

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Gambaran Umum Penelitian

Daun pegagan dalam penelitian ini diambil dari lingkungan sekitar Kelurahan Abianbase, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Provinsi Bali. Kelurahan Abianbase terletak pada koordinat sekitar 8°33'22" LS dan 115°19'37" BT, dengan ketinggian wilayah ±108–111 meter di atas permukaan laut (mdpl). Kelurahan ini memiliki luas wilayah sekitar 4,66 km² dengan kondisi geografis berupa dataran rendah yang cukup mendukung kegiatan pertanian dan perkebunan. Berdasarkan kondisi wilayahnya, sebagian masyarakat di Kelurahan Abianbase bekerja pada sektor perdagangan, jasa, serta pertanian dan perkebunan dalam skala rumah tangga. Aktivitas masyarakat yang masih berkaitan dengan sektor pertanian turut mendukung pemanfaatan lahan untuk budidaya berbagai tanaman, termasuk tanaman obat tradisional seperti pegagan.

Tanaman pegagan umumnya tumbuh pada area terbuka maupun setengah teduh, dengan kondisi tanah yang lembab serta mendapatkan cukup sinar matahari. Selain itu, sistem drainase yang baik juga mendukung pertumbuhan tanaman pegagan sehingga dapat berkembang dengan optimal dan menghasilkan daun dengan kualitas yang baik.

Kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman pegagan dapat mempengaruhi kualitas daun, terutama dalam hal kandungan metabolit sekundernya. Menurut AP *et al.*, (2022), kandungan metabolit sekunder pada tanaman dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi faktor genetik, sedangkan

faktor eksternal meliputi intensitas cahaya matahari, suhu lingkungan, kelembaban, pH tanah, kandungan unsur hara, serta ketinggian tempat.

Dalam hal ini, ketinggian tempat menjadi salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman dan proses metabolisme di dalamnya. Kelurahan Abianbase memiliki ketinggian wilayah sekitar ± 111 meter di atas permukaan laut (mdpl) sehingga termasuk wilayah dataran rendah. Perbedaan ketinggian dapat mempengaruhi suhu lingkungan dan intensitas cahaya yang pada akhirnya berdampak terhadap proses biokimia tanaman. Oleh karena itu, tanaman pegagan yang tumbuh di wilayah dataran rendah seperti Kelurahan Abianbase memiliki kondisi lingkungan yang mendukung proses metabolisme serta pembentukan metabolit sekunder pada daun pegagan.



Gambar 4. (a), (b) Lahan di Desa Abianbase, Gianyar yang ditumbuhi pegagan

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram, dengan parameter yang diamati berupa diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram disk. Untuk memperoleh hasil yang akurat dan dapat dibandingkan, beberapa variabel dikendalikan selama proses penelitian. Variabel kontrol tersebut meliputi konsentrasi suspensi bakteri sebesar 50%, yang digunakan untuk menyeragamkan jumlah inokulum bakteri pada setiap perlakuan sehingga tidak memengaruhi hasil pengukuran zona hambat.

Selain itu, jarak antar cakram disk diatur sebesar ± 25 mm (2,5 cm) untuk

mencegah terjadinya tumpang tindih zona hambat yang dapat memengaruhi hasil pengukuran. pH media dijaga pada kondisi netral, yaitu sekitar pH 7,0, agar pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berlangsung optimal dan tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan media yang tidak sesuai.

Dengan dikontrolnya faktor-faktor tersebut, maka perbedaan zona hambat yang dihasilkan dapat dikaitkan dengan kemampuan masing-masing ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dipengaruhi oleh jenis pelarut dalam proses ekstraksi dan kandungan senyawa aktif yang dihasilkan dari daun pegagan.

2. Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder

Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n-heksana daun pegagan (*Centella asiatica L.*) dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu:

a. Pengumpulan sampel

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pegagan yang segar, yang tumbuh di wilayah Desa Abianbase, Gianyar yang memenuhi kriteria daun berwarna hijau merata tanpa bercak coklat atau kuning. Tidak menunjukkan tanda kerusakan fisik seperti sobek atau berlubang.

b. Pengolahan simplisia

Pembuatan simplisia daun pegagan dilakukan dengan cara sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bagian yang rusak, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Daun pegagan yang telah bersih selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ hingga kering. Simplisia yang telah kering ditandai dengan tekstur yang rapuh dan mudah dipatahkan, kemudian dihaluskan

menjadi serbuk. Daun pegagan segar yang digunakan dalam penelitian sebanyak 3 kg. Setelah melalui proses sortasi dan pengeringan, diperoleh simplisia daun pegagan sebanyak 810 gram. Simplisia kemudian diekstraksi menggunakan beberapa jenis pelarut, yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol.



Gambar 5. Daun pegagan kering

c. Pembuatan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.)

Pembuatan ekstrak daun pegagan dilakukan dengan metode maserasi menggunakan tiga jenis pelarut, yaitu etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Simplisia yang digunakan pada masing-masing pelarut sebanyak 150 gram sehingga total simplisia yang digunakan sebanyak 450 gram. Pada maserasi awal digunakan pelarut sebanyak 750 mL, kemudian ampas simplisia yang sama diremaserasi menggunakan pelarut baru sebanyak 750 mL untuk memperoleh hasil ekstraksi yang lebih optimal. Dengan demikian, total pelarut yang digunakan pada masing-masing pelarut sebanyak 1.500 mL. Banyaknya ekstrak yang diperoleh, serta hasil rendemen dinyatakan dalam tabel 3.

Tabel 3
Rendemen ekstrak daun pegagan

Pelarut	Berat simplisia(g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Etanol 96%	150	27,38	18,25
Etil asetat	150	5	3,33
N-heksana	150	2,48	1,65

d. Uji fitokimia

Dalam uji skrining fitokimia pada ekstrak etanol 96%, ekstrak etil aetat, dan ekstrak n-heksana daun pegagan (*Centella asiatica L.*) diperoleh hasil sesuai pada tabel 4.

Tabel 4
Hasil Uji Fitokimia Ekstrak

Jenis Uji	Hasil Uji Fitokimia					
	Ekstrak Etanol 96%	Kesimpulan	Ekstrak Etil Asetat	Kesimpulan	Ekstrak N-Heksana	Kesimpulan
Uji alkaloid	Terbentuk endapan jingga/coklat	(+)	Terbentuk endapan jingga/coklat	(+)	Tidak terbentuk endapan jingga/coklat	(-)
Uji flavonoid	Terjadi perubahan warna oranye	(+)	Perubahan warna kuning/oranye/merah	(+)	Tidak terjadi perubahan warna kuning/oranye/merah	(-)
Uji tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman	(+)	Tidak terbentuk warna hijau kehitaman	(-)	Tidak terbentuk warna hijau kehitaman	(-)
Uji terpenoid	Terbentuk warna merah/coklat	(+)	Terbentuk warna merah kecoklatan	(+)	Terbentuk warna merah kecoklatan	(+)
Uji saponin	Terbentuk busa stabil	(+)	Tidak ada busa stabil	(-)	Tidak ada busa stabil	(-)

Keterangan : (+) positif, (-) negatif

Berdasarkan tabel 4 dinyatakan bahwa ekstrak etanol 96% daun pegagan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Ekstrak etil asetat daun pegagan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Sementara ekstrak n-heksana daun pegagan mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid.

3. Diameter zona hambat ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica L.*) dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan dengan perbedaan pelarut

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi ekstrak tiap pelarutnya 50% dengan pengulangan sebanyak lima kali. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan parameter diameter zona hambat di sekitar cakram disk. Untuk memperoleh hasil yang akurat, beberapa variabel dikendalikan, yaitu konsentrasi suspensi bakteri 50%, jarak antar cakram ± 25 mm (2,5 cm), dan pH media netral sekitar 7,0 agar pertumbuhan bakteri optimal serta hasil pengukuran tidak dipengaruhi faktor lain. Dari hasil pengukuran diperoleh rerata luas zona hambat ekstrak etanol 96% sebesar 10,75 mm, rerata luas zona hambat ekstrak etil asetat sebesar 7,70 mm, dan rerata luas zona hambat ekstrak n-heksana sebesar 5,72 mm. Hasil luas zona hambat masing-masing ekstrak daun pegagan dinyatakan dalam tabel 5.

Tabel 5
Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Perlakuan	Zona Hambat (mm)					Rata-Rata $\pm$ SD (mm)	Kategori
	Pengulangan						
	1	2	3	4	5		
Kontrol negatif	0	0	0	0	0	0,00 $\pm$ 0,00	Tidak terbentuk zona hambat
Kontrol positif	25,12	25,35	24,28	23,91	24,61	24,65 $\pm$ 0,59	Sangat kuat
Ekstrak etanol 96%	9,88	11,16	10,35	11,20	11,19	10,75 $\pm$ 0,61	Kuat
Ekstrak etil asetat	7,98	7,90	7,56	7,23	7,82	7,70 $\pm$ 0,31	Sedang
Ekstrak n-heksana	4,92	6,20	5,28	6,25	5,96	5,72 $\pm$ 0,59	Sedang

4. Hasil analisis data

a. Uji normalitas

Uji normalitas data pada penelitian ini dilakukan dengan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan diperoleh hasil sesuai dengan tabel 6.

Tabel 6
Hasil Uji Normalitas Data

Variabel	Saphiro Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Kontrol positif	0.963	5	0.828
Ekstrak etanol 96%	0.788	5	0.064
Ekstrak etil asetat	0.903	5	0.426
Ekstrak n-heksana	0.936	5	0.276

Berdasarkan hasil uji normalitas menggunakan metode Shapiro-Wilk pada data diameter zona hambat, diperoleh nilai signifikansi untuk masing-masing kelompok perlakuan yaitu ekstrak etanol 96% sebesar 0,064, etil asetat sebesar 0,426, n-heksana sebesar 0,276, dan kontrol positif sebesar 0,828.

Nilai signifikansi seluruh kelompok menunjukkan nilai $p > 0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan berdistribusi normal. Kontrol negatif tidak disertakan dalam uji normalitas karena memiliki nilai konstan, sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan pengujian normalitas.

b. Uji homogenitas

Berdasarkan hasil uji homogenitas varians menggunakan uji Levene, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,196 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa varians data antar kelompok perlakuan homogen.

Terpenuhinya asumsi homogenitas ini menunjukkan bahwa data memenuhi syarat untuk dilakukan pengujian statistik paraetrik lebih lanjut yaitu uji *One Way ANOVA*.

c. Uji *One Way ANOVA*

Data hasil pengukuran zona hambat dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata antar perlakuan. Hasil analisis ANOVA disajikan pada tabel berikut.

Tabel 7
Hasil Uji *One Way Anova*

Variabel	Rata-Rata $\pm$ SD (mm)	Sig.
Kontrol positif	24,65 $\pm$ 0,59	0,001
Ekstrak etanol 96%	10,75 $\pm$ 0,61	
Ekstrak etil asetat	7,70 $\pm$ 0,31	
Ekstrak n-Heksana	5,72 $\pm$ 0,59	

Berdasarkan hasil uji *One-Way ANOVA*, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap diameter zona hambat. Dengan demikian, jenis pelarut memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan.

d. Uji *Post Hoc Tukey*

Setelah uji *ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing kelompok perlakuan. Hasil uji *Tukey* disajikan pada tabel berikut.

Tabel 8
Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Perlakuan (I)	Perlakuan (J)	p	Keterangan
Kontrol positif	Ekstrak etanol 96%	0.001	Berbeda
	Ekstrak etil asetat	0.001	
	Ekstrak n-heksana	0.001	
Ekstrak etanol 96%	Ekstrak etil asetat	0.001	Berbeda
	Ekstrak n-heksana	0.001	
Ekstrak etil asetat	Ekstrak n-heksana	0.001	Berbeda

Berdasarkan hasil uji lanjut *Tukey*, seluruh pasangan kelompok perlakuan menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara semua pasangan perlakuan. Uji *Tukey* menunjukkan seluruh pasangan perlakuan berbeda signifikan ($p < 0,05$). Urutan daya hambat tertinggi hingga terendah adalah kontrol positif, etanol 96%, etil asetat, n-heksana, dan kontrol negatif.

B. Pembahasan

1. Identifikasi kandungan metabolit sekunder ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica L.*)

a. Ekstraksi daun pegagan (*Centella asiatica L.*)

Dalam penelitian ini digunakan daun pegagan (*Centella asiatica L.*) yang dikumpulkan dari lingkungan Desa Abianbase, Gianyar. Daun yang dipilih adalah daun berwarna hijau merata tanpa bercak cokelat atau kuning. Tidak menunjukkan tanda kerusakan fisik seperti sobek atau berlubang.. Pemilihan lokasi pengambilan daun mempertimbangkan kondisi geografis desa yang berada di dataran rendah dengan aktivitas pertanian, sehingga tanaman pegagan tumbuh optimal dengan metabolit sekunder yang stabil.

Proses pembuatan simplisia daun pegagan dimulai dengan sortasi basah untuk memisahkan daun yang sesuai kriteria. Daun yang telah disortasi dicuci bersih untuk menghilangkan debu dan kontaminan, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama tiga hari hingga kering secara merata. Pengeringan pada suhu ini dilakukan untuk menjaga kadar air rendah sekaligus mempertahankan senyawa metabolit sekunder daun pegagan, karena suhu tinggi dapat merusak senyawa aktif seperti flavonoid, saponin, dan tanin (Warnis *et al.*, 2020)

Setelah pengeringan, daun pegagan ditimbang dan dihancurkan menjadi simplisia kering. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan tiga pelarut: etanol 96% (polar), etil asetat (semi-polar), dan n-heksana (non-polar). Pemilihan pelarut didasarkan pada prinsip “*like dissolves like*”, dimana senyawa aktif dalam daun pegagan akan larut dalam pelarut yang sesuai polaritasnya.

Etanol 96% dengan dipol 1,8 D mengekstrak senyawa polar seperti alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid. Etil asetat, semi-polar dengan dipol 1,78 D, mampu mengekstrak senyawa polar dan sebagian non-polar, sedangkan n-heksana, non-polar dengan dipol 0,08 D, efektif untuk senyawa non-polar seperti lipid dan minyak volatil (Aisy *et al.*, 2022).

Rasio pelarut terhadap sampel adalah 1:5, dimana semakin banyak pelarut digunakan, semakin besar perbedaan konsentrasi senyawa aktif antara pelarut dan simplisia. Namun, penambahan pelarut yang berlebihan tidak selalu meningkatkan hasil ekstraksi secara signifikan (Widyastutik *et al.*, 2022).

Hasil ekstraksi menunjukkan berat kental sebagai berikut: etanol 96% sebanyak 27,38 gram, ekstrak etil asetat sebanyak 5 gram, dan ekstrak –heksana sebanyak 2,48 gram. Hasil pengukuran nilai rendemen pada ekstrak etanol 96% diperoleh sebesar 18,25%, ekstrak etil asetat sebesar 3,33%, dan n-heksana sebesar 1,65%. Perbedaan nilai rendemen ini menunjukkan adanya pengaruh jenis pelarut terhadap kemampuan mengekstraksi senyawa metabolit sekunder dari daun pegagan.

Rendemen tertinggi pada ekstrak etanol 96% disebabkan oleh sifat etanol yang bersifat polar sehingga mampu melarutkan senyawa metabolit sekunder dalam jumlah lebih besar, terutama senyawa polar hingga semipolar seperti flavonoid, fenolik, saponin, dan alkaloid. Pelarut polar diketahui lebih efektif dalam proses ekstraksi karena memiliki kesesuaian dengan sifat senyawa target, sehingga proses difusi senyawa ke dalam pelarut menjadi lebih optimal (Ningsih *et al.*, 2025)

Sebaliknya, ekstrak etil asetat yang bersifat semipolar menghasilkan rendemen lebih rendah karena hanya mampu melarutkan senyawa dengan kepolaran

menengah. Sementara itu, ekstrak n-heksana sebagai pelarut nonpolar menunjukkan rendemen paling kecil karena hanya dapat menarik senyawa nonpolar seperti lipid, lilin, dan komponen minyak atsiri yang jumlahnya relatif sedikit dalam daun pegagan. Hal ini sesuai dengan prinsip “*like dissolves like*”, yaitu senyawa akan lebih mudah larut dalam pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama (Olivira *et al.*, 2023).

Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun pegagan lebih dominan bersifat polar, sehingga lebih efektif diekstraksi menggunakan pelarut polar seperti etanol 96%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hasnaeni *et al.*, (2019) yang menyatakan bahwa semakin tinggi nilai rendemen yang diperoleh, maka semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang berhasil diekstraksi. Dengan demikian, pemilihan pelarut yang sesuai sangat berpengaruh terhadap jumlah dan jenis senyawa yang diperoleh dalam proses ekstraksi.

b. Identifikasi senyawa fitokimia

Identifikasi metabolit sekunder pada ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa bioaktif yang berpotensi mendukung aktivitas antibakteri. Metabolit sekunder yang diuji meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid, dengan masing-masing ekstrak menggunakan pelarut etanol 96% (polar), etil asetat (semi-polar), dan n-heksana (non-polar). Tujuan uji fitokimia adalah untuk menentukan jenis senyawa yang terekstraksi oleh pelarut tertentu dan hubungannya dengan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Berdasarkan hasil uji fitokimia (Tabel 4), ekstrak dengan pelarut berbeda

menunjukkan profil metabolisme yang berbeda. Hal ini disebabkan perbedaan polaritas pelarut yang memengaruhi kemampuan larut senyawa aktif dalam daun pegagan (Aisy *et al.*, 2022). Prinsip “*like dissolves like*” menjelaskan bahwa senyawa polar larut dalam pelarut polar, senyawa semi-polar larut dalam pelarut semi-polar, dan senyawa non-polar larut dalam pelarut non-polar.

Alkaloid adalah senyawa nitrogen kompleks yang banyak ditemukan pada tanaman dikotil, termasuk daun pegagan. Senyawa ini memiliki sifat polar hingga semi-polar dan dikenal memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan. Uji alkaloid menggunakan reagen Dragendorff menunjukkan terbentuknya endapan jingga/coklat pada ekstrak etanol 96% dan etil asetat, sedangkan ekstrak n-heksana negatif. Aktivitas antibakteri alkaloid terjadi melalui mekanisme pengikatan pada dinding sel bakteri, mengganggu sintesis protein, serta mengintervensi peptidoglikan, sehingga pertumbuhan mikroba terhambat. Hal ini menjelaskan mengapa ekstrak etanol 96% dan etil asetat menunjukkan potensi antibakteri lebih tinggi dibanding ekstrak n-heksana (Sarjono *et al.*, 2025).

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang bersifat polar dan dikenal memiliki aktivitas antibakteri alami. Senyawa ini banyak ditemukan pada tanaman dikotil, termasuk daun pegagan (*Centella asiatica*), serta mudah terekstraksi menggunakan pelarut polar seperti etanol dan semipolar seperti etil asetat. Flavonoid dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis, salah satunya sebagai antibakteri melalui berbagai mekanisme kerja (Wulandari *et al.*, 2024). Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan NaOH 2% dan HCl, menghasilkan perubahan warna kuning pada ekstrak etanol 96% dan ekstrak etil asetat sementara pada ekstrak n-heksana tidak menunjukkan

perubahan warna. Perubahan warna ini terjadi akibat terbentuknya garam flavonoid dalam suasana basa yang kemudian kembali ke bentuk semula setelah penambahan asam. Sementara itu, ekstrak n-heksana tidak menunjukkan perubahan warna karena flavonoid bersifat polar sehingga tidak larut dalam pelarut nonpolar. Aktivitas antibakteri flavonoid terjadi melalui beberapa mekanisme, di antaranya adalah merusak permeabilitas membran sel bakteri, menghambat aktivitas enzim penting dalam metabolisme mikroba, serta membentuk kompleks dengan ion logam yang dibutuhkan oleh bakteri untuk pertumbuhan. Mekanisme ini menyebabkan terganggunya fungsi sel bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bahkan menyebabkan kematian sel (Putri *et al.*, 2025)

Tanin adalah senyawa polifenol polar yang banyak terdapat pada tanaman dikotil dan berperan sebagai antibakteri serta antioksidan. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antioksidan. Karena sifatnya yang polar, tanin umumnya lebih mudah terekstraksi menggunakan pelarut polar seperti etanol (Sunani & Hendriani, 2023). Uji tanin menggunakan larutan FeCl_3 menunjukkan perubahan warna hijau kehitaman pada ekstrak etanol 96%. Sementara itu, ekstrak etil asetat dan n-heksana tidak menunjukkan perubahan warna (negatif). Hal ini disebabkan oleh perbedaan kepolaran pelarut, di mana etanol yang bersifat polar mampu melarutkan tanin, sedangkan etil asetat (semipolar) dan n-heksana (nonpolar) kurang efektif dalam mengekstraksi senyawa tersebut. Tanin memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme pengikatan terhadap protein membran sel bakteri, yang menyebabkan terjadinya denaturasi protein dan kerusakan struktur sel. Selain itu, tanin juga dapat menghambat kerja enzim mikroba serta mengganggu proses metabolisme sel, sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat (Putri *et al.*, 2025; Sunani &

Hendriani, 2023)

Terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang umumnya bersifat nonpolar hingga semipolar dan banyak terdapat pada tanaman, termasuk daun pegagan (*Centella asiatica*). Senyawa ini dapat diekstraksi dengan berbagai pelarut, namun lebih optimal menggunakan pelarut nonpolar seperti n-heksana karena kesesuaian sifat kepolarannya. Meskipun demikian, beberapa jenis terpenoid juga dapat terekstraksi dalam pelarut semipolar dan polar tergantung pada struktur kimianya (Candra *et al.*, 2023). Hasil uji fitokimia terpenoid menunjukkan adanya perubahan warna menjadi merah atau jingga pada ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana, yang menandakan adanya kandungan terpenoid pada ketiga ekstrak tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa terpenoid dalam daun pegagan memiliki variasi kepolaran, sehingga dapat larut dalam berbagai jenis pelarut, baik polar, semipolar, maupun nonpolar. Terpenoid diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme kerusakan membran sel bakteri. Senyawa ini dapat meningkatkan permeabilitas membran, menyebabkan kebocoran komponen intraseluler, serta mengganggu keseimbangan (homeostasis) sel bakteri. Kerusakan tersebut menyebabkan terganggunya fungsi sel hingga menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian bakteri (Putri *et al.*, 2025)

Saponin merupakan senyawa metabolit sekunder golongan glikosida yang bersifat polar dan banyak ditemukan pada tanaman, termasuk daun pegagan (*Centella asiatica*). Senyawa ini dikenal memiliki aktivitas sebagai antibakteri alami serta mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol (Aisy *et al.*, 2022) Hasil uji fitokimia saponin dengan metode pengocokan menggunakan air menunjukkan

terbentuknya busa yang stabil pada ekstrak etanol 96%, yang menandakan adanya kandungan saponin. Sementara itu, ekstrak etil asetat dan n-heksana tidak menunjukkan pembentukan busa (negatif). Hal ini disebabkan oleh sifat saponin yang polar, sehingga hanya dapat terekstraksi secara optimal menggunakan pelarut polar, sedangkan pelarut semipolar dan nonpolar kurang efektif dalam melarutkan senyawa tersebut. Saponin memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme peningkatan permeabilitas membran sel bakteri. Senyawa ini dapat berinteraksi dengan komponen lipid membran, sehingga menyebabkan kebocoran isi sel dan berujung pada lisis sel mikroba. Selain itu, saponin juga diketahui dapat membentuk kompleks dengan sterol pada membran sel, yang semakin memperkuat kerusakan struktur membran (Putri *et al.*, 2025)

Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak daun *Centella asiatica* menunjukkan kandungan metabolit sekunder yang berbeda pada setiap jenis pelarut. Ekstrak etanol 96% mengandung senyawa paling lengkap yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid, sedangkan ekstrak etil asetat hanya mengandung alkaloid, flavonoid, dan terpenoid, serta ekstrak n-heksana hanya menunjukkan adanya terpenoid.

Perbedaan kandungan senyawa tersebut dipengaruhi oleh polaritas pelarut yang digunakan, di mana pelarut polar cenderung mengekstraksi lebih banyak senyawa bioaktif dibandingkan pelarut semi-polar dan non-polar.

2. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.)

a. Diameter zona hambat kontrol positif

Dalam penelitian ini digunakan antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif. Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang bekerja dengan

cara menghambat sintesis protein bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri dapat terhambat. Antibiotik ini efektif terhadap berbagai bakteri, termasuk *Staphylococcus aureus* (Islamiyati & Husen, 2025)

Penggunaan kloramfenikol sebagai kontrol positif bertujuan untuk memastikan bahwa metode pengujian yang dilakukan telah valid serta bakteri uji berada dalam kondisi sensitif terhadap antibiotik. Kloramfenikol yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk kertas cakram yang telah mengandung antibiotik, sehingga akan terbentuk zona bening di sekitar cakram sebagai indikator adanya aktivitas antibakteri.

Berdasarkan hasil penelitian, kontrol positif menunjukkan rata-rata diameter zona hambat sebesar 24,65 mm yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Menurut (Davis & Stout, 1971) dalam Aisy *et al.*, (2022), diameter zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan sebagai daya hambat sangat kuat.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh (Magvirah *et al.*, 2019) yang melaporkan bahwa kloramfenikol menghasilkan diameter zona hambat sebesar 23–28 mm terhadap *Staphylococcus aureus*, yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Nilai tersebut mendekati hasil yang diperoleh dalam penelitian ini. Perbedaan kecil yang terjadi dapat dipengaruhi oleh faktor seperti konsentrasi antibiotik, ketebalan media, kepadatan inokulum, serta kondisi inkubasi (Febrianti *et al.*, 2025).

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Dalam penelitian ini digunakan akuades sebagai kontrol negatif. Penggunaan akuades sebagai kontrol negatif bertujuan untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan dalam kondisi tanpa mengandung zat aktif dapat memberikan pengaruh

terhadap terbentuknya zona hambat pada bakteri uji. Akuades dipilih karena bersifat netral dan tidak memiliki aktivitas antibakteri, sehingga diharapkan tidak menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa diameter zona hambat pada kontrol negatif (akuades) adalah 0 mm pada seluruh pengulangan. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terbentuk zona bening di sekitar cakram disk, sehingga bakteri tetap tumbuh secara normal. Hasil ini menandakan bahwa akuades tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh (Magvirah *et al.*, 2019) yang melaporkan bahwa penggunaan akuades sebagai kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat (0 mm) terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut yang tidak mengandung senyawa aktif tidak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Tidak terbentuknya zona hambat pada kontrol negatif juga menegaskan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan pada perlakuan ekstrak sepenuhnya disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan, bukan oleh pelarut yang digunakan. Dengan demikian, akuades sebagai kontrol negatif tidak memiliki efek antibakteri dan tidak mempengaruhi hasil pengujian, sehingga validitas metode uji yang digunakan dapat diterima (Putri *et al.*, 2025)

c. Diameter zona hambat perlakuan

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n-heksana daun pegagan (*Centella asiatica L.*) terhadap bakteri

Staphylococcus aureus, yang dilakukan dengan pengulangan sebanyak lima kali, menunjukkan adanya perbedaan diameter zona hambat pada masing-masing perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rata-rata diameter zona hambat ekstrak etanol 96% sebesar 10,75 mm yang tergolong kategori kuat, ekstrak etil asetat sebesar 7,70 mm dan ekstrak n-heksana sebesar 5,722 mm yang keduanya tergolong kategori sedang, sedangkan kontrol positif sebesar 24,65 mm termasuk kategori sangat kuat, dan kontrol negatif tidak menunjukkan zona hambat (0 mm).

Berdasarkan klasifikasi daya hambat menurut Davis & Stout, 1971 dalam Aisy *et al.*, (2022), diameter zona hambat >20 mm termasuk kategori sangat kuat, 10–20 mm kuat, 5–10 mm sedang, dan <5 mm lemah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksana.

Perbedaan aktivitas antibakteri ini dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Etanol 96% sebagai pelarut polar mampu mengekstraksi lebih banyak senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar seperti flavonoid, tanin, dan saponin. Sementara itu, etil asetat sebagai pelarut semipolar hanya mampu mengekstraksi sebagian senyawa tersebut, dan n-heksana sebagai pelarut nonpolar cenderung mengekstraksi senyawa nonpolar seperti terpenoid. Hal ini sesuai dengan prinsip *like dissolves like*, yaitu senyawa akan larut dalam pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama (Aisy *et al.*, 2022). Meskipun demikian, jumlah dan variasi senyawa antibakteri yang terekstraksi lebih sedikit dibanding pelarut polar, sehingga aktivitas antibakterinya lebih rendah.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat kepolaran

pelarut yang digunakan, maka semakin besar diameter zona hambat yang dihasilkan. Hal ini sejalan dengan penelitian yang melaporkan bahwa pelarut polar lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa aktif antibakteri dibandingkan pelarut nonpolar karena mampu melarutkan senyawa bioaktif dalam jumlah lebih banyak (Aisy *et al.*, 2022).

Aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 96% berasal dari kandungan senyawa metabolit sekunder yang berhasil diekstraksi, berdasarkan hasil uji fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid. Keberadaan senyawa-senyawa tersebut berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* melalui berbagai mekanisme kerja.

Flavonoid bekerja dengan merusak membran sel bakteri, menghambat aktivitas enzim, serta mengganggu sintesis asam nukleat. Tanin dapat mengendapkan protein sel dan mengganggu permeabilitas membran, sehingga menyebabkan kerusakan struktur sel bakteri. Sementara itu, saponin bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan kebocoran isi sel bakteri. Selain itu, alkaloid berperan dalam menghambat sintesis protein dan mengganggu pembentukan dinding sel, sedangkan terpenoid dapat merusak membran sel bakteri dan mengganggu keseimbangan sel (Putri *et al.*, 2025)

Ekstrak etil asetat juga menunjukkan aktivitas antibakteri meskipun lebih rendah dibandingkan etanol, yang diduga karena kandungan senyawa aktif yang terekstraksi lebih sedikit. Sementara itu, ekstrak n-heksana menunjukkan aktivitas paling rendah karena hanya mampu mengekstraksi senyawa nonpolar seperti terpenoid. Terpenoid memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme kerusakan membran sel, namun efektivitasnya relatif lebih rendah dibandingkan senyawa

polar dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Candra *et al.*, 2023)

Selain faktor pelarut, perbedaan zona hambat juga dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain seperti konsentrasi ekstrak, sensitivitas mikroorganisme, ketebalan media, serta kondisi inkubasi. Menurut (Hafizah *et al.*, 2024), faktor teknis seperti konsentrasi zat antibakteri, jarak antar cakram, serta kondisi aseptik juga dapat mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% daun pegagan memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksana terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri pada daun pegagan cenderung bersifat polar sehingga lebih optimal diekstraksi menggunakan pelarut polar.

3. Analisis perbedaan luas zona hambat antibakteri ekstrak daun pegagan

Perbedaan zona hambat ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n-heksana dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan aplikasi *Statistical Program for Social Science* (SPSS). Untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak, dilakukan uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50.

Berdasarkan hasil uji normalitas, diperoleh nilai signifikansi ekstrak etanol 96% sebesar $p = 0,064$, ekstrak etil asetat $p = 0,532$, ekstrak n-heksana $p = 0,635$, dan kontrol positif $p = 0,828$. Jika dibandingkan dengan nilai $\alpha = 0,05$, seluruh kelompok memiliki nilai $p > 0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Kontrol negatif tidak disertakan dalam uji normalitas karena data bersifat konstan (tidak memiliki zona hambat).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui kesamaan varians antar kelompok. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,196$ ($p > 0,05$), yang berarti data homogen. Hal ini menunjukkan bahwa varians antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara signifikan, sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik.

Untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata zona hambat, dilakukan uji *One Way ANOVA*. Hasil analisis menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,001$. Jika dibandingkan dengan nilai $\alpha = 0,05$, maka $p < \alpha$ ($0,001 < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai perlakuan ekstrak daun pegagan.

Karena data berdistribusi normal dan homogen, maka uji lanjut (*post hoc test*) yang digunakan adalah uji Tukey HSD. Berdasarkan hasil uji lanjut (*post hoc test*) menggunakan metode Tukey HSD, dilakukan analisis perbandingan antar masing-masing kelompok perlakuan untuk mengetahui pasangan mana yang memiliki perbedaan signifikan terhadap diameter zona hambat. Hasil uji menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol 96% dengan ekstrak etil asetat ($p < 0,05$), serta antara ekstrak etanol 96% dengan ekstrak n-heksana ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki aktivitas antibakteri yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kedua ekstrak lainnya. Selain itu, terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksana ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksana. Perbandingan antara masing-masing ekstrak dengan kontrol positif juga

menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), di mana kontrol positif memiliki daya hambat yang paling tinggi dibandingkan seluruh ekstrak. Dengan demikian, berdasarkan uji Tukey urutan aktivitas antibakteri dari yang tertinggi hingga terendah adalah kontrol positif, ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n-heksana. Kontrol negatif tidak disertakan dalam analisis statistik karena memiliki nilai konstan (0 mm) pada seluruh pengulangan, sehingga tidak memenuhi asumsi variasi data dan dapat mempengaruhi hasil uji statistik. Namun, kontrol negatif tetap digunakan sebagai pembanding secara deskriptif untuk menunjukkan bahwa pelarut tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Hasil ini menunjukkan bahwa jenis pelarut berpengaruh terhadap kemampuan dalam mengekstraksi senyawa aktif dari daun pegagan. Pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda akan melarutkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda pula, sehingga menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda terhadap *Staphylococcus aureus*.