

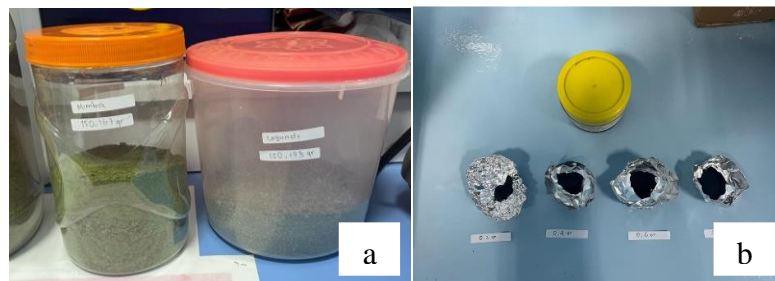
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik objek penelitian

Objek penelitian ini adalah daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) dan daun legundi (*Vitex trifolia* L.) yang didapat dari Br. Abianseka, Mas, Ubud. Daun mimba dan daun legundi yang digunakan dalam penelitian ini yakni daun yang berwarna hijau, segar, tidak berlubang dan diperoleh dari daun dari tangkai ketiga sampai ketujuh dari pucuk. Dalam penelitian ini diperlukan 1 kg daun mimba dan 1 kg daun legundi segar. Selanjutnya dilakukan pengeringan dan pembuatan serbuk simplisia. Serbuk simplisia yang diperoleh adalah sebanyak 161,235 g serbuk daun mimba dan 163,132 g serbuk daun legundi. Ekstrak pekat diperoleh melalui proses maserasi dengan merendam sebanyak 300 g kombinasi serbuk daun mimba dan daun legundi dengan perbandingan 1:1 dalam 1500 ml etanol 96% selama 3 hari pada suhu ruang, dengan 1 kali remaserasi. Dari proses maserasi tersebut diperoleh ekstrak pekat sebanyak 26,415 g.

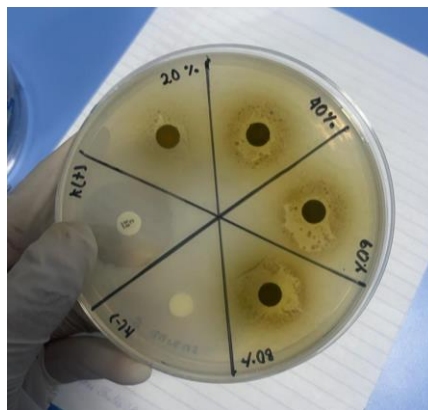


Gambar 6. a) Serbuk Daun Mimba dan Daun Legundi, b) Ekstrak Kombinasi Daun Mimba dan Daun Legundi

Ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi merupakan sampel yang akan diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi diujikan dalam berbagai konsentrasi yaitu 20, 40, 60, dan 80% yang diencerkan menggunakan pelarut etanol 96%. Konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% dipilih untuk mencakup rentang yang luas dan memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi efek dengan baik.

2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi menggunakan empat perlakuan konsentrasi yaitu 20, 40, 60, dan 80% dengan enam kali pengulangan menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling cakram. Zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Zona Hambat Ekstrak Kombinasi Daun Mimba dan Daun

Legundi Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

3. Pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Diameter zona hambat kontrol kerja

Hasil pengukuran diameter zona hambat pada kontrol kerja terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3
Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri
***Staphylococcus aureus* Pada Kontrol Kerja**

Kontrol	Diameter Zona Hambat (mm)						Rerata±SD (mm)
	I	II	III	IV	V	VI	
Kontrol Kerja (Kloramfenikol 30µg)	12,75	12,25	11,75	15,75	12,75	15,75	13,58±1,78

Data pada Tabel 3, diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh kloramfenikol 30µg terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki rerata sebesar 13,58 mm±1,78.

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Hasil pengukuran diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh etanol 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 0 mm pada semua pengulangan. Hasil ini menunjukkan bahwa etanol 96% tidak menghasilkan zona hambat.

c. Diameter zona hambat kelompok perlakuan

Hasil pengukuran diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4
Diameter Zona Hambat Ekstrak Kombinasi Daun Mimba dan Daun Legundi Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi (%)	Diameter Zona Hambat (mm)						Rerata±SD (mm)
	I	II	III	IV	V	VI	
20	3,25	3,50	3,25	3,00	2,75	2,75	3,08±0,30
40	4,00	4,50	3,50	4,25	4,50	5,25	4,33±0,58
60	5,75	6,25	5,25	6,50	6,25	5,75	5,95±0,45
80	8,75	5,75	6,00	6,25	8,50	6,50	6,95±1,31

Berdasarkan data pada Tabel 4, diketahui bahwa nilai tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi. Hasil pengukuran tersebut berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi.

4. Kategori zona hambat pada berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Kategori hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi berdasarkan kategori daya hambat zat antibakteri disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5
Kategori Zona Hambat Ekstrak Kombinasi Daun Mimba dan Daun Legundi Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi (%)	Rerata Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
20	3,08	Lemah
40	4,33	Lemah
60	5,95	Sedang
80	6,95	Sedang

Berdasarkan data pada Tabel 5, diketahui bahwa daya hambat ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki rentang kategori lemah hingga sedang.

5. Hasil analisis data

Data hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian statistik dengan menggunakan SPSS. Hasil uji statistik *Kolmogorov Smirnov* didapatkan hasil yaitu nilai probabilitas (ρ) sebesar 0,200, jika dibandingkan dengan nilai α (0,05) maka nilai $\rho > \alpha$ ($0,200 > 0,05$) yang menandakan bahwa data tersebut berdistribusi normal. Karena data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji statistik *One Way Anova*, hasil uji *One Way Anova* didapatkan hasil rerata ρ sebesar 0,000, jika dibandingkan dengan nilai α (0,05) maka nilai $\rho < \alpha$ ($0,000 < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing variasi konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan uji statistik *Least Significant Difference* (LSD), hasil uji LSD didapatkan hasil yaitu nilai probabilitas (ρ) sebesar 0,000, jika dibandingkan dengan nilai α (0,05) maka nilai $\rho < \alpha$ ($0,000 < 0,05$), nilai tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai zona hambat yang bermakna pada masing-masing variasi konsentrasi.

B. Pembahasan

1. Ekstraksi zat uji

Daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mimba dan daun legundi yang daun yang berwarna hijau, segar, dan tidak berlubang untuk

mengindari faktor pengganggu yang tidak diteliti. Daun yang dipetik diperoleh dari daun dari tangkai ketiga sampai ketujuh dari pucuk yaitu daun yang tidak terlalu muda dan tidak tua. Menurut Hans dan Heldt dalam Rahmawati, Bintang dan Artika (2017) pemilihan posisi daun mempengaruhi kandungan zat aktif pada daun, dimana produksi senyawa metabolit sekunder pada daun semakin menurun seiring dengan bertambahnya umur daun.

Daun mimba dan daun legundi kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven karena suhu oven lebih stabil dan akan terjadi pengurangan kadar air dalam jumlah besar dalam waktu singkat (Winangsih, Prihastanti dan Parman, 2013). Pada penelitian yang dilakukan oleh Warnis, Aprilina dan Maryanti (2020) membuktikan bahwa pengeringan dengan metode oven lebih baik untuk kandungan fitokimia simplisia karena suhu pemanasan oven lebih konstan dan sirkulasi udara lebih sempurna sehingga mengoptimalkan proses pengeringan. Suhu pengeringan dengan oven sangat berpengaruh terhadap kadar air dan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun. Penggunaan suhu yang tinggi menyebabkan perubahan komponen bioaktif dan menurunkan aktivitas senyawa aktif, sedangkan pengeringan pada suhu rendah menyebabkan waktu pengeringan lebih lama, mengalami pembusukan dan rendahnya aktivitas senyawa aktif yang dihasilkan akibat belum inaktifnya enzim polifenol oksidase (Khatulistiwa, Permana dan Puspawati, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Warnis, Aprilina dan Maryanti, (2020) pada pengeringan daun menggunakan variasi suhu didapatkan hasil yaitu pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C merupakan perlakuan terbaik yang menghasilkan bubuk dengan aktivitas senyawa metabolit sekunder tertinggi.

Daun mimba dan daun legundi yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk agar ukuran partikel menjadi lebih kecil sehingga memperluas kontak dan meningkatkan daya interaksi dengan pelarut. Kerusakan dinding sel akibat penghalusan menjadi serbuk akan memudahkan pelarut menarik senyawa yang terkandung dalam sel sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh optimal (Ningsih, Zufahair dan Kartika, 2016).

Serbuk simplisia kombinasi daun mimba dan daun legundi selanjutnya diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan merendam 300 g serbuk kombinasi daun mimba dan daun legundi kedalam 1500 ml etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena dapat mengekstraksi senyawa aktif dengan baik melalui perendaman tanpa pemanasan, sehingga dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang labil (Hidayah dkk, 2016). Pemilihan pelarut untuk maserasi didasari pada konsep "*like dissolve like*" dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar, begitupun sebaliknya (Arifianti, Oktarina dan Kusumawati, 2014). Etanol 96% digunakan sebagai pelarut karena merupakan pelarut ideal yang sering digunakan untuk mengekstraksi hampir semua senyawa dengan berat molekul rendah seperti flavonoid dan saponin. Keunggulan etanol 96% yaitu dapat lebih mudah berpenetrasi kedalam sel, bersifat universal yang mampu menarik semua jenis zat aktif, baik bersifat polar, semipolar, dan non polar serta memiliki kadar toksisitas yang rendah (Sarlina, Razak dan Tandah, 2017). Penggunaan rasio bahan : pelarut dalam penelitian ini yaitu 1:5 karena semakin banyak pelarut yang digunakan, maka semakin besar pula keterkaitan senyawa pada ekstrak. Hal ini dikarenakan semakin tinggi rasio pelarut, semakin besar perbedaan konsentrasi antar pelarut dengan senyawa dalam sampel, namun peningkatan lebih lanjut dapat

menurunkan hasil ekstrak (Widyastutik, Hardani dan Sari, 2022). Setelah proses maserasi zat uji kemudian divaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram adalah metode sederhana yang digunakan untuk melihat kemampuan antibakteri suatu zat uji. Metode ini digunakan karena dapat dilakukan pengujian lebih banyak dalam satu kali percobaan serta tenaga biaya yang dikeluarkan lebih ringan (Haryati dkk, 2017).

2. Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Diameter zona hambat kontrol kerja

Antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai kontrol kerja dalam penelitian ini, karena kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang efektif melawan bakteri gram positif dan gram negatif. Cara kerja kloramfenikol yaitu dengan menghambat sintesis protein sel bakteri (Muntasir dkk, 2022). Kloramfenikol dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol untuk meyakinkan bahwa bakteri yang digunakan dalam pengujian masih layak digunakan yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekeliling cakram antibiotik kloramfenikol. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa rata-rata diameter zona hambat yang dimiliki kloramfenikol 30 μ g terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah 13,58 mm termasuk kedalam kategori kuat, bila dibandingkan dengan tabel CLSI, termasuk kedalam kategori *intermediate*. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian dari Afnidar (2014) yang membuktikan bahwa kloramfenikol 30 μ g

mampu membentuk diameter zona hambat sebesar 14 mm termasuk kedalam kategori kuat, bila dibandingkan dengan tabel CLSI, termasuk kedalam kategori *intermediate*.

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Etanol 96% digunakan sebagai kontrol negatif dalam penelitian ini untuk memastikan apakah pelarut uji berdampak pada luas zona hambat yang dihasilkan pada setiap konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh etanol 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 0 mm pada semua pengulangan. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Suyasa dkk (2022) yang menyatakan bahwa etanol 96% sebagai kontrol negatif tidak dapat membentuk zona hambat dengan diameter 0 mm pada semua pengulangan.

Hal ini membuktikan bahwa etanol 96% tidak mampu menghambat bakteri dan tidak berpengaruh terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri yang diuji. Hasil ini menunjukkan bahwa etanol 96% tidak mempengaruhi zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi. Etanol dengan konsentrasi yang tinggi yaitu 96% mudah menguap dan bersifat sebagai *short acting*.

c. Diameter zona hambat kelompok perlakuan

Hasil penelitian pada Tabel 4 menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi ekstrak 20, 40, 60, dan 80% secara berturut-turut yaitu 3,08 mm, 4,33 mm, 5,95 mm dan 6,95 mm. Hasil tersebut membuktikan bahwa

semakin tinggi konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi, semakin besar pula diameter zona hambat yang dihasilkan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar ekstrak konsentrasi yang diuji maka kemampuan aktivitas antibakteri akan semakin besar. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Oroh dkk, (2015) yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin lebar zona hambat yang ditimbulkan. Hal ini disebabkan oleh kadar senyawa aktif yang menghambat bakteri juga semakin meningkat seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak.

Ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi memiliki kemampuan menekan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* karena adanya pengaruh senyawa bioaktif atau metabolit sekunder. Daun mimba mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid/triterpenoid (Andhiarto, Andayani dan Ilmiyah, 2019), sedangkan pada daun legundi juga mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, steroid/triterpenoid yang berperan sebagai zat antibakteri (Marpaung dkk, 2020). Senyawa aktif tersebut dengan mekanisme masing-masing mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga mengakibatkan terbentuknya zona bening.

Husna dkk dalam Egra dkk, (2019) menyatakan bahwa cara kerja senyawa alkaloid sebagai antibakteri meliputi penggangguan bagian penyusun peptidoglika pada bakteri, hal ini mengakibatkan lapisan dinding sel gagal terbentuk dengan baik sehingga menyebabkan kematian sel.

Senyawa flavonoid memiliki kemampuan antibakteri dengan cara mencegah produksi membran sel bakteri yang mengakibatkan penggabungan rantai glikan,

pelemahan membran sel dan peptidoglikan, kemudian terjadi kerusakan yang dapat menyebabkan lisisnya dinding sel (Ode, Ramli dan Sahidin, 2019).

Efek antibakteri saponin yaitu melalui mekanisme penghambatan yang melibatkan pembentukan senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, hal ini mengakibatkan rusaknya sifat permeabilitas dinding sel bakteri dan menimbulkan kematian sel (Ernawati dan Sari, 2015).

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu dengan menargetkan dinding polipeptida sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel tidak sempurna yang menyebabkan sel menjadi lisis dan bakteri mengalami kematian. Tanin juga memiliki kemampuan untuk menghentikan kerja enzim bakteri dan menghalangi jalannya protein pada lapisan dalam sel (Sapara, Waworuntu dan Juliatri, 2016).

Kemampuan merusak sel bakteri dimiliki oleh zat steroid dan triterpenoid. Senyawa triterpenoid memiliki cara kerja dengan mengganggu membran sitoplasma sehingga pertumbuhan bakteri menjadi lambat atau mati, sedangkan senyawa steroid cenderung bersifat lipofilik yaitu dengan merusak membran sel pada bakteri (Ode, Ramli dan Sahidin, 2019).

3. Kategori zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Kekuatan daya hambat antibakteri menurut Davis dan Stout (1971) dalam Lestari, Ardiningsih dan Nurlina (2016) menyatakan bahwa kekuatan daya hambat antibakteri dapat dikategorikan menjadi 4 kelompok, yaitu kurang dari sama dengan 5 mm dikategorikan sebagai lemah, 5 hingga 10 mm dikategorikan sedang, 10 hingga 20 mm dikategorikan kuat, serta lebih dari sama dengan 20 mm

dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk pada Tabel 5, diketahui bahwa kemampuan menghambat ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi termasuk kedalam kategori lemah hingga sedang.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Andhiarto, Andayani dan Ilmiyah, (2019) menggunakan ekstrak tunggal daun mimba terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, mendapatkan hasil rerata diameter zona hambat dengan kategori sedang hingga kuat. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Suyasa dkk, (2022) mendapatkan hasil rerata diameter zona hambat daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kategori sedang.

Walaupun dalam penelitian ini didapatkan diameter zona hambat lebih kecil dibandingkan ekstrak tunggal daun tersebut, akan tetapi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi tetap mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Dilakukannya kombinasi kedua daun tersebut untuk dapat meminimalisir efek yang dapat ditimbulkan oleh salah satu bahan uji. Daun legundi mengandung *vitexicarpin* dan *vitexin* yang menyebabkan efek samping seperti jerawat, pruritis dan gatal-gatal (Wahyuni dkk, 2016), pada daun mimba mengandung senyawa *nimbin* dan *nimbidin* yang mempunyai efek anti inflamasi dan dapat mengurangi rasa gatal (Kumawat dan Kumar, 2018). Untuk itu diperlukan kombinasi dengan daun mimba yang dapat meminimalisir efek dari daun legundi sehingga dapat diaplikasikan secara topikal.

Faktor yang mempengaruhi perbedaan zona hambat yaitu toksisitas bahan uji, kemampuan dan kecepatan difusi bahan uji pada media, konsentrasi bahan uji, sensitivitas mikroorganisme terhadap zat uji dan kondisi lingkungan mikro *in vitro*. Selain itu faktor teknis juga dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri, diantaranya

suhu, komponen medium, konsentrasi zat antibakteri, ukuran dan kepekatan inokulum, ketebalan media, jarak antar cakram, lama inkubasi, spesies bakteri, serta aktivitas metabolik mikroorganisme (Candrasari, 2012). Astuti dkk, (2014) juga menyatakan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman pada umur dan tempat yang berbeda akan menghasilkan jumlah yang berbeda. Namun faktor-faktor tersebut telah dikondisikan sehingga tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap zona hambat yang dihasilkan dalam penelitian ini.

4. Perbedaan zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi dapat diketahui dengan menggunakan uji statistik. Untuk melihat apakah data berdistribusi normal atau tidak dilakukan dengan uji statistik *Kolmogorov Smirnov*. Didapatkan hasil yaitu nilai probabilitas (ρ) sebesar 0,200, jika dibandingkan dengan nilai α (0,05) maka nilai $\rho > \alpha$ ($0,200 > 0,05$) yang menandakan bahwa data tersebut berdistribusi normal.

Untuk mengetahui adanya perbedaan zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dapat diketahui dengan uji *One Way Anova*. Hasil uji statistik *One Way Anova* didapatkan hasil rerata ρ sebesar 0,000, jika dibandingkan dengan nilai α (0,05) maka nilai $\rho < \alpha$ ($0,000 < 0,05$), hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi.

Untuk mengetahui pada konsentrasi mana yang berbeda signifikan dan bermakna digunakan uji statistik *Least Significant Difference* (LSD), didapatkan hasil yaitu nilai probabilitas (ρ) sebesar 0,000, jika dibandingkan dengan nilai nilai α (0,05) maka nilai $\rho < \alpha$ (0,000 < 0,05), nilai tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai zona hambat yang bermakna pada masing-masing variasi konsentrasi.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa diantara masing-masing konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi 20, 40, 60, dan 80% memiliki perbedaan diameter zona hambat yang bermakna.