

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Gambaran lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua laboratorium yaitu laboratorium kimia dasar dan kimia terapan untuk proses maserasi, evaporasi dan skrining fitokimia. Serta di laboratorium bakteriologi untuk proses uji aktivitas antibakteri. Di laboratorium kimia dasar dan terapan, terdapat alat *rotary evaporator* yang fungsinya untuk memisahkan pelarut etanol dengan zat aktif pada maserat dengan cara di uapkan, sehingga didapatkan ekstrak pekat daun anggur. Selain itu, terdapat reagen fitokimia yang digunakan peneliti untuk melakukan skrining fitokimia pada ekstrak daun anggur. Di laboratorium bakteriologi terdapat beberapa alat yang mendukung peneliti untuk melakukan penelitian seperti *Biosafety Cabinet*, inkubator, *Mc Farland* Densitometer, dan alat gelas lainnya. Serta terdapat beberapa bahan seperti *Mueller Hinton Agar*, *Nutrient Agar*, cakram kosong, dan cakram antibiotik untuk pembiakan bakteri dan uji daya hambat bakteri.

Lokasi pengambilan sampel daun anggur dilakukan di Jalan Taman Sari, Desa Banyupoh, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng Alasan peneliti memilih lokasi tersebut karena banyak terdapat kebun anggur dan perkebunan anggur merupakan salah satu mata pencaharian masyarakat di Desa Banyupoh. Selain itu tanaman anggur telah menjadi primadona bagi petani di Desa Banyupoh sejak tahun 1980.

2. Karakteristik obyek penelitian

a. Ekstrak etanol daun anggur

Objek dalam penelitian ini adalah daun anggur segar yang memiliki warna hijau, memiliki bentuk menyerupai jantung dengan tepi yang bergerigi, dan dengan ujung daun yang meruncing. Daun anggur diperoleh dari tanaman anggur yang berada di Jalan Taman Sari, Desa Banyupoh, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng. Jumlah daun anggur yang dapat diperoleh oleh penulis setelah proses penyortiran yaitu seberat 1,3 kg. Sampel yang sudah disortir dikeringkan selama tujuh hari sehingga menjadi kering. Kemudian sampel kering tersebut diblender hingga menjadi bubuk halus. Simplisia yang telah dihasilkan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Hasil ekstraksi tersebut kemudian dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental. Untuk memperoleh 33,5 gram ekstrak kental, diperlukan 1300 gram serbuk daun anggur. Ekstrak kental yang dihasilkan memiliki warna coklat hitam hijau dan memiliki tekstur lengket seperti madu.

b. Skrining fitokimia

Ekstrak kental daun anggur dilakukan uji skrining fitokimia secara kualitatif untuk mendeteksi keberadaan senyawa kimia tertentu. Skrining fitokimia mencakup pengujian terhadap kuinon, fenol, flavonoid, dan steroid. Hasil dari uji skrining fitokimia tersebut tercantum dalam Tabel 5. Setelah itu, ekstrak kental daun anggur diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yang berbeda dengan melakukan pengenceran dari ekstrak daun anggur konsentrasi 100%, dengan menambahkan etanol 96%, sehingga diperoleh konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

Tabel 5
Hasil Uji Skrining Fitokimia

Senyawa	Pereaksi	Keterangan
Kuinon	NaOH 1N	Negatif (-)
Fenol	FeCl ₃	Positif (+)
Flavonoid	HCl Pekat dan Mg	Positif (+)
Steroid	H ₂ SO ₄	Negatif (-)

c. Peremajaan bakteri dan pengamatan bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, yang merupakan bakteri gram positif. Bakteri tersebut diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Untuk memperbarui kultur bakteri, bakteri diinokulasikan pada media NA (*Nutrient Agar*) dan diinkubasi dalam kondisi anaerobik menggunakan *anaerobic jar* pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Setelah proses inkubasi, hasil menunjukkan bahwa bakteri tumbuh dengan baik dalam kondisi anaerobik.

Lalu, dilakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis pada koloni bakteri *Propionibacterium acnes*. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa koloni berbentuk bulat, berwarna putih, permukaannya halus, konsistensinya padat, dan *opaque*. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pengecatan gram dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa bakteri berbentuk batang dengan ujung kokoid, sel-selnya tersusun tidak beraturan, dan berwarna ungu.

3. Hasil uji aktivitas antibakteri

Pada penelitian ini yang diamati adalah zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* akibat pengaruh berbagai

konsentrasi ekstrak daun anggur. Hasil uji aktivitas antibakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6
Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Pengulangan	Diameter zona hambat kontrol (mm)			Diameter zona hambat tiap konsentrasi ekstrak (mm)			
	Etanol 96%	NaCl 0,9%	Kontrol positif	20%	40%	60%	80%
I	6,76	0	24,64	10,42	13,52	13,28	14,00
II	7,2	0	24,22	10,92	13,54	13,34	13,74
III	6,52	0	24,60	11,24	12,78	13,76	13,48
IV	5,98	0	23,30	10,32	13,30	13,50	13,52
V	6,7	0	23,20	10,64	13,40	13,00	13,52
VI	7,2	0	23,30	11,58	13,48	13,72	1426
Rerata	6,73	0	23,88	10,85	13,34	13,43	13,75

Menurut data yang terdapat dalam Tabel 6, rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif terhadap *Propionibacterium acnes* adalah sekitar 23,88 mm, dengan diameter maksimum mencapai 24,64 mm. Kloramfenikol 30 µg digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Sebagai kontrol negatif, NaCl 0,9% digunakan, yang tidak menunjukkan adanya zona hambat dengan diameter 0 mm dalam setiap pengulangan. Ini menegaskan bahwa NaCl 0,9% tidak memiliki efek terhadap pertumbuhan bakteri. Kontrol reagen dalam penelitian ini adalah etanol 96%, yang menunjukkan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,73 mm, dengan diameter maksimum mencapai 7,20 mm.

Dalam penelitian ini, ekstrak daun anggur diuji pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Variasi ini dipilih untuk menemukan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Setiap konsentrasi diuji enam kali. Hasil pengujian menunjukkan adanya zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Data dari Tabel 6 menunjukkan bahwa rerata diameter

zona hambat tertinggi dalam penelitian ini adalah pada konsentrasi 80% dari ekstrak daun anggur, yaitu sebesar 13,75 mm, sedangkan rerata diameter zona hambat terendah ditemukan pada konsentrasi 20%, dengan nilai sebesar 10,85 mm. Diameter zona hambat ini jika dibandingkan dengan tabel kategori zona hambat menurut Davis dan Stout (1971) termasuk ke dalam kategori kuat dalam menghambat bakteri.

4. Analisis perbedaan diameter zona hambat

Data hasil pengukuran diameter zona hambat dari penelitian ini kemudian dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer. Langkah awal yang dilakukan adalah memeriksa normalitas data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Adapun hasil dari uji normalitas dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 7
Hasil Uji *Kolmogorov-Smirnov*

Konsentrasi Ekstrak	Sig.
20%	.200
40%	.146
60%	.200
80%	.198

Hasil uji yang diperoleh pada tabel 7, didapatkan nilai Sig. > 0,05 pada seluruh data. Sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter zona hambat berdistribusi normal. Karena data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji beda *One Way ANOVA* untuk menganalisis perbedaan zona hambat pada variasi konsentrasi ekstrak daun anggur dan uji LSD untuk melihat perbedaan diameter zona hambat antar masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol daun anggur. Adapun hasil uji dapat di lihat pada tabel berikut:

Tabel 8
Hasil uji ANOVA dan Uji LSD

LSD			ANOVA
Konsentrasi Ekstrak	Konsentrasi Signifikan	Sig.	
20%	40%	.000	.000
	60%	.000	
	80%	.000	
40%	20%	.000	
	60%	.686	
	80%	.088	
60%	20%	.000	
	40%	.686	
	80%	.186	
80%	20%	.000	
	40%	.088	
	60%	.186	

Berdasarkan tabel 8, didapatkan nilai signifikansi $p < \alpha$ (0,05), yang artinya terdapat perbedaan signifikan antara diameter zona hambat pada masing-masing variasi konsentrasi. Adapun nilai $p < \alpha$ (0,05) diperoleh pada konsentrasi 20% terhadap konsentrasi 40%, 60%, dan 80%; konsentrasi 40% terhadap konsentrasi 20%; konsentrasi 60% terhadap konsentrasi 20%; konsentrasi 80% terhadap konsentrasi 20%.

Sedangkan konsentrasi 40% dengan konsentrasi 60% dan 80%; konsentrasi 60% dengan konsentrasi 40% dan 80%; dan konsentrasi 80% dengan 40% dan 60% didapatkan nilai $p > \alpha$ (0,05) yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan antara diameter zona hambat pada masing-masing variasi konsentrasi.

B. Pembahasan

1. Hasil uji aktivitas antibakteri

- a. Diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik Kloramfenikol 30µg. Kloramfenikol dipilih karena bersifat bakteriostatik. Kloramfenikol bekerja pada spektrum yang luas, efektif baik terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Mekanisme kerja kloramfenikol sebagai antibakteri yaitu melalui penghambatan terhadap pembentukan ikatan peptide dan biosintesis protein pada siklus pemanjangan rantai asam amino, dengan cara mengikat subunit ribosom 50-S sel mikroba target (Minanda dkk., 2023).

Berdasarkan data pengukuran, ditemukan bahwa rata-rata diameter zona hambat adalah 23,88 mm. Menurut CLSI (2012), zona hambat yang dihasilkan oleh kloramfenikol dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori, yaitu sensitif (>18 mm), intermediet (13-17 mm), dan resisten (< 12 mm). Dengan membandingkan hasil tersebut dengan standar CLSI, dapat disimpulkan bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif masuk dalam kategori sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

Penggunaan kloramfenikol 30µg sebagai kontrol positif terhadap daya hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* juga digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Priamsari dkk, (2023) dengan judul *Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kulit Buah Markisa Kuning (Passiflora edulis van Flavicarpa D.) Terhadap Bacillus subtilis dan Propionibacterium acnes* dari penelitian tersebut

didapatkan bahwa antibiotik kloramfenikol 30µg yang digunakan sebagai kontrol positif dikategorikan sensitif terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

b. Diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada kontrol reagen

Etanol 96% pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol reagen. Tujuannya untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan untuk uji memiliki pengaruh terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun anggur. Didapatkan rata-rata diameter zona hambat pada etanol 96% sebesar 6,73 mm. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri uji meskipun tergolong lemah.

Beberapa faktor yang dapat menyebabkan terbentuknya zona hambat pada etanol 96% meliputi waktu kontak, konsentrasi, dan volume yang digunakan. Penurunan kualitas pelarut etanol juga dapat memengaruhi ukuran zona hambat yang dihasilkan. Faktor-faktor ini dapat dipengaruhi oleh kesalahan dalam penyimpanan dan penggunaan reagen, seperti lamanya waktu penyimpanan setelah reagen pertama kali digunakan. Etanol yang telah dibuka dan terus digunakan akan mengalami penurunan kualitas seiring berjalannya waktu karena sifat mudah menguapnya, yang mengakibatkan berkurangnya konsentrasi etanol dalam reagen tersebut (Innocenzi et al., 2008).

Penelitian lain juga dilakukan oleh Niluwih (2023) dengan judul “*Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Jukut Pendul (Kyllinga nemoralis) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus*”. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil rerata diameter zona hambat pada etanol 96% sebesar 6,29 mm.

c. Diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada kontrol negatif

Penggunaan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif dalam penelitian ini bertujuan untuk memverifikasi apakah proses pengujian tidak mengalami kontaminasi dan untuk mengevaluasi apakah NaCl 0,9% yang digunakan dalam pembuatan suspensi bakteri memiliki dampak terhadap pembentukan zona hambat. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada kontrol negatif adalah 0 mm, menunjukkan bahwa NaCl 0,9% yang digunakan dalam pembuatan suspensi bakteri tidak memiliki pengaruh pada pembentukan zona hambat dan menegaskan bahwa tidak ada kontaminasi selama proses pengujian.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pramesuari (2023) dengan judul “*Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Sirsak (Annona muricata L) Terhadap Bakteri Propionibacterium acnes*”. Pada penelitian tersebut menggunakan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif dan didapatkan rerata diameter zona hambat sebesar 0 mm.

d. Diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* pada ekstrak daun anggur dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%

Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun anggur dengan tujuan untuk menentukan kemampuannya dalam membentuk zona hambat. Ekstrak daun anggur diuji dalam empat konsentrasi yang berbeda, dengan setiap konsentrasi diulang tiga kali. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 20%, 40%, 60%, dan 80%, yang diperoleh dengan mencampur ekstrak pekat dengan etanol 96%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak daun anggur mampu menghambat pertumbuhan bakteri

Propionibacterium acnes, yang ditunjukkan oleh adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Ramadan et al, (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun anggur memiliki kemampuan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Hasil yang diperoleh kemudian diklasifikasikan berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan untuk zona hambat antibakteri. Menurut Davis dan Stout (1971) dalam penelitian Ifora et al., (2022), daya hambat senyawa antibakteri dapat dikelompokkan ke dalam empat kategori: lemah jika diameter zona hambat < 5 mm, sedang jika diameter zona hambat 5-10 mm, kuat jika diameter zona hambat 10-20 mm, dan sangat kuat jika diameter zona hambat > 20 mm. Berdasarkan klasifikasi ini, zona hambat pada konsentrasi ekstrak daun anggur 20% (10,85 mm), 40% (13,34 mm), 60% (13,43 mm), dan 80% (13,75 mm) dapat dikategorikan sebagai kuat.

Adapun penelitian yang dilakukan oleh Anwar dan Anggreani (2021) dengan judul *Uji Sensitivitas Bakteri Salmonella typhi Terhadap Ekstrak Daun Anggur Hijau (Vitis vinivera L)*. Dalam penelitian tersebut didapatkan hasil rata-rata diameter zona hambat berturut-turut yaitu 0 mm; 2,3 mm; 7,5 mm; 8 mm; dan 8,6 mm pada konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100%. Zona hambat yang terbentuk pada ekstrak daun anggur terhadap bakteri *Salmonella typhi* lebih kecil daripada zona hambat yang terbentuk pada ekstrak daun anggur terhadap bakteri *Propionobacterium acnes* dengan konsentrasi yang sama yaitu 20, 40, 60, dan 80%.

Hal tersebut terjadi karena kemampuan antibakteri pada ekstrak etanol daun anggur juga bergantung pada jenis bakteri uji yang digunakan. Pada penelitian ini

bakteri yang digunakan adalah bakteri gram positif, sedangkan *Salmonella typhi* merupakan bakteri gram negatif yang mana terdapat perbedaan sifat dan sel penyusunan bakteri. Pada umumnya, bakteri Gram positif lebih mudah dihambat dibandingkan bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan bakteri Gram negatif memiliki ketahanan dinding sel yang lebih baik dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Pada bakteri Gram negatif mempunyai struktur dinding sel yang kompleks di mana tersusun dari tiga lapisan yaitu lapisan luar yang berupa lipoprotein, bagian tengah yang merupakan lipopolisakarida yang mampu menyeleksi zat-zat asing dan bagian dalam merupakan peptidoglikan. Sedangkan pada bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri Gram negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk (Pamudi dkk., 2021)

Terbentuknya zona hambat disebabkan oleh keberadaan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun anggur, yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini, zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak etanol daun anggur terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* disebabkan oleh keberadaan senyawa seperti flavonoid, steroid, dan fenol yang terdapat dalam ekstrak. Temuan ini diperkuat oleh hasil skrining fitokimia yang dilakukan oleh peneliti, yang menunjukkan adanya kandungan zat aktif seperti flavonoid, steroid, dan fenol dalam ekstrak etanol daun anggur. Senyawa-senyawa tersebut dikenal memiliki sifat antibakteri dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda.

2. Analisis perbedaan zona hambat

Hasil pengukuran diameter zona hambat yang diperoleh dari penelitian ekstrak etanol daun anggur dalam menghambat bakteri *Propionibacterium acnes* menunjukkan adanya perbedaan pada berbagai konsentrasi. Data yang diperoleh kemudian di olah dengan menggunakan uji statistik.

Uji pertama yang dilakukan adalah uji normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Apabila data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji beda menggunakan uji *Oneway ANOVA* dan uji LSD. Pada penelitian ini, didapatkan hasil data berdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Oneway ANOVA* didapatkan hasil Sig. (0,00) < (0,05) yang artinya terdapat perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai konsentrasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat bakteri *Propionibacterium acnes* dan diperoleh hasil konsentrasi 20% signifikan terhadap seluruh variasi konsentrasi yaitu Sig. (0,00) < (0,05).

Perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada masing-masing konsentrasi disebabkan oleh adanya pengenceran dari setiap seri konsentrasi. Menurut Dewi, dkk (2018) dalam penelitiannya yang berjudul “*Perbedaan Zona Hambat Pertumbuhan Staphylococcus aureus Pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Biduri Secara In Vitro*”, semakin tinggi pengenceran maka semakin sedikit pula kandungan zat aktif yang terdapat pada ekstrak sehingga semakin kecil diameter zona hambat yang terbentuk. Sehingga pada konsentrasi 20% diperoleh diameter zona hambat paling kecil daripada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 40%, 60%, dan 80%.

Akan tetapi, pada konsentrasi 40% terhadap 60%, konsentrasi 60% terhadap 80%, dan konsentrasi 40% terhadap 80% didapatkan hasil perbedaan yang tidak signifikan, hal tersebut dikarenakan ekstrak pada konsentrasi tersebut terlalu pekat dan kental sehingga zat aktif pada ekstrak sulit terserap ke dalam cakram dan menyebabkan kurangnya kemampuan ekstrak untuk berdifusi secara maksimal pada media agar MHA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun anggur efektif dalam menghambat pertumbuhan, dengan perbedaan zona hambat yang teramati pada variasi konsentrasi. Hal ini menunjukkan potensi ekstrak daun anggur sebagai agen antibakteri yang dapat dieksplorasi lebih lanjut untuk pengembangan aplikasi medis.