

Research Article

Pengaruh Suhu dan Waktu Pemanasan Larutan Serbuk Ekstrak Rosela (*Hibiscus Sabdariffa L.*) terhadap Hambatan Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**The Effect of Temperature and Heating Time of Roselle Extract (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Powder Solution on Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923****Hana Sofiana Maghfira, Isnaeni*, Asri Darmawati**Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,
Gedung Nanizar Zaman Joenoes, Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia*Corresponding author, e-mail: isnaeni@ff.unair.ac.id

Article History

Received: 1 September 2021; Received in Revision: 23 September 2021; Accepted: 30 September 2021

ABSTRAK

Kandungan utama rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) yang memiliki khasiat antioksidan dan anti bakteri adalah flavonoid dan antosianin. Senyawa flavonoid tidak stabil pada suhu tinggi. Sedangkan pengolahan serbuk ekstrak rosela untuk menjadi makanan atau minuman siap saji umumnya memerlukan pemanasan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh suhu dan waktu pemanasan larutan serbuk ekstrak rosela terhadap hambatan pertumbuhan mikroba *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Metode penelitian ini menggunakan sampel serbuk ekstrak bunga rosela siap-olah. Larutan serbuk ekstrak rosela dalam tabung bertutup ulir dipanaskan pada suhu 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C di atas penangas air, dengan waktu pemanasan pada masing-masing suhu tersebut adalah 15 menit dan 30 menit. Aktifitas anti bakteri larutan sampel diukur berdasarkan kemampuan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi agar sumuran. Zona hambat yang ditimbulkan sampel diukur dengan jangka sorong. Hasil penelitian ini menunjukkan zona ambat yang ditimbulkan oleh larutan sampel yang sudah mengalami pemanasan pada suhu tersebut selama 15 menit adalah 9,55±0,70 mm, 9,53±0,04 mm, 9,70±0,14 mm, 9,68±0,24 mm, 10,10±0,14 mm, 10,25±0,21 mm. Sedangkan diameter zona hambat sampel setelah pemanasan pada suhu tersebut selama 30 menit adalah 10,08±0,25 mm, 10,20±0,28 mm, 10,43±0,18 mm, 10,08±0,18 mm, 10,78±0,04 mm, 9,70±0,14 mm. Uji statistik two way ANOVA Randomized Control Block Design dengan derajat kepercayaan 95% digunakan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna diantara rerata zona hambat masing-masing sampel. Kesimpulan dari penelitian ini adalah suhu dalam rentang 40o-90o C tidak berpengaruh terhadap aktivitas anti bakteri sampel. Tetapi waktu pemanasan sampel berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kata kunci: Suhu pengulahan, waktu pemanasan, Larutan Serbuk Ekstrak Rosela, Aktivitas Antibakteri, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ABSTRACT

The main ingredients of roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) which have antioxidant and antibacterial effect were anthocyanins, and flavonoids. Flavonoid compounds were unstable at high temperatures. Meanwhile, the processing of roselle extract powder into ready-to drink or food preparations generally requires the thermal processes. The aims of this study were to determine the effect of temperature and heating time of roselle extract powder solution on the inhibition of microbial growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The method of this study uses a ready-to-process roselle powder extract sample. The roselle extract powder solution in a screw cap tube was heated at a temperature of 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, and 90°C on a waterbath, with heating times at each temperature were 15 minutes and 30 minutes. Anti bacterial activity of the sample solution was measured based on the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by the agar-well diffusion method. The inhibition zone of the sample was measured by caliper. The result of this study showed that inhibition zones caused by the sample that had been heated at those temperature for 15 minutes were 9.55±0.70 mm, 9.53 ±0.04 mm, 9.70±0.14 mm, 9.68±0.24 mm, 10.10±0.14 mm, and 10.25±0.21 mm. Meanwhile, after heating for 30 minutes the inhibition zones were 10.08±0.25 mm, 10.20±0.28 mm, 10.43±0.18 mm, 10.08±0.18 mm, 10.78±0.04 mm, 9.70±0.14 mm. Two ways statistical test ANOVA Randomized Control Block Design with 95% confidence level was used to prove that there was a significant difference between the mean inhibition zones of each sample. The conclusion of this research was, the temperature in the range of 40 -90 oC has no effect on the anti-bacterial activity of the sample. However, the heating time of the sample affected the antibacterial activity of the roselle extract powder solution against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

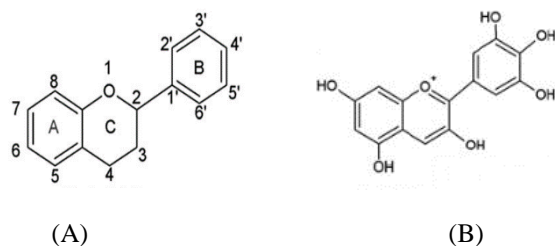
Keywords: Heating, Roselle Powder Extract Solution, Antibacterial Activity, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pendahuluan

Tanaman Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai alternatif pengobatan (Oktaviani dan Megantara, 2018). Kandungan utama *Hibiscus sabdariffa* L. yang berkaitan dengan khasiatnya sebagai antioksidan dan antibakteri adalah asam organik, antosianin, polisakarida dan flavonoid (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Menurut penelitian yang dilakukan Jung et al., (2013) ekstrak air bunga rosela terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) dan *Escherichia coli* (ATCC 8739). Mekanisme antibakteri senyawa flavonoid antara lain dengan menghambat sintesis asam nukleat, penghambatan fungsi membran dan menghambat metabolisme energi (Xie et al., 2015).

Senyawa flavonoid tidak stabil pada suhu tinggi. Peningkatan suhu menyebabkan degradasi flavonoid karena terjadi reaksi oksidasi gugus hidroksil. (Zainol et al., 2009; Kemit et al., 2019). Suhu tinggi pada saat pengolahan maupun penyimpanan juga dapat menyebabkan penurunan stabilitas antosianin dan pigmen tumbuhan lainnya (Riaz et al., 2016). Daun dan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) kaya akan kandungan antosianin (Wu et al., 2018). Antosianin termasuk dalam golongan flavonoid yang memiliki karakteristik C-6 (cincin A) -C-3 (cincin C) -C-6 (cincin B), dicantumkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur flavonoid (A) dan antosianin (B)

Antosianin banyak ditemukan di alam sebagai glikosida yang terdiri dari aglikon dan glikon. Bagian aglikon (antosianidin) cukup reaktif karena adanya kation flavilium yang kekurangan elektron. Bagian glikon yang paling umum adalah D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, D-xilosa dan arabinosa (Riaz et al., 2016). Antosianin yang paling banyak ditemukan pada tanaman rosela yaitu delphinidin-3-O sambubioside dan cyanidin-3-O-sambubioside (Hapsari et al., 2021).

Antosianin sangat tidak stabil, baik dalam jaringan tumbuhan maupun produk pangan. Secara enzimatik, keberadaan enzim polifenol oksidase dan peroksidase mempengaruhi stabilitas antosianin. Sedangkan secara non enzimatik dipengaruhi oleh faktor pH, cahaya, suhu dan oksigen. (Diaconeasa, 2018; Amperawati et al., 2019). Degradasi antosianin dapat terjadi karena reaksi hidrolisis yang diawali dengan pemutusan ikatan glikosidik. Hidrolisis ini dikenal sebagai langkah awal degradasi

antosianin. Suhu yang tinggi dapat menyebabkan hidrolisis antosianin menjadi khalkon, cincin C terbuka dan tidak berwarna (Diaconeasa, 2018; Aryati et al., 2020). Reaksi degradasi antosianin juga dapat terjadi akibat reaksi adisi nukleofilik pada atom C2, sehingga membentuk senyawa hemiketal yang selanjutnya membentuk senyawa khalkon (Dangles dan Fenger, 2018). Suzery et al., (2020) melaporkan bahwa pemanasan ekstrak kelopak bunga rosela pada suhu 40 °C, 60 °C, 80 °C selama 60 menit menyebabkan total antosianin menurun karena terjadi degradasi struktur antosianin. Amperawati et al., (2019) juga melaporkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosela yang dipanaskan pada suhu 70 °C, 80 °C, 90 °C dan 99,5 °C selama 20, 40, 60, 80, dan 100 menit menunjukkan penurunan kadar antosianin seiring dengan meningkatnya suhu dan lamanya waktu pemanasan.

Sementara itu proses termal lazim diaplikasikan pada proses pengolahan pangan untuk tujuan inaktivasi enzim, perbaikan warna dan tekstur, perbaikan mutu nutrisi, dan sterilisasi. Blanching, pemanggangan (roasting), perebusan (boiling), oven gelombang mikro (microwaving), dan sterilisasi adalah beberapa contoh aplikasi proses termal (Rohadi and Wahjuningsih, 2019). Pada proses manufaktur produk farmasi pemilihan suhu yang tepat sangat penting untuk menjamin kualitas produk (Valentine, 2014).

Metode difusi agar sumuran banyak digunakan untuk menguji aktifitas antimikroba ekstrak tanaman, yaitu dengan mengukur diameter zona hambat disekeliling sumuran. Menurunnya kadar senyawa antimikroba dalam ekstrak karena terdegradasi diduga akan mempengaruhi/mengurangi ukuran diameter zona hambat. Serbuk ekstrak rosela dalam penelitian ini merupakan bahan baku yang selanjutnya akan dikemas atau diolah lagi menjadi sediaan (minuman/makanan atau kosmetik) Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh suhu dan waktu pemanasan larutan serbuk ekstrak rosela *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Metode

Bahan dan cara kerja

Serbuk ekstrak rosela produk suatu pabrik farmasi yang dibuat dengan cara mengekstraksi kuncup bunga rosela menggunakan pelarut etanol-air kemudian ditambahkan pengisi maltodextrin dengan perbandingan 1 : 1

Nutrient Agar (Oxoid), Kanamisin Sulfat serbuk untuk injeksi (Meiji), air suling (PD. Surabaya Aqua), NaCl, Butanol, Asam Asetat, Kloroform, Etil Asetat, Asam Formiat, Ammonia dan FeCl₃. Kecuali dinyatakan lain, bahan tersebut berderajat kemurnian pro analisis dari EMerck

Pemeriksaan karakteristik serbuk ekstrak rosela Pemeriksaan organoleptis.

Dilakukan pengamatan serbuk ekstrak rosela dan larutan serbuk ekstrak rosela secara visual yakni bentuk, warna dan bau.

Pemeriksaan fitokimia menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis profil kromatografi lapis tipis senyawa polifenol dilakukan dengan menimbang 1 gram sampel kemudian mencampurkan ekstrak dengan 10 ml air suling panas pada suhu kamar. Ekstrak sebanyak 6 µl kemudian ditotolkan dengan linomat pada plat silika gel. Kemudian plat silika dieluasi menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5:9:0,5). Setelah proses eluasi selesai plat silika dikeringkan di udara kemudian dilakukan uji kualitatif menggunakan penampak noda FeCl₃.

Analisis senyawa flavonoid dilakukan dengan cara mengocok 1 gram sampel menggunakan n-heksana beberapa kali hingga ekstrak tidak berwarna kemudian residu dilarutkan dalam 5 ml etanol. Ekstrak sebanyak 6 µl kemudian ditotolkan dengan linomat pada plat silika gel. Kemudian plat silika dieluasi menggunakan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5). Setelah proses eluasi selesai plat silika dikeringkan di udara kemudian dilakukan uji kualitatif dengan penampak noda uap amonia (Isnaeni et al., 2020).

Pembuatan larutan serbuk ekstrak rosela

Serbuk ekstrak rosela ditimbang sebanyak 5 g menggunakan timbangan analitik. Kemudian serbuk ekstrak dilarutkan dengan air suling dalam beaker glass. Setelah larut masukkan kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml. Selanjutnya ditambahkan air suling sampai 50 ml.

Pembuatan media nutrient agar

Medium NA sebanyak 28 g dengan komposisi meet extract 1 g, yeast extract 2 g, 5 g pepton, NaCl 5 g dan agar 15 g dilarutkan dalam 1000 ml air suling dalam erlenmeyer. Kemudian diaduk sampai larut, jika perlu lakukan pemanasan menggunakan hotplate. Setelah itu, erlenmeyer ditutup dengan kapas lalu diikat dengan benang kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Peremajaan Staphylococcus aureus ATCC 25923

Dimasukkan 10 ml media agar yang telah masak ke dalam tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas. Media tersebut disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian tabung media agar diletakkan pada kemiringan 45°C biarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat. Perlu diperhatikan bahwa media agar tidak boleh menyentuh tutup tabung. Media agar dibiarkan menjadi dingin dan keras. Kemudian satu koloni biakan murni bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923 diambil dengan menggunakan ose steril, selanjutnya ditanam dalam medium Nutrien Agar (NA) miring, kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Putri et al., 2019).

Penyiapan inokulum bakteri

Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923 yang telah melalui proses peremajaan diberi NaCl 0,9% steril. Tabung digoyangkan sampai koloni pada permukaan medium terlepas dan tersuspensi dalam NaCl 0,9%. Suspensi bakteri diukur transmisinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh transmitan sebesar 25%. Blanko yang digunakan adalah NaCl 0,9%.

Penentuan konsentrasi hambat minimum larutan serbuk ekstrak rosela

Larutan serbuk ekstrak rosela 5% diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi yaitu konsentrasi 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,312%. Kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela konsentrasi tersebut dalam satu cawan petri dengan menggunakan medium nutrient agar.

Disiapkan 2 tabung reaksi yang berisi Nutrien Agar (NA) steril. Satu tabung berisi media untuk base layer dan tabung lainnya berisi media untuk seed layer. Sebanyak 12 ml media nutrient agar dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian diratakan dan ditunggu hingga memadat sebagai base layer. Inokulum bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923 sebanyak 3 µL dimasukkan dalam 8 ml media Nutrient Agar. Kemudian dihomogenkan dengan vortex mixer. Media yang telah mengandung bakteri kemudian dituangkan diatas base layer yang telah memadat sebagai seed layer.

Dibuat 9 lubang atau sumuran yang terdiri dari 2 sumuran untuk masing-masing konsentrasi dan 1 sumuran untuk kontrol positif yaitu Kanamisin Sulfat 100 ppm. Sebanyak 50 µl ekstrak dan kontrol positif dimasukkan ke dalam sumuran agar. Selanjutnya cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada inkubator. Setelah diinkubasi selama 24 jam dilakukan pengukuran diameter zona hambat bakteri. KHM ditentukan untuk mengetahui kadar minimal ekstrak yang akan digunakan untuk pengujian pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap aktifitas antibakteri.

Pemanasan larutan serbuk ekstrak rosela

Larutan serbuk ekstrak rosela konsentrasi 2,5% dimasukkan ke dalam 12 tabung reaksi bertutup ulir. Masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan serbuk ekstrak rosela ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat awal larutan ekstrak pada tiap-tiap tabung. Kemudian dilakukan pemanasan dalam waterbath. Suhu waterbath diatur 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, dan 90 °C dengan waktu pemanasan 15 dan 30 menit. Dua tabung reaksi digunakan untuk masing-masing suhu dan waktu pemanasan (duplo). Sampel yang telah diberi perlakuan kemudian didiamkan hingga dingin. Selanjutnya tabung ulir ditimbang kembali dan berat yang diperoleh dicatat sebagai berat akhir. Tahapan ini dilakukan untuk memastikan bahwa volume larutan serbuk ekstrak rosela tidak berkurang akibat perlakuan pemanasan. Apabila terdapat selisih berat awal masing-masing tabung dengan berat akhir setelah pemanasan maka ditambahkan aquades hingga diperoleh berat awal (mengembalikan berat awal larutan ekstrak).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela.

Uji aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela

Penyaringan larutan serbuk ekstrak rosela

Masing-masing sampel dalam 12 tabung yang telah dipanaskan pada berbagai suhu dan waktu, disaring menggunakan membran filter milipore. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan diberi label sesuai perlakuan suhu dan waktu pemanasan.

Penyiapan Media Difusi Agar

Disiapkan 2 tabung reaksi yang berisi Nutrien Agar (NA) steril. Satu tabung berisi media untuk base layer dan tabung lainnya berisi media untuk seed layer. Sebanyak 30 ml media nutrient agar dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian diratakan dan ditunggu hingga memadat sebagai base layer. Kemudian inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki transmitem 25% diambil sebanyak 8 µl lalu dimasukkan dalam 20 ml media Nutrient Agar. Kemudian dihomogenkan dengan vortex mixer. Media yang telah mengandung bakteri kemudian dituangkan diatas base layer yang telah memadat sebagai seed layer.

Pengujian Sampel

Dibuat lubang atau sumuran pada media uji yang telah disiapkan pada cawan petri menggunakan pipa pencetak agar steril. Sumuran dibuat sebanyak 27 yang terdiri dari 24 sumuran untuk sampel yang telah diberi perlakuan, 2 sumuran untuk kontrol negatif dan 1 sumuran untuk kontrol positif. 24 sumuran untuk uji terdiri dari 2 lubang perlakuan berbagai suhu selama 15 menit dan 30 menit. Larutan serbuk ekstrak rosela 2,5% yang telah diberi perlakuan dimasukkan sebanyak 50 µl pada sumuran uji. Ke dalam sumuran kontrol negatif dimasukkan 50 µl ekstrak yang tidak diberi perlakuan dan kedalam sumuran kontrol positif dimasukkan 50 µl antibiotik Kanamisin Sulfat 100 ppm. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengukuran Diameter Zona Hambatan

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan menggunakan alat jangka sorong dengan cara mengukur diameter zona jernih yang terbentuk disekitar sumuran agar. Pengukuran masing-masing zona jernih dilakukan sebanyak dua kali yakni secara diagonal transversal dan horizontal kemudian hasil yang diperoleh dirata-rata. Pengukuran dilakukan pada tiap-tiap zona jernih yang terbentuk. Hasil pengukuran zona jernih sekitar sumuran agar dicatat sebagai diameter zona hambat pertumbuhan bakteri.

Rancangan Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menetapkan diameter zona hambat larutan serbuk ekstrak rosela yang telah diberi perlakuan berbagai suhu terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Selanjutnya data diameter zona hambat pada berbagai perlakuan suhu dan waktu dianalisis menggunakan analisis statistik untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan suhu dan waktu pemanasan. Metode analisis yang digunakan adalah

analisis varian two way ANOVA Randomized Control Block Design (RCBD) atau two way ANOVA tanpa interaksi. Dari hasil analisis two ways ANOVA RCBD jika diketahui hasilnya berbeda makna, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan menggunakan metode uji tukey dengan derajat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan organoleptis

Tabel 1 Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk ekstrak rosela dan larutan serbuk ekstrak rosela

Sampel	Bentuk	Warna	Bau
Serbuk ekstrak rosela	Serbuk	Coklat muda	Khas rosela
Larutan serbuk ekstrak rosela	Larutan	Coklat tua	Khas rosela dan sedikit bau khas gula

Pemeriksaan fitokimia menggunakan metode kromatografi lapis tipis

Tabel 2. Hasil pemeriksaan fitokimia serbuk ekstrak rosela

Golongan Senyawa	Eluen	Pereaksi penampak noda	Hasil	Keterangan
Polifenol	Kloroform : Etil Asetat : Asam Formiat (0,5:9:0,5)	FeCl ₃	Noda hitam	Positif
Flavonoid	Butanol : Asam asetat : Air (4:1:5)	Uap Amonia	Noda kuning intensif	Positif

Hasil pengamatan dengan metode kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa serbuk ekstrak rosela mengandung senyawa polifenol dan flavonoid. Hasil ini sejalan dan penelitian (Obouayeba *et al.*, 2015) bahwa ekstrak kelopak bunga rosela mengandung senyawa polifenol dan flavonoid serta beberapa senyawa lainnya.

Timbulnya noda berwarna hitam disebabkan karena senyawa polifenol mengandung gugus OH yang kemudian bereaksi dengan FeCl₃ membentuk kompleks flavonoid-Fe³⁺ (Warsi dan Sholichah, 2017). Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning intensif pada plat KLT setelah direaksikan dengan uap amonia. Flavonoid bereaksi dengan amonia membentuk quinoind pada cincin B yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi (Warsi dan Sholichah, 2017)

Penentuan konsentrasi hambat minimum larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Diameter zona hambat berbagai konsentrasi larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditunjukkan pada Tabel III. Larutan ekstrak dengan konsentrasi 2,5%, dan 1,25% berturut-turut memiliki diameter zona hambat sebesar $13,57 \pm 0,10$ mm dan $11,35 \pm 0,21$ mm. Sedangkan pada konsentrasi 0,625% dan 0,312% tidak terbentuk zona hambat bakteri. Kontrol positif Kanamisin Sulfat 100 ppm diperoleh diameter zona hambat bakteri sebesar 22,20 mm. Sehingga disimpulkan konsentrasi hambat minimum (KHM) larutan serbuk ekstrak rosela adalah 1,25%.

Tabel 3. Diameter zona hambat larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Konsentrasi serbuk (%)	Diameter Zona Hambat (mm)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Rata-rata
2,5%	13,65	13,50	$13,57 \pm 0,10$
1,25%	11,20	11,50	$11,35 \pm 0,21$
0,625%	-	-	-
0,312%	-	-	-
Kontrol Positif	22,20		$22,20 \pm 0,00$

Tabel 4. Rata-rata diameter zona hambat larutan serbuk ekstrak rosela 2,5% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah pemanasan pada suhu 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, dan 90 °C dengan waktu pemanasan 15 menit dan 30 menit

Waktu Suhu	Diameter Zona Hambat (mm)					
	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
15 menit	$9,55 \pm 0,70$	$9,53 \pm 0,04$	$9,70 \pm 0,14$	$9,68 \pm 0,24$	$10,10 \pm 0,14$	$10,25 \pm 0,21$
30 menit	$10,08 \pm 0,25$	$10,20 \pm 0,2$	$10,43 \pm 0,1$	$10,08 \pm 0,1$	$10,78 \pm 0,04$	$9,70 \pm 0,14$

Kontrol negatif: $10,10 \pm 0,28$ mm

Diameter zona hambat yang diperoleh setelah larutan sampel dipanaskan suhu 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, dan 90 °C selama 15 menit dan 30 menit tercantum pada Tabel IV. Hasil pengukuran diameter zona hambat bakteri pada tiap suhu pemanasan selama 30 menit lebih besar dibandingkan dengan pemanasan selama 15 menit. Sehingga dapat dikatakan bahwa lamanya waktu pemanasan larutan serbuk ekstrak rosela mengakibatkan aktivitas antibakteri ekstrak semakin meningkat.

Kenaikan aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela akibat lamanya pemanasan diduga karena terbentuknya degradan dari senyawa antosianin yaitu khalkon yang juga memiliki gugus fenolik sehingga memiliki aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri khalkon kemungkinan lebih tinggi sehingga menyebabkan kenaikan diameter zona hambat larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Senyawa khalkon

diketahui lebih efektif melawan MRSA daripada flavanon maupun flavon, dikarenakan adanya gugus hidroksil pada posisi 2 yang penting untuk aktivitas antistaphylococcal senyawa khalkon (Cushnie dan Lamb, 2005). Selain itu pemanasan juga menyebabkan peningkatan senyawa fenolik. Musilova et al., (2020) melaporkan bahwa Total Phenolic Compound (TPC) dalam ubi jalar yang telah melalui proses microwave mencapai 5,5 kali lebih tinggi daripada ubi jalar mentah. Al-Farsi et al., (2005) juga melaporkan bahwa kandungan total fenolik dalam kurma menunjukkan peningkatan setelah pengeringan dibawah sinar matahari akibat degradasi tanin oleh suhu selama proses pengeringan. Sehingga kenaikan aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela setelah perlakuan lamanya waktu pemanasan kemungkinan juga disebabkan karena kenaikan total fenolik.

Sehingga dalam hal ini tidak hanya senyawa flavonoid saja yang berperan dalam aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela namun juga terdapat senyawa lain (degradan) yang juga memiliki aktivitas antibakteri.

Pada suhu pemanasan 90°C selama 30 menit diameter zona hambat yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan dengan pemanasan selama 15 menit. Hasil penelitian Chaaban et al., (2017) menunjukkan bahwa pada suhu pemanasan 90 °C selama 2 jam menyebabkan degradasi senyawa rutin hingga 50% begitu juga dengan senyawa luteolin yang terdegradasi sebesar 45%. Chen et al., (2014) menyebutkan bahwa polifenol ekstrak apel memiliki stabilitas yang baik terhadap panas namun saat kenaikan suhu dari 70 °C menjadi 95 °C konsentrasi polifenol apel sedikit menurun yakni dari 750 ppm menjadi 700 ppm. Peningkatan suhu pemanasan menyebabkan degradasi flavonoid karena terjadi reaksi oksidasi gugus hidroksil (Zainol et al., 2009). Substitusi gugus hidroksil merupakan aspek penting dalam aktivitas antibakteri flavonoid, sebagai contoh pada flavonol adanya gugus hidroksil pada posisi 4' akan meningkatkan aktivitas antibakteri (Wu et al., 2013). Tanpa kehadiran dari gugus hidroksil akan menyebabkan aktivitas antibakteri senyawa flavonoid menjadi menurun. Diameter zona hambat terbesar larutan ekstrak serbuk rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terjadi pada suhu pemanasan 80 °C selama 30 menit yaitu sebesar $10,78 \pm 0,04$ mm. Pemanasan pada suhu 80 °C selama 30 menit merupakan suhu dan waktu pemanasan larutan serbuk ekstrak rosela dengan hambatan pertumbuhan *staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang paling tinggi.

Analisis statistik menggunakan metode analisis varian two way ANOVA Randomized Control Block Design (RCBD) atau two way ANOVA tanpa interaksi untuk mengetahui pengaruh suhu dan pengaruh waktu terhadap aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela. Analisis didahului dengan pemeriksaan normalitas dan homogenitas sampel sebagai syarat untuk dapat dilakukannya analisis dengan metode two way ANOVA. Hasil tes normalitas sampel menggunakan normality test Shapiro-Wilk test diperoleh nilai sig. $\geq 0,05$ untuk masing-masing perlakuan suhu dan waktu sehingga sampel dalam pengujian ini dinyatakan berdistribusi normal. Hasil tes homogenitas sampel

diperoleh sig. 0,080 sehingga sampel dinyatakan homogen (sig. $\geq 0,05$). Syarat analisis menggunakan metode two way ANOVA lainnya adalah data yang akan dianalisis berskala rasio atau interval dan masing-masing populasi saling independen. Berdasarkan hal tersebut maka dapat dikatakan data pada penelitian ini telah memenuhi syarat untuk dilakukan pengujian dengan metode analisis two way ANOVA. Hasil analisis two way ANOVA RCBD dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) diperoleh nilai sig. 0,088 untuk variabel suhu pemanasan sehingga dapat dikatakan bahwa suhu pemanasan tidak berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dikarenakan nilai sig. nya $\geq 0,05$. Sedangkan hasil sig. untuk variabel waktu adalah 0,004 sehingga dapat dikatakan bahwa lamanya waktu pemanasan berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri larutan serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dikarenakan nilai sig. nya $\leq 0,05$. Dikarenakan hasil analisis untuk variabel waktu didapatkan sig. $\leq 0,05$ maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan pada kelompok perlakuan waktu. Pada penelitian ini hanya terdapat dua kelompok perlakuan waktu yaitu 15 menit dan 30 menit maka dapat dikatakan bahwa kelompok waktu 15 menit berbeda dengan kelompok waktu 30 menit.

Kesimpulan

Suhu pemanasan (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, dan 90 °C) larutan serbuk ekstrak rosela tidak berpengaruh terhadap hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Namun lamanya waktu pemanasan (15 menit dan 30 menit) berpengaruh terhadap hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pemanasan pada suhu 40 °C-90 °C hingga 30 menit merupakan suhu dan waktu pemanasan yang sesuai untuk mempertahankan kemampuan larutan serbuk ekstrak rosela dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Saran

Dalam mengonsumsi atau mengolah serbuk ekstrak rosela yang prosesnya melibatkan pemanasan dapat dilakukan pada rentang suhu 40 °C-90 °C hingga 30 menit karena suhu dan waktu pemanasan tersebut dapat mempertahankan kemampuan serbuk ekstrak rosela dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Apabila akan dilakukan pemanasan pada suhu dan waktu diluar dari yang disarankan pada penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan suhu dan waktu pemanasan yang sesuai untuk mempertahankan aktivitas antibakteri serbuk ekstrak rosela terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC.

Daftar Pustaka

- Amperawati, S., Hastuti, P., Pranoto, Y., and Santoso, U. 2019. The Anthocyanins Content, Colour Changes and Thermal Stability of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Petal Extract. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, Vol. 8, No. 4, pp. 428–435.
- Aryati, D. L., Rohadi dan Pratiwi, E. 2020. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kelopak Bunga Rosela (*H. sabdariffa* L.) Merah Pada Berbagai Suhu Pemanasan. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian*, Vol. 15, No. 1, pp. 1–9.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gerardin, C., Paris, C., Charbonnel C., Chekir L., and Ghoul, M. 2017. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*, pp. 1–12.
- Chen, J., Sun, H., Wang, Y., Wang, S., Tao, X., and Sun A. 2014. Stability of apple polyphenols as a function of temperature and pH. *International Journal of Food Properties*, Vol. 17, pp. 1742–1749.
- Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J. 2005 Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 26, pp. 343–356.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., dan Heinrich, M. 2014 *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, Vol. 5, pp. 424–443.
- Dangles, O. and Fenger, J.-A. 2018. The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules*, Vol. 23, pp. 1–23.
- Diaconeasa, Z. 2018. Time-dependent degradation of polyphenols from thermally-processed berries and their in vitro antiproliferative effects against melanoma. *Molecules*, Vol. 23, No. 10, pp. 1–18.
- Hapsari, B. W., Manikharda and Setyaningsih, W. 2021. Methodologies in the analysis of phenolic compounds in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition, biological activity, and beneficial effects on human health. *Horticulturae*, Vol. 7, No. 35, pp. 1–36.
- Isnaeni, I., Hendradi, E. and Zettira, N. Z. 2020. Inhibitory effect of roselle aqueous extracts-HPMC 6000 gel on the growth of *staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 17, No. 2, pp. 190–196.
- Jung, E., Kim, Y. and Joo, N. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 93, pp. 3769–3776.
- Putri, R. M., Diana, V. E. and Fitri, K. 2019. Perbandingan Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Bunga, Daun dan Akar Tumbuhan Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Dunia Farmasi*, Vol. 3, No. 3, pp. 131–143.
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M. and Saad, B. (2016) Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects, *Springer Briefs in Food, Health*

- and Nutrition. Switzerland: Springer Briefs in Food, Health and Nutrition.
- Rohadi and Wahjuningsih, S. B. 2019. The Effect of Thermal Treatment on Tea (*C. sinensis* Linn.) Extract, Type of White Tea on the Stability of Its Antioxidant Activity. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, Vol. 14, No. 1, pp. 41–49.
- Suzery, M., Nudin, B., Bima, D. N., and Cahyono, B. 2020. Effects of Temperature and Heating Time on Degradation and Antioxidant Activity of Anthocyanin from Roselle Petals (*Hibiscus sabdariffa* L.). *International Journal of Science, Technology & Management*, Vol. 1, No. 4, pp. 288–236.
- Valentine, P. N. E. 2014. Semi Solid dosage Forms Manufacturing: Tools, Critical Process Parameters, Strategies, Optimization and Validation. *Sch. Acad. J. Pharm.*, Vol. 3, No. 2, pp. 153–161.
- Wang, D., Liang, J., Zhang, J., Wan, Y., and Chai, X. 2020. Natural Chalcones in Chinese Materia Medica: Licorice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Vol, 2020, pp. 1–14.
- Warsi and Sholichah, A. R. 2017. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanolic extract and ethyl acetate fraction from basil leaf (*Ocimum basilicum* L.) by DPPH radical scavenging method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 259, pp. 1–11.
- Wu, H. Y., Yang, K. M. and Chiang, P. Y. 2018. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules*, Vol. 23, No. 1357, pp. 1–13.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., Ren, L. 2015. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 22, No. 1, pp. 132–149.
- Zainol, M. K. M., Hamid A., Bakar, A., dan Dek, P. 2009. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*, Vol. 16, pp. 531–537.