

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Data yang diperoleh yakni hasil determinasi tanaman, rendemen, hasil uji organoleptik, hasil skrining fitokimia, hasil uji kromatografi lapis tipis, hasil pewarnaan gram dan hasil uji aktivitas antibakteri.

1. Determinasi Tanaman

Daun pepaya yang digunakan diperoleh dari Desa Tajeman, Palbapang, Bantul. Determinasi daun pepaya dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tanggal 5 Maret 2021 dengan nomor pendaftaran 014978/S.Tb./III/2021. Hasil identifikasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 2.

2. Persiapan Sampel

a. Pembuatan simplisia

Daun pepaya (*Carica papaya* L.) warna hijau tua yang masih segar, bagus dan utuh sebanyak 1,5 kg dicuci bersih dengan air mengalir. Daun tersebut dipindahkan pada nampan lalu dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam untuk dilakukan proses pengeringan. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air serta menghentikan reaksi enzimatik yang dapat merusak mutu simplisia (Wirasti et al., 2021). Tujuan ditutup menggunakan kain hitam untuk mencegah terjadinya kerusakan komponen kimia yang ada pada daun pepaya (Anggrahini et al., 2007). Selama pengeringan, daun dibolak-balik agar kering merata. Total waktu pengeringan adalah 5 hari, ditandai dengan simplisia yang

kaku serta saat dipatahkan menimbulkan suara. Daun pepaya yang sudah kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk, tujuannya untuk memperluas permukaan agak kontak antara daun pepaya dengan pelarut penyari menjadi lebih besar (Christalina et al., 2017). Serbuk daun pepaya ditimbang sebanyak 300 gram dan siap untuk diekstraksi.

b. Pembuatan ekstrak kental etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya

Serbuk daun pepaya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70 %. Proses maserasi dilakukan dengan cara 300 gram serbuk daun pepaya direndam dalam pelarut etanol 70 % sebanyak 3 liter kemudian dilakukan pengadukan tiap 6 jam, tujuan pengadukan agar mencapai keadaan setimbang dan mencegah kejenuhan sehingga zat aktif yang ada pada simplisia dapat tersari sempurna dalam cairan penyari. Alasan menggunakan pelarut etanol 70 % karena etanol memiliki sifat non toksik, aman dan mampu menarik senyawa yang ada pada simplisia lebih banyak (Hasanah & Novian, 2020). Proses maserasi dilakukan selama tiga hari dan dilanjutkan dengan remaserasi selama dua hari. Remaserasi merupakan suatu proses perendaman kembali serbuk daun pepaya menggunakan pelarut baru. Remaserasi dilakukan dengan tujuan untuk menarik senyawa yang kemungkinan masih tertinggal selama proses maserasi (Nadia et al., 2016). Hasil maserasi dan remaserasi digabung dan dilanjutkan dengan proses penyaringan menggunakan kain saring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan diatas kompor hingga terbentuk ekstrak kental.

Fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut etanol p.a dan air. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa penyusun daun pepaya sesuai tingkat kepolarannya (Tanaya & Retnowati, 2015). Fraksinasi dilakukan dengan cara melarutkan 3 gram ekstrak kental daun pepaya dengan air panas 10 mL dan etanol sebanyak 40 mL, dimasukkan kedalam corong pisah. Selanjutnya ditambahkan n-

heksan p.a sebanyak 50 mL kemudian dipartisi dengan sesekali membuka tutup corong pisah untuk membuang gas yang ada akibat proses penggojogan. Larutan dalam corong pisah didiamkan hingga terjadi pemisahan dua fase. Lapisan atas merupakan pelarut non polar n-heksan sedangkan lapisan bawah merupakan pelarut polar etanol-air. Fraksi n-heksan dan fraksi etanol-air dikeluarkan dari corong pisah. Proses fraksinasi dengan pelarut n-heksan direplikasi sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi pelarut polar diuapkan diatas *waterbath* 50°C hingga diperoleh fraksi kental etanol-air.



Gambar 5. Proses Fraksinasi

Ekstrak etanol daun pepaya yang didapat sebanyak 82,59 gram dan fraksi etanol-air daun pepaya sebanyak 4,7 gram. Ekstrak dan fraksi kental yang diperoleh selanjutnya dihitung rendemen dalam bentuk persen dengan membagi berat yang didapat terhadap berat yang digunakan saat maserasi. Rendemen ekstrak etanol daun pepaya sebesar 27,53% sedangkan rendemen fraksi etanol-air diperoleh 5,69 %.

Tabel 2. Rendemen Ekstrak Etanol Daun Pepaya dan Fraksi Etanol-Air

	Berat yang didapat (g)	Rendemen (100%)
Ekstrak etanol	82,59	27,53%
Fraksi etanol-air	4,7	5,69 %.

3. Kontrol Kualitas

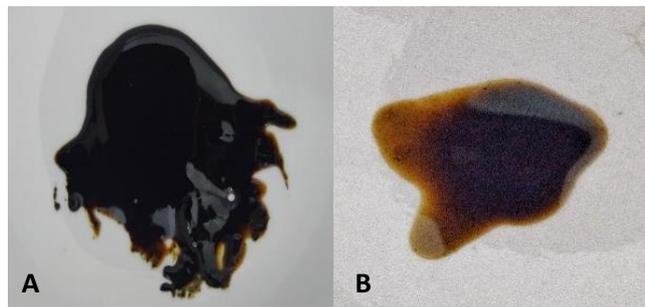
a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk memberikan pengenalan awal terhadap ekstrak etanol dan fraksi etanol-air secara objektif menggunakan panca indra. Pengamatan organoleptik meliputi bentuk, warna, bau dan rasa yang dapat dilihat pada tabel 3.

Ekstrak etanol daun pepaya berbentuk kental berwarna hijau kecoklatan dan berbau khas. Fraksi etanol-air berbentuk cair agak kental berwarna hijau kehitaman dengan bau khas. Hasil uji organoleptik ekstrak dan fraksi kental terhadap pengamatan unsur rasa menunjukkan hasil sangat pahit. Rasa pahit tersebut dapat disebabkan karena adanya kandungan enzim papain pada daun pepaya.

Tabel 3. Hasil Uji Organoleptik

Pengamatan	Ekstrak Etanol Daun Pepaya	Fraksi Etanol-Air Daun Pepaya
Bentuk	Kental	Cair, agak kental
Warna	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan
Bau	Khas	Khas
Rasa	Sangat pahit	Sangat pahit



Gambar 6. Ekstrak Etanol Daun Pepaya (A), Fraksi Etanol-Air Daun Pepaya (B).

b. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung pada suatu tanaman. Ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh dari Desa Tajeman, Palbapang, Bantul positif mengandung saponin, flavonoid dan tanin. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nor et al., (2018), ekstrak etanol daun pepaya yang diperoleh dari kota Kupang mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Menurut Karisma (2019) ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) mengandung senyawa flavonoid. Menurut Alorkpa et al., (2016) ekstrak etanol daun pepaya positif mengandung alkaloid, flavonoid, glikosida dan tanin. Uji skrining fitokimia pada penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dengan beberapa pustaka. Hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan seperti cahaya, suhu, pH, ketinggian tempat dapat berpengaruh terhadap hasil metabolisme sekunder suatu tanaman (Sholekah, 2017). Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya terhadap kandungan saponin, flavonoid, tanin dan alkaloid dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol dan Fraksi Etanol-Air Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Uji Senyawa	Teori	Hasil yang diperoleh		Kesimpulan	
		Ekstrak Etanol	Fraksi Etanol-Air	Ekstrak Etanol	Fraksi Etanol-Air
Saponin	Terbentuk buih	Terbentuk buih	Terbentuk buih	Positif	Positif
Flavonoid	Warna merah/jingga	Tidak terjadi perubahan warna	Warna jingga	Positif	Positif
Tanin	Warna biru tua/hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman	Positif	Positif
Alkaloid	Endapan putih (Pereaksi Mayer)	Tidak terbentuk endapan	Tidak terbentuk endapan	Negatif	Negatif
	Endapan merah kecoklatan (Pereaksi Wagner)	Tidak terbentuk endapan	Tidak terbentuk endapan	Negatif	Negatif
	Endapan merah jingga (Pereaksi Dragendrof)	Tidak terbentuk endapan	Tidak terbentuk endapan	Negatif	Negatif

Saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar, dimana gugus polar akan berikatan dengan air sedangkan gugus non polar akan berikatan dengan udara sehingga pada saat dikocok akan timbul busa. Uji kandungan saponin ekstrak etanol dan

fraksi etanol-air daun pepaya menunjukkan hasil positif yaitu terbentuknya buih setelah dikocok dan saat ditambah dengan HCl 1% buih tidak hilang. Uji saponin memiliki prinsip dimana akan terjadi reaksi hidrolisis senyawa saponin, ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil (Wardana & Tukiran, 2016). Tujuan penambahan HCl pada uji ini untuk meningkatkan kepolaran sehingga buih yang terbentuk menjadi lebih stabil.

Uji kandungan flavonoid ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi etanol-air memberikan hasil positif yaitu terjadi perubahan warna jingga. Penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid sehingga terbentuk senyawa berwarna merah (Wardana & Tukiran, 2016). Sampel daun pepaya diduga mengandung senyawa flavonoid golongan flavon dan flavonol (Ningsih & Rejeki, 2018).

Uji kandungan tanin ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya memberikan hasil positif yaitu terbentuk warna hijau kehitaman setelah ditambah dengan pereaksi FeCl_3 1%. Menurut Kusumaningsih et al., (2015) terbentuknya warna hijau kehitaman terjadi karena adanya reaksi antara tanin dan FeCl_3 yang membentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks terjadi karena atom O pada tanin yang memiliki pasangan elektron bebas yang dapat berikatan ke atom pusat ion Fe^{3+} sebagai ligannya.

Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung atom nitrogen dan bersifat basa. Prinsipnya akan terjadi reaksi pengendapan karena adanya penggantian ligan dari masing-masing pereaksi. Uji alkaloid ekstrak etanol dan fraksi etanol-air pada pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff memberikan hasil negatif yaitu tidak terbentuk endapan. Hal tersebut bisa terjadi karena kemungkinan daun pepaya yang digunakan memiliki sedikit kandungan alkaloid sehingga tidak terbentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari masing-masing pereaksi (Simaremare, 2014).

c. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi senyawa penanda dalam ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya senyawa penanda kuersetin dalam sampel. Pada penelitian ini dilakukan optimasi sebanyak tiga kali hingga diperoleh hasil yang paling optimal. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 5. Berdasarkan hasil optimasi penentuan fase gerak, kombinasi kloroform-metanol (9:1 v/v) merupakan fase gerak yang dapat memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya. Sesuai dengan penelitian Raaman, (2015) dan Muthmainnah, (2016) menyatakan bahwa eluen kloroform-metanol dapat memisahkan komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak daun pepaya. Hasil uji KLT terhadap ekstrak etanol, fraksi etanol-air daun pepaya dan standar kuersetin dapat dilihat pada gambar 7.

Tabel 5. Optimasi Fase Gerak pada KLT

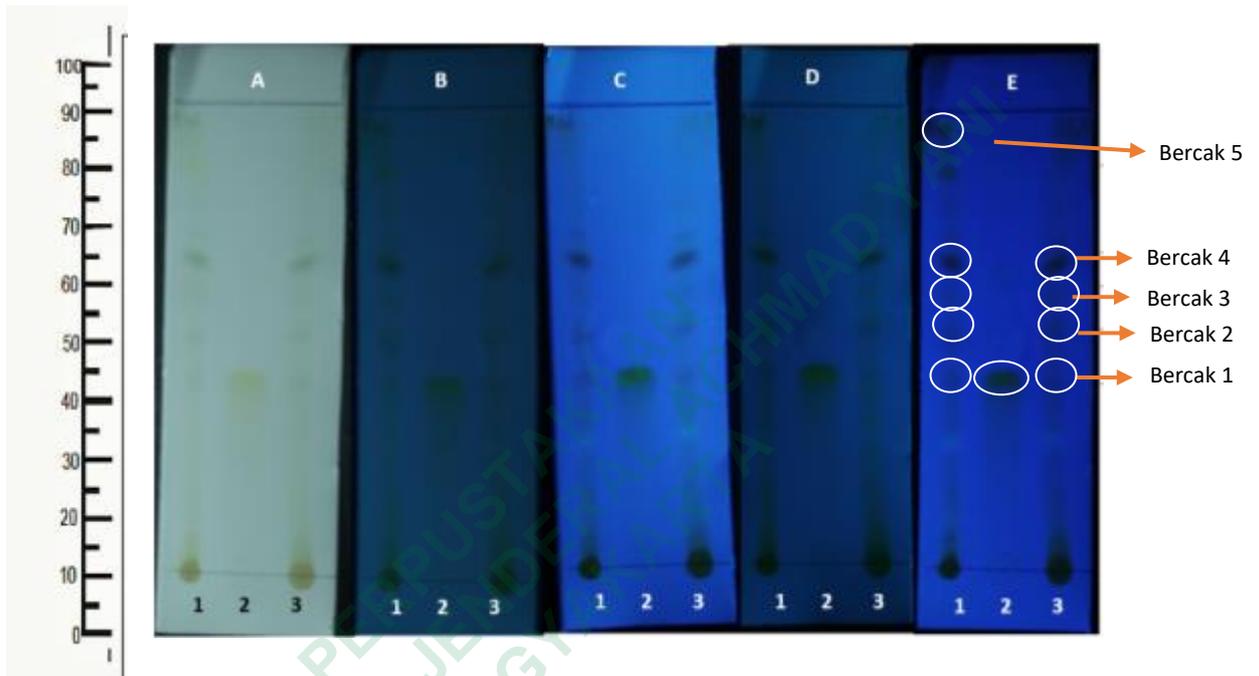
No.	Fase Gerak	Hasil
1.	Kloroform:Metanol (9:1)	Sampel konsentrasi 10% memisah dengan baik namun standar kuersetin <i>tailing</i> . Penyelesaian: fase gerak ditambah asam asetat glasial.
2.	Kloroform:Metanol: Asam Asetat Glasial (9:1:0,5)	Bercak sampel tidak ada yang sama dengan bercak standar kuersetin. Penyelesaian: konsentrasi sampel dinaikkan jadi 25%.
3.	Kloroform:Metanol (9:1)	Sampel ekstrak dan fraksi konsentrasi 25% memisah dengan baik, spot sampel ada yang sama dengan spot standar.

Prinsip KLT sendiri untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan prinsip partisi (pemisahan) dan adsorpsi (penyerapan), yang ditentukan dari fase gerak dan fase diam. Fase gerak yang digunakan adalah kombinasi kloroform-metanol dengan perbandingan 9:1 sedangkan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60. Fase gerak yang digunakan merupakan eluen semi polar. Nantinya apabila komponen sampel dapat larut dalam fase gerak serta tidak tertahan pada fase diam, maka dapat diartikan bahwa senyawa yang ada pada sampel mengandung senyawa semi polar. Sebelum digunakan, silika gel diaktifkan dengan cara dioven pada suhu 100°C selama 30 menit, tujuannya untuk menguapkan air yang ada pada plat sehingga daya serapnya menjadi lebih maksimal.

Langkah pemisahan senyawa dari sampel daun pepaya dimulai dengan penjenuhan bejana (*chamber*). Penjenuhan dilakukan dengan memasukkan fase gerak dan meletakkan kertas saring ke dalam bejana, kemudian bejana ditutup. Penjenuhan dilakukan sampai kertas saring terbasahi semua. Penjenuhan bertujuan agar permukaan bejana terisi uap eluen sehingga hasil elusi dapat menghasilkan rambatan yang baik (Nurmalasari et al., 2018). Selanjutnya, plat KLT ukuran 4 x 10 cm yang telah diaktifkan diberi batas atas dan batas bawah masing-masing 1 cm menggunakan pensil. Sampel dan standar kemudian ditotolkan pada plat untuk selanjutnya dielusi. Setelah mencapai batas atas, plat diangkat dan diangin-anginkan. Untuk memperjelas bercak pada plat, maka dilakukan penyemprotan dengan pereaksi AlCl_3 5%.

Bercak dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil elusi pada penelitian kali ini terdapat lima noda sampel ekstrak etanol, empat noda sampel fraksi etanol-air dan satu noda pada standar kuersetin. Dapat dilihat bahwa kebanyakan senyawa yang terkandung pada kedua sampel adalah senyawa polar. Menurut Rahayu et al., (2015) noda kuning pada standar kuersetin dengan nilai R_f antara 0,2

hingga 0,75 menunjukkan noda yang mengandung senyawa flavonoid. Nilai R_f bercak 1 dari kedua sampel mirip dengan nilai R_f kuersetin standar, hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang ada di ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya memiliki karakteristik yang mirip. Nilai R_f dapat dilihat pada tabel 6.



Gambar 7. Hasil Uji Klt Ekstrak Etanol Daun Pepaya Dan Fraksi Polar yang Dibandingkan dengan Standar Kuersetin.

Keterangan:

1 : ekstrak etanol daun pepaya.

2 : standar kuersetin.

3 : fraksi etanol-air daun pepaya.

A : visualisasi sinar tampak.

B : deteksi UV 254 nm sebelum disemprot $AlCl_3$.

C : deteksi UV 365 nm sebelum disemprot $AlCl_3$.

D : deteksi UV 254 nm setelah disemprot $AlCl_3$.

E : deteksi UV 365 nm setelah disemprot $AlCl_3$.

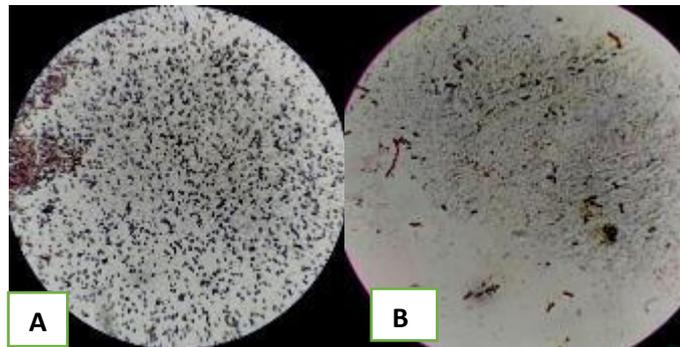
Tabel 6. Nilai Rf Sampel Ekstrak Etanol, Fraksi Etanol-Air dan Standar Kuersetin.

	Ekstrak etanol	Standar kuersetin	Fraksi eatnol-air
Bercak 1	0,45	0,43	0,43
Bercak 2	0,51		0,51
Bercak 3	0,68		0,67
Bercak 4	0,71		0,71
Bercak 5	0,9		

4. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk mempermudah identifikasi bakteri gram positif dan gram negatif serta untuk mengetahui bentuk morfologinya. Pada proses pewarnaan, bakteri gram positif akan menyerap zat warna kristal violet sehingga bakteri akan berwarna ungu. Sedangkan gram negatif akan melunturkan zat warna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol dan akan menyerap zat warna safranin sehingga bakteri akan berwarna merah (Putri & Kusdiyantini, 2018). Perbedaan warna bakteri gram negatif dan gram positif terjadi karena adanya perbedaan struktur dinding sel. Bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sedangkan gram negatif memiliki kandungan lipid yang tinggi.

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 100 x, bakteri *Staphylococcus aureus* yang diuji memiliki sel berbentuk bulat (*coccus*) dan terbentuk warna ungu karena mengikat zat warna kristal violet. Hal tersebut membuktikan bahwa bakteri yang diamati merupakan bakteri gram positif. Bakteri *Escherichia coli* yang diuji memiliki sel berbentuk batang (*bacil*). Terbentuk warna merah akibat mengikat zat warna safranin sehingga terbukti bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 8.

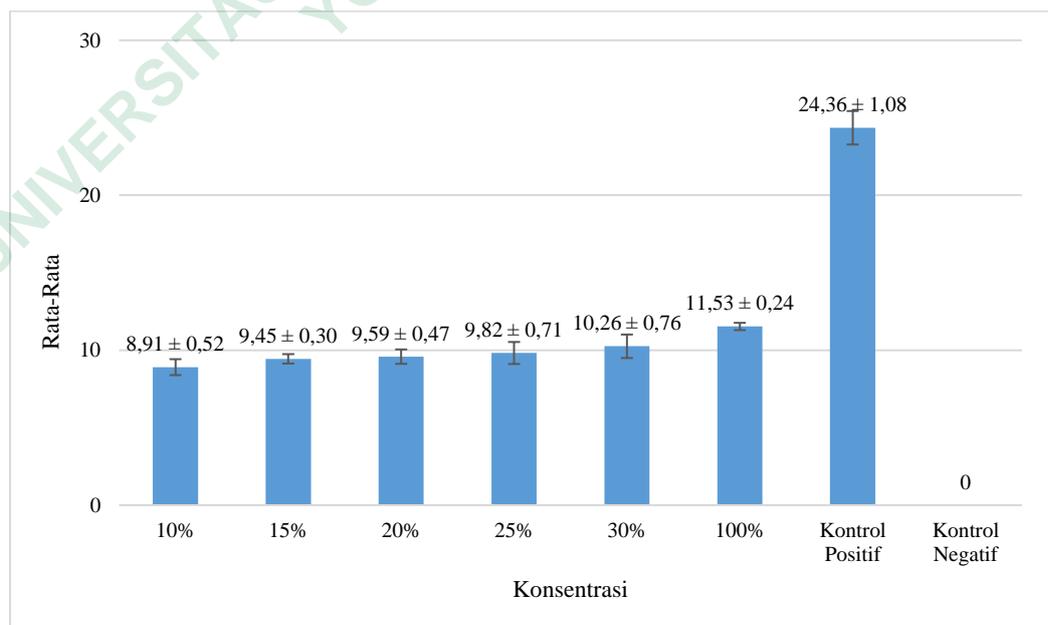


Gambar 8. Pewarnaan gram bakteri perbesaran 100 x. (A) Bakteri *Staphylococcus aureus* gram positif (B) Bakteri *Escherichia coli* gram negatif.

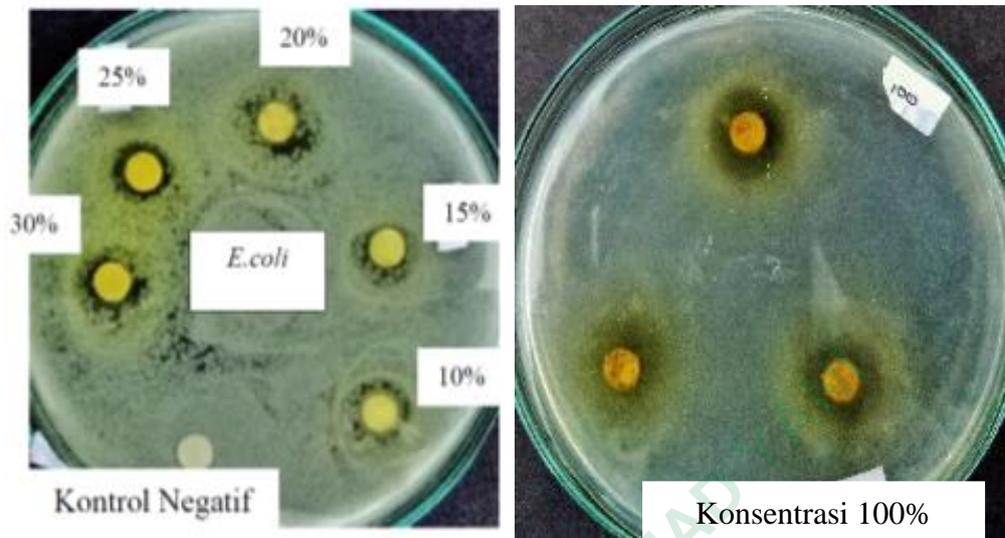
5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Hasil Analisa Deskriptif

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etanol-air daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil percobaan terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya zona hambat pada tiap kelompok perlakuan yang dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Hasil Diameter Zona Hambat Fraksi Etanol-Air terhadap *Escherichia coli* (Rata-Rata±SD)

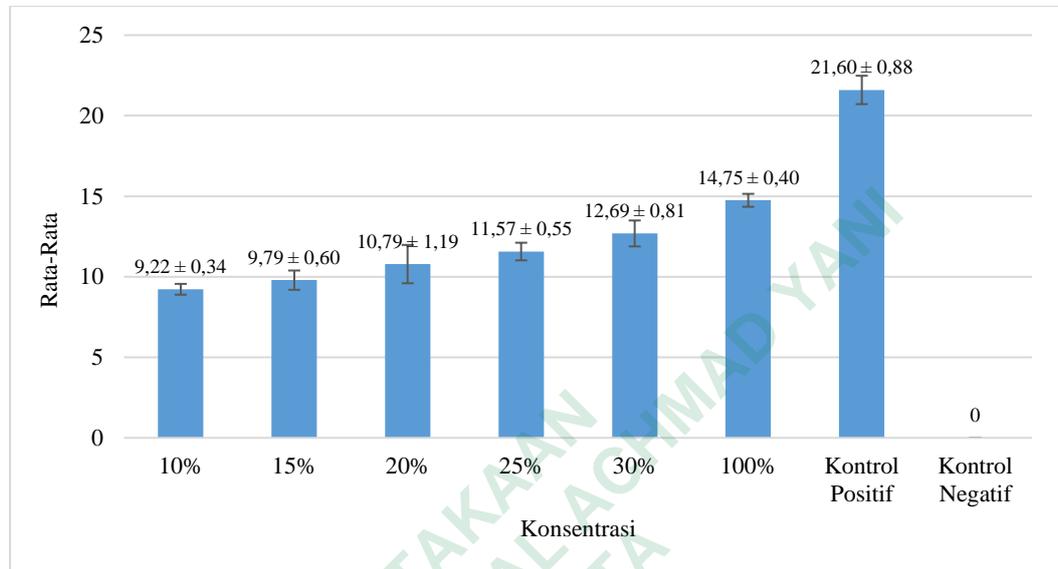


Gambar 10. Diameter Zona Hambat Kelompok Perlakuan dari Bakteri *Escherichia coli*

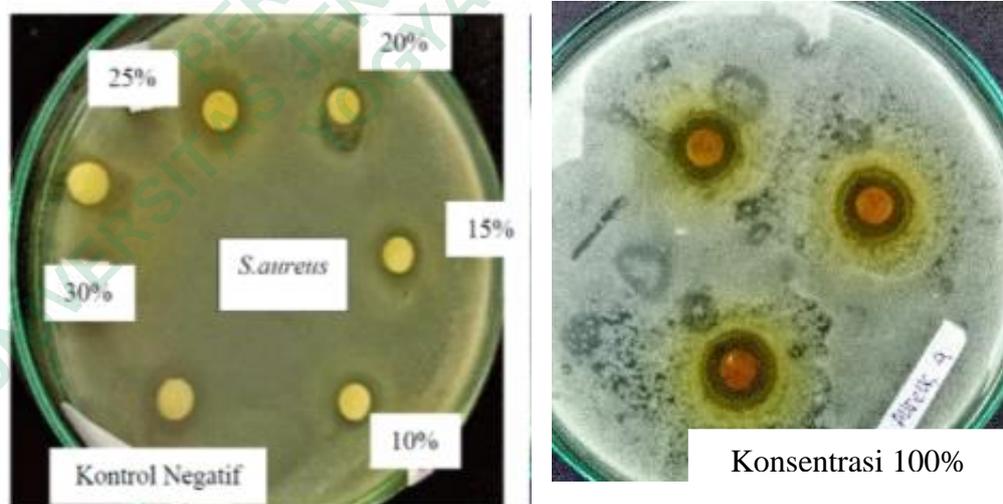
Berdasarkan gambar 9, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan rerata hasil zona hambat *Escherichia coli* pada masing-masing kelompok perlakuan. Nilai rerata hasil zona hambat dari masing-masing kelompok perlakuan mengalami peningkatan seiring tingginya konsentrasi. Rerata zona hambat kelompok perlakuan yang paling besar ditunjukkan pada konsentrasi 100%. Meskipun zona hambat yang terbentuk pada kelompok perlakuan tidak sebesar kontrol positif kloramfenikol, namun hasil yang diperoleh sudah dapat disimpulkan bahwa kandungan fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Sedangkan pada gambar 11, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan rerata hasil zona hambat *Staphylococcus aureus* pada masing-masing kelompok perlakuan. Nilai rerata hasil zona hambat dari masing-masing kelompok perlakuan juga mengalami peningkatan seiring tingginya konsentrasi. Rerata zona hambat kelompok perlakuan yang paling besar ditunjukkan pada konsentrasi 100%. Meskipun zona hambat yang terbentuk pada kelompok perlakuan tidak sebesar kontrol positif kloramfenikol, namun hasil yang

diperoleh sudah dapat disimpulkan bahwa sampel yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 11. Hasil Diameter Zona Hambat Fraksi Etanol-Air terhadap *Staphylococcus aureus* (Rata-Rata±SD)



Gambar 12. Diameter Zona Hambat Kelompok Perlakuan dari Bakteri *Staphylococcus aureus*

b. Hasil Analisa Statistik

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik parametrik (*One-Way ANOVA*) menggunakan program SPSS dengan

taraf kepercayaan 95% (α 0,05). Untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak maka dilakukan uji normalitas. Dikarenakan data pada tiap kelompok kurang dari 50, maka dianalisis menggunakan uji statistik *Shapiro-Wilk*.

Uji normalitas pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diperoleh nilai signifikansi yang dapat dilihat pada tabel 7. Data dikatakan terdistribusi normal apabila nilai signifikansi lebih besar dari 0,05. Semua kelompok pada kedua bakteri tersebut terdistribusi normal.

Tabel 7. Hasil Analisa Statistik Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol-Air Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi	Uji Normalitas		Uji Homogenitas		ANOVA	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
10 %	0.968	0.885				
15%	0.315	0.112				
20%	0.846	0.801				
25%	0.642	0.070				
30%	0.126	0.565	0.142	0.083	0.000*	0.000*
100%	0.977	0.808				
K.Positif	0.980	0.370				
K. Negatif	.	.				

Data yang terdistribusi normal selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Data dikatakan homogen apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05. Dari hasil uji homogenitas dapat disimpulkan bahwa data kedua kelompok bakteri mempunyai varian yang sama atau homogen.

Setelah syarat uji terpenuhi, maka uji statistik parametrik dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka H_0 diterima atau tidak terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan sedangkan apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka H_0 ditolak atau terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One-Way ANOVA* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* didapatkan hasil dengan nilai signifikansi masing-masing 0,000 atau $<0,05$ sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima atau dapat diartikan nilai zona hambat antar kelompok perlakuan fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya adalah berbeda bermakna. Untuk melihat kelompok perlakuan yang berbeda bermakna tersebut, maka dilakukan analisis *post-hoc*.

Tabel 8. Hasil Analisis *Post-hoc* Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol-Air Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

	10	15	20	25	30	100	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
10	-	0,289	0,186	0,081	0,014*	0,000*	0,000*	0,000*
15	0,289	-	0,779	0,453	0,118	0,001*	0,000*	0,000*
20	0,186	0,779	-	0,636	0,190	0,001*	0,000*	0,000*
25	0,081	0,453	0,636	-	0,389	0,003*	0,000*	0,000*
30	0,014*	0,118	0,190	0,389	-	0,019*	0,000*	0,000*
100	0,000*	0,001*	0,001*	0,003*	0,019*	-	0,000*	0,000*
Kontrol Positif	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,000*
Kontrol Negatif	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-

Keterangan: * menyatakan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Apabila pada uji *post-hoc* memiliki nilai $p < 0,05$ artinya data tersebut berbeda bermakna dengan kelompok konsentrasi lain atau signifikan. Sedangkan nilai $p > 0,05$ artinya data tersebut tidak berbeda bermakna dengan kelompok konsentrasi lain. Uji *post-hoc* menunjukkan zona hambat bakteri *Escherichia coli* konsentrasi 100%

berbeda bermakna dengan semua konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%, 30%), kontrol positif dan kontrol negatif (Tabel 8). Uji *post-hoc* pada tabel 9 menunjukkan zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* untuk konsentrasi 100% berbeda bermakna dengan semua konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%, 30%), kontrol positif dan kontrol negatif.

Tabel 9. Hasil Analisis *Post-hoc* Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol-Air Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

	10	15	20	25	30	100	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
10	-	0,328	0,013*	0,001*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
15	0,328	-	0,095	0,006*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
20	0,013*	0,095	-	0,184	0,004*	0,003*	0,000*	0,000*
25	0,001*	0,006*	0,184	-	0,063	0,000*	0,000*	0,000*
30	0,000*	0,000*	0,004*	0,063	-	0,002*	0,000*	0,000*
100	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,002*	-	0,000*	0,000*
Kontrol Positif	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,000*
Kontrol Negatif	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-

Keterangan: * menyatakan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

B. Pembahasan

Pepaya merupakan tanaman yang setiap bagiannya mengandung senyawa berkhasiat. Daun pepaya biasanya digunakan sebagai penambah nafsu makan, penghilang rasa nyeri, anti jerawat, obat demam berdarah, pelancar ASI dan antibakteri. Senyawa yang bersifat antibakteri dalam daun pepaya antara lain tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid dan saponin (Tuntun, 2016). Pada penelitian ini ekstrak etanol dan fraksi etanol-air daun pepaya mengandung senyawa saponin, tanin dan flavonoid.

Fraksi etanol-air daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang didapat dilakukan uji antibakteri menggunakan metode *disk diffusion* dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri pada media *Mueller-Hinton Agar* lalu diratakan dengan batang L. Selanjutnya *disk* yang sudah direndam pada larutan sampel diletakkan diatas

media. Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Menurut Himedia, (2018) *Mueller-Hinton Agar* (MHA) direkomendasikan sebagai media untuk uji antimikroba karena dapat menumbuhkan sebagian besar bakteri patogen. Adanya aktivitas antibakteri dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar *disk*. Zona tersebut merupakan area difusi sampel yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Besarnya area zona hambat yang terbentuk menunjukkan kekuatan antibakteri dari sampel yang digunakan.

Pada uji kali ini digunakan enam konsentrasi fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya (% v/v) yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, 30% dan 100%. Sebagai pembanding digunakan kontrol positif (kloramfenikol) dan kontrol negatif (akuades). Penentuan seri konsentrasi pada uji didasarkan pada penelitian Karisma, (2019) yang menunjukkan konsentrasi terendah (10%) ekstrak etanol daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri. Pembuatan seri konsentrasi bertujuan untuk melihat perbedaan dari zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi. Kontrol positif digunakan untuk melihat adanya aktivitas terhadap pertumbuhan di kedua bakteri. Pemilihan kontrol positif kloramfenikol karena bersifat bakteriostatik dan merupakan antibiotik berspektrum luas yang efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Sedangkan kontrol negatif digunakan untuk memastikan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan karena pengaruh dari pelarut, melainkan murni dari senyawa aktif yang terkandung dalam sampel.

Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan tiga kali pengukuran dari sisi yang berbeda yaitu horizontal, vertikal dan diagonal. Dari hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi etanol-air daun pepaya memiliki senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Roni et al., (2018) menyatakan bahwa fraksi polar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Zona hambat yang terbentuk pada kontrol positif lebih besar dibanding dengan semua kelompok perlakuan. Hal ini dikarenakan kloramfenikol merupakan senyawa murni. Fraksi etanol-air daun pepaya mengandung senyawa

flavonoid, saponin dan tanin yang berfungsi sebagai antibakteri. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sari et al., (2015), (Nugraha et al., 2017), (Zahro & Agustini, 2013) yang menyatakan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri. Sebagai antibakteri, senyawa saponin bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan yang mengakibatkan kebocoran sel dan senyawa intraseluler menjadi keluar. Senyawa tersebut akan berdifusi lalu mengikat membran sitoplasma, sehingga sitoplasma keluar dari sel dan akhirnya mengakibatkan sel mati (Nor et al., 2018). Tanin juga mempunyai kemampuan antibakteri dengan cara mengerutkan dinding sel hingga terjadi kerusakan membran, nutrisi yang diperlukan bakteri jadi tidak dapat masuk akibatnya permeabilitas sel terganggu dan menyebabkan kematian sel. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu akan terjadi interaksi antara senyawa flavonoid dengan DNA bakteri yang akan menyebabkan rusaknya permeabilitas dinding sel, mitokondria dan lisosom (Riwanti et al., 2021).

Berdasarkan hasil penelitian ini, nilai zona hambat yang terbentuk akan semakin besar seiring dengan meningkatnya konsentrasi atau berbanding lurus. Sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas antibakteri fraksi polar ekstrak etanol daun pepaya bersifat *dose-dependent*. Konsentrasi yang optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yakni konsentrasi 100% dengan diameter zona hambat masing-masing 11,53 mm dan 14,75 mm. Sedangkan diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol 30 µg terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing yakni 24,36 mm dan 21,60 mm. Apabila diameter zona hambat yang terbentuk diklasifikasikan aktivitas antibakterinya maka pada konsentrasi 100% fraksi etanol-air termasuk kategori kuat sedangkan pada kontrol positif kloramfenikol termasuk kategori sangat kuat (Zahro & Agustini, 2013). Zona hambat pada kontrol positif sangat kuat dalam menghambat kedua bakteri diperkuat dengan penelitian yang dilakukan Elvira et al., (2017) menyatakan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* 100% sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol. Penelitian lain menyatakan antibiotik kloramfenikol 30 µg sensitif terhadap bakteri *Escherichia coli* (Dian et al., 2015).

Pada penelitian ini, nilai zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut diduga karena terdapat perbedaan dari struktur dinding sel bakteri uji. Struktur dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* lebih banyak peptidoglikan dan penyusun lipidnya sedikit sekitar 1-4%, oleh karena itu dinding sel bakteri gram positif bersifat lebih polar. Sedangkan struktur dinding sel bakteri *Escherichia coli* mengandung banyak lipid. Diketahui senyawa saponin, flavonoid dan tanin bersifat polar maka senyawa tersebut akan lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan daripada lapisan lipid. Hal ini menyebabkan zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan bakteri *Escherichia coli*.

Untuk memperkuat argumen tersebut maka dilakukan uji *t-test*. Hasil uji *t-test* menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama (25%, 30%, 100% dan kontrol positif) antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menunjukkan nilai signifikansi (2-tailed) $<0,05$. Hal tersebut mendukung teori bahwa senyawa polar lebih baik untuk bakteri gram positif. Hasil uji *t-test* dapat dilihat pada lampiran 9.

Perbandingan nilai zona hambat antara fraksi etanol-air dengan ekstrak etanol daun pepaya yang dilakukan oleh Tuntun, (2016) menunjukkan hasil yang berbeda. Ekstrak etanol pada konsentrasi 30% dan 100% dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* secara berurutan sebesar 7,9 mm dan 13,2 mm, sedangkan konsentrasi 30% dan 100% pada bakteri *Escherichia coli* secara berurutan dapat menghambat sebesar 7 mm dan 9,1 mm. Fraksi etanol-air pada konsentrasi 30% dan 100% dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* secara berurutan sebesar 12,69 mm dan 14,75 mm, sedangkan konsentrasi 30% dan 100% pada bakteri *Escherichia coli* secara berurutan dapat menghambat sebesar 10,26 mm dan 11,53 mm. Fraksi etanol-air menunjukkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena ekstrak etanol daun pepaya mengandung senyawa yang efektif sebagai antibakteri namun sifatnya semi atau non polar sehingga senyawa tersebut tidak dapat masuk ke dalam fraksi polar. Sedangkan pada fraksi etanol-air hanya mengandung senyawa bermanfaat yang bersifat polar seperti saponin, flavonoid

dan tanin (tidak ada pengotor). Adanya pemisahan senyawa berdasar tingkat kepolaran memberikan efek yang lebih baik.

Hasil analisis statistik *One Way* ANOVA zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menunjukkan nilai signifikansi 0,000. Metode yang digunakan antara konsentrasi yang sama terhadap kedua bakteri pada penelitian kali ini dapat dikatakan sudah cukup valid. Diperkuat dengan hasil statistik uji LSD antara kontrol positif dengan kontrol negatif yang berbeda bermakna.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA