

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Kondisi Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada fasilitas laboratorium Poltekkes Kemenkes Denpasar yaitu Kimia Dasar jurusan Teknologi Laboratorium Medis yang meliputi proses maserasi dan evaporasi, laboratorium lain yang dipakai yaitu Laboratorium Mikrobiologi yang berada di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar yang juga mempunyai ruang pembuatan media dan ruang sterilisasi, pada laboratorium mikrobiologi dilakukan pengujian aktivitas antibakteri.

Pada laboratorium kimia dasar, terdapat peralatan *rotary evaporator* yang berfungsi untuk memisahkan etanol dari zat aktif dalam maserat dengan menguapkan pelarutnya, sehingga menghasilkan ekstrak pekat dari tanaman pegagan. Sedangkan di laboratorium mikrobiologi, tersedia bermacam peralatan seperti *Biosafety Cabinet*, *autoclaf*, *inkubator*, *Mc Farland Densitometer*, serta peralatan gelas lainnya. Selain itu, tersedia bahan-bahan media pertumbuhan bakteri seperti *Mueller Hinton Agar*, *Nutrient Agar*, cakram kosong, dan cakram antibiotik untuk kultur bakteri dan pengujian aktivitas antibakteri.

2. Karakterisasi Obyek Penelitian

a. Tanaman pegagan dan ekstrak etanol pegagan

Sampel tanaman pegagan didapatkan dari perkebunan yang terletak di kawasan Banjar Kawan, Bangli. Tanaman pegagan berkelompok pada tanaman liar di sekeliling kawasan perkebunan. Jumlah sampel tanaman pegagan yang didapatkan dan sudah melalui sistem penyortiran sekitar 1,5 kg. Sampel yang sudah

disortir kemudian menjalani proses pengeringan selama tujuh hari hingga mendapatkan sampel kering. Tahap berikutnya merupakan penyortiran kering dan penggilingan sampel kering hingga mendapatkan simplisia berbentuk serbuk halus. Berat pada simplisia yang didapatkan sesudah pada tahap ini sebanyak 480 g.

Simplisia yang didapatkan diekstrak dengan teknik maserasi pada pelarut etanol 96% pada perbandingan 1:5. Maserat yang didapatkan pada tahap ini dievaporasi untuk didapatkan ekstrak etanol yang pekat. Berat ekstrak pekat yang dihasilkan sebesar 47 g.



Gambar 7 Tanaman pegagan dan Ekstrak pekat

b. Peremajaan bakteri dan pengamatan bakteri

Propionibacterium acnes ATCC 11827, bakteri gram positif dari Pusat Laboratorium Kesehatan Surabaya, berperan sebagai bakteri uji penelitian ini. Bakteri tersebut diinokulasi memakai media NA (*Nutrient Agar*). Sesudah bakteri diinokulasi pada media NA, bakteri diinkubasi memakai 16 hingga 18 jam pada suhu 37°C dalam toples anaerobik dalam kondisi anaerobik. Hasil inkubasi menunjukkan pertumbuhan bakteri optimal pada lingkungan anaerobik. lalu, dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis pada bakteri *Propionibacterium acnes*.

Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan jika koloni tersebut mempunyai bentuk bulat, warna putih, yang memiliki permukaan halus, konsistensi padat, dan opak. Sementara itu, dilakukan pemeriksaan mikroskopis pada metode pewarnaan gram, dilanjutkan dengan pengamatan pada mikroskop memakai pembesaran 100x. Hasil dari pengamatan mikroskopis menunjukkan jika bakteri mempunyai bentuk batang, dan penyusun sel yang tidak teratur, dengan warna ungu sesudah pewarnaan gram.

3. Diameter Zona Hambat

Dalam penelitian yang telah dilaksanakan, didapatkan data hasil dari uji daya hambat antibakteri ekstrak etanol pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. 5, 25, 50, dan 75% merupakan rangkaian seri konsentrasi ekstrak yang dipakai. Data hasil ukuran daya hambat ekstrak etanol pegagan kepada bakteri *Propionibacterium acnes* disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5
Hasil Diamter Zona Hambat

Pengulangan	Diameter zona hambat kontrol (mm)		Diameter zona hambat tiap konsentrasi ekstrak (mm)			
	Kontrol negatif	Kontrol positif	5%	25%	50%	75%
I	0	23.84	8.74	9.68	11.54	13.10
II	0	24.00	9.84	9.90	12.22	12.38
III	0	22.38	9.84	9.90	10.84	12.58
IV	0	22.76	8.74	10.12	11.72	12.88
V	0	22.74	9.52	9.94	12.34	13.54
VI	0	23.82	8.66	8.98	11.50	11.90
Rerata	0	23,25	9,22	9,75	11,69	12,73

a. Diameter zona hambat antibiotik kloramfenikol

Pada uji daya hambat antibakteri, Cakram antibiotik kloramfenikol 30µg berfungsi sebagai kontrol positif. Dilakukan Enam kali pengulangan tes sensitivitas

antibiotik ini dan didapatkan diameter rata-rata zona hambat yang dibentuk oleh cakram antibiotik yaitu 23,25 mm.

b. Diameter zona hambat Etanol 96%

Dalam penelitian ini, Etanol 96% dipakai pada kontrol negatif. Kontrol ini diulang sebanyak enam kali. Didasarkan hasil pengukuran, rata-rata diameter zona hambat yang dibentuk merupakan 0 mm.

c. Diameter zona hambat konsentrasi ekstrak 5, 25, 50 dan 75%

Pada penelitian ini, variasi konsentrasi ekstrak sebesar 5%, 25%, 50%, dan 75% dipakai sebagai kelompok eksperimen untuk menguji daya hambat kepada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Variasi konsentrasi ini dipilih agar membantu peneliti menentukan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Setiap kelompok diuji sebanyak enam kali. Didasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat, rata-rata hasil yang didapatkan untuk konsentrasi ekstrak 5% sebesar 9,22 mm; untuk konsentrasi ekstrak 25% sebesar 9,75 mm; untuk konsentrasi ekstrak 50% sebesar 11,69 mm; dan untuk konsentrasi ekstrak 75% sebesar 12,73 mm.

4. Hasil Analisis Data

Diameter zona hambat yang diukur di penelitian ini dianalisis memakai uji statistik pada bantuan perangkat lunak komputer. Hasil dari uji statistik tersebut yaitu:

a. Uji normalitas

Langkah yang paling utama yang dibuat merupakan menguji normalitas data memakai uji *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil uji ini ditunjukkan di Lampiran 1, di

mana semua data mempunyai nilai $p > 0,05$. Oleh karena itu, dapat disimpulkan jika data diameter zona hambat terdistribusi normal.

b. Uji beda diameter zona hambat di variasi konsentrasi ekstrak

Dikarenakan data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji One Way ANOVA untuk menganalisis perbedaan zona hambat di bermacam konsentrasi ekstrak pegagan. Hasil uji One Way ANOVA menunjukkan nilai $p < \alpha$ ($0,000 < 0,05$), yang mengindikasikan adanya perbedaan signifikan pada diameter zona hambat pada bakteri *Propionibacterium acnes* di antara variasi ekstrak etanol pegagan.

c. Uji beda diameter zona hambat di antara kontrol dengan variasi konsentrasi ekstrak

Berikutnya dilakukan uji pembeda diameter zona hambat di antara kontrol dan setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol pegagan memakai uji *Least Significant Difference*. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,000$ ($p < \alpha$ ($0,05$)) untuk pengujian kontrol negatif di setiap variasi konsentrasi, yang berarti ada pembeda signifikan di antara diameter zona hambat kontrol negatif dengan konsentrasi 5%, 25%, 50%, dan 75%. Begitu pula, nilai $p = 0,000$ ($p < \alpha$ ($0,05$)) didapatkan untuk kontrol positif dengan konsentrasi 5%, 25%, 50%, dan 75%, yang menandakan adanya pembeda signifikan di antara diameter zona hambat kontrol positif dan konsentrasi tersebut.

d. Uji beda diameter zona hambat antar variasi konsentrasi

Langkah berikutnya, dilakukan uji pembeda diameter zona hambat antar bermacam konsentrasi ekstrak etanol pegagan memakai uji *Least Significant Difference*. Hasil uji, yang dapat dilihat pada Lampiran 1, menunjukkan nilai signifikansi $p < \alpha$ ($0,05$), yang berarti ada pembeda signifikan diantara diameter

zona hambat pada setiap variasi konsentrasi. Nilai $p < \alpha$ (0,05) didapatkan untuk konsentrasi 5% kepada konsentrasi 50% dan 75%; konsentrasi 25% kepada konsentrasi 50% dan 75%; konsentrasi 50% kepada konsentrasi 5%, 25%, dan 75%; serta konsentrasi 75% kepada konsentrasi 5%, 25%, dan 50%. Namun, untuk konsentrasi 5% kepada 25%, serta konsentrasi 25% kepada 5%, nilai $p > \alpha$ (0,05), menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan di antara diameter zona hambat pada variasi konsentrasi tersebut.

B. Pembahasan

1. Tanaman pegagan dan ekstrak etanol pegagan

Tanaman pegagan yang dipakai sebagai sampel penelitian berasal dari perkebunan di Banjar Kawan, Bangli. Bahan tanaman yang dipakai dalam proses ekstraksi meliputi batang dan daun. Proses pembuatan simplisia dibagi menjadi beberapa bagian, yaitu sortasi basah, pengeringan, sortasi kering, dan penghalusan. Sebelum dikeringkan, sampel yang sudah di sortasi diangin-anginkan dan diiris. Untuk menjaga kualitas simplisia, tanaman diangin-anginkan di ruang terbuka yang jauh dari sinar matahari langsung, sehingga dapat mengurangi kadar air dan menghambat aktivitas enzim.

Tahap berikutnya merupakan penghalusan, bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga mengoptimalkan ekstraksi senyawa oleh pelarut. Simplisia kemudian diekstraksi memakai metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, memakai perbandingan sampel dan pelarut 1:5. Metode maserasi dipilih karena tidak memerlukan pemanasan, sehingga senyawa aktif yang termolabil terjaga dari kerusakan. Metode ini juga sederhana dan terjangkau, meskipun memerlukan waktu yang cukup lama untuk memisahkan senyawa dari simplisia.

Tahap terakhir untuk mendapatkan ekstrak pekat merupakan penguapan vakum atau evaporasi, yang dilakukan dengan menurunkan tekanan untuk menurunkan titik didih pelarut.

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

a. Diameter zona hambat kontrol positif

Antibiotik Kloramfenikol 30µg digunakan sebagai kontrol positif dalam percobaan ini. Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang dapat membunuh bakteri gram positif dan gram negatif (Dwi Rahmitasari dkk., 2020). Kloramfenikol merupakan obat bakteristatik yang efektif melawan bakteri gram positif aerob dan anaerob. Kloramfenikol menghambat sintesis protein dengan cara mencegah ujung aminoasil dari T-RNA berinteraksi dengan peptidil transferase, yang mengubah asam amino menjadi rantai peptida memakai sintesis protein (Kusumawati dkk., 2017).

Tujuan dari kontrol positif pada penelitian ini merupakan untuk mengatur proses kerja saat melakukan penelitian, dan dipakai untuk menilai daya hambat bakteri yang akan dipakai dalam kondisi prima, kesesuaian isolat bakteri, dan ketepatan konsentrasi suspensi bakteri. Hal ini dapat diselidiki dan dievaluasi dengan melihat kemampuan antibiotik kloramfenikol dalam menekan pertumbuhan bakteri uji, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat. Hasil pengukuran menunjukkan jika zona hambat kloramfenikol mempunyai diameter rata-rata 23,25 mm.

CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) mendefinisikan zona hambat kloramfenikol sebagai sensitif (>18 mm), moderat (13-17 mm), atau

resisten (<12 mm). Jika hasil ini dibandingkan, zona hambat kontrol positif berada di kisaran sensitif (>18 mm) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

b. Diameter zona hambat pada kontrol negatif

Pada penelitian ini dipakai etanol 96% sebagai kontrol negatif. Tujuan pengujian dengan etanol 96% sebagai kontrol negatif merupakan agar memberitahu apakah pelarut yang dipakai dalam pengujian memberikan pengaruh diameter zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi ekstrak etanol pegagan. Diameter zona hambat kontrol negatif pada penelitian ini diukur dan didapatkan hasil sebesar 0 mm. Hal ini menggambarkan jika konsentrasi pelarut tidak berpengaruh kepada zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi karena etanol 96% tidak mempunyai aktivitas antibakteri kepada bakteri uji.

Tidak ditemukannya daya hambat bakteri disebabkan oleh konsentrasi etanol yang tinggi (96%), yang mudah menguap. Menurut penelitian (Ramadhan dkk., 2015), alkohol saja tidak efektif untuk membunuh bakteri karena sifatnya yang singkat dan tidak bertahan lama. Menurut (Marjoni, 2016), etanol merupakan pelarut yang direkomendasikan untuk maserasi karena bersifat selektif, menghambat pertumbuhan kapang dan kuman, tidak beracun (non-toxic), netral, mempunyai kemampuan absorpsi yang baik, membutuhkan lebih sedikit panas untuk pemekatan, dan memperlambat pelarutan komponen yang mengganggu seperti lemak.

Demikian pula, Riferty (2018) menguji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi biji pare kepada *Propionibacterium acnes* dengan memakai etanol 96%

sebagai kontrol negatif. Dalam penelitian ini, zona hambat etanol 96% berdiameter 0 mm, yang menunjukkan jika etanol tidak menghambat.

c. Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada konsentrasi 5, 25, 50 dan 75%

Hasil penelitian yang tercantum dalam Tabel 5 menunjukkan jika semakin tinggi konsentrasi yang diterapkan, semakin luas pula diameter zona hambat yang terbentuk. Perbedaan dalam diameter zona hambat antar konsentrasi ekstrak pegagan disebabkan oleh variasi dalam tingkat konsentrasi, di mana semakin tinggi konsentrasi, semakin besar pula diameter zona hambat yang dihasilkan. Konsentrasi yang lebih tinggi cenderung mengandung lebih banyak komponen senyawa aktif, yang meningkatkan efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan menghasilkan zona hambat yang lebih besar. Aktivitas antibakteri ekstrak pegagan kepada bakteri *Propionibacterium acnes* diyakini disebabkan oleh kandungan senyawa aktif dalam tanaman tersebut. (Widiastuti dkk., 2017) menyatakan jika aktivitas pegagan disebabkan oleh keberadaan fitokimia di dalamnya.

Pegagan mengandung bermacam macam senyawa fitokimia seperti flavonoid, saponin, steroid, terpenoid, dan tanin (Hasyati & Meilani, 2022). Flavonoid, sebagai contoh diketahui mempunyai sifat bakteriostatik yang diyakini merusak dinding sel bakteri yang terdiri dari lipid dan asam amino. Selain itu, senyawa ini juga diketahui bereaksi dengan DNA bakteri, mengakibatkan kerusakan pada struktur lipidnya dan menyebabkan lisis sel bakteri. Tanin, di sisi lain, dikenal bekerja sebagai antibakteri dengan membentuk kompleks dengan enzim atau substrat mikroba, dan dapat menembus membran sel bakteri. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri melibatkan penurunan tegangan

permukaan, yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas sel dan lepasnya senyawa intraseluler. Senyawa tanin juga dapat menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase, serta membentuk ikatan hidrogen dengan protein, yang dapat menyebabkan denaturasi protein dan mengganggu metabolisme bakteri. Terpenoid, pada gilirannya, diketahui bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat, dan akhirnya merusak porin tersebut. Hal ini mengakibatkan penurunan permeabilitas dinding sel bakteri dan kekurangan nutrisi yang menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri (Heni & Zaharah, 2015)

d. Kategori zona hambat bermacam konsentrasi ekstrak pegagan kepada pertumbuhan *Propionibacterium acnes*

Didasarkan kategori daya hambat oleh Davis dan Stout (1971) dalam Ifora dkk, (2022) diklasifikasikan menjadi empat zona hambat yaitu <5 mm kategori lemah, 5-<10 mm kategori sedang, 10-20 mm kategori kuat dan >20 mm termasuk kategori daya hambat sangat kuat. Didasarkan klasifikasi tersebut diameter zona hambat yang diamati pada Tabel 6

Tabel 6
Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Pegagan Kepada
Bakteri *Propionibacterium acnes*

Konsentrasi (%)	Rerata Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
5%	9,22	Sedang
25%	9,75	Sedang
50%	11,69	Kuat
75%	12,73	Kuat

Tabel 6 menunjukkan jika ekstrak etanol pegagan mempunyai efek penghambatan sedang hingga kuat kepada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium*

acnes. Penelitian sebelumnya oleh (Fadhillah Azzahra, 2018) mengenai uji aktivitas ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urb*) kepada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* menemukan jika ekstrak daun pegagan dapat menghambat perkembangan bakteri *Streptococcus mutans* pada rentang sedang hingga kuat.

(Yufiradani dkk., 2020) melakukan penelitian serupa mengenai aktivitas antibakteri daun suruhan (*Peperomia pellucida L. Kunth*) kepada *Propionibacterium acnes*, bakteri penyebab jerawat, dan menyimpulkan jika daun suruhan mempunyai efek penghambatan yang tinggi kepada perkembangan *Propionibacterium acnes*. Kedua penelitian tersebut menemukan jika ekstrak pegagan dapat membentuk zona hambat dengan diameter yang cukup besar sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Propionibacterium acnes*. Bakteri gram positif mempunyai struktur sel yang lebih sederhana sehingga memungkinkan agen antibakteri untuk masuk dan mencapai targetnya, namun bakteri gram negatif mempunyai struktur yang lebih kompleks dengan tiga lapisan yaitu lipoprotein, peptidoglikan, dan lipopolisakarida. Hal ini menghasilkan peningkatan daya hambat terhadap bakteri gram positif. Bakteri gram positif mempunyai dinding sel yang kaya peptidoglikan, sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel yang kaya lipid. (Sulastri dkk., 2017).

Perbedaan zona hambat bermacam konsentrasi ekstrak etanol pegagan kepada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

Data diameter zona hambat ekstrak etanol pegagan di bermacam konsentrasi uji analisis memakai uji statistika pada bantuan perangkat lunak komputer. Hasil *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p < \alpha$ ($0,000 < 0,05$) yang berarti jika adanya perbedaan pada nilai diameter zona hambat pertumbuhan

bakteri *Propionibacterium acnes* di bermacam variasi konsentrasi pada ekstrak etanol pegagan dengan nilai probabilitas (p) ($0,000$) $<$ yang lebih kecil dari tingkat signifikansi (α) sebesar $0,05$. Lalu, agar memberitahu perbedaan yang signifikan di antara setiap konsentrasi ekstrak etanol pegagan, dibuat uji *Least Significant Difference*. Hasil uji bisa di lihat di lampiran 1, didapatkan nilai signifikansi $p < \alpha$ ($0,05$), yang berarti adanya perbedaan yang signifikan di antara diameter zona hambat di setiap variasi konsentrasi. Hasil ini menegaskan adanya perbedaan signifikan dalam nilai zona hambat pada setiap variasi konsentrasi.

Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan jika ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi 5%, 25%, 50% dan 75% menunjukkan perbedaan signifikan dalam diameter zona hambat. Perbedaan tersebut dalam diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* di setiap konsentrasi disebabkan oleh perbedaan kadar zat aktif yang ada dalam masing-masing konsentrasi, yang memberikan pengaruh pada proses diencerkannya. Jika tinggi konsentrasi zat aktif yang larut, maka akan besar pula diameter zona hambatan yang dibentuk. Kehadiran zat antimikroba yang lebih tinggi dalam ekstrak dapat menyebabkan kerusakan yang lebih besar pada struktur tubuh dan sistem metabolisme bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri dapat dihambat secara efektif (Virgianti, 2015).

Faktor-faktor yang memberikan pengaruh aktivitas antibakteri merupakan pH lingkungan, pengkomposisian media, populasi jenis bakteri yang akan dibinasakan, temperatur, serta konsentrasi zat antimikroba (Cappuccino, 2017). Di penelitian ini variabel kontrol telah dikondisikan. Namun faktor teknis juga bisa mempengaruhi aktivitas bakteri, di antaranya komponen pada media, stabilitas obat, pengukuran inokulum, lama masa inkubasi, kegiatan metabolik pada

mikroorganisme, cepatnya difusi suatu bahan pada uji di dalam suatu media, kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi di antara bahan aktif pada suatu media, temperatur masa inkubasi, kepekatan pada inokulum, waktu memasang cakram, suhu menginkubasikan, lama waktu inkubasi, ukuran suatu lempeng, tebalnya media agar, serta mengatur jarak cakram antimikroba. tetapi, faktor –faktor itu sudah dikondisikan hingga tidak bisa memberi dampak yang signifikan kepada zona hambatan yang ada pada penelitian ini.