

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Pemisahan Dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan dengan kromatografi kolom ekstrak total etilasetat daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl diperoleh 5 fraksi gabungan yaitu: F1, F2, F3, F4, F5, yang kemudian dilakukan uji aktivitas antimikrobia dan uji toksisitas dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

4.1.2. Uji Aktivitas Antimikrobia

4.1.2.1 Uji aktivitas antibakteri dengan metoda difusi (*Kirby Bauer Test*)

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak etilasetat dan fraksi gabungan dapat dilihat pada Lampiran 5,6,dan 7 serta Tabel 1.

Tabel 1. Diameter Daya Hambat (DDH) sampel terhadap bakteri uji.

Sampel (100µg)	Diameter Zona Bening (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
F1	14	15	14
F2	9	7	9
F3	11	10	9
F4	12	16	16
F5	14	12	14
Ekstrak total	14	14	11
Kontrol (+)	22	23	22

4.1.2.2 Uji aktivitas antijamur

Selain uji aktivitas antibakteri juga dilakukan uji aktivitas antijamur terhadap ekstrak total etilasetat dan hasil fraksi gabungannya terhadap jamur *Candida albicans*, *Rhizopus oryzae* dan *Penicillium sp.*. Hasil yang diperoleh tidak satupun menunjukkan adanya aktivitas antijamur yang ditandai dengan tidak adanya zona bening pada media agar jamur yang di uji (Lampiran 8, 9 dan 10).

4.1.3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan hewan uji yang digunakan ialah larva *Artemia*

salina Leach dan waktu inkubasi selama 24 jam. Data yang diperoleh dari uji toksisitas ekstrak etilasetat dan fraksi-fraksi daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl yakni berupa jumlah larva *Artemia salina* yang hidup dalam air laut setelah waktu inkubasi, kemudian dihitung nilai LC_{50} menggunakan uji probit dengan selang kepercayaan 95%. Uji dilakukan terhadap ekstrak etilasetat dan hasil fraksi gabungan yakni F1 sampai F5.

Tabel 2. Nilai LC_{50} hasil BSLT ekstrak etilasetat dan fraksi gabungannya.

No.	Sampel	LC_{50} (ppm)
1	Ekstrak	248,8
2	F1	3012,5
3	F2	506990,7
4	F3	4,2
5	F4	70,1
6	F5	48582,6

Hasil penentuan nilai-nilai LC_{50} terlihat dalam Tabel 2 dan perhitungan uji probit dapat dilihat pada Lampiran 12. Hasil perhitungan uji probit dari uji toksisitas dengan metode BSLT diperoleh bahwa ekstrak etilasetat, F3 dan F4 bersifat toksik. Ekstrak etilasetat tersebut dikatakan toksik karena memiliki nilai LC_{50} sebesar 248,8 ppm, sedangkan F6 merupakan fraksi yang paling toksik dengan nilai LC_{50} paling rendah yakni 4,2 ppm. Fraksi yang tidak bersifat toksik berasal dari fraksi yang memiliki nilai LC_{50} yang lebih dari 1000 ppm yakni F1, F2 dan F5 dengan nilai LC_{50} masing-masing yaitu sebesar 3012,5 ppm, 506990,7 ppm dan 48582,6 ppm.

4.2. PEMBAHASAN

4.2.1 Uji Aktivitas Antimikrobia

Metoda uji aktivitas antimikrobia yang digunakan adalah metoda difusi agar. Metoda ini dipilih karena relatif lebih sederhana dan hasil yang didapat cukup teliti untuk mengetahui adanya aktivitas dari mikroba uji. Zona bening disekitar kertas cakram yang berisi sampel uji menandakan tidak adanya pertumbuhan mikroba, hal ini menunjukkan bahwa sampel uji mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Apabila tidak terdapat zona bening disekitar cakram menandakan tidak aktifnya sampel uji. Bakteri dan jamur uji yang digunakan

dalam penelitian ini bersifat patogen terhadap manusia yang umumnya ditemukan pada kulit dan saluran pencernaan serta makanan.

4.2.1.1 Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif yang bersifat patogen pada manusia. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* (Gram negatif), *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Gram positif). *Escherichia coli* dipakai sebagai indikator cemaran yang berbahaya bagi manusia (Buckle dkk., 1985). Hal ini disebabkan beberapa strain dari *Escherichia coli* dapat memproduksi toksin yang dapat menyebabkan timbulnya *gastro enteritis* pada manusia yang ditandai dengan gejala diare, demam kadang disertai muntah bahkan kematian. Terhadap bakteri Gram positif digunakan *Staphylococcus aureus* karena bakteri ini dapat menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan keracunan makanan, meningitis dan pneumonia. Selain enterotoksin, bakteri ini juga memproduksi hemolisin yaitu toksin yang dapat merusak dan memecah sel-sel darah merah (Ajizah dkk., 2007). *Bacillus subtilis* digunakan sebagai pembanding untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yang juga termasuk bakteri dari Gram positif.

Terhadap ekstrak kental etilasetat yang didapat kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri. Untuk melarutkan ekstrak kental etilasetat digunakan etanol absolut. Etanol absolut juga digunakan sebagai kontrol negatif. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kental etilasetat dari tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* B1 mempunyai aktivitas antibakteri. Hal ini ditunjukkan dengan adanya diameter daerah hambat (DDH) disekitar cakram yang berisi sampel. Adapun DDH yang diperoleh adalah 14 mm untuk bakteri *Escherichia coli*, 14 mm untuk bakteri *Staphylococcus aureus*, dan 11 mm untuk bakteri *Bacillus subtilis*. Aktifnya ekstrak etilasetat ini terhadap bakteri uji diduga karena adanya efek sinergis antar senyawa yang terkandung di dalam ekstrak.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri terhadap fraksi gabungan hasil kolom kromatografi menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri terjadi pada setiap fraksi gabungan tersebut. Diameter daerah hambat yang terbesar adalah pada fraksi FG4 untuk bakteri *Bacillus subtilis* dan fraksi FG4 untuk bakteri *Escherichia*

coli yaitu 16 mm. Sedangkan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* diameter daerah hambat terbesar adalah pada fraksi FG5 yaitu 14 mm.

Proses perakitan dinding sel bakteri diawali dengan pembentukan rantai peptida yang akan membentuk jembatan silang peptida yang menggabungkan rantai glikan dari peptidoglikan dengan rantai yang lain sehingga menyebabkan dinding sel terakit sempurna. Untuk dapat membunuh mikroorganisme, bahan uji harus masuk ke dalam sel melalui dinding sel sehingga dinding sel tersebut akan rusak. Kerusakan pada sel bakteri tersebut terjadi akibat penghambatan terhadap sintesis dinding sel. Senyawa yang menghalangi tahap apapun dalam sintesis peptidoglikan akan menyebabkan dinding sel bakteri diperlemah dan sel menjadi lisis (Jawetz dkk., 2001). Lisisnya sel bakteri tersebut disebabkan oleh tidak berfungsinya lagi dinding sel dalam mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri yang memiliki tekanan osmotik tinggi (Ajizah dkk., 2007). Tanpa dinding sel, bakteri tidak dapat bertahan terhadap pengaruh luar dan segera mati. Oleh karena itu, adanya senyawa metabolit dari ekstrak maupun fraksi etilasetat dapat menghambat sintesis dinding sel yang utuh, serta lisisnya dinding sel memberikan aktivitas antibakteri terhadap ekstrak maupun fraksi etilasetat dari daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl.

4.2.1.2 Uji aktivitas anti jamur

Uji aktivitas antijamur untuk ekstrak etilasetat dan fraksi gabungannya terhadap jamur *Candida albicans*, *Rhizopus oryzae* dan *Penicillium sp.* tidak menunjukkan adanya aktivitas antijamur. Hal ini disebabkan karena senyawa yang ada pada ekstrak maupun fraksi etilasetat tidak mampu menghambat biosintesis ergosterol yang ada pada jamur. Ergosterol adalah sebuah sterol selular utama jamur yang penting dalam menjaga integritas dan fungsi membran jamur. Penghambatan biosintesis ergosterol oleh senyawa menyebabkan rusaknya membran sel jamur, merubah permeabilitasnya lalu menyebabkan terbentuknya pori, akibatnya membran jamur kehilangan elemen intraseluler penting seperti glukosa, protein dan ion K^+ (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Selain itu, senyawa yang ada pada ekstrak maupun fraksi etilasetat tidak mampu menghambat aktivitas enzim pada jamur. Penghambatan aktivitas enzim

oksidatif dan peroksidatif jamur, dapat menyebabkan tingginya kadar hidrogen peroksida intrasetular yang berkontribusi pada kematian sel jamur (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening pada masa inkubasi. Tidak terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa ekstrak etilasetat dan fraksi gabungannya tidak mampu menahan pertumbuhan sel jamur uji tersebut.

4.2.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine shrimp lethality test* (BSLT), menggunakan larva *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak total etilasetat dan fraksi gabungannya menghasilkan suatu data (Tabel 2) yang kemudian diolah dengan metoda probit untuk menentukan nilai LC_{50} (Lampiran 12).

Larva *Artemia salina* diinkubasi dalam air laut yang telah dilarutkan di dalamnya ekstrak dan fraksi-fraksi uji selama 24 jam. Masing-masing fraksi terdiri dari 10 ekor larva *Artemia salina* untuk konsentrasi 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm tiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan, kemudian dihitung jumlah larva yang masih hidup untuk mengetahui jumlah mati selama masa inkubasi. Penentuan nilai LC_{50} menggunakan uji probit dengan selang kepercayaan 95%, dapat di hitung dari jumlah larva yang mati tersebut.

Hasil perhitungan uji probit diperoleh konsentrasi *lethal* dari masing-masing fraksi. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa nilai LC_{50} paling rendah diberikan oleh fraksi FG3 dengan nilai LC_{50} sebesar 4,2 ppm dan tertinggi diberikan oleh fraksi FG2 yakni sebesar 506990,7 ppm. Menurut Meyer dkk., (1982) suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik jika memiliki nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm. Oleh sebab itu, dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa ekstrak, fraksi FG3 dan fraksi FG4 bersifat toksik, kecuali fraksi FG1, fraksi FG2 dan fraksi FG5 yang tidak bersifat toksik karena memiliki nilai LC_{50} lebih besar dari 1000 ppm.

Berdasarkan hasil analisis data menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung didalam ekstrak etil asetat, FG3, dan FG4 bersifat toksik terhadap kematian larva udang, sehingga dapat dilakukan pendekatan uji senyawa antikanker (Sajuthi, 2000).