

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Kondisi lokasi pengambilan sampel daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Sampel daun tanaman *Averrhoa bilimbi* diambil pada sebuah lahan di Desa Sumerta Kaja, Kecamatan Denpasar Timur, Bali. Pengambilan sampel dilakukan pada area lahan yang terbuka dan ditumbuhi beberapa vegetasi peneduh. Kondisi lingkungan lokasi pengambilan sampel memiliki intensitas cahaya matahari yang cukup, sirkulasi udara yang baik, serta kondisi tanah yang relatif lembab. Lingkungan sekitar lokasi relatif bersih dan tidak berada pada area dengan tingkat polusi tinggi karena berada di dalam kawasan yang jauh dari lalu lintas jalan utama.

Tanaman *Averrhoa bilimbi* L. yang digunakan sebagai sumber sampel merupakan tanaman yang tumbuh pada kondisi pertumbuhan yang baik. Tanaman ini termasuk pohon berukuran kecil hingga sedang dengan tinggi berkisar antara ± 5 –10 meter. Batang tanaman berbentuk tegak, berkayu, dan berwarna cokelat keabu-abuan dengan permukaan batang yang relatif kasar. Daun tanaman tersusun secara majemuk menyirip (pinnatus) dengan anak daun yang tersusun berhadapan pada satu tangkai daun. Setiap daun majemuk umumnya terdiri dari sekitar 11–37 anak daun. Bentuk anak daun lonjong hingga lanset dengan ujung meruncing dan tepi daun rata. Permukaan daun berwarna hijau dengan tekstur relatif halus serta memiliki tulang daun yang tampak jelas.

Kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman diketahui berperan penting dalam memengaruhi kandungan senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Faktor lingkungan seperti intensitas cahaya, suhu, ketersediaan air, kondisi tanah, serta ketinggian tempat dapat memicu perubahan fisiologis yang berdampak pada proses biosintesis senyawa bioaktif pada tanaman. Menurut Agustin dkk. (2020), kondisi lingkungan seperti iklim, ketinggian tempat, serta variasi kondisi tanah dapat memengaruhi metabolisme tanaman sehingga menyebabkan perbedaan kandungan metabolit sekunder pada tanaman yang tumbuh di lokasi yang berbeda. Selain itu, penelitian yang dipublikasikan dalam Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi juga menyebutkan bahwa faktor lingkungan seperti intensitas cahaya, suhu, dan kondisi lingkungan dapat memengaruhi aktivitas metabolisme tanaman yang berperan dalam sintesis metabolit sekunder, sehingga kandungan senyawa bioaktif pada tanaman dapat berbeda tergantung pada kondisi habitat tempat tanaman tersebut tumbuh (Sari dkk., 2021). Oleh karena itu, kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman menjadi salah satu faktor penting yang dapat memengaruhi kualitas sampel tanaman serta kandungan senyawa aktif yang dihasilkan.

Berdasarkan hal tersebut, pemilihan lokasi pengambilan sampel yang memiliki kondisi lingkungan relatif bersih, cukup mendapat paparan cahaya matahari, serta mendukung pertumbuhan tanaman *Averrhoa bilimbi*, diharapkan dapat menghasilkan sampel daun dengan kualitas yang baik dan kandungan senyawa bioaktif yang optimal untuk digunakan dalam penelitian.



Gambar 8. Lokasi Pengambilan Sampel

2. Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder

Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak air, etanol 70% dan n – heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu :

a. Pengumpulan sampel

Objek yang digunakan pada penelitian ini adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Pengambilan sampel daun dilakukan pada bagian tanaman yang masih segar, berwarna hijau, tidak mengalami kerusakan fisik, serta tidak menunjukkan tanda-tanda serangan hama atau penyakit. Daun yang digunakan dipanen pada tingkat kematangan sedang, daun segar dan berwarna hijau tua yang diambil pada tangkai ke 3 dari pucuk sampai tangkai ke 5, diperoleh dari lokasi dan waktu panen yang relatif sama. Daun dipetik secara langsung dari cabang tanaman yang mudah dijangkau dan memiliki kondisi fisiologis yang baik. Sampel daun yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam wadah bersih untuk menjaga kualitas sampel sebelum dilakukan proses pengolahan lebih lanjut di laboratorium.



Gambar 9. Pengumpulan Sampel Daun Belimbing Wuluh

b. Pengolahan simplisia

Pembuatan simplisia daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) menggunakan daun belimbing wuluh yang sudah dipisahkan dengan tangkainya dan dipilah menggunakan daun yang berwarna hijau dan tidak robek. Daun belimbing wuluh yang telah bersih, dikeringkan selama tiga hari lalu dihaluskan hingga menjadi simplisia. Berat kering simplisia yang diperoleh setelah proses pengeringan menyusut menjadi 2.550 gram. Standarisasi simplisia dilakukan dengan perhitungan kadar air dengan diperoleh kadar air simplisia sebesar 2,186% (<10%) dan kadar abu total sebesar 5,15% (<6,0%).



Gambar 10. Proses Pengolahan Simplisia

c. Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh

Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan dengan metode maserasi menggunakan tiga jenis pelarut diantaranya air, etanol 70% dan n – heksana. Simplisia yang digunakan dalam proses ekstraksi masing – masing pelarut sebanyak 300 gram dengan jumlah pelarut yaitu 3 liter dan dilakukan remaserasi sebanyak satu kali. Jumlah ekstrak yang diperoleh dari masing – masing pelarut yaitu ekstrak air sebanyak 10 gram, ekstrak etanol 70% sebanyak 4,1 gram, dan ekstrak n – heksana sebanyak 4,8 gram.

Pengukuran rendemen dinyatakan dalam rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

$$\text{Ekstrak Air} = \frac{10}{300} \times 100\% = 3,33\%$$

$$\text{Ekstrak Etanol 70\%} = \frac{4,1}{300} \times 100\% = 1,37\%$$

$$\text{Ekstrak N-Heksana} = \frac{4,8}{300} \times 100\% = 1,60\%$$

Hasil pengukuran nilai rendemen pada ekstrak air diperoleh sebesar 3,33%, ekstrak etanol 70% diperoleh sebesar 1,37%, dan ekstrak n – heksana diperoleh sebesar 1,60%.

d. Uji fitokimia

Dalam uji skrining fitokimia pada ekstrak air, etanol 70% dan n – heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) diperoleh hasil sesuai pada tabel 5.

Tabel 5.

Hasil Uji Skrining Fitokimia

Jenis Uji	Hasil Uji Fitokimia					
	Ekstrak Air	Keterangan	Ekstrak Etanol 70%	Keterangan	Ekstrak N - Heksana	Keterangan
1	2	3	4	5	6	7
Uji Alkaloid	(-)	Tidak ada endapan merah kecoklatan	(-)	Tidak ada endapan merah kecoklatan	(-)	Tidak ada endapan merah kecoklatan
Uji Flavonoid	(-)	Berwarna kekuningan	(+)	Berwarna kecoklatan	(+)	Berwarna hijau kehitaman

1	2	3	4	5	6	7
Uji Tanin	(+)	Berwarna coklat kehitaman	(+)	Berwarna coklat kehitaman	(-)	Berwarna hijau
Uji Terpenoid	(-)	Berwarna coklat kekuningan	(-)	Berwarna coklat kehitaman	(+)	Berwarna hijau keabuan
Uji Saponin	(-)	Berwarna putih kekuningan	(-)	Berwarna kuning jernih	(-)	Berwarna keabuan

Berdasarkan tabel 5 dinyatakan bahwa ekstrak air daun belimbing wuluh hanya mengandung senyawa tanin. Ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Sementara ekstrak n – heksana mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid.

3. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan pelarut air, etanol 70% dan n – heksana

Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan perbedaan jenis pelarut yaitu air, etanol 70% dan n – heksana yang masing – masing dengan menggunakan konsentrasi 10% dan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali, dilakukan dengan mengukur diameter luas zona hambat yang timbul disekitar cakram disk. Dari hasil pengukuran diperoleh rerata luas zona hambat ekstrak air sebesar 0,00 mm, rerata luas zona hambat ekstrak etanol 70% sebesar 8,77 mm dan rerata luas zona hambat ekstrak n – heksana sebesar 0,00 mm.

Hasil luas zona hambat masing – masing ekstrak daun belimbing wuluh dinyatakan dalam tabel 6.

Tabel 6.

Hasil Luas Zona Hambat

Jenis Sampel Ekstrak	Zona Hambat (mm)					Kategori
Daun Belimbing	Pengulangan				Rerata $\pm$ SD	
Wuluh	1	2	3	4	(mm)	
Ekstrak Etanol 70%	9	8,9	8,5	8,7	8,77 $\pm$ 0,22	
Kontrol Positif	26	25	25,5	25,8	25,57 $\pm$ 0,43	Sangat Kuat

4. Hasil analisis data

a. Uji normalitas

Uji normalitas data pada penelitian ini dilakukan dengan uji normalitas *Shapiro – Wilk* dan diperoleh hasil sesuai dengan tabel 7.

Tabel 7.

Hasil Uji Normalitas

Variabel	<i>Shapiro - Wilk</i>		
	Statistic	df	Sig.
Kontrol Positif	.958	4	.764
Ekstrak Etanol 70%	.963	4	.798

Berdasarkan hasil uji yang ditunjukkan pada tabel 7, kelompok kontrol positif memperoleh nilai signifikansi sebesar 0,764 ($p > 0,05$) dan kelompok ekstrak etanol 70% memperoleh nilai signifikansi sebesar 0,798 ($p > 0,05$). Jika dibandingkan dengan nilai sig = (0,05), maka $p < \alpha$ yang menunjukkan data berdistribusi normal.

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan Uji *Levene Statistic* dan diperoleh hasil sesuai dengan tabel 8.

Tabel 8.

Hasil Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.941	3	12	.006

Berdasarkan hasil analisis diperoleh nilai *Levene Statistic* sebesar 6,941 dengan nilai signifikansi 0,006. Hasil uji homogenitas menunjukkan nilai $(p) > \alpha$ ($0,006 < 0,05$), maka data dinyatakan varian data antar kelompok tidak homogen.

c. Uji Kruskal-Wallis (Uji beda)

Uji beda pada penelitian ini dilakukan dengan uji Kruskal Wallis dan diperoleh hasil sesuai dengan tabel 9.

Tabel 9.

Hasil Uji Beda Kruskal Wallis

Variabel	Sig.
Diameter luas zona hambat antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ekstrak air, ekstrak etanol 70% dan ekstrak n – heksana daun belimbing wuluh	.002

Berdasarkan tabel 9 hasil analisis diperoleh nilai signifikansi (Asymp. Sig.) sebesar 0,002. Nilai signifikansi tersebut lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$), sehingga dinyatakan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap daya hambat bakteri.

d. Uji Hipotesis Statistik

Uji hipotesis statistik pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas antibakteri antara kelompok perlakuan yang meliputi ekstrak air, ekstrak etanol 70%, ekstrak n-heksana, dan kontrol positif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hipotesis nol (H_0) menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri antar kelompok perlakuan, sedangkan hipotesis alternatif (H_a) menyatakan bahwa terdapat perbedaan aktivitas antibakteri antar kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil uji Kruskal–Wallis diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,002 ($p < 0,05$), sehingga H_0 ditolak dan H_a diterima. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dalam aktivitas antibakteri antara kelompok perlakuan.

e. Uji *Post Hoc*

Uji *Post Hoc* pada penelitian ini dilakukan dengan uji Mann-Whitney dan diperoleh hasil sesuai dengan tabel 10.

Tabel 10.

Hasil Uji *Post Hoc*

Perlakuan (I)	Perlakuan (J)	<i>p</i>	Keterangan
Ekstrak Air	Ekstrak Etanol 70%	.014	$p < \alpha (0,05)$
	Kontrol Positif	.014	$p < \alpha (0,05)$
Ekstrak Etanol 70%	Ekstrak N – Heksana	.014	$p < \alpha (0,05)$
	Kontrol Positif	.021	
Ekstrak N - Heksana	Kontrol Positif	.014	$p < \alpha (0,05)$

Berdasarkan tabel 10 pada hasil Uji Mann–Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada beberapa pasangan perlakuan. Pada perbandingan antara ekstrak air dan ekstrak etanol 70%, diperoleh nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$), yang

berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua perlakuan tersebut. Demikian pula, perbandingan antara ekstrak air dan kontrol positif juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$. Namun, pada perbandingan antara ekstrak air dan ekstrak n-heksana, diperoleh nilai $p = 1,000$ ($p > 0,05$), yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kedua perlakuan tersebut.

Selanjutnya, perbandingan antara ekstrak etanol 70% dan ekstrak n-heksana menunjukkan hasil yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$). Perbandingan antara ekstrak etanol 70% dan kontrol positif juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,021$. Terakhir, perbandingan antara ekstrak n-heksana dan kontrol positif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$).

B. Pembahasan

1. Identifikasi kandungan metabolit sekunder ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

a. Ekstraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Dalam penelitian ini daun belimbing wuluh yang digunakan adalah daun yang masih segar, berwarna hijau, tidak mengalami kerusakan fisik, serta tidak menunjukkan tanda-tanda serangan hama atau penyakit. Daun belimbing wuluh diambil pada sebuah lahan di Desa Sumerta Kaja, Denpasar Timur. Daun yang digunakan dipanen pada tingkat kematangan sedang, daun segar dan berwarna hijau tua yang diambil pada tangkai ke 3 dari pucuk sampai tangkai ke 5, diperoleh dari

lokasi dan waktu panen yang relatif sama. Daun dipetik secara langsung dari cabang tanaman yang mudah dijangkau dan memiliki kondisi fisiologis yang baik.

Pemilihan daun belimbing wuluh pada pucuk daun ketiga hingga kelima didasarkan pada tingkat kematangan daun yang dianggap optimal dalam menghasilkan metabolit sekunder. Daun yang terlalu muda umumnya masih berada pada fase pertumbuhan sehingga kandungan metabolit sekundernya belum terbentuk secara maksimal, sedangkan daun yang terlalu tua dapat mengalami penurunan kandungan senyawa aktif akibat proses degradasi metabolik. Oleh karena itu, daun pada posisi ketiga sampai kelima dipilih karena berada pada fase fisiologis yang lebih stabil sehingga diharapkan memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih optimal untuk proses ekstraksi dan pengujian aktivitas antibakteri (Gultom, Sakinah, dan Hasanah, 2020).

Proses pembuatan simplisia diawali dengan melakukan sortasi basah, lalu dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan secara tidak langsung dibawah sinar matahari hingga kadar air mencapai $<30\%$ lalu dilanjutkan dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C hingga kadar air $<10\%$. Suhu pengeringan akan berpengaruh terhadap kadar air dan kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun belimbing wuluh. Suhu yang terlalu tinggi pada saat proses pengeringan dapat merusak senyawa yang ada dalam tanaman tersebut. Mengurangi kandungan kadar air untuk mendapatkan simplisia yang tahan lama dan memudahkan dalam penyimpanan merupakan tujuan dari pengeringan (Depkes RI, 1985). Menurut penelitian Marfuatin, 2019 suhu 60°C merupakan suhu yang optimal untuk mendapatkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang baik. Dalam pembuatan simplisia daun belimbing wuluh diperoleh berat basah daun belimbing wuluh

sebesar 6.300 gram, setelah dikeringkan dan dihaluskan berat daun belimbing wuluh mengalami penyusutan menjadi 2.550 gram.

Simplisia daun belimbing wuluh yang telah dihaluskan selanjutnya diuji kadar air dan kadar abu sebagai parameter standar mutu simplisia. Pengujian kadar air dilakukan menggunakan metode thermogravimetri untuk mengetahui jumlah residu air yang masih tersisa setelah proses pengeringan, karena kadar air yang terlalu tinggi dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme serta mempercepat kerusakan bahan herbal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air simplisia daun belimbing wuluh sebesar 2,186%, sehingga telah memenuhi persyaratan mutu simplisia dengan batas maksimum <10% (BPOM RI, 2019). Nilai kadar air yang rendah menunjukkan bahwa proses pengeringan yang dilakukan telah optimal sehingga dapat meningkatkan stabilitas dan daya simpan simplisia.

Selain itu, dilakukan pula pengujian kadar abu total untuk mengetahui kandungan mineral atau zat anorganik yang tersisa setelah proses pembakaran bahan organik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kadar abu simplisia daun belimbing wuluh sebesar 5,15%, yang masih berada di bawah batas maksimum standar yaitu <6,0% menurut Farmakope Herbal Indonesia (2022). Nilai kadar abu yang memenuhi standar menunjukkan bahwa simplisia memiliki tingkat kemurnian yang baik serta relatif bebas dari kontaminasi bahan anorganik seperti pasir atau tanah.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan tiga jenis pelarut berbeda yaitu air, etanol 70% dan n – heksana. Pemilihan pelarut ini didasarkan pada prinsip “*like dissolve like*” dimana senyawa akan larut dalam pelarut yang memiliki tingkat polaritas yang

sama. Dalam hal ini air memiliki sifat polar, etanol 70% memiliki sifat semi polar, dan n – heksana memiliki sifat non polar.

Air merupakan pelarut polar yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi karena memiliki kemampuan melarutkan senyawa-senyawa hidrofilik seperti gula, garam, dan beberapa senyawa fenolik. Polaritas air yang tinggi menyebabkan pelarut ini efektif dalam mengekstraksi senyawa yang bersifat sangat polar. Etanol 70% merupakan pelarut polar yang banyak digunakan dalam ekstraksi bahan alam karena memiliki sifat semi-polar akibat campuran etanol dan air, sehingga mampu melarutkan senyawa polar dan sebagian semi-polar. N-heksana merupakan pelarut non-polar yang umum digunakan untuk mengekstraksi senyawa hidrofobik seperti lipid, minyak atsiri, dan steroid. Dalam proses maserasi, perbandingan rasio antara sampel dengan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1:10, dimana semakin banyak pelarut yang digunakan maka semakin besar perbedaan konsentrasi antar senyawa pada sampel dengan pelarut, akan tetapi peningkatan lebih lanjut dapat menurunkan hasil ekstraksi (Widyastutik *et al.*, 2022).

Pada penelitian ini ekstrak yang diperoleh dari masing – masing pelarut yaitu ekstrak air sebanyak 10 gram, ekstrak etanol sebanyak 4,1 gram, dan ekstrak n – heksana sebanyak 4,8 gram. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai rendemen ekstrak. Hasil pengukuran nilai rendemen pada ekstrak air diperoleh sebesar 3,33%, ekstrak etanol 70% diperoleh sebesar 1,37%, dan ekstrak n – heksana diperoleh sebesar 1,60%. Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan untuk menentukan jumlah ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi.

Dalam proses ekstraksi tumbuhan, rendemen ekstrak sangat dipengaruhi oleh kemiripan polaritas antara pelarut dan komponen yang terdapat dalam bahan

tanaman. Pelarut yang memiliki polaritas tinggi seperti air mampu melarutkan beragam senyawa polar dan semi-polar, termasuk karbohidrat, protein, polifenol, dan tanin yang dominan dalam jaringan daun, sehingga jumlah total bahan yang terekstraksi lebih besar dibanding pelarut semi-polar atau nonpolar (Wijaya *et al.*, 2023). Hal ini telah dibuktikan dalam beberapa penelitian ekstraksi bahan alam dari daun pepaya di mana pelarut air (aquadest) menghasilkan rendemen ekstrak yang jauh lebih tinggi (26,48%) dibandingkan dengan pelarut etanol 96% (8,51%) dan n-heksana (5,60%) pada masaerasi simplisia daun pepaya, yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang larut air lebih banyak terkandung dalam jaringan tumbuhan tersebut (Wijaya *et al.*, 2023). Secara kimia, air yang bersifat sangat polar memiliki kemampuan untuk menginteraksikan gugus-gugus polar dan membentuk ikatan hidrogen, sehingga molekul-molekul polar yang berada di dalam sel tumbuhan lebih mudah terlepas dan terlarut dalam pelarut (Sulistiaiwanti *et al.*, 2025). Oleh karena itu, dalam penelitian ini nilai rendemen ekstrak air lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 70% dan n-heksana, mencerminkan bahwa komponen-komponen polar lebih dominan dalam simplisia daun belimbing wuluh yang diekstraksi.

b. Identifikasi senyawa fitokimia

Identifikasi senyawa fitokimia pada ekstrak daun belimbing wuluh bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat mendukung kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid dan juga saponin pada ekstrak air, etanol 70% dan ekstrak n – heksana daun belimbing wuluh.

Berdasarkan tabel 5 diketahui bahwa masing – masing ekstrak dengan jenis pelarut yang memiliki sifat yang berbeda akan memiliki senyawa metabolit sekunder yang berbeda. Ekstrak air daun belimbing wuluh hanya mengandung senyawa tanin. Ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Sementara ekstrak n – heksana mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid. Perbedaan jenis kandungan senyawa metabolit sekunder ini dapat disebabkan karena sifat dari masing – masing pelarut. Air sebagai senyawa paling polar maka dapat menarik senyawa aktif yang memiliki sifat polar, etanol 70% sebagai senyawa semi polar dimana pelarut juga dapat mengikat senyawa polar maupun semi polar, dan n – heksana sebagai senyawa non polar akan mengikat senyawa dengan tingkat senyawa non polar saja.

Alkaloid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada berbagai tanaman obat dan diketahui memiliki beragam aktivitas biologis, termasuk sebagai antibakteri melalui mekanisme gangguan pada sintesis protein serta interaksi dengan komponen dinding sel mikroba. Dalam skrining fitokimia, keberadaan alkaloid umumnya diuji menggunakan pereaksi spesifik seperti Dragendorff, Mayer, atau Wagner yang menghasilkan endapan berwarna sebagai indikasi terbentuknya kompleks antara alkaloid dengan ion logam dalam pereaksi (Harborne, 1998). Namun, pada penelitian ini senyawa alkaloid tidak terdeteksi pada ketiga ekstrak yang diuji, yaitu ekstrak air, etanol 70%, dan n-heksana.

Tidak terdeteksinya alkaloid pada seluruh ekstrak dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis bagian tanaman yang digunakan, kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman, serta metode ekstraksi yang diterapkan.

Kandungan metabolit sekunder dalam tanaman diketahui dapat bervariasi tergantung pada faktor genetik maupun lingkungan seperti intensitas cahaya, suhu, dan ketersediaan nutrisi tanah (Sari, Nurhayati & Rahman, 2021). Selain itu, proses ekstraksi juga sangat menentukan keberhasilan isolasi senyawa alkaloid, karena sebagian alkaloid lebih stabil atau lebih mudah terekstraksi pada kondisi pelarut tertentu maupun pada ekstraksi yang melibatkan kondisi asam-basa (Makalalag, Santi & Kumaunang, 2019).

Selain faktor metode ekstraksi, kemungkinan lain adalah kandungan alkaloid dalam daun belimbing wuluh pada sampel yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak terdapat pada bagian tanaman tersebut, sehingga tidak dapat terdeteksi pada pengujian skrining fitokimia. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian fitokimia yang melaporkan bahwa tidak semua tanaman atau bagian tanaman mengandung seluruh golongan metabolit sekunder, sehingga hasil skrining dapat menunjukkan keberadaan senyawa tertentu saja seperti flavonoid, tanin, atau terpenoid tanpa ditemukannya alkaloid (Agustin, Nurcahyanti & Setyawan, 2020). Oleh karena itu, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas biologis ekstrak daun belimbing wuluh dalam penelitian ini kemungkinan lebih dipengaruhi oleh keberadaan senyawa metabolit sekunder lain seperti flavonoid, tanin, dan terpenoid dibandingkan oleh alkaloid.

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk aktivitas antibakteri. Senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui beberapa mekanisme, seperti merusak membran sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran, serta menghambat sintesis asam nukleat dan metabolisme energi dalam sel bakteri (Kesumawati *et al.*, 2024).

Uji flavonoid menggunakan pereaksi H_2SO_4 (asam sulfat) bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa flavonoid melalui perubahan warna yang terjadi akibat reaksi oksidasi dan pembentukan kompleks dengan gugus fenolik dalam struktur flavonoid. Pada pengujian ini, ekstrak sampel yang ditambahkan beberapa tetes H_2SO_4 akan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning tua, merah kebiruan, jingga-merah, atau merah tua hingga coklat kehitaman sebagai indikasi adanya senyawa flavonoid (Shaikh & Patil, 2020).

Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan, ekstrak daun belimbing wuluh dengan pelarut etanol 70% dan n-heksana menunjukkan perubahan warna dari hijau menjadi kecoklatan serta hijau kehitaman, yang mengindikasikan adanya senyawa flavonoid. Sebaliknya, ekstrak air tidak menunjukkan perubahan warna yang signifikan sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak air tidak mengandung flavonoid. Perbedaan hasil ini dipengaruhi oleh polaritas pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Etanol 70% merupakan pelarut semi-polar yang diketahui efektif mengekstraksi berbagai senyawa fenolik termasuk flavonoid karena mampu melarutkan senyawa polar maupun semi-polar. Sementara itu, n-heksana yang bersifat non-polar dapat mengekstraksi sebagian flavonoid yang berada dalam bentuk aglikon yang lebih bersifat non-polar (Harborne, 1998). Sebaliknya, pelarut air yang sangat polar cenderung mengekstraksi senyawa polar lain seperti gula, protein larut air, dan polisakarida sehingga senyawa flavonoid tidak terekstraksi secara optimal.

Perbedaan kemampuan pelarut dalam mengekstraksi metabolit sekunder ini menunjukkan bahwa jenis pelarut memiliki pengaruh penting terhadap kandungan senyawa bioaktif yang diperoleh dari bahan tanaman. Keberadaan flavonoid dalam

ekstrak etanol 70% dan n-heksana pada penelitian ini juga berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri yang diamati, mengingat flavonoid diketahui memiliki mekanisme antibakteri melalui gangguan permeabilitas membran sel dan penghambatan aktivitas enzim mikroba.

Tanin merupakan salah satu metabolit sekunder dalam kelompok polifenol yang umum terdapat pada berbagai bagian tumbuhan dan dikenal memiliki kemampuan mengendapkan protein serta aktivitas biologis lainnya. Tanin juga diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui kemampuannya membentuk kompleks dengan protein pada dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu fungsi fisiologis mikroorganisme. Interaksi antara tanin dengan protein sel bakteri dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel yang pada akhirnya menghambat pertumbuhan bakteri (Saputra *et al.*, 2021).

Uji tanin secara kualitatif biasanya dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida (FeCl_3) ke dalam ekstrak sampel, reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehijauan sampai biru-hitam tergantung jenis tanin yang terkandung. Sebagai contoh, pada penelitian skrining fitokimia beberapa ekstrak tanaman obat seperti kulit batang *Mangifera indica* dan daun *Psidium guajava*, pemeriksaan dengan FeCl_3 menunjukkan perubahan warna khas yang menandakan keberadaan tanin dalam ekstrak etanol dan air, sedangkan fraksi nonpolar tidak menunjukkan reaksi tersebut karena tanin bersifat lebih polar. Hasil pengujian seperti ini umumnya digunakan untuk mengonfirmasi bahwa senyawa tanin memang hadir dalam pelarut polar tetapi tidak terlarut dengan baik dalam pelarut nonpolar seperti n-heksana, sehingga fraksi nonpolar sering negatif terhadap tanin. (Saputra, Haryanti & Azizah, 2021).

Pada penelitian ini, senyawa tanin terdeteksi pada ekstrak air dan ekstrak etanol 70%, namun tidak terdeteksi pada ekstrak n-heksana. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tanin lebih mudah larut dalam pelarut polar dan semi-polar dibandingkan pelarut non-polar. Air sebagai pelarut polar dan etanol 70% sebagai pelarut polar–semi-polar mampu menarik senyawa tanin dari daun belimbing wuluh, sedangkan n-heksana yang bersifat non-polar tidak mampu melarutkan tanin secara optimal. Perbedaan kelarutan ini sesuai dengan prinsip *like dissolves like*, yaitu senyawa akan lebih mudah larut pada pelarut dengan tingkat polaritas yang serupa.

Terpenoid merupakan senyawa non-polar yang memiliki potensi sebagai senyawa antibakteri. Senyawa ini diketahui memiliki potensi antibakteri melalui mekanisme gangguan terhadap integritas membran sel mikroba (Makalalag *et al.*, 2019). Dalam penelitian ini dilakukan dengan menambahkan kloroform dan asam sulfat pekat yang akan terbentuk reaksi antara reagen dan senyawa terpenoid pada ekstrak daun belimbing wuluh (Makalalag A.K, Sangi M dan Kumaunang M., 2019). Dari hasil uji diperoleh adanya perubahan warna dari warna hijau menjadi keabuan pada ekstrak n – heksana. Sementara pada ekstrak air dan etanol 70% tidak menunjukkan adanya perubahan warna. Hal ini dikarenakan senyawa terpenoid memiliki tingkat polaritas yang sama dengan pelarut n - heksana yaitu nonpolar.

Saponin merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok glikosida triterpenoid atau steroid yang banyak ditemukan pada berbagai tanaman obat. Senyawa ini dikenal memiliki sifat surfaktan alami yang mampu menurunkan tegangan permukaan air sehingga dapat menghasilkan busa yang stabil ketika dikocok dalam larutan berair. Oleh karena itu, uji saponin umumnya dilakukan dengan menambahkan air suling pada sampel kemudian

dipanaskan dan dikocok hingga terbentuk busa stabil yang bertahan selama kurang lebih 10 menit sebagai indikasi adanya saponin dalam ekstrak (Harborne, 1998).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada penelitian ini, ekstrak daun belimbing wuluh dengan pelarut air, etanol 70%, dan n-heksana seluruhnya menunjukkan hasil negatif terhadap uji saponin yang ditandai dengan tidak terbentuknya busa stabil setelah proses pengocokan. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa saponin tidak terdeteksi dalam ekstrak yang diuji. Tidak terdeteksinya saponin pada penelitian ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis bagian tanaman yang digunakan, metode ekstraksi, serta kandungan metabolit sekunder yang secara alami bervariasi pada setiap tanaman. Kandungan metabolit sekunder pada tanaman dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti kondisi tanah, intensitas cahaya, suhu, serta tahap pertumbuhan tanaman sehingga komposisi senyawa yang dihasilkan dapat berbeda-beda (Agustin, Nurcahyanti & Setyawan, 2020).

Selain itu, kemungkinan lain adalah bahwa daun belimbing wuluh pada sampel penelitian ini memang tidak mengandung saponin dalam jumlah yang cukup untuk terdeteksi melalui metode skrining fitokimia sederhana, sehingga hasil pengujian menunjukkan negatif. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian fitokimia yang melaporkan bahwa tidak semua tanaman atau bagian tanaman mengandung seluruh golongan metabolit sekunder secara bersamaan, sehingga dalam beberapa kasus hanya senyawa tertentu seperti flavonoid, tanin, atau terpenoid yang terdeteksi (Sari, Nurhayati & Rahman, 2021).

Pelarut air merupakan pelarut yang bersifat sangat polar sehingga cenderung menarik senyawa metabolit sekunder yang juga bersifat polar, seperti tanin. Pada penelitian ini, ekstrak air daun belimbing wuluh terdeteksi mengandung tanin.

Senyawa tanin memiliki banyak gugus hidroksil yang menyebabkan senyawa ini mudah larut dalam air. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Mohammed dan Shnawa (2022) yang melaporkan bahwa ekstrak air (*aqueous extract*) daun *Averrhoa bilimbi* mampu mengekstraksi senyawa polar, termasuk tanin dan beberapa metabolit sekunder lainnya karena sifat kepolaran pelarut air yang tinggi.

Etanol 70% merupakan pelarut polar hingga semi-polar sehingga mampu menarik senyawa dengan tingkat kepolaran yang lebih luas dibandingkan air. Pada penelitian ini, ekstrak etanol 70% terdeteksi mengandung flavonoid dan tanin. Kandungan air pada etanol 70% membantu proses penetrasi pelarut ke jaringan sel tanaman sehingga senyawa metabolit sekunder lebih mudah terekstraksi. Hasil ini didukung oleh penelitian Rahardhian *et al.* (2023) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, tanin, dan senyawa fenolik lainnya karena etanol 70% efektif mengekstraksi senyawa polar dan semi-polar.

N-heksana merupakan pelarut non-polar yang cenderung menarik senyawa non-polar hingga semi-non-polar. Pada penelitian ini, ekstrak n-heksana terdeteksi mengandung flavonoid dan terpenoid. Senyawa terpenoid memiliki sifat lipofilik sehingga lebih mudah larut dalam pelarut non-polar seperti n-heksana. Selain itu, beberapa flavonoid non-polar juga dapat terekstraksi dalam pelarut ini. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Yanti dan Vera (2022) yang melaporkan bahwa ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh mampu menarik senyawa terpenoid dan flavonoid non-polar karena kesesuaian tingkat kepolaran antara senyawa dan pelarut yang digunakan.

Perbedaan kandungan metabolit sekunder pada masing-masing ekstrak dipengaruhi oleh tingkat polaritas pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Pelarut air yang bersifat sangat polar cenderung menarik senyawa polar, seperti tanin, sehingga pada penelitian ini ekstrak air terdeteksi mengandung tanin. Etanol 70% bersifat polar hingga semi-polar sehingga mampu menarik senyawa dengan rentang kepolaran lebih luas, yaitu flavonoid dan tanin. Sementara itu, n-heksana merupakan pelarut non-polar yang cenderung menarik senyawa non-polar hingga semi-non-polar, seperti terpenoid dan beberapa jenis flavonoid non-polar. Perbedaan senyawa yang terdeteksi pada masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa jenis pelarut sangat memengaruhi senyawa metabolit sekunder yang berhasil terekstraksi berdasarkan prinsip *like dissolves like*, yaitu senyawa akan lebih mudah larut pada pelarut dengan tingkat polaritas yang serupa.

2. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi cakram. Metode difusi cakram merupakan teknik laboratorium standar untuk menguji kerentanan bakteri terhadap antibiotik dengan mengukur diameter zona hambat (zona bening) di sekitar cakram kertas yang berisi agen antimikroba pada media agar Mueller-Hinton.

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*, yaitu bakteri gram positif berbentuk kokus yang tersusun menyerupai buah anggur. Bakteri ini umumnya hidup sebagai flora normal pada kulit, rongga hidung, ketiak, dan saluran pernapasan manusia, namun dalam kondisi tertentu dapat menjadi

patogen penyebab infeksi. Sebagai bakteri gram positif, *Staphylococcus aureus* memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal pada dinding selnya sehingga interaksi senyawa antibakteri dengan dinding sel bakteri menjadi salah satu faktor yang memengaruhi terbentuknya zona hambat pada penelitian ini.

Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Metode ini bekerja melalui proses difusi senyawa aktif dari ekstrak ke dalam media agar yang telah diinokulasi bakteri *Staphylococcus aureus*. Senyawa aktif yang berhasil berdifusi akan menghambat pertumbuhan bakteri di sekitar cakram sehingga terbentuk zona bening yang disebut zona hambat. Besarnya diameter zona hambat menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

a. Diameter zona hambat kontrol positif

Dalam penelitian ini kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol. Diameter zona hambat pada kontrol positif yang menggunakan antibiotik kloramfenikol dalam penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri uji. Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang efektif terhadap berbagai bakteri gram positif maupun gram negatif sehingga sering digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas antibakteri di laboratorium mikrobiologi. Penggunaan antibiotik ini bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri uji masih memiliki sensitivitas terhadap antibiotik standar serta untuk membandingkan potensi aktivitas antibakteri dari sampel yang diteliti. Terbentuknya zona bening di sekitar cakram antibiotik pada media agar menunjukkan adanya daerah dimana pertumbuhan bakteri terhambat akibat aktivitas antibakteri dari kloramfenikol (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol positif kloramfenikol menghasilkan diameter zona hambat sebesar 25,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan klasifikasi kekuatan daya hambat antibakteri, diameter zona hambat yang lebih dari 20 mm termasuk dalam kategori sangat kuat, yang menunjukkan bahwa kloramfenikol memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Besarnya zona hambat yang dihasilkan menunjukkan bahwa antibiotik tersebut mampu berdifusi dengan baik pada media agar serta bekerja secara efektif dalam menghambat sintesis protein bakteri. Hasil ini juga sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kloramfenikol mampu menghasilkan zona hambat yang besar terhadap bakteri *S. aureus* sehingga sering digunakan sebagai kontrol positif dalam berbagai penelitian aktivitas antibakteri (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016; Jawetz, Melnick & Adelberg, 2018).

Terbentuknya zona hambat yang besar pada kontrol positif juga menunjukkan bahwa kondisi pengujian, seperti media pertumbuhan, metode difusi cakram, serta viabilitas bakteri uji berada dalam kondisi yang baik sehingga hasil pengujian dapat dianggap valid. Oleh karena itu, kloramfenikol digunakan sebagai pembanding untuk menilai potensi aktivitas antibakteri dari ekstrak yang diteliti. Dengan adanya kontrol positif yang menghasilkan zona hambat yang jelas, maka aktivitas antibakteri dari sampel dapat dievaluasi dengan lebih akurat melalui perbandingan diameter zona hambat yang terbentuk (Cappuccino & Welsh, 2017).

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Diameter zona hambat pada kontrol negatif dalam penelitian ini menunjukkan hasil 0 mm pada seluruh perlakuan. Kontrol negatif yang digunakan berupa masing-

masing pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, yaitu air, etanol 70%, dan n-heksana. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ketiga pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Kontrol negatif dalam uji aktivitas antibakteri berfungsi untuk memastikan bahwa zona hambat yang terbentuk pada perlakuan sampel benar-benar berasal dari senyawa aktif dalam ekstrak, bukan disebabkan oleh pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016).

Tidak terbentuknya zona hambat pada kontrol negatif menunjukkan bahwa pelarut air, etanol 70%, dan n-heksana tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri pada media agar. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut tersebut hanya berfungsi sebagai medium pelarut senyawa metabolit sekunder dari bahan tanaman tanpa memberikan efek antibakteri secara langsung pada konsentrasi yang digunakan dalam pengujian. Dengan demikian, apabila pada perlakuan ekstrak terbentuk zona hambat, maka aktivitas antibakteri tersebut dapat dipastikan berasal dari kandungan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak, bukan dari pelarut yang digunakan (Cappuccino & Welsh, 2017).

Selain itu, hasil kontrol negatif dengan diameter zona hambat 0 mm juga menandakan bahwa metode pengujian yang digunakan telah berjalan dengan baik. Dalam metode difusi cakram, apabila pelarut tidak memiliki aktivitas antibakteri, maka bakteri akan tetap tumbuh secara normal di sekitar cakram sehingga tidak terbentuk zona bening. Kondisi ini menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri uji tidak terganggu oleh faktor lain di luar senyawa aktif yang diuji, sehingga hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat dianggap valid (Madigan et al., 2019).

Dengan demikian, hasil kontrol negatif yang menunjukkan diameter zona hambat sebesar 0 mm pada pelarut air, etanol 70%, dan n-heksana menegaskan bahwa pelarut yang digunakan dalam penelitian ini tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Oleh karena itu, zona hambat yang terbentuk pada perlakuan ekstrak dapat dikaitkan secara langsung dengan aktivitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak tanaman yang diuji.

c. Diameter zona hambat perlakuan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diperoleh menggunakan pelarut yang berbeda menunjukkan aktivitas antibakteri yang berbeda terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri tersebut diamati melalui metode difusi cakram dengan melihat diameter zona hambat yang terbentuk pada media Mueller Hinton Agar setelah inkubasi. Zona hambat merupakan daerah bening di sekitar cakram yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin kuat aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh suatu ekstrak (CLSI, 2022).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% menghasilkan zona hambat dengan rata-rata diameter sebesar 8,77 mm yang termasuk dalam kategori sedang, sedangkan ekstrak air dan ekstrak n-heksana tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat dengan diameter 0 mm. Perbedaan aktivitas antibakteri ini berkaitan erat dengan kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada masing-masing ekstrak sebagaimana ditunjukkan pada hasil uji skrining fitokimia. Skrining fitokimia merupakan metode awal untuk mengidentifikasi golongan

senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada suatu ekstrak tumbuhan, seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid, yang diketahui memiliki potensi sebagai agen antibakteri (Harborne, 1998; Dewick, 2019).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak etanol 70% mengandung senyawa flavonoid dan tanin, sedangkan senyawa alkaloid dan saponin tidak terdeteksi pada ekstrak tersebut. Keberadaan flavonoid dan tanin pada ekstrak etanol diduga menjadi faktor utama yang menyebabkan terbentuknya zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antibakteri melalui beberapa mekanisme, di antaranya merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis asam nukleat, serta mengganggu metabolisme energi dalam sel bakteri. Selain itu, flavonoid juga mampu membentuk kompleks dengan protein dinding sel bakteri sehingga menyebabkan perubahan permeabilitas membran dan menghambat pertumbuhan bakteri (Kumar & Pandey, 2019).

Sementara itu, tanin diketahui memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein dan membentuk kompleks dengan protein pada dinding sel bakteri. Interaksi antara tanin dengan protein ini dapat menyebabkan kerusakan struktur dinding sel bakteri sehingga proses metabolisme sel terganggu dan akhirnya menyebabkan kematian bakteri. Tanin juga dapat menghambat aktivitas enzim mikroba yang berperan penting dalam proses metabolisme sel (Cowan, 2020). Oleh karena itu, keberadaan flavonoid dan tanin pada ekstrak etanol 70% diduga berperan dalam menghasilkan zona hambat dengan diameter rata-rata 8,77 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Selain kandungan senyawa metabolit sekunder, aktivitas antibakteri ekstrak juga dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Etanol 70% merupakan pelarut yang memiliki polaritas menengah sehingga mampu melarutkan senyawa polar maupun semi-polar seperti flavonoid dan tanin. Kombinasi antara etanol dan air dalam pelarut etanol 70% juga memungkinkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan sel tanaman menjadi lebih baik sehingga proses ekstraksi senyawa aktif menjadi lebih optimal. Oleh karena itu, pelarut etanol sering digunakan dalam penelitian ekstraksi tanaman obat karena kemampuannya dalam mengekstraksi berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri (Sarker & Nahar, 2020).

Berbeda dengan ekstrak etanol 70%, ekstrak air pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini dapat disebabkan oleh kemampuan pelarut air yang terbatas dalam mengekstraksi senyawa metabolit sekunder tertentu yang berperan sebagai antibakteri. Air merupakan pelarut yang sangat polar sehingga lebih efektif melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat sangat polar, seperti gula, protein larut air, serta beberapa komponen polisakarida yang secara umum tidak memiliki aktivitas antibakteri yang kuat. Meskipun ekstrak air pada penelitian ini menghasilkan nilai rendemen yang paling tinggi dibandingkan pelarut lainnya yaitu sebesar 3,33%, tingginya rendemen tersebut tidak selalu menunjukkan tingginya aktivitas biologis ekstrak. Hal ini karena komponen yang terekstraksi dalam jumlah besar dapat berupa senyawa-senyawa yang tidak berperan langsung sebagai agen antibakteri. Pote *et al.* (2025) menjelaskan bahwa jenis pelarut dapat mempengaruhi rendemen ekstrak sekaligus aktivitas antibakterinya secara berbeda, di mana ekstrak dengan

rendemen tinggi belum tentu menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat jika senyawa bioaktifnya tidak optimal terekstraksi. Rendemen ekstrak tidak selalu berbanding lurus dengan aktivitas antibakteri karena rendemen hanya mencerminkan jumlah total ekstrak, sedangkan aktivitas antibakteri lebih dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya (Rahardhian *et al.*, 2021).

Hasil skrining fitokimia pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air mengandung senyawa tanin. Tanin diketahui memiliki potensi sebagai antibakteri melalui kemampuannya berinteraksi dengan protein pada dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas membran sel. Namun, efektivitas aktivitas antibakteri tanin sangat dipengaruhi oleh konsentrasi serta kemampuan difusinya dalam media agar, di mana peningkatan konsentrasi dapat meningkatkan zona hambat, dan interaksi tanin dengan komponen media juga dapat memengaruhi aktivitasnya (Sardjiman *et al.*, 2023). Hal ini mengindikasikan konsentrasi tanin yang terekstraksi dalam ekstrak air relatif rendah atau memiliki kemampuan difusi yang terbatas pada media agar sehingga tidak mampu menghasilkan efek hambatan terhadap pertumbuhan bakteri pada metode difusi cakram. Selain itu, tidak terekstraksinya senyawa antibakteri lain seperti flavonoid secara optimal pada pelarut air juga dapat menyebabkan aktivitas antibakteri ekstrak menjadi rendah. Kondisi ini menyebabkan tidak terbentuknya zona hambat pada ekstrak air dengan diameter 0 mm.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun belimbing wuluh tidak menghasilkan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus*, sedangkan ekstrak etanol 70% mampu menghasilkan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang.

Perbedaan hasil tersebut sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ekstrak air umumnya memiliki aktivitas antibakteri yang lebih rendah dibandingkan ekstrak etanol. Penelitian oleh Rahardhian et al. (2021) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh menghasilkan zona hambat yang lebih besar terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan ekstrak dengan pelarut yang lebih polar. Hal ini dikarenakan etanol 70% mampu mengekstraksi senyawa bioaktif seperti flavonoid dan tanin secara lebih optimal dibandingkan air.

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekstrak air pada tanaman obat cenderung menghasilkan daya hambat yang lebih rendah dibandingkan ekstrak etanol terhadap bakteri gram positif. Penelitian Rahmawati et al. (2022) melaporkan bahwa ekstrak etanol buah ihaui menghasilkan zona hambat lebih besar terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan ekstrak air, yang menunjukkan bahwa pelarut etanol lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa bioaktif antibakteri dibandingkan air.

Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian Wahyuni et al. (2023) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol cenderung menghasilkan aktivitas antibakteri lebih tinggi dibandingkan ekstrak air karena etanol memiliki kemampuan melarutkan senyawa polar maupun semi-polar secara lebih efektif. Dengan demikian, tidak terbentuknya zona hambat pada ekstrak air dalam penelitian ini masih dapat dianggap valid dan sesuai dengan teori ekstraksi serta hasil penelitian sebelumnya. Perbedaan aktivitas antibakteri antar pelarut menunjukkan bahwa efektivitas ekstrak tanaman tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah rendemen yang diperoleh, tetapi juga oleh jenis senyawa bioaktif yang berhasil terekstraksi.

Hasil yang sama juga ditemukan pada ekstrak n-heksana yang tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. N-heksana merupakan pelarut non-polar yang umumnya digunakan untuk mengekstraksi senyawa non-polar seperti minyak, lipid, serta beberapa jenis terpenoid atau steroid non-polar. Senyawa-senyawa tersebut pada umumnya tidak selalu menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri gram positif terutama terhadap bakteri gram positif yang memiliki dinding sel tebal berupa peptidoglikan seperti *Staphylococcus aureus*, karena aktivitas antibakteri senyawa metabolit sekunder dapat bersifat bervariasi dari lemah hingga kuat tergantung pada struktur kimia dan konsentrasinya (Hamid *et al.*, 2024).

Hasil skrining fitokimia pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid. Meskipun flavonoid dikenal memiliki aktivitas antibakteri, sebagian besar flavonoid yang terekstraksi dalam pelarut non-polar seperti n-heksana biasanya berada dalam bentuk aglikon yang jumlahnya relatif sedikit, sehingga aktivitas antibakterinya tidak optimal. Selain itu, hal ini diduga karena konsentrasi senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak n-heksana relatif rendah serta kemampuan difusinya dalam media agar juga terbatas. Kondisi ini menyebabkan ekstrak n-heksana tidak mampu menghasilkan zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada metode difusi cakram yang digunakan dalam penelitian ini (Cushnie & Lamb, 2011).

Adapun ekstrak n-heksana memiliki nilai rendemen sebesar 1,60%. Nilai ini sedikit lebih besar daripada nilai rendemen ekstrak etanol 70% sebesar 1,37%. Meskipun ekstrak n-heksana memiliki rendemen yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 70%, hal tersebut tidak berbanding lurus dengan aktivitas

antibakterinya. Rendemen hanya menggambarkan jumlah total ekstrak yang diperoleh, sedangkan aktivitas antibakteri lebih ditentukan oleh jenis dan konsentrasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak (Makalalag, Santi & Kumaunang, 2019). Pelarut n-heksana cenderung mengekstraksi senyawa non-polar seperti lipid dan minyak yang umumnya memiliki aktivitas antibakteri yang terbatas, sedangkan etanol 70% mampu mengekstraksi senyawa semi-polar seperti flavonoid dan tanin yang berperan sebagai antibakteri (Sari, Nurhayati & Rahman, 2021). Selain itu, kemampuan difusi senyawa dalam media agar juga mempengaruhi terbentuknya zona hambat, di mana senyawa dengan kepolaran rendah cenderung memiliki difusi yang lebih terbatas sehingga menghasilkan zona hambat yang kecil atau tidak terbentuk (Agustin, Nurcahyanti & Setyawan, 2020).

Hasil ekstrak n-heksana yang tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* sesuai dengan temuan penelitian sebelumnya, di mana n-heksana dari *Strychnos lucida* tidak menghasilkan zona hambat yang signifikan terhadap *S. aureus* (Setyaningsih, Bahri & Nurjanah, 2024), serta studi lain yang melaporkan bahwa ekstrak n-heksana kulit nanas tidak memiliki aktivitas terhadap *S. aureus* dalam uji difusi cakram (Sitepu, Rahman & Puspasari, 2022).

Terbentuknya zona hambat pada perlakuan menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak mampu berdifusi ke dalam media agar dan berinteraksi dengan sel bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada metode difusi cakram, senyawa aktif akan menyebar dari cakram kertas menuju media di sekitarnya, kemudian menghambat pertumbuhan bakteri sehingga terbentuk area bening di sekitar cakram. Besar kecilnya diameter zona hambat dipengaruhi oleh kemampuan senyawa aktif untuk berdifusi, konsentrasi senyawa yang terkandung

dalam ekstrak, serta sensitivitas bakteri terhadap senyawa tersebut. Oleh karena itu, perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk pada masing-masing perlakuan menunjukkan adanya perbedaan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Pratiwi, 2017)

Perbedaan aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa polaritas pelarut memiliki pengaruh yang besar terhadap jenis senyawa metabolit sekunder yang berhasil diekstraksi dari bahan tanaman. Prinsip dasar ekstraksi menyatakan bahwa suatu senyawa akan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki polaritas yang sama atau mendekati polaritasnya. Oleh karena itu, pemilihan pelarut yang tepat sangat penting untuk memperoleh ekstrak dengan kandungan senyawa bioaktif yang optimal (Sarker & Nahar, 2020).

Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian yang dilakukan oleh Rahardhian *et al.* (2021) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, tanin, dan saponin yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian tersebut melaporkan bahwa ekstrak etanol menghasilkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak yang menggunakan pelarut non-polar. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut etanol lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa antibakteri dari daun belimbing wuluh.

Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Kesumawati (2022) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat yang meningkat seiring

dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan tanin memiliki peran penting dalam aktivitas antibakteri ekstrak tanaman. Penelitian lain oleh Wahyuni *et al.* (2023) juga menunjukkan bahwa ekstrak tanaman yang menggunakan pelarut polar hingga semi-polar cenderung menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut non-polar.

Berdasarkan hasil penelitian serta perbandingan dengan penelitian sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi serta kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Ekstrak etanol 70% menunjukkan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang karena mampu mengekstraksi senyawa flavonoid dan tanin yang berperan sebagai antibakteri. Sebaliknya, ekstrak air dan n-heksana tidak menunjukkan aktivitas antibakteri karena tidak mampu mengekstraksi senyawa antibakteri secara optimal.

3. Analisis perbedaan luas zona hambat antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Perbedaan zona hambat ekstrak air, ekstrak etanol 70% dan ekstrak n – heksana daun belimbing wuluh dapat diketahui melalui uji statistik. Dalam hal ini uji statistik dilakukan menggunakan aplikasi software *Statistical Program for Socian Science* (SPSS). Uji normalitas data dilakukan menggunakan metode Shapiro–Wilk untuk mengetahui apakah data zona hambat berdistribusi normal atau tidak. Berdasarkan hasil uji yang ditunjukkan pada tabel 7, kelompok kontrol positif memperoleh nilai signifikansi sebesar 0,764 ($p > 0,05$) dan kelompok ekstrak etanol

70% memperoleh nilai signifikansi sebesar 0,798 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa data pada kedua kelompok tersebut berdistribusi normal. Sementara itu, pada kelompok ekstrak air dan ekstrak n-heksana tidak dapat dilakukan uji normalitas sehingga tidak diperoleh nilai signifikansi. Hal ini disebabkan karena data yang diperoleh pada kelompok tersebut memiliki nilai yang sama atau tidak bervariasi. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa sebagian data tidak memenuhi asumsi normalitas, sehingga analisis statistik selanjutnya dilakukan menggunakan uji nonparametrik.

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah varian data antar kelompok perlakuan bersifat sama (homogen) atau tidak. Uji ini menggunakan *Levene's Test*. Berdasarkan hasil analisis diperoleh nilai *Levene Statistic* sebesar 6,941 dengan nilai signifikansi 0,006. Nilai signifikansi yang diperoleh lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa varian data antar kelompok tidak homogen. Dengan demikian, data penelitian tidak memenuhi asumsi homogenitas, sehingga analisis statistik selanjutnya menggunakan uji nonparametrik.

Uji Kruskal–Wallis dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan aktivitas antibakteri antara kelompok perlakuan yang meliputi ekstrak air, ekstrak etanol 70%, ekstrak n-heksana, dan kontrol positif. Uji ini digunakan karena data penelitian tidak memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Berdasarkan hasil analisis diperoleh nilai signifikansi (Asymp. Sig.) sebesar 0,002. Nilai signifikansi tersebut lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap daya hambat bakteri. Berdasarkan hasil uji Kruskal–Wallis tersebut, maka analisis dilanjutkan

dengan uji lanjut Mann–Whitney untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan.

Berdasarkan tabel 10 pada hasil Uji Mann–Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada beberapa pasangan perlakuan. Pada perbandingan antara ekstrak air dan ekstrak etanol 70%, diperoleh nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$), yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua perlakuan tersebut. Demikian pula, perbandingan antara ekstrak air dan kontrol positif juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$. Namun, pada perbandingan antara ekstrak air dan ekstrak n-heksana, diperoleh nilai $p = 1,000$ ($p > 0,05$), yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kedua perlakuan tersebut. Selanjutnya, perbandingan antara ekstrak etanol 70% dan ekstrak n-heksana menunjukkan hasil yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$). Perbandingan antara ekstrak etanol 70% dan kontrol positif juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,021$. Terakhir, perbandingan antara ekstrak n-heksana dan kontrol positif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,014$ ($p < 0,05$).

Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan, kecuali pada perbandingan antara ekstrak air dan ekstrak n-heksana yang tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik.