

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman Pepaya (*Carica papaya* Linn.)

Sebelum daun pepaya digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu dilakukan determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Berdasarkan Surat Keterangan Nomor 014978/S.Tb/III/2021 dari Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta bahwa hasil identifikasi tanaman sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida
Ordo : Caricales
Familia : Caricaceae
Genus : *Carica*
Species : *Carica papaya* L.
Nama Daerah : Papaya

Jadi, sampel daun pepaya yang digunakan untuk penelitian ini benar spesies dari *Carica papaya* L.

2. Penyiapan Sampel

a. Pengambilan sampel

Daun pepaya yang utuh, tidak rusak, ukuran besar atau lebar, dan berwarna hijau tua yang segar. Daun pepaya diambil dari Desa Tajeman, Palbapang, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

b. Pengolahan sampel

Daun pepaya yang sudah dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan selama 6 hari menggunakan bantuan sinar matahari untuk

memperoleh simplisia kering. Simplisia kering dibuat serbuk menggunakan *miller*. Serbuk yang diperoleh sebanyak 300 gram untuk pembuatan ekstrak etanol daun pepaya.

c. Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*)

Metode penyarian yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol daun pepaya dengan cara maserasi. Proses maserasi dilakukan selama 6 hari. Serbuk daun pepaya sebanyak 300 gram direndam menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut (1:10 b/v) dalam sebuah toples kaca kemudian disimpan di tempat yang gelap. Tujuan disimpan di tempat gelap agar terhindar dari reaksi yang dikatalisis cahaya dan mencegah terjadinya perubahan warna (Voigt, 1995).



Gambar 11. Proses maserasi

Pada hari ke-4 dilakukan penyaringan menggunakan kain mori sehingga diperoleh filtrat 1. Kemudian dilakukan remaserasi, yaitu hasil ampas dari penyaringan direndam kembali dengan pelarut etanol 70% perbandingan bahan dan pelarut (1:10 b/v). Pada hari ke-6 dilakukan penyaringan menggunakan kain mori sehingga diperoleh filtrat 2. Hasil filtrat 1 dan filtrat 2 dicampurkan lalu diuapkan menggunakan bantuan wajan dan kompor listrik dengan sesekali diaduk menggunakan spatula kayu untuk memperoleh ekstrak kental. Hasil yang diperoleh berat ekstrak etanol daun pepaya adalah 43,55 gram. Kemudian dihitung nilai rendemen dari ekstrak etanol daun pepaya untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang

didapatkan dalam proses ekstraksi. Hasil yang diperoleh nilai rendemen ekstrak etanol daun pepaya adalah 14,516%.

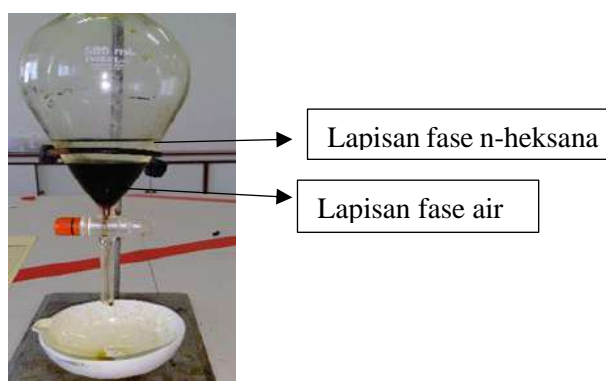
Tabel 5. Hasil rendemen ekstrak etanol daun pepaya

Berat simplisia (gram)	Berat ekstrak (gram)	Hasil rendemen ekstrak (% b/b)
300 gram	43,55 gram	14,516%

3. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Metode pemisahan ekstrak etanol daun pepaya dengan cara fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Metode ekstraksi cair-cair ini dilakukan dengan corong pisah menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur.

Ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 8 gram dilarutkan dengan air hangat 50 mL lalu dimasukkan dalam corong pisah. Kemudian ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak 50 mL dan digojog perlahan sampai tercampur. Pada saat penggojogan sesekali membuka kran dari corong pisah untuk mengeluarkan gas yang terbentuk dan mengurangi tekanan agar corong pisah tidak pecah. Kemudian didiamkan hingga memisah menjadi 2 lapisan, yaitu lapisan atas berupa fase n-heksana dan lapisan bawah berupa fase air.



Gambar 12. Proses fraksinasi

Hasil fraksinasi yang diperoleh berat fraksi n-heksana kental adalah 3,2 gram. Kemudian dihitung nilai rendemen dari fraksi n-heksana kental untuk

mengetahui banyaknya fraksi yang didapatkan dalam proses fraksinasi. Hasil yang diperoleh nilai rendemen fraksi n-heksana daun pepaya adalah 40%.

Tabel 6. Hasil rendemen fraksi n-heksana kental daun pepaya

Berat ekstrak (gram)	Berat fraksi (gram)	Hasil rendemen fraksi (% b/b)
8 gram	3,2 gram	40%

4. Kontrol Kualitas Ekstrak Etanol dan Fraksi N-Heksana Daun Pepaya

a. Hasil organoleptik

Ekstrak etanol dan fraksi n-heksan kental daun pepaya yang diperoleh kemudian dilakukan pengamatan secara organoleptik. Tujuan dilakukan organoleptik ialah mengetahui secara fisik dengan cara yang sederhana menggunakan alat indera untuk mendeskripsikan tekstur, bau, warna, dan rasa pada ekstrak dan fraksi. Hasil organoleptik dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil organoleptik

Deskripsi	Ekstrak etanol daun pepaya	Fraksi n-heksana kental daun pepaya
Tekstur	Kental	Kental cair
Bau	Khas pepaya	Khas pepaya
Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
Rasa	Pahit	Pahit

b. Hasil penapisan fitokimia

Setelah dilakukan secara organoleptik ekstrak etanol dan fraksi n-heksana kental daun pepaya kemudian diuji penapisan fitokimia. Uji penapisan fitokimia meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi secara kualitatif golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun pepaya menggunakan beberapa penambahan pereaksi dan dibandingkan hasilnya dengan teori. Apabila hasil identifikasi senyawa diperoleh menunjukkan hasil positif atau sama dengan teori maka dalam ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana daun pepaya diduga memiliki kandungan senyawa tersebut. Hal tersebut sangat penting untuk

mengetahui kandungan yang ada di dalam fraksi n-heksana daun pepaya sebagai larutan uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureua*. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia	Hasil positif menurut (A'yun & Laily, 2015)	Hasil yang diperoleh	
		Ekstrak etanol daun pepaya	Fraksi n-heksana kental daun pepaya
Alkaloid: Pereaksi Mayer	Terbentuk endapan putih	Negatif Terbentuk warna hijau kecoklatan	Negatif Terbentuk endapan coklat kehitaman
Pereaksi Wagner	Terbentuk endapan merah kecoklatan	Negatif Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif Terbentuk endapan merah kecoklatan
Pereaksi Dragendorff	Terbentuk endapan jingga	Negatif Terdapat endapan hijau kecoklatan	Negatif Terbentuk endapan coklat kehitaman
Flavonoid	Terbentuk warna merah tua atau hitam kemerahan	Positif Terbentuk warna coklat kemerahan	Positif Terbentuk warna merah tua
Saponin	Terbentuk busa stabil setinggi 1-10 cm	Positif Terbentuk busa	Positif Terbentuk busa
Tanin	Terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan	Positif Terbentuk warna hitam kehijauan	Positif Terbentuk warna hitam kehijauan

c. Hasil pemisahan senyawa menggunakan metode KLT

Identifikasi pemisahan senyawa secara kualitatif pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun pepaya menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Identifikasi pemisahan senyawa dianalisis dengan cara menghitung nilai R_f (faktor retardasi). R_f merupakan

perbandingan jarak elusi sampel dengan jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan.

Fase diam yang digunakan adalah plat silika GF254 dengan ukuran plat 10 cm×4 cm yang diberi garis tepi atas dan bawah masing-masing 1 cm. Sebelumnya plat silika yang akan digunakan untuk KLT dilakukan aktivasi dengan cara dipanaskan menggunakan oven pada suhu 110°C selama 30 menit untuk mengaktifkan plat silika gel, yaitu silanol dan siloksan agar pemisahan yang dihasilkan optimal. Kemudian, dilakukan penjenuhan chamber menggunakan fase gerak. Tujuan dilakukan penjenuhan chamber ialah untuk meratakan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan sehingga menghasilkan pemisahan yang optimal (Dewi dkk, 2018).

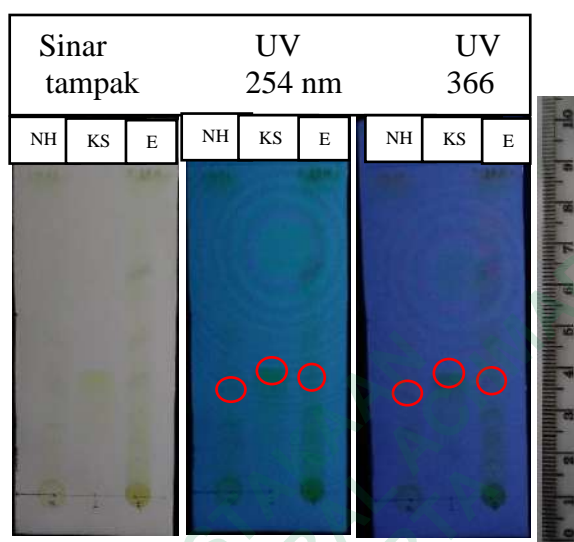
Pemisahan senyawa dengan metode KLT diawali dengan optimasi fase gerak. Tujuan diawali dengan optimasi fase gerak adalah untuk mengetahui fase gerak dan perbandingannya sehingga akan menghasilkan pemisahan yang optimal. Standar yang digunakan sebagai pembanding dari ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun pepaya adalah Kuersetin standar 0,1%.

Tabel 9. Optimasi beberapa fase gerak pada KLT

No.	Fase gerak	Hasil
1.	N-butanol: asam asetat glasial: air (4: 1: 5)	Terjadinya kenaikan pada ekstrak, fraksi n-heksana, dan Kuersetin standar tetapi hasilnya <i>tailing</i> serta bercak tidak terlihat.
2.	Kloroform: etanol (8: 2)	Terjadi kenaikan bercak pada ekstrak, fraksi n-heksana, dan Kuersetin standar serta tidak <i>tailing</i> , tetapi kenaikan tidak sampai atas. Kenaikan pada Kuersetin standar sedikit.
3.	Kloroform: etanol (9: 1)	Terjadi kenaikan bercak pada ekstrak, fraksi n-heksana, dan Kuersetin standar serta tidak <i>tailing</i> , tetapi Kuersetin standar kenaikannya sedikit.

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak tersebut maka kloroform: metanol (9: 1 v/v) dipilih karena menghasilkan pemisahan yang optimal

dalam pemisahan ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun pepaya serta Kuersetin standar. Hasil pemisahan senyawa dapat dilihat pada pada Gambar 13.



Gambar 13. Pengamatan hasil KLT melalui sinar tampak dan sinar UV

Keterangan : NH (fraksi n-heksana); KS (Kuersetin standar 0,1%);
E (ekstrak etanol daun pepaya)

Tabel 10. Hasil KLT

Sampel	Jarak elusi sampel	Sinar tampak	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 366 nm	Nilai Rf
Fraksi n-heksana daun pepaya	2,5 cm	Hijau tua	Hijau tua	Hijau	0,312
Ekstrak etanol daun pepaya	2,7 cm	Hijau tua	Hijau tua	Hijau	0,337
Kuersetin standar	3 cm	Kuning	Hijau	Hijau	0,375
Kuersetin standar (kloroform: metanol 1: 4) (Priyanto dkk, 2014)	-	-	-	Hijau	0,69

Hasil pemisahan senyawa diperoleh bahwa fraksi n-heksana daun pepaya, ekstrak etanol daun pepaya, dan Kuersetin standar memiliki bercak noda. Pada fraksi n-heksana daun pepaya jarak elusi sampel 2,5 cm sedangkan ekstrak etanol daun pepaya dan Kuersetin standar memiliki jarak elusi sampel yang lebih mendekati, yaitu 2,7 cm dan 3 cm. Berdasarkan letak bercak noda serta nilai Rf yang diperoleh bahwa ekstrak etanol daun pepaya memiliki kemiripan atau mendekati nilai Kuersetin standar artinya ekstrak etanol daun pepaya memiliki karakteristik yang sama dengan Kuersetin standar.

5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar *Kirby Bauer* dengan 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol meliputi kontrol positif menggunakan antibiotik Ampisilin 10 µg dan kontrol negatif menggunakan akuades. Kelompok perlakuan meliputi larutan uji fraksi n-heksana daun pepaya dengan konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.

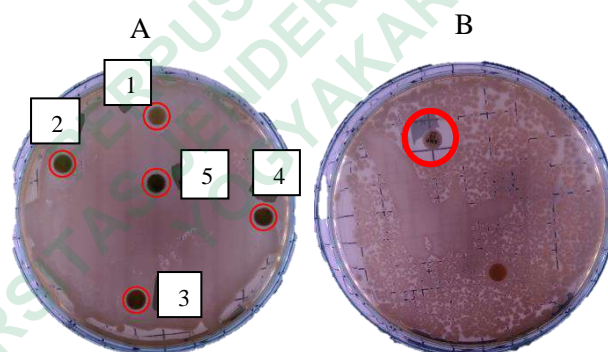
Hasil pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk pada kertas cakram berupa zona bening menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter zona hambat dilakukan secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Perolehan data rerata diameter zona hambat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil rerata diameter zona hambat

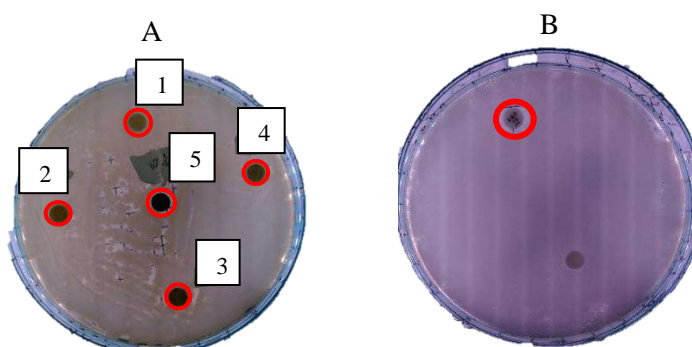
Bakteri uji	Kelompok	Konsentrasi	Rerata ± SD (mm)	Kekuatan daya antibakteri
<i>E. coli</i>	Fraksi n-heksana	20%	6,57 ± 0,15	Sedang
		40%	6,71 ± 0,20	Sedang
		60%	7,02 ± 0,52	Sedang
		80%	7,27 ± 0,31	Sedang
		100%	7,92 ± 0,23	Sedang

Bakteri uji	Kelompok	Konsentrasi	Rerata ± SD (mm)	Kekuatan daya antibakteri
	Kontrol positif (Ampisilin 10 µg)	-	12,16 ± 2,90	Kuat
	Kontrol negatif (Akuades)	-	0	Lemah
<i>S. aureus</i>	Fraksi n-heksana	20%	6,69 ± 0,33	Sedang
		40%	6,77 ± 0,28	Sedang
		60%	6,86 ± 0,25	Sedang
		80%	7,31 ± 0,63	Sedang
		100%	7,94 ± 0,16	Sedang
	Kontrol positif (Ampisilin 10 µg)	-	9,21 ± 1,70	Sedang
Kontrol negatif (Akuades)	-	0	Lemah	

Kemudian hasil uji aktivitas antibakteri kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap *E. coli* dan *S. aureus* didokumentasikan yang dapat dilihat pada Gambar 14 dan Gambar 15.

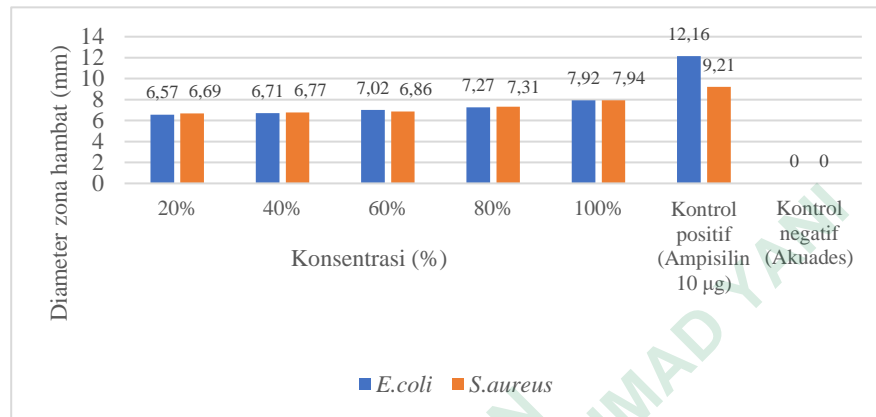


Gambar 14. Uji aktivitas antibakteri pada *E. coli* oleh (A) fraksi n-heksana daun pepaya (1) 20%, (2) 40%, (3) 60%, (4) 80%, dan (5) 100% serta (B) Ampisilin 10 µg dan akuades



Gambar 15. Uji aktivitas antibakteri pada *S. aureus* oleh (A) fraksi n-heksana daun pepaya (1) 20%, (2) 40%, (3) 60%, (4) 80%, dan (5) 100% serta (B) Ampisilin 10 µg dan akuades

Berdasarkan hasil data rerata diameter zona hambat tersebut kemudian dibuat dalam bentuk grafik batang. Hasil rerata diameter zona hambat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Hasil rerata diameter zona hambat terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

Hasil rerata diameter zona hambat tersebut menunjukkan semakin tinggi nilai konsentrasi fraksi n-heksana daun pepaya maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Hal tersebut sejalan dengan penelitian (Surjowardojo dkk, 2015) bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin besar zona hambat yang dihasilkan, karena semakin banyak komponen zat aktif yang terkandung. Diameter zona hambat pada Ampisilin 10 µg terhadap *E. coli* lebih besar dibandingkan dengan *S. aureus*, sedangkan pada akuades tidak terbentuk diameter zona hambat pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

6. Analisis Data

Analisis pengolahan data diameter zona hambat dilakukan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara statistik menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Sebelum dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way ANOVA*, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 20.

Berdasarkan hasil pengolahan menggunakan perangkat lunak SPSS, uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* pada kelompok perlakuan dan

kelompok kontrol memiliki nilai Sig. > 0,05. Pengukuran uji homogenitas dan uji *One-Way* ANOVA dilakukan secara bersamaan. Hasil yang diperoleh bahwa uji homogenitas diameter zona hambat terhadap bakteri *E. coli* memiliki nilai Sig. 0,001 dan diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* memiliki nilai Sig. 0,047. Artinya, kedua data tersebut tidak homogen karena nilai Sig. < 0,05 sehingga hasil uji *One-Way* ANOVA tidak bisa dilanjutkan. Hasil pengolahan data menggunakan SPSS versi 20 dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil pengolahan data menggunakan SPSS versi 20

Diameter zona hambat	Kelompok	Kosentrasi	Uji normalitas (Shapiro-Wilk)	Uji homogenitas	Uji Kruskal Wallis
<i>Escherichia coli</i>	Fraksi n-heksana	20%	.263 N	.001 TH	.006 AP
		40%	.672 N		
		60%	.968 N		
		80%	.637 N		
		100%	.836 N		
	Kontrol positif (Ampisilin 10 µg)	-	.455 N		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fraksi n-heksana	20%	.900 N	.047 TH	.014 AP
		40%	.804 N		
		60%	.398 N		
		80%	.683 N		
		100%	.430 N		
	Kontrol positif (Ampisilin 10 µg)	-	.961 N		

Keterangan: N (data normal); TH (tidak homogen); AP (ada perbedaan)

Oleh karena itu, pengolahan data dilanjutkan dengan uji non parametrik sebagai alternatif dari uji parametrik *One-Way* ANOVA, yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diameter zona hambat terhadap *E. coli* dan *S. aureus* memiliki nilai Sig. 0,006 dan Sig. 0,014 yang artinya diameter zona yang terbentuk terhadap *E. coli* dan *S. aureus* memiliki perbedaan aktivitas antibakteri.

B. Pembahasan

1. Penyiapan sampel

Pengambilan sampel daun pepaya, yaitu daun yang utuh, tidak rusak, ukuran besar atau lebar, dan berwarna hijau tua yang segar. Daun pepaya diambil dari Desa Tajeman, Palbapang, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Kemudian, pengolahan daun pepaya dibuat dalam simplisia kering yang mudah diremas akan hancur dan diserbuk menggunakan *miller*. Tujuan dibuat serbuk agar memudahkan proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut dari dalam jaringan tumbuhan.

Metode penyarian untuk membuat ekstrak etanol daun pepaya dengan cara maserasi. Proses maserasi dilakukan selama 6 hari. Metode maserasi dilakukan dengan cara perendaman bagian tanaman secara utuh atau yang sudah digiling kasar dengan pelarut dalam bejana tertutup selama sekurang-kurangnya 3 hari dengan sesekali dilakukan pengadukan sampai semua melarut dalam cairan pelarut (Endarini, 2016). Pemilihan metode maserasi digunakan karena merupakan metode yang mudah dan sederhana untuk dilakukan. Pelarut yang digunakan untuk merendam serbuk daun pepaya adalah etanol 70%. Menurut Snyder (1997) dalam penelitian Padmasari dkk (2013) pemilihan pelarut etanol 70% karena pelarut etanol bersifat universal yang dapat menarik senyawa bersifat polar, semi polar, dan non polar sehingga diharapkan dapat menarik semua senyawa aktif yang terkandung dalam daun pepaya. Pada hari ke-4 dilakukan penyaringan menggunakan kain mori dan diperoleh filtrat 1. Kemudian, hasil ampas dari penyaringan direndam kembali dengan pelarut

etanol 70%. Tujuan dilakukan remaserasi untuk menarik kembali kandungan dari serbuk yang masih tertinggal pada maserasi pertama dan dapat menghasilkan filtrat yang lebih banyak.

Berdasarkan hasil yang diperoleh berat ekstrak etanol daun pepaya adalah 43,55 gram dengan nilai rendemen, yaitu 14,516%. Menurut Harborne (1987) dalam penelitian Hasnaeni dkk (2019) semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak berat ekstrak yang diperoleh dan senyawa aktif yang terkandung juga semakin banyak.

2. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Pepaya

Fraksinasi merupakan pemisahan suatu komponen senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Fraksinasi diperlukan karena ekstrak yang didapat masih berupa campuran dari berbagai senyawa. Oleh karena itu, fraksinasi ekstrak etanol daun pepaya dilakukan menggunakan pelarut n-heksana dan pelarut air untuk memperoleh fraksi n-heksana daun pepaya. Pelarut n-heksana bersifat non polar dan pelarut air bersifat polar. Senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar dan senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar. Pemilihan pelarut n-heksana karena dapat melarutkan senyawa yang bersifat non polar, stabil, dan mudah menguap, sedangkan pemilihan pelarut air karena bersifat polar dan harganya murah.

Berdasarkan hasil yang diperoleh berat fraksi n-heksana kental daun pepaya adalah 3,2 gram dengan nilai rendemen 40%. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak berat fraksi yang diperoleh.

3. Kontrol Kualitas Ekstrak Etanol Daun Pepaya dan Fraksi N-Heksana Daun Pepaya

a. Penetapan organoleptik

Ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana kental daun pepaya dilakukan pengamatan organoleptik untuk mengetahui secara fisik tekstur, bau, warna, dan rasa. Berdasarkan hasil yang diperoleh bahwa ekstrak

etanol daun pepaya memiliki tekstur yang kental, berbau khas pepaya, berwarna hitam kehijauan, dan rasanya pahit, sedangkan pada fraksi n-heksana kental daun pepaya memiliki tekstur yang kental cair, berbau khas pepaya, berwarna hitam kehijauan, dan rasanya pahit.

b. Penapisan fitokimia

Uji penapisan fitokimia meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Penapisan fitokimia diperlukan untuk mengidentifikasi secara kualitatif golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana daun pepaya.

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan penambahan HCl 2 N dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi lalu ditambahkan peraksi Mayer, Wagner, dan Dragendroff. Adanya senyawa alkaloid pada peraksi Mayer adalah terbentuk endapan putih, pada pereaksi Wagner adalah terbentuk merah kecoklatan, dan pada pereaksi Dragendroff adalah terbentuk endapan jingga (A'yun dan Ainin, 2015). Penambahan HCl 2 N berfungsi untuk menarik alkaloid dalam ekstrak karena alkaloid bersifat basa maka ditambahkan asam sehingga terbentuk garam dan akan terpisah dengan komponen-komponen lain (Wullur dkk, 2012).

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan dilarutkan menggunakan etanol 70% karena bersifat polar sehingga akan larut dalam pelarut polar. Warna merah tua atau hitam kemerahan menandakan adanya flavonoid akibat dari reduksi oleh serbuk magnesium dan HCl pekat (Robinson, 1995).

Identifikasi saponin dilakukan dengan menambahkan air panas lalu dinginkan setelah itu dikocok kuat-kuat. Adanya senyawa saponin, yaitu terdapat busa yang stabil setinggi 1-10 cm. Saponin memiliki glikosil yang bersifat polar dan non polar sehingga saat dilakukan pengocokkan akan terbentuk misel. Struktur misel gugus polar menghadap ke luar, sedangkan non polar menghadap ke dalam. Hal tersebut yang menyebabkan terbentuknya busa (A'yun & Laily, 2015).

Identifikasi tanin dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 10% yang akan terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan. FeCl_3 10% akan bereaksi dengan gugus hidroksil pada tanin sehingga akan terbentuk warna biru tua menandakan tanin terhidrolisis, sedangkan warna hitam kehijauan menandakan tanin terkondensasi (A'yun & Laily, 2015).

Berdasarkan hasil yang diperoleh bahwa ekstrak etanol daun pepaya menunjukkan hasil positif adanya senyawa flavonoid, saponin, dan tanin, sedangkan fraksi n-heksana daun pepaya menunjukkan hasil positif adanya alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Menurut A'yun & Laily (2015) dalam penapisan fitokimia daun pepaya bahwa daun pepaya memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Pada hasil yang diperoleh memiliki perbedaan karena adanya sifat pelarut pada ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana daun pepaya. Menurut Snyder (1997) dalam penelitian Padmasari dkk (2013) etanol 70% bersifat universal artinya dapat menarik senyawa pelarut polar, semi polar, dan non polar, sedangkan pada fraksi n-heksana daun pepaya bersifat non polar. Selain perbedaan tersebut, dapat juga disebabkan dari jenis daun pepaya yang digunakan dalam penelitian.

Menurut Harborne (1987) dalam penelitian (Romadanu dkk, 2014) pelarut non polar seperti n-heksana efektif terhadap alkaloid selain itu dapat juga larut dalam semi polar (etil asetat) dan polar (metanol) tetapi sukar larut dalam air. Flavonoid memiliki gugus hidroksil sehingga termasuk senyawa polar tetapi ada juga beberapa senyawa flavonoid yang bersifat non polar, yaitu isoflavon, flavon, flavanol, dan flavanon yang dapat larut dalam pelarut non polar (Doloksaribu, 2009). Saponin bersifat polar yang dapat larut dalam air dan juga bersifat non polar karena memiliki gugus hidrofobik, yaitu aglikon (sapogenin) (Agustina dkk, 2017). Menurut Fengel dan Wegener (1995) dalam penelitian (Romadanu dkk, 2014) bahwa tanin merupakan golongan polifenol yang bersifat polar yang dapat larut dalam pelarut polar. Oleh karena itu, penapisan fitokimia fraksi n-heksana daun pepaya tidak sesuai karena menunjukkan hasil positif pada tanin yang

bersifat polar, sedangkan fraksi n-heksana daun pepaya yang bersifat non polar akan melarutkan senyawa yang bersifat non polar.

c. Pemisahan senyawa menggunakan metode KLT

Pemilihan dengan metode KLT untuk pemisahan senyawa ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana daun pepaya karena pelarut dan perlengkapan yang dibutuhkan sedikit serta persiapan sampel mudah. Prinsip metode KLT adalah pemisahan komponen kimia berdasarkan adsorpsi dan partisi oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) (Alen dkk, 2017). Standar yang digunakan sebagai pembanding dari ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana daun pepaya adalah Kuersetin 0,1%. Kuersetin merupakan bentuk glikosida yang secara umum pada flavonol. Flavonol merupakan subkelas dari golongan flavonoid. Selain flavonol terdapat juga subkelas lain, yaitu flavanol, flavanon, flavon, isoflavon, antosianidin (Arifin & Ibrahim, 2018).

Identifikasi pemisahan senyawa dianalisis dengan cara menghitung nilai Rf. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform: metanol (9:1 v/v) karena pada fase gerak tersebut menghasilkan kenaikan bercak pada ekstrak etanol daun pepaya, fraksi n-heksana daun pepaya, dan Kuersetin standar serta tidak terjadi *tailing*, tetapi Kuersetin standar kenaikannya sedikit. Nilai Rf pada fraksi n-heksana daun pepaya 0,312; ekstrak etanol daun pepaya 0,337 dan Kuersetin standar 0,375. Berdasarkan jarak elusi sampel serta nilai Rf yang diperoleh bahwa ekstrak etanol daun pepaya memiliki kemiripan atau mendekati nilai Kuersetin standar artinya ekstrak etanol daun pepaya memiliki karakteristik yang hampir sama dengan Kuersetin standar. Menurut penelitian Priyanto dkk (2014) analisis kualitatif Kuersetin standar dengan fase diam plat silika GF254 dan fase gerak kloroform: metanol (1: 4) menggunakan metode KLT menghasilkan warna hijau pada pengamatan sinar UV 366 nm dan nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,69. Oleh karena itu, dalam penelitian ini untuk identifikasi Kuersetin standar nilai Rf masih jauh dibandingkan dengan penelitian tersebut. Menurut

Sastrohamidjojo (1991) dalam penelitian Sarwastuti (2010) bahwa nilai Rf dapat dipengaruhi oleh volume penotolan, struktur senyawa kimia yang dipisahkan, polaritas fase diam, tebal dan kerataan permukaan fase gerak, polaritas fase gerak, kejenuhan bejana kromatografi, dan kesetimbangan.

4. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri dipersiapkan terlebih dahulu tahapan-tahapannya antara lain sterilisasi alat dan bahan; pembuatan media, pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5; peremajaan bakteri; pembuatan suspensi bakteri; dan pembuatan larutan uji fraksi n-heksana daun pepaya. Pada pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5 dilakukan pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm untuk memastikan larutan standar *McFarland* 0,5 yang dibuat memiliki nilai absorbansi 0,08 sampai 0,1 (Dalynn Biologicals, 2014). Hasil yang diperoleh larutan standar *McFarland* 0,5 memiliki nilai absorbansi 0,195 artinya melebihi ketentuan untuk larutan standar *McFarland* 0,5. Kemudian, dilakukan pengenceran menggunakan akuades dengan cara mengambil 2 mL larutan standar *McFarland* 0,5 dan ditambahkan 2 mL akuades lalu diukur kembali nilai absorbansinya. Setelah dilakukan pengenceran, diperoleh nilai absorbansi larutan standar *McFarland* 0,5 adalah 0,086 sehingga telah memenuhi syarat sebagai standar *McFarland* 0,5.

Uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi agar *Kirby Bauer*. Pemilihan metode tersebut karena mudah dilakukan, menggunakan kertas cakram yang berisi senyawa antibakteri dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri, serta hasil pengamatannya mudah dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk pada kertas cakram berupa zona bening menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm). Dalam uji aktivitas antibakteri ini dikelompokkan menjadi 2, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol meliputi kontrol positif menggunakan antibiotik Ampisilin 10 µg dan kontrol

negatif menggunakan akuades. Kelompok perlakuan meliputi larutan uji fraksi n-heksana daun pepaya dengan konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh bahwa fraksi n-heksana daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Nirossha & R. Mangalanayaki (2013), bahwa ekstrak daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Fraksi n-heksana daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri dibuktikan dengan adanya diameter zona hambat yang terbentuk pada kertas cakram yang berupa zona bening.

Pada kelompok perlakuan fraksi n-heksana daun pepaya pada konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100% terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dikategorikan memiliki kekuatan daya antibakteri yang sedang. Pada kelompok kontrol positif (Ampisilin 10 µg) terhadap bakteri *E. coli* dikategorikan kekuatan daya antibakteri yang kuat, sedangkan terhadap bakteri *S. aureus* dikategorikan kekuatan daya antibakteri yang sedang. Hasil kekuatan daya antibakteri tersebut dikelompokkan berdasarkan Ardiansyah (2005) dalam penelitian (Sudrajat dkk, 2012) bahwa diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, 6-10 mm dikategorikan sedang, 11-20 mm dikategorikan kuat, dan ≥ 21 mm dikategorikan sangat kuat.

Menurut CLSI (2019), antibiotik Ampisilin 10 µg terhadap bakteri *Enterobacteriaceae* (bakteri Gram negatif) memiliki kriteria daya antibakteri dengan diameter zona hambat ≤ 13 mm dikategorikan *resistant* (resisten), 14-16 mm dikategorikan *intermediate* (sedang), ≥ 17 mm dikategorikan *susceptible* (sensitif), sedangkan terhadap bakteri *Staphylococcus* spp. (bakteri Gram positif) memiliki kriteria daya antibakteri dengan diameter zona hambat ≤ 28 mm dikategorikan *resistant* (resisten) dan ≥ 29 mm dikategorikan *susceptible* (sensitif). Oleh karena itu, diameter zona hambat pada Ampisilin 10 µg apabila dikelompokkan menurut CLSI (2019) bahwa Ampisilin 10 µg terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dikategorikan resisten. Artinya, Ampisilin 10 µg tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pada kelompok kontrol negatif (akuades) tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*

dan *S. aureus* karena tidak terbentuk diameter zona hambat sehingga dikelompokkan pada kekuatan daya antibakteri yang lemah.

Hasil rerata diameter zona hambat fraksi n-heksana daun pepaya terdapat perbedaan pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Tuntun (2016) bahwa diameter zona hambat ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* adanya perbedaan, yaitu pada jenis bakteri uji. Jenis bakteri dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri.

Bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif memiliki perbedaan pada struktur dinding selnya. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki satu atau lebih lapisan peptidoglikan dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan, dan tidak memiliki asam teikoat. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih rumit dibandingkan dengan dinding sel bakteri Gram positif. Membran luar sel bakteri Gram negatif terdiri dari lipoprotein, fosfolipida, dan lipopolisakarida (Radji, 2010). Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki beberapa lapisan peptidoglikan yang tebal dan kaku (20-80 nm), memiliki asam teikoat, serta tidak memiliki lipoprotein, fosfolipida, dan lipopolisakarida (Radji, 2010).

Sifat senyawa antibakteri juga berpengaruh dalam aktivitas antibakteri karena senyawa antibakteri yang bersifat non polar lebih mudah menembus lapisan lipid yang dimiliki bakteri *E. coli*, sedangkan senyawa antibakteri yang bersifat polar lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang dimiliki bakteri *S. aureus*. Hal tersebut disebabkan karena lapisan lipid lebih bersifat non polar dan lapisan peptidoglikan bersifat polar. Fraksi n-heksana daun pepaya yang bersifat non polar akan memiliki pengaruh besar terhadap bakteri *E. coli* karena memiliki lapisan lipid yang bersifat non polar sehingga diameter zona hambat yang terbentuk akan lebih besar dibandingkan dengan bakteri *S. aureus*. Berdasarkan hasil rerata diameter zona hambat yang diperoleh bahwa diameter zona hambat yang terbentuk tidak sesuai karena diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* lebih besar dibandingkan bakteri *E. coli*.

Dalam uji aktivitas antibakteri terdapat faktor yang dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Menurut Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg (2008)

kandungan senyawa metabolit dan kecepatan difusi senyawa antibakteri dapat mempengaruhi hasil diameter zona hambat. Selain itu, suspensi bakteri uji yang tidak merata pada media uji sehingga jumlah tumbuhnya bakteri di media MHA tidak sama atau dapat juga suspensi bakteri uji yang sudah merata tetapi tidak tumbuh dengan baik, serta suspensi bakteri uji yang tidak sama keruhnya dengan larutan standar *McFarland* 0,5 (Suheri dkk, 2015). Semakin keruh suspensi bakteri uji yang dibuat maka menghasilkan kepadatan sel bakteri semakin banyak pada media uji sehingga senyawa antibakteri yang bekerja kurang optimal. Jumlah bakteri telah memenuhi syarat untuk uji kepekaan, yaitu 10^5 – 10^8 CFU/mL (Nor dkk, 2018).

Antibiotik merupakan obat sintetis yang diindikasikan untuk penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Menurut Pelczar (1986), antibiotik dibagi menjadi 2 berdasarkan cara kerjanya, yaitu menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh sel bakteri (bakterisidal). Kertas cakram yang berisi antibiotik Ampisilin 10 µg digunakan sebagai kontrol positif. Ampisilin merupakan antibiotik golongan Penisilin berspektrum luas yang dapat bekerja pada bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Mekanisme kerja Ampisilin dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan menghambat pembentukan mikropeptida. Pembentukan sintesis dinding sel diganggu maka bakteri tidak dapat mengatasi perbedaan tekanan osmosis di luar dan di dalam sel sehingga bakteri akan mati (Wirastuti, 2016). Akuades digunakan sebagai kontrol negatif untuk pembandingan yang tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Mekanisme kerja antibakteri senyawa alkaloid adalah merusak DNA bakteri sehingga inti sel akan rusak. Kerusakan tersebut disebabkan karena pada alkaloid memiliki gugus basa yang dapat berinteraksi dengan DNA bakteri (Tuntun, 2016). Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme sintesis dinding bakteri. Flavonoid akan mengganggu sintesis dinding bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma dan kemudian bakteri akan lisis. Selain itu, flavonoid juga menghambat DNA girase dan menghambat aktivitas enzim ATPase sehingga bakteri tidak dapat tumbuh (Robinson, 1995). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri.

Saponin menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak atau mengubah struktur dinding sel setelah terbentuk dan permeabilitas sel bakteri dirusak sehingga menyebabkan kebocoran nutrisi di dalam sel (Pelczar, 1986). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri dengan cara menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat tumbuh (Robinson, 1995). Selain itu, tanin juga memiliki aktivitas antibakteri dengan cara menginaktifkan adhesin sel mikroba dan enzim, serta mengganggu traspor protein pada lapisan dalam sel (Cowan, 1994) dalam penelitian (Ngajow dkk, 2013).

Pengolahan data diameter zona hambat pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dianalisis secara statistik parametrik menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan terlebih dahulu sebelum dianalisis statistik menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan perangkat lunak SPSS versi 20. Tujuan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui populasi data terdistribusi normal atau tidak, sedangkan uji homogenitas digunakan untuk mengetahui beberapa varian populasi sama (homogen) atau tidak homogen. Data terdistribusi normal apabila nilai Sig. > 0,05 dan sebaran data homogen apabila nilai Sig. > 0,05 (Priyatno, 2009).

Berdasarkan pengolahan data terhadap uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* kelompok perlakuan dan kelompok kontrol memiliki nilai Sig. > 0,05 yang artinya data tersebut terdistribusi normal. Penggunaan *Shapiro-Wilk* dalam uji normalitas karena jumlah dalam sampel ≤ 50 (Hulu & Taruli, 2019). Selanjutnya, pengolahan data terhadap uji homogenitas dan uji *One-Way* ANOVA yang dilakukan secara bersamaan. Hasil yang diperoleh bahwa uji homogenitas diameter zona hambat terhadap bakteri *E. coli* memiliki nilai Sig. 0,001 dan diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* memiliki nilai Sig. 0,047. Artinya, kedua data tersebut tidak homogen karena nilai Sig. < 0,05 sehingga hasil uji *One-Way* ANOVA tidak bisa dilanjutkan. Hal tersebut karena dalam uji *One-Way* ANOVA memiliki syarat yang harus terpenuhi, yaitu data

harus terdistribusi normal dan varian data harus homogen (Dahlan, 2011). Oleh karena itu, dilakukan uji non parametrik sebagai alternatif dari uji parametrik, yaitu dengan uji *Kruskal-Wallis*. Pemilihan dengan uji *Kruskal-Wallis* karena digunakan untuk 2 atau lebih sampel acak yang independen untuk mengetahui sampel-sampel tersebut berasal dari populasi yang memiliki nilai rata-rata yang sama. Jika hasil yang diperoleh nilai Sig. $> 0,05$ maka tidak ada perbedaan (H_0 diterima dan H_a ditolak), sedangkan jika nilai Sig. $< 0,05$ maka ada perbedaan (H_0 ditolak dan H_a diterima) (Harinaldi, 2005). Dalam penelitian ini nilai H_0 (hipotesis nihil): tidak ada perbedaan aktivitas antibakteri fraksi n-heksana daun pepaya pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, sedangkan nilai H_a (hipotesis alternatif): ada perbedaan aktivitas antibakteri fraksi n-heksana daun pepaya pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Berdasarkan hasil pengolahan data terhadap uji *Kruskal-Wallis* didapat bahwa diameter zona hambat terhadap *E. coli* memiliki nilai Sig. $0,006 < 0,05$ artinya ada perbedaan (H_0 ditolak dan H_a diterima), sedangkan diameter zona hambat terhadap *S. aureus* memiliki nilai Sig. $0,014 < 0,05$ artinya ada perbedaan (H_0 ditolak dan H_a diterima). Hasil analisis pengolahan data secara statistik dapat dilihat pada Lampiran 9.