologi kelautan Bandung menggunakan alat SEM. Pengujian ini bertujuan untuk melihat adanya perbedaan morfologi

dinding sel bakteri sebelum (sel bakteri normal) dan sesudah penambahan bahan uji. Hasil menunjukkan adanya perbedaan morfologi dinding sel bakteri sebelum dan sesudah penambahan bahan uji.



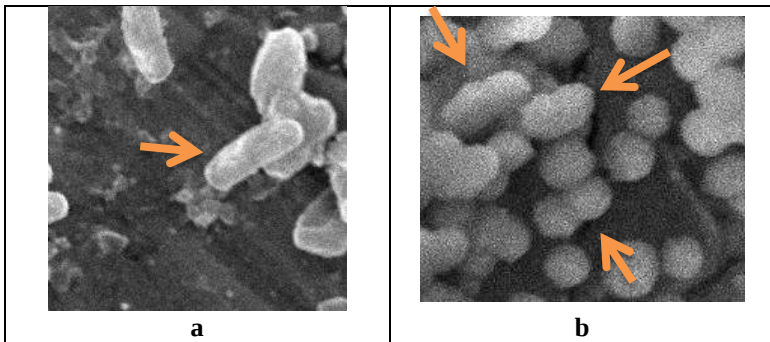
Ket : (1 x KHM) 7%, (2x KHM) 14%

Gambar VI.4
Grafik Hasil Uji Kebocoran Membran Sel Bakteri

Secara normal, *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri berbentuk basil (batang) dengan permukaan yang halus dan licin dapat dilihat pada gambar VI.5 (a), sedangkan setelah pemberian bahan uji dengan konsentrasi 2xKHM fraksi etilasetat menjadikan permukaan dinding sel bakteri berubah. Dapat dilihat pada gambar VI.5 (b) ditemukan sel yang membengkak dengan ujung yang agak membulat dan permukaan tidak beraturan dan sedikit ada kerutan .

Propionibacterium acnes merupakan bakteri gram positif, yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. Perubahan sel yang membengkak dengan ujung yang agak membulat dan permukaan

tidak beraturan disebabkan karena peptidoglikan menahan tekanan intraseluler yang tinggi (Naufalin, 2014). Hal ini didukung dengan adanya senyawa asam nukleat dan protein yang terlepas dari sel bakteri yang dapat diabsorpsi pada panjang gelombang 260nm dan 280nm.



Ket : (a) sel bakteri normal *Propionibacterium acnes* skala 10.000x,
(b) sel bakteri *Propionibacterium acnes* setelah penambahan fraksi etilasetat 14% skala 10.000x

Gambar VI.5
Hasil morfologi Dinding Sel Bakteri