

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik objek penelitian

Objek pada penelitian ini adalah daun pepaya dan daun jambu biji yang memenuhi kriteria yang telah ditetapkan. Pada penelitian ini, terdapat beberapa macam ekstrak yang akan diuji, diantaranya ekstrak daun pepaya, ekstrak daun jambu biji, serta ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji dengan perbandingan 1:1, 1:2, 2:1. Dalam proses pembuatan ekstrak, berat basah daun segar yang digunakan masing-masing adalah sebanyak 3 kg. Kemudian dilakukan pengeringan dan penghalusan sehingga didapatkan serbuk simplisia daun pepaya sebanyak 303,134 gram dan simplisia daun jambu biji sebanyak 307,253 gram. Selanjutnya dilakukan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 hari dengan 1 kali remaserasi. Selanjutnya maserat dipekatkan dengan metode evaporasi, sehingga diperoleh ekstrak pekat yang disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4
Massa Ekstrak Pekat Tiap Perlakuan

Ekstrak	Massa Ekstrak Pekat (g)
Ekstrak daun pepaya	13,873
Ekstrak daun jambu biji	8,144
1:1	10,874
1:2	9,656
2:1	11,669

Bakteri uji pada penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli*.

2. Pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

a. Diameter zona hambat kontrol kerja

Dalam penelitian ini, kloramfenikol digunakan sebagai kontrol kerja. Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat, kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan rerata diameter zona hambat sebesar $34,35\text{mm} \pm 0,54$.

b. Kontrol negatif (etanol 96%)

Kontrol negatif pada penelitian ini adalah etanol 96%. Tujuannya adalah untuk mengetahui sterilisasi pelarut yang digunakan dalam proses maserasi. Dalam penelitian ini, tidak terdapat zona hambat oleh etanol 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (0 mm).

c. Diameter dan katogeri zona hambat tiap perlakuan

Pada penelitian ini, terdapat beberapa macam ekstrak yang digunakan yaitu ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji dengan perbandingan 1:1, 1:2, 2:1 dengan lima kali pengulangan menggunakan metode difusi sumuran. Hasil pengukuran diameter dan kategori zona hambat masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5

Diameter Zona Hambat Ekstrak Tunggal dan Kombinasi Daun Pepaya dan Daun Jambu Biji Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*

Perlakuan	Rerata Diameter Zona Hambat (mm) ±SD	Kategori zona hambat
Ekstrak tunggal daun pepaya	11,21±1,09	Kuat
Ekstrak tunggal daun jambu biji	10,69±0,38	Kuat
1:1	6,95±0,50	Sedang
2:1	7,10±0,22	Sedang
1:2	11,65±3,63	Kuat

Berdasarkan data pada Tabel 5, dapat dilihat bahwa ekstrak tunggal maupun ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan kategori sedang hingga kuat.

3. Efektivitas antibakteri ekstrak tunggal dan kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Efektivitas antibakteri diperoleh dengan membandingkan diameter zona hambat ekstrak uji dengan diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol kemudian dikalikan 100%. Efektivitas antibakteri tiap perlakuan disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6

Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tunggal dan Kombinasi Daun Pepaya dan Daun Jambu Biji Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*

Perlakuan	Efektivitas Antibakteri (%)
Ekstrak tunggal daun pepaya	32,63%
Ekstrak tunggal daun jambu biji	31,12%
1:1	20,23%
2:1	22,47%
1:2	33,91%

Berdasarkan data pada Tabel 6, dapat dilihat bahwa tiap perlakuan memiliki efektivitas dengan rentang nilai 20,23% – 33,91% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dibanding dengan kontrol positifnya.

4. Analisis Data

Pada penelitian ini, diameter zona hambat dianalisis dengan uji statistik menggunakan uji *Kolmogorov smirnov* (KS) untuk mengetahui distribusi data. Hasil uji dengan *Kolmogorov smirnov* didapatkan nilai $p > \alpha$ ($0,200 > 0,05$) yang berarti data berdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) yang dimana dalam uji ini pada diameter zona hambat antara masing-masing ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:2 memiliki perbedaan yang tidak signifikan, serta pada ekstrak kombinasi antara perbandingan 1:1 dan 2:1 juga memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > \alpha$ ($0,05$). Namun, antara diameter zona hambat dari masing-masing ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi perbandingan 1:2 memiliki perbedaan yang signifikan dengan ekstrak kombinasi pada perbandingan 1:1 dan 2:1 dengan nilai $p < \alpha$ ($0,05$).

B. Pembahasan

1. Ekstrak tunggal dan kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji

Daun pepaya dan daun jambu biji yang digunakan berupa daun segar berwarna hijau. Pemilihan daun muda segar didasarkan pada kandungan bioaktif yang terkandung di dalamnya. Pada daun muda memiliki potensi yang lebih tinggi dari daun tua serta memiliki senyawa polifenol yang lebih tinggi dibandingkan daun tua. Kandungan senyawa aktif akan terus berkurang seiring dengan penuaan daun (Wenas dkk, 2023). Proses pembuatan ekstrak tunggal maupun kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji dilakukan menggunakan metode maserasi dengan merendam simplisia ke dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:7. Simplisia dibuat dalam bentuk serbuk dengan tujuan agar memperluas permukaan yang berinteraksi dengan pelarut, sehingga dapat meningkatkan jumlah senyawa yang tertarik pada saat proses ekstraksi (Sapitri & Marpaung., 2023). Agar proses penyarian lebih maksimal maka dilakukan remaserasi. Pada penelitian ini proses remaserasi dilakukan 1 kali. Tujuan dari remaserasi adalah agar senyawa kimia yang terdapat dalam simplisia terekstrak secara menyeluruh (Mengko dkk., 2022).

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut. Etanol 96% digunakan sebagai pelarut karena mampu melarutkan berbagai kandungan senyawa aktif yang terdapat pada simplisia baik yang bersifat polar maupun nonpolar serta kandungan airnya sedikit (Maulidah dkk., 2023). Penggunaan pelarut berlandaskan pada prinsip "*like dissolved like*" yang berarti senyawa polar akan larut pada pelarut polar. Keunggulan metode maserasi adalah kandungan zat aktif dalam simplisia dijamin tidak rusak. Pada proses perendaman simplisia, tekanan yang berbeda pada bagian dalam dan luar sel mengakibatkan

pecahnya dinding dan membran sel, sehingga senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sitoplasma pecah kemudian larut dalam pelarut yang digunakan (Chairunnisa dkk., 2019).

Setelah proses maserasi, dilanjutkan dengan proses evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator*. Hal tersebut bertujuan untuk menguapkan pelarut di bawah titik didih sehingga ekstrak tidak rusak akibat suhu tinggi, serta menghilangkan sisa-sisa pelarut pada ekstrak sehingga memperoleh ekstrak pekat (Sapitri & Marpaung, 2023).

2. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

a. Diameter zona hambat kontrol kerja

Penelitian ini menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol kerja. Tujuan adanya kontrol kerja yaitu sebagai pembanding diameter zona hambat yang terbentuk. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol kerja karena memiliki kemampuan bakteristatik dengan spektrum yang luas serta aktif terhadap mikroorganisme aerobik maupun anaerobik, baik bakteri gram negatif maupun gram positif (Mengko dkk., 2022). Kloramfenikol menghambat pertumbuhan bakteri dengan memasuki sub unit 50S ribosom, sehingga mengakibatkan sintesis protein terganggu bahkan tidak berlangsung. Antibiotik dengan sistem kerja mengganggu sintesis protein mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi (Ayen & Rahmawati, 2017).

Diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kloramfenikol pada penelitian ini sebesar 34,35 mm. Berdasarkan standar *Clinical and Laboratory Standar Institut*, dikatakan sensitif jika mampu menghambat bakteri dengan baik dan terbentuknya zona hambat pada pengujian dengan MHA. Sedangkan tergolong intermediet jika

dapat menghambat bakteri namun dengan daya hambat yang lemah. Kloramfenikol pada penelitian ini memiliki tingkat sensitivitas yang sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standar Institut* (CLSI) yaitu ≥ 20 mm (Admi dkk., 2021). Daya hambat yang dihasilkan kloramfenikol pada penelitian ini sensitif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan etanol 96%, menyesuaikan dengan pelarut yang digunakan pada pembuatan ekstrak yang bertujuan untuk memastikan bahwa pelarut yang digunakan tidak berpengaruh terhadap kandungan ekstrak. Etanol 96% sebagai kontrol negatif pada penelitian ini tidak menimbulkan zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hasil pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan oleh etanol 96% terhadap *Escherichia coli* sebesar 0 mm. Hal tersebut menandakan bahwa etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut tidak mempengaruhi hasil uji efektivitas antibakteri, sehingga kemampuan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan bakteri tidak terpengaruh oleh jenis pelarut yang digunakan, melainkan karena komponen senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak tersebut.

Penggunaan etanol 96% umum digunakan sebagai pelarut karena bersifat polar, selektif dan tidak toksik, mudah diperoleh, memiliki absorbansi yang baik, serta kemampuan penyariannya tinggi, sehingga mampu menarik senyawa non polar, semi polar dan polar. Etanol dengan konsentrasi 96% sebagai pelarut lebih mudah menembus dinding sel sampel dibandingkan etanol dengan konsentrasi lebih rendah (Wendersteyt dkk., 2021). Etanol 96% tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Niah dkk., (2019) yang menyatakan

bahwa etanol 96% tidak menunjukkan adanya zona hambat, karena etanol dengan konsentrasi diatas 90% atau dibawah 50% kurang efektif bahkan tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Niah dkk., 2019). Hal ini menegaskan bahwa tidak terdapat pengaruh etanol 96% terhadap daya hambat yang dihasilkan oleh ekstrak uji dimana pembuatan ekstrak uji tersebut menggunakan etanol 96%.

c. Diameter dan kategori zona hambat tiap perlakuan

Uji efektivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran, dengan 5 perlakuan yaitu ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, serta ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 5, ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji baik secara tunggal maupun kombinasi berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut dilihat dari zona bening yang terbentuk disekitar sumuran yang berisi ekstrak uji. Hasil uji efektivitas ekstrak tunggal menunjukkan bahwa zona hambat ekstrak daun pepaya lebih luas daripada ekstrak daun jambu biji. Sedangkan hasil uji efektivitas ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:2 memiliki zona hambat yang lebih luas dibandingkan dengan ekstrak kombinasi perbandingan 1:1 dan 2:1. Selanjutnya antara ekstrak tunggal dan kombinasi, ekstrak dengan perbandingan 1:2 menghasilkan zona hambat lebih luas daripada masing-masing ekstrak tunggal.

Berdasarkan hasil pada Tabel 5, diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji baik tunggal maupun kombinasi dikategorikan sedang hingga kuat. Hal tersebut didasarkan pada pendapat Davis dan Stout (1971) yang menyatakan bahwa pengkategorian daya antibakteri suatu senyawa di kelompokkan menjadi 4 yaitu dikategorikan lemah apabila diameter

zona hambat <5 mm, sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm) dan sangat kuat (>20 mm) (Rastina dkk., 2015).

Penggunaan kombinasi dua bahan dapat memicu terjadinya interaksi seperti sinergis dan antagonis. Efek sinergis terjadi ketika dua atau lebih komponen kimia yang mempunyai potensi serupa saling meningkatkan hasilnya ketika digabungkan. Senyawa aktif berbeda pada masing-masing ekstrak akan berinteraksi, saling menguatkan, dan memperoleh efek sinergis sehingga kemampuan antibakteri yang dihasilkan menjadi lebih baik. Efek sinergis merupakan efek dari ekstrak kombinasi yang menghasilkan zona hambat yang lebih luas dibandingkan dengan zona hambat dari masing-masing ekstrak tunggal (Niswah dkk., 2023). Sedangkan efek antagonis merupakan interaksi kombinasi ekstrak dimana luas zona hambat ekstrak kombinasi lebih kecil daripada ekstrak tunggal. Efek antagonis dapat timbul karena senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak kombinasi mempunyai sifat yang berbeda (bakteriostatik dan bakterisidal). Senyawa bioaktif yang bersifat bakterisidal akan bekerja pada bakteri yang aktif bermultiplikasi sehingga mampu membunuh bakteri dan senyawa bioaktif yang bersifat bakteriostatik akan mencegah multiplikasi tersebut sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat (Susanti & Asri, 2024). Selain itu, efek antagonis reseptor terjadi ketika suatu senyawa kimia inaktif yang serupa dengan agonis bersaing menempati bagian aktif reseptor, sehingga efek yang diinginkan tidak terjadi (Sambou, 2017).

Berdasarkan penelitian oleh Girsang dkk., (2020) menyatakan bahwa ekstrak daun jambu biji memiliki senyawa aktif seperti kuersetin, kuinon, polifenolat, alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid yang berperan sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri salah satunya *Escherichia coli*. *Quercetin* berupa

senyawa turunan flavonoid merupakan zat yang paling efektif dalam daun jambu biji untuk mengatasi diare (Ujan dkk., 2019). Pada daun pepaya, berdasarkan penelitian dari Nor dkk., (2018) menyatakan bahwa daun pepaya juga mengandung zat antibakteri seperti saponin, alkaloid, tanin, dan flavonoid. Penelitian lain juga menyatakan bahwa daun pepaya mempunyai zat aktif berupa alkaloid karpain, steroid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Senyawa yang berperan aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ialah *tocophenol* dari golongan fenol dan *alkaloid karpain* dari golongan senyawa alkaloid (Tuntun, 2016).

Kandungan tanin pada ekstrak juga mampu mengikat sejumlah senyawa aktif, sehingga sulit diabsorpsi dan menyebabkan keefektifan dari senyawa aktif lain kurang optimal karena jumlah yang dapat diabsorpsi terbatas (Sambou, 2017). Ledoh dan Irianto menyatakan bahwa senyawa fenolik berupa tanin yang terkandung dalam daun jambu biji mampu menarik senyawa alkaloid karpain yang terdapat dalam daun pepaya (Ledoh & Irianto, 2016). Zona hambat ekstrak kombinasi yang diperoleh pada komposisi ekstrak daun jambu biji yang lebih besar menghasilkan zona hambat yang lebih luas daripada zona hambat dari masing-masing ekstrak tunggal. Hal tersebut disebabkan karena kandungan senyawa fenolik pada ekstrak daun jambu biji lebih tinggi dibandingkan dengan daun pepaya. Daun jambu biji kaya akan *quersetin* yang merupakan golongan senyawa flavonoid, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang lebih besar dari masing-masing ekstrak tunggal (Eveline & Herga, 2020).

Perbedaan efektivitas antibakteri dari tiap ekstrak uji disebabkan oleh kandungan senyawa aktif yang terdapat didalamnya. Bakteri *Escherichia coli* dapat dihambat melalui mekanisme metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak.

Flavonoid berupa senyawa fenolik yang mekanisme antibakterinya adalah dengan cara pembentukan senyawa kompleks dengan protein di luar sel, merubah sifat fisik dan kimiawi sitoplasma, serta melalui ikatan hidrogen akan mendenaturasi dinding sel bakteri. Mekanisme tersebut mengakibatkan terganggunya fungsi permeabilitas selektif dan fungsi pengangkutan aktif, serta terganggunya susunan protein mengakibatkan bakteri lisis dan mati (Dewi dkk., 2020). Alkaloid juga memiliki sifat antibakteri yang mengganggu komponen penyusun peptidoglikan bakteri. Hal tersebut mengakibatkan pembentukan lapisan dinding sel bakteri menjadi tidak sempurna sehingga bakteri tersebut mati. Senyawa saponin melalui ikatan hidrogen akan membentuk senyawa kompleks dengan membran sel yang mengakibatkan dinding sel menjadi kurang permeabel sehingga sel dapat mati. Tanin bekerja dengan merusak dinding sel bakteri melalui pembentukan kompleks polisakarida dan ion logam, menginaktivasi fungsi materi genetik bakteri, serta menargetkan polipeptida dinding sel yang mengakibatkan lisisnya sel bakteri akibat dari tekanan fisik maupun osmotik, sehingga metabolisme bakteri terganggu dan menyebabkan kematian bakteri (Artaningsih dkk., 2018). Mekanisme kerja steroid yaitu melakukan interaksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa lipofilik, sehingga mengakibatkan kebocoran pada liposom bakteri dan sel menjadi rapuh dan lisis. Senyawa terpenoid akan merusak protein transmembran yang menjadi pintu masuk dan keluarnya senyawa, sehingga permeabilitas dinding sel bakteri berkurang dan nutrisi sel bakteri tidak tercukupi, yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri dan kemudian mati (Anggraini dkk., 2019).

3. Efektivitas antibakteri ekstrak tunggal dan kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Efektivitas antibakteri diperoleh dengan membandingkan diameter zona hambat yang diperoleh ekstrak uji dengan diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol. Berdasarkan hasil efektivitas antibakteri pada Tabel 6, dapat dilihat bahwa setiap ekstrak uji dimulai dari ekstrak daun pepaya memiliki nilai efektivitas yaitu 32,63%, ekstrak daun jambu biji memiliki efektivitas 31,12%, ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:1 memiliki efektivitas 20,23%, 1:2 (22,47 %), dan 2:1 (33,91 %). Menurut Oroh dkk (2015), ekstrak uji dikatakan efektif apabila nilai efektivitas antibakteri lebih dari 50% (Oroh dkk., 2015).

Faktor yang mempengaruhi perbedaan efektivitas antibakteri adalah mekanisme kerja metabolit sekunder yang terkandung dalam tiap ekstrak uji. Selain itu, struktur dinding sel bakteri juga mempengaruhi perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri. *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang resisten dengan beberapa antibakteri dikarenakan memiliki dinding sel yang tebal sehingga beberapa senyawa tidak mampu merusak dinding sel dari bakteri *Escherichia coli*. Dinding sel bakteri gram negatif terdiri atas tiga polimer, antara lain lapisan dalam peptidoglikan, lapisan tengah lipopolisakarida, lapisan luar lipoprotein, serta membran luar berupa bilayer dengan sistem pertahanan yang lebih kuat terhadap senyawa yang masuk atau keluar sel, sehingga mengakibatkan efek toksik (Septiani dkk., 2017). Hal tersebut menyebabkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak uji sulit untuk menembus dinding sel *Escherichia coli*.

Efektivitas antibakteri suatu senyawa dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti kemampuan difusi ekstrak, jenis bakteri yang dihambat, dan kandungan senyawa

antibakteri (Harlita dkk., 2019). Faktor-faktor lain yang mungkin mempengaruhi diameter zona hambat antibakteri antara lain pH lingkungan, ketebalan media agar, suhu dan waktu inkubasi, kerapatan inokulum, komposisi media agar, serta kurangnya daya difusi bahan antibakteri ke dalam media (Pragita dkk., 2021; Rahman dkk., 2022; (Widyastari, 2015).

4. Perbedaan efektivitas antibakteri tiap perlakuan

Data diameter zona hambat ekstrak tunggal dan kombinasi dari daun pepaya dan daun jambu biji dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan *software* komputer.

Untuk melihat perbedaan antara diameter zona hambat ekstrak tunggal dan kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji maka dilakukan uji statistik menggunakan uji LSD (*Least Significant Difference*). Berdasarkan hasil uji LSD, diameter zona hambat antara masing-masing ekstrak tunggal memiliki perbedaan yang tidak signifikan terhadap ekstrak kombinasi perbandingan 1:2 dengan nilai $p > \alpha$ (0,05). Sedangkan diameter zona hambat antara masing-masing ekstrak tunggal memiliki perbedaan yang signifikan terhadap ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:1 dan 2:1 dengan nilai $p < \alpha$ (0,05).

Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa antara ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji memiliki perbedaan efektivitas antibakteri.