

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik objek penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah daun pegagan dan daun sirih cina. Daun pegagan dan daun sirih cina yang digunakan adalah daun yang segar berwarna hijau, tidak berlubang diperoleh dari daun kedua sampai keempat dari pucuk. Dalam proses pembuatan ekstrak, digunakan masing-masing sebanyak 1 kg daun segar. Selanjutnya, daun segar dikeringkan dengan metode oven pada suhu 50°C selama 24 jam dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk simplisia sebanyak 232,21 gram. Kemudian, ekstrak dibuat dengan merendam sebanyak 200 gram serbuk simplisia dalam 1500 ml etanol 96% dengan cara maserasi sebanyak 2 kali. Setelah proses pemakatan dengan evaporator diperoleh ekstrak pekat sebanyak 20,68 gram.

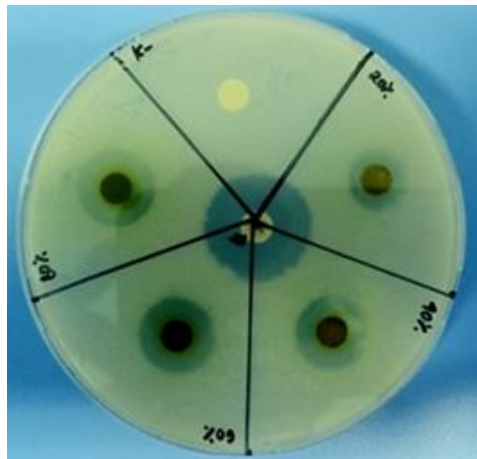


Gambar 7. (a) Daun pegagan (b) Daun sirih cina (c) Ekstrak pekat

Ekstrak hasil evaporasi merupakan sampel yang akan diujikan pada bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. Sampel ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina diujikan dalam berbagai konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80% yang diencerkan dengan pelarut etanol 96%.

2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

Uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dengan empat perlakuan yaitu konsentrasi 20, 40, 60, 80% dilakukan dengan enam kali pengulangan menggunakan metode difusi cakram. Kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling cakram sebagaimana disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Zona hambat ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina (Konsentrasi 20, 40, 60, 80% dan Kontrol kerja, K- (Kontrol negatif) terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

a. Kontrol kerja

Kontrol kerja yang digunakan dalam penelitian ini adalah kloramfenikol 30 μ g. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada kontrol kerja kloramfenikol dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5
Diameter Zona Hambat Pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada
Kontrol Kerja dan Kontrol Negatif

Kontrol	Diameter Zona Hambat (mm)						Rerata (mm)
	I	II	III	IV	V	VI	±SD
Kontrol Kerja (Kloramfenikol 30µg	14,25	14,75	14,25	14,75	14,25	13,75	14,3±0,37

Data pada Tabel 5, menunjukkan bahwa kloramfenikol 30µg mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan rerata diameter zona hambat sebesar 14,3mm±0,37.

b. Kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Berdasarkan hasil pengukuran diketahui bahwa kontrol negatif tidak dapat menghasilkan zona bening di sekeliling cakram. Dari hasil penelitian, diameter zona hambat yang ditimbulkan etanol 96% pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* adalah 0 mm pada semua pengulangan.

c. Diameter zona hambat kelompok perlakuan

Pada penelitian ini konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina yang digunakan adalah konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% dengan 6 kali pengulangan menggunakan metode difusi cakram *Kirby Bauer*. Hasil pengukuran diameter zona hambat masing-masing konsentrasi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6
Diameter Zona Hambat Berbagai Konsentrasi Ekstrak Kombinasi Daun Pegagan dan Daun Sirih Cina Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Konsentrasi (%)	Diameter Zona Hambat (mm)						Rerata(mm) ±SD
	I	II	III	IV	V	VI	
20	4,75	4	4.5	4,5	4,74	4	4,41±0,34
40	7,5	7	7	7,25	7,25	5,5	6,91±0,71
60	7,25	7,75	8	7,25	7,75	6,5	7,25±0,54
80	7,75	8	8,25	8	8,25	7,25	7,91±0,37

Berdasarkan data pada Tabel 6, diketahui bahwa ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai variasi konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar.

4. Kategori zona hambat pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

Kategori hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina berdasarkan kategori daya hambat zat antibakteri disajikan pada Tabel 6.

Tabel 7
Diameter Zona Hambat Ekstrak Kombinasi Daun Pegagan dan Daun Sirih Cina Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*

Konsentrasi (%)	Rerata Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
20	4,41	Lemah
40	6,91	Sedang
60	7,25	Sedang
80	7,91	Sedang

Berdasarkan data pada Tabel 6, diketahui bahwa daya hambat ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* memiliki rentang kategori lemah hingga sedang.

5. Analisis data

Hasil pengukuran diameter zona hambat pada penelitian ini, dianalisis dengan uji statistik menggunakan uji *Kolmogorov smirnov* (KS) untuk mengetahui distribusi data. Hasil uji *Kolmogorov Smirnov* (KS) yang diperoleh dalam penelitian ini adalah nilai *probabilitas* $p > \alpha$ ($0,128 > 0,05$) yang artinya data tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya data diuji dengan Uji *One Way Anova*. Pada uji ini, diperoleh hasil p ($0,000$) $< \alpha$ ($0,05$) kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji (*Least Significant Difference*) LSD, dalam uji ini diperoleh hasil $P(0,000) < \alpha$ ($0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai zona hambat yang bermakna pada masing-masing variasi konsentrasi.

B. Pembahasan

1. Ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina

Ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dibuat dengan cara merendam 1:1 serbuk simplisia daun pegagan dan daun sirih cina dalam 1500 mL etanol 96%. Sampel dibuat dalam bentuk serbuk untuk memperluas permukaan sehingga interaksi pelarut dengan senyawa yang akan diambil lebih efektif dan dapat terekstrak sempurna. Semakin kecil ukuran bahan yang digunakan maka semakin luas bidang kontak antara bahan dengan pelarut. Kondisi ini akan menyebabkan kecepatan untuk mencapai keseimbangan sistem menjadi lebih besar. Jaringan bahan atau simplisia dapat mempengaruhi efektivitas ekstraksi. Ukuran bahan yang sesuai akan menjadikan proses ekstraksi berlangsung dengan baik dan tidak memakan waktu yang lama (Ningsih dkk., 2019).

Senyawa-senyawa aktif yang ada dalam daun pegagan dan daun sirih cina dapat dipisahkan melalui proses yang disebut ekstraksi. Serbuk simplisia diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut. Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena selama perendaman terjadi peristiwa yang menyebabkan terjadi pemecahan dinding sel akibat perbedaan tekanan didalam dan diluar sel sehingga senyawa yang ada dalam sitoplasma akan terlarut kedalam pelarut organik dan proses ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang diinginkan (Ananta, Putra dan Arnata, 2021).

Metode maserasi memiliki kelebihan, yaitu bagian tanaman yang akan diekstraksi tidak harus dalam wujud serbuk yang halus, tidak diperlukan

keahlian khusus dan lebih sedikit kehilangan cairan penyaring (Nahor, Rumagit dan Tou, 2017). Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah etanol. Pemilihan pelarut pada proses maserasi didasarkan pada prinsip kelarutan “*like dissolve like*”, artinya senyawa polar hanya larut dalam pelarut polar, begitu juga sebaliknya untuk senyawa-senyawa semipolar dan non polar (Kemit, Widarta dan Nocianitri, 2010).

2. Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

a. Diameter zona hambat kontrol kerja

Kontrol kerja yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik Kloramfenikol 30µg. Antibiotik kloramfenikol merupakan bakteriostatik berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram positif maupun negatif (Rahmitasari dkk., 2020). Kloramfenikol memiliki efek bakteriostatik serta berspektrum luas yang sensitif terhadap bakteri gram positif baik yang bersifat aerob dan anaerob (Samputri, Toemon dan Widayati, 2020). Mekanisme kerja kloramfenikol adalah dengan menghambat sintesis protein, mencegah ujung aminoasil tRNA bergabung dengan peptidil tranferase yaitu enzim yang menghubungkan asamamino dengan rantai peptide selama proses sintesis protein (Kusumawati dkk., 2017).

Penggunaan kontrol kerja dalam penelitian ini bertujuan sebagai kontrol dalam proses bekerja pada saat melakukan penelitian dan digunakan untuk pengujian daya hambat bakteri yang akan digunakan dalam kondisi baik, isolat bakteri layak digunakan, dan ketepatan konsentrasi suspensi bakteri. Hal ini dapat diamati dan dinilai dengan melihat kemampuan antibiotik kloramfenikol dalam

menghambat pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat.

Diameter zona hambat yang ditentukan oleh NCCLS (*National Comitee for Clinical Laboratory Standards*) dikategorikan menjadi tiga yaitu sensitif, intermediet dan resisten. Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan rerata diameter zona hambat kloramfenikol yaitu 14,3 mm. Hasil tersebut bila dibandingkan dengan tabel NCCLS, maka zona hambat yang dihasilkan kontrol positif tersebut termasuk dalam kategori Intermediet (zona hambat ≥ 12 mm) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

b. Diameter zona hambat pada kontrol negatif

Dalam penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 96%. Pengujian dengan menggunakan etanol 96% sebagai kontrol negatif bertujuan untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan untuk uji memiliki pengaruh terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina. Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol negatif dalam penelitian ini adalah 0 mm. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi tidak mempengaruhi zona hambat yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi tersebut karena etanol 96% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Dapat dikatakan bahwa zona hambat yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi berasal dari zat aktif yang terkandung dalam ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina. Hasil 0 yang diperoleh disebabkan karena etanol memiliki konsentrasi tinggi yaitu 96% sehingga mudah menguap. Penelitian Ramadhan (2013) mengatakan bahwa kandungan alkohol saja tanpa ada campuran

air atau bahan lain, tidak efektif dalam membunuh bakteri dan hanya bersifat *short acting* dan tidak bersifat persisten. Menurut Marjoni, (2016) pilihan utama pelarut untuk maserasi adalah etanol karena memiliki keunggulan antara lain bersifat selektif, dapat menghambat pertumbuhan kapang dan kuman, bersifat non toksik (tidak beracun), bersifat netral, memiliki daya absorpsi yang baik, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit dan meminimalisir terlarutnya zat pengganggu seperti lemak.

Penelitian serupa yang menggunakan etanol 96% sebagai kontrol negatif, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Rifwerty, Sakti dan Dasuki (2018) tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi biji pare terhadap *Propionibacterium acnes*. Pada penelitian tersebut juga didapatkan hasil diameter zona hambat etanol 96% sebesar 0 mm atau tidak menimbulkan daya hambat.

c. Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada konsentrasi 20, 40, 60 dan 80%

Hasil penelitian pada Tabel 6, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka ukuran diameter zona hambat yang terbentuk akan semakin luas. Perbedaan diameter zona hambat yang dihasilkan antar konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terjadi karena perbedaan konsentrasi dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak terdapat komponen senyawa aktif yang dikandungnya sehingga akan menghasilkan peningkatan efektifitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan menghasilkan zona hambat yang semakin besar.

Aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina

pada bakteri *Propionibacterium acnes* diduga karena kandungan senyawa aktif dalam kedua daun tersebut. Widiastuti (2014) menyatakan bahwa aktivitas daun pegagan disebabkan oleh adanya kandungan fitokimia. Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun pegagan yaitu flavanoid, saponin, steroid, terpenoid, dan tanin (Hasyati dan Meilani, 2022). Sama halnya dengan daun pegagan, daun sirih cina juga memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa flavonoid yang bersifat bakteriostatik, diduga merusak dinding sel dari bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino. Senyawa yang terdapat dalam dinding bakteri ini akan bereaksi dengan gugus alkohol dari senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan menyebabkan senyawa ini akan bereaksi dengan DNA pada inti sel bakteri sehingga akan merusak struktur lipid dari DNA bakteri sehingga inti sel bakteri akan mengalami lisis (Sudrajat, Sadani and Sudiastuti, 2012).

Selanjutnya mekanisme kerja senyawa tanin sebagai antibakteri melalui pembentukan kompleks dengan enzim mikroba atau substrat, masuk melalui membran selnya (Karomah, 2019). Mekanisme kerja senyawa alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel (Dwicahyani dkk., 2018). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler

akan keluar. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk, selain itu tanin dapat membentuk ikatan hidrogen dengan protein yang mengakibatkan kemungkinan protein terendapkan, hal ini menyebabkan denaturasi protein. Jika protein dari bakteri terdenaturasi, dapat mengganggu metabolisme bakteri sehingga menyebabkan kerusakan sel bakteri (Nuria dkk., 2009). Mekanisme penghambatan senyawa terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri dan membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin mengakibatkan masuknya senyawa yang akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri akan kekurangan nutrisi dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Heni dkk., 2015).

3. Kategori zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

Berdasarkan kategori daya hambat oleh Davis dan Stout (1971) diklasifikasikan menjadi empat zona hambat yaitu <5 mm termasuk kategori daya hambat lemah, 5 – 10 mm termasuk kategori daya hambat sedang, 10 – 20 mm termasuk kategori daya hambat kuat dan >20 mm termasuk kategori daya hambat sangat kuat. Berdasarkan klasifikasi tersebut diameter zona hambat yang diamati pada Tabel 7, Diketahui bahwa kemampuan menghambat ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* termasuk dalam kategori lemah hingga sedang.

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Azzahra, dkk (2018) tentang uji

aktivitas ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urb*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan kategori sedang hingga kuat. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Mayefis, dkk (2020) tentang uji aktivitas antibakteri daun suruhan (*Peperomia pellucida L. Kunth*) terhadap *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan kategori kuat.

Dari kedua hasil penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak daun pegagan dan daun sirih cina mampu menghasilkan diameter zona hambat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang merupakan bakteri gram positif. Struktur sel bakteri gram positif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan target kerjanya berbeda dengan struktur bakteri gram negatif lebih kompleks dan memiliki tiga lapisan yaitu lipoprotein, peptidoglikan dan lipopolisakarida. Hal tersebut menyebabkan daya hambat yang lebih kuat akan terjadi pada bakteri gram positif. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Fitri dan Yasmin, 2011).

Meskipun daun pegagan memiliki aktivitas antibakteri yang kuat, akan tetapi daun pegagan berpotensi menyebabkan iritasi yang dapat menimbulkan rasa perih dikulit serta alergi pada orang-orang yang memiliki kulit sensitif (Sulastris, Indiaty dan Pandanwangi, 2017). Sehingga untuk meminimalisir terjadinya efek samping yang tidak diinginkan yaitu dengan mengkombinasikannya dengan ekstrak daun sirih cina. Karena daun sirih cina memiliki efek antiinflamasi yang

dapat mengurangi rasa gatal serta mengurangi peradangan pada kulit (Darma dkk., 2017). Penelitian ini memiliki kelemahan yaitu diameter zona hambat yang terbentuk tidak bisa menyamai atau melampaui penelitian sebelumnya karena menggunakan perbandingan yang sama. Sehingga diperlukan perbandingan daun yang lebih tinggi yaitu 2:1 agar didapatkan diameter zona hambat yang lebih besar.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah pH lingkungan, komposisi media, waktu kontak, populasi jenis mikroba yang akan dibinasakan, temperatur, dan konsentrasi zat antimikroba itu sendiri (Jawetz, Melnick and Adelberg, 1996; dan Cappucino, 1982). Pada penelitian ini variabel kontrol sudah dikondisikan. Selain itu faktor teknis juga dapat mempengaruhi aktifitas bakteri, antara lain komponen media, stabilitas obat, ukuran inokulum, lama inkubasi, aktivitas metabolik mikroorganisme kecepatan difusi bahan uji ke dalam media, kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan media, temperatur inkubasi, kepekatan inokulum, waktu pemasangan cakram, suhu inkubasi, waktu inkubasi, ukuran lempeng, ketebalan media agar, dan pengaturan jarak cakram antimikroba dan potensi cakram antimikroba (Andries, Gunawan, Supit, 2014 ; Kurniawan dan Aryana, 2015). 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 pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri propionibacterium acnes

Data diameter zona hambat ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih

cina pada berbagai konsentrasi uji dianalisis menggunakan uji statistika dengan bantuan perangkat lunak komputer.

Hasil uji *One Way Anova* nilai probabilitas $p (0,000) < \alpha (0,05)$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina. Selanjutnya, untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang bermakna antara masing-masing konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*). Pada uji ini didapatkan nilai $p (0,000) < \alpha (0,05)$ Nilai tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai zona hambat yang bermakna pada masing-masing variasi konsentrasi.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina 20, 40, 60 dan 80% memiliki perbedaan diameter zona hambat yang bermakna.

Perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada masing-masing konsentrasi disebabkan karena adanya kadar zat aktif yang berbeda-beda dari setiap konsentrasi yang dipengaruhi oleh seri pengenceran. Semakin banyak zat yang aktif yang dilarutkan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Apabila zat antimikroba semakin besar pada ekstrak, maka semakin banyak pula bakteri yang dapat dirusak, baik itu struktur tubuh maupun sistem metabolismenya sehingga bakteri dapat dihambat pertumbuhannya (Virgianti dan Purwati, 2015).