

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra* L.)

Hasil determinasi tanaman yang dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta bahwa tanaman yang digunakan adalah daun kayu putih (Lampiran 2).

2. Penyiapan Sampel

Daun kayu putih segar sebanyak 1000 gram dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C, dilakukan penyerbukan menggunakan grinder, kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan ukuran 40 mesh. Hasil dari penyerbukan diperoleh serbuk daun kayu putih 630,50 gram.

Dilakukan metode maserasi untuk pembuatan ekstrak daun kayu putih dengan perbandingan 1:10 b/v menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil nilai rendemen ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Kayu Putih

Sampel	Berat Serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	% Rendemen	Kemenkes RI (2017)
Ekstrak daun kayu putih	400	135,03	33,75	≥15,0%.

3. Uji Kadar Air

Hasil uji kadar air dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Kadar Air Ekstrak Daun Kayu Putih

Kadar Air Ekstrak	FHI
6,11%	≤20,3%

4. Kontrol Kualitas Ekstrak Daun Kayu Putih

a. Hasil organoleptik

Ekstrak daun kayu putih diamati secara organoleptik. Tujuan dilakukannya pengamatan organoleptik adalah untuk mengetahui warna, bau,

rasa, dan tekstur pada ekstrak menggunakan alat indera. Hasil pengamatan organoleptik disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak Daun Kayu Putih

Uji Organoleptik	Hasil Uji	Referensi (Kemenkes RI, 2017)
Warna	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman
Bau	Khas kayu putih	Khas aromatis
Rasa	Pahit	Pahit
Tekstur	Kental	Kental

b. Hasil skrining fitokimia

Dilakukan untuk mengidentifikasi adanya kandungan senyawa pada ekstrak daun kayu putih. Hasil skrining fitokimia disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Skrining Fitokimia

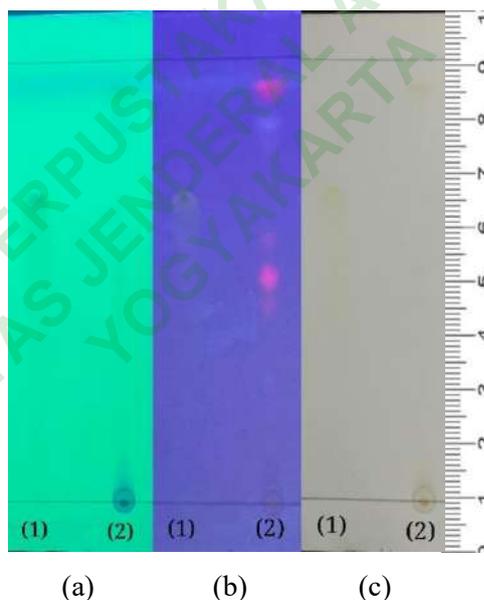
Skrining Fitokimia	Pereaksi	Hasil Yang Diperoleh	Keterangan	Literatur
Alkaloid	Mayer	Terdapat endapan berwarna putih	+	Adanya endapan putih (Wardhani <i>et al.</i> , 2018)
	Dragendorff	Terdapat endapan berwarna jingga	+	Adanya endapan jingga (Wardhani <i>et al.</i> , 2018)
	Wagner	Terdapat endapan berwarna coklat	+	Adanya endapan coklat (Endarini, 2016)
Flavonoid	HCL pekat + Magnesium	Terjadi perubahan warna menjadi jingga	+	Terbentuk warna jingga (Wardhani <i>et al.</i> , 2018)
Saponin	Akuades panas	Terbentuk busa setabil setinggi 3 cm	+	Terbentuk busa stabil (Wardhani <i>et al.</i> , 2018)
Tanin	Air panas+FeCl ₃ 1%	Terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman	+	Terbentuk warna biru (Shubhreet <i>et al.</i> , 2019)
Terpenoid	Etanol+asam asetat+H ₂ SO ₄	Terjadi perubahan warna menjadi hijau tua	+	Terbentuk warna hijau (Wardhani <i>et al.</i> , 2018)

c. Hasil identifikasi pemisahan senyawa dengan metode KLT

Dilakukan optimasi fase gerak dengan tujuan mengetahui fase gerak sehingga dapatkan hasil pemisahan yang optimal. Tabel 7 menunjukkan hasil dari optimalisasi. Kuersetin standar 0,1% adalah standar yang digunakan untuk membandingkan ekstrak daun kayu putih.

Tabel 7. Optimasi Fase Gerak KLT

No	Fase Gerak	Hasil
1.	n-heksan:aseton 6 : 4	Standar dan sampel terelusi, tetapi hasil keduanya <i>tailing</i> dan bercak melebar.
2.	n-heksan:etil asetat 7:3	Standar terelusi cukup baik, sampel terelusi tetapi <i>tailing</i>
3.	n-butanol:asam asetat:air 4:1:5	Standar dan sampel terelusi dengan baik, tetapi semakin naik tidak terlihat
4.	Etil asetat:n-heksan 7:3	Standar dan sampel terelusi dan terjadi pemisahan, namun sampel yang terelusi berwarna merah muda



Gambar 10. Hasil Pengamatan Plat KLT (Lampiran 8)

Keterangan : (a) deteksi dengan uv 254, (b) identifikasi dengan uv 366, (c) sinar tampak, (1) standar kuersetin, dan (2) ekstrak daun kayu putih

Gambar 10 menunjukkan hasil pemisah senyawa, dengan konsentrasi ekstrak yang digunakan 1% dan standar kuersetin 0,1%. Bercak standar dan sampel ditemukan pada plat KLT yang diamati pada sinar UV. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 10. Hasil perhitungan nilai R_f ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Nilai Rf Uji KLT

Sampel	Spot Rf Sampel Daun Kayu Putih	Standar kuersetin 0,1%
Bercak 1	0,562	0,812
Bercak 2	0,625	
Bercak 3	0,712	
Bercak 4	1,062	

5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Digunakan difusi cakram untuk pengujian aktivitas antibakteri, menggunakan kontrol positif (klorheksidin 0,2%), kontrol negatif (DMSO 10%), serta sampel ekstrak daun kayu putih. Jangka sorong digunakan untuk pengamatan diameter zona hambat diukur dengan satuan mm. Rata-rata diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Rata-Rata Diameter Zona Hambat

Kelompok	Konsentrasi (%)	Rata-Rata \pm SD	Keterangan
Ekstrak daun kayu putih	20	11,155 \pm 0,167	Kuat
	40	13,166 \pm 0,233	Kuat
	60	16,044 \pm 0,203	Kuat
	80	17,421 \pm 0,189	Kuat
	100	19,744 \pm 0,164	Kuat
Kontrol positif	-	24,744 \pm 0,430	Sangat kuat
Kontrol negatif	-	0	Lemah

6. Analisis Data

Diameter zona hambat yang dihasilkan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 22. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan zona hambat pada setiap variasi konsentrasi terdistribusi normal. Uji *Levene's* pada data sampel didapatkan nilai Sig. 0,283 > 0,05, nilai tersebut menunjukkan bahwa data yang didapatkan homogen. Pada uji *One-Way* didapatkan nilai Sig. 0,000 < 0,05 nilai tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas antibakteri antara konsentrasi pada setiap kelompok perlakuan ekstrak daun kayu putih serta kelompok kontrol positif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Pada uji lanjutan uji *Post Hoc* menunjukkan setiap variasi konsentrasi tidak berbeda signifikan. Hasil statistik dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Daun Kayu Putih

Kelompok	Konsentrasi	Uji Normalitas Shapiro-Wilk	Uji Homogenitas Levene's	Uji One-Way ANOVA
Ekstrak daun kayu putih	20%	0,779 ^a	0,283 ^b	0,000 ^c
	40%	0,271 ^a		
	60%	0,640 ^a		
	80%	0,509 ^a		
	100%	0,192 ^a		
Kontrol positif (Klorheksidin 0,2%)	-	0,526 ^a		

Keterangan:

a = data terdistribusi normal

b = data homogen

c = ada perbedaan aktivitas antibakteri

B. Pembahasan

Penelitian ini bersifat eksperimen di Laboratorium guna mengetahui aktivitas antibakteri dari daun kayu putih terhadap *Streptococcus mutans*. Penelitian ini diawali dengan determinasi tanaman dengan tujuan menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel (Klau & Hesturini, 2021). Hasil determinasi menunjukkan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah spesies tanaman kayu putih (*Melaleuca leucadendra* L.) terdapat pada Lampiran (2). Daun kayu putih yang digunakan adalah daun yang utuh, tidak rusak, diambil dari urutan ke 5-15, dan berwarna hijau tua sebanyak 1000 gram, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven suhu 40°C, tujuannya adalah untuk menghindari tumbuhnya jamur dan kapang pada sampel dan menghentikan reaksi enzimatis pada tanaman serta mengurangi kadar air dengan waktu yang cepat dan suhu yang konstan (Fahmi *et al.*, 2019). Daun kayu putih kering dilakukan penyerbukan dengan tujuan memperkecil partikel serta memudahkan proses penarikan zat aktif (Salamah *et al.*, 2017), didapatkan hasil dari penyerbukan diperoleh sebesar 630,50 gram.

Serbuk daun kayu putih sebanyak 400 gram dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi untuk mengambil zat aktif pada daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra* L.), alasan digunakan metode ini karena alat dan cara pengerjaannya yang sederhana serta menghindari rusaknya zat aktif karena pemanasan (Badaring *et al.*, 2020). Etanol merupakan pelarut polar, namun pelarut

ini bersifat universal yang mampu mengekstraksi baik senyawa polar maupun non polar (Gusti *et al.*, 2021). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%, alasan penggunaan pelarut ini adalah karena sifat polar, sehingga dapat melarutkan senyawa dengan sifat polar (Pertiwi *et al.*, 2022). Mekanisme maserasi adalah proses terjadinya difusi pelarut masuk ke dalam sel tumbuhan, kemudian menarik zat aktif yang terkandung (Kiswando, 2011).

Proses maserasi dilakukan selama 3×24 jam dalam toples kaca yang ditutup rapat terlindung dari cahaya matahari serta disimpan pada ruangan tertutup untuk mencegah reaksi yang dikatalis oleh cahaya yang dapat merusak sampel, dilakukan pengadukan dilakukan setiap 6 jam selama 5 menit untuk meratakan kontak antara pelarut dan simplisia lebih optimal. Proses remaserasi juga dilakukan pada penelitian ini menggunakan etanol 70% selama 1×24 jam, pengadukan dilakukan setiap 6 jam selama 5 menit, tujuannya yaitu untuk menarik kandungan zat aktif yang masih ada di dalam sampel (Makalunsenge *et al.*, 2022). Filtrat yang didapatkan dilakukan penguapan pada suhu tidak lebih dari 55°C sampai didapatkan ekstrak kental untuk menghilangkan pelarut etanol yang terdapat pada ekstrak, suhu tersebut dipilih karena beberapa alasan utama yang berkaitan dengan menjaga kualitas senyawa yang diekstraksi, selain itu suhu tersebut digunakan untuk mencegah degradasi akibat pemanasan dari senyawa aktif yang sensitif terhadap panas, tetapi cukup tinggi untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi hal ini serupa dengan penelitian dari Hakim *et al.*, (2019) yang menggunakan suhu yang sama. Ekstrak kental yang didapatkan dihitung % rendemennya, rendemen menggambarkan banyaknya jumlah zat yang tersari, dan jumlah zat yang berhasil diambil. Rendemen adalah jumlah ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi tanaman dan dinyatakan dalam bentuk persen, semakin tinggi rendemen semakin banyak senyawa aktif yang terdapat dalam sampel (Kusuma & Aprileili, 2022). Hasil penelitian didapatkan ekstrak sebanyak 135,03 gram dengan nilai rendemen yang didapatkan adalah 33,75% memenuhi syarat rendemen ekstrak daun kayu putih pada FHI yaitu >15% (Kemenkes RI, 2017).

Uji kadar air dilakukan menggunakan *Moisture balance* selama 10 menit hingga alat menunjukkan satuan persen. Uji kadar air dilakukan pada ekstrak daun

kayu putih dengan tujuan mengukur kadar air yang terdapat dalam ekstrak, kadar air dapat berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme pada ekstrak daun kayu putih (Effendi *et al.*, 2015). Didapatkan persentase 6,11%, yang artinya memenuhi syarat ekstrak daun kayu putih dalam Farmakope Herbal Indonesia yaitu <20,3% (Kemenkes RI, 2017).

Sampel ekstrak daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra* L.) yang didapatkan dilakukan pengamatan organoleptik dengan tujuan memberikan identifikasi awal simplisia dan ekstrak menggunakan pancaindra melalui dekskripsi warna, bau, rasa, dan tekstur (Utami, 2020). Berdasarkan hasil penelitian didapatkan, ekstrak daun kayu putih memiliki warna coklat kehitaman, bau khas kayu putih, rasa pahit, dan tekstur kental. Sesuai dengan penjelasan yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia mengenai ekstrak daun kayu putih (Kemenkes RI, 2017).

Selanjutnya dilakukan uji skrining fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak daun kayu putih. Tabel 6 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun kayu putih mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wardhani *et al.*, (2018) bahwa ekstrak daun kayu putih mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid serta pada penelitian Shubhreet *et al.*, (2019) ekstrak daun kayu putih mengandung tanin terhidrolisis.

Pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner digunakan dalam identifikasi senyawa alkaloid. Pengujian dengan pereaksi Mayer hasil positif jika terbentuknya endapan putih. Pengujian pereaksi Dragendorff hasil positif jika terbentuknya endapan jingga (Wardhani *et al.*, 2018). Pengujian pereaksi Wagner hasil positif jika terbentuknya endapan coklat (Endarini, 2016). Hasil identifikasi pada pereaksi mayer terdapat endapan berwarna putih kecoklatan, pada pereaksi Dragendorff terdapat endapan jingga, dan pada pereaksi Wagner terdapat endapan coklat. Hal ini menunjukkan ekstrak daun kayu putih positif mengandung alkaloid pada ketiga pereaksi. Dihasilkan endapan karena terjadinya pembentukan kompleks kalium–alkaloid. Alkaloid mempunyai pasangan elektron bebas yang terdapat dalam atom nitrogen berikatan dengan ion K⁺ pada pereaksi alkaloid (Oktavia & Sutoyo, 2021).

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak menggunakan serbuk magnesium serta HCl pekat. Magnesium dan HCl pekat akan menghasilkan reaksi berwarna jingga yang menghasilkan senyawa kompleks yang menandakan positif mengandung senyawa flavonoid golongan flavon, auron atau khalkon (Oktavia & Sutoyo, 2021). Hasil penelitian ekstrak daun kayu putih mengandung flavonoid berwarna jingga. Sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan Wardhani *et al.*, (2018) ekstrak daun kayu putih mengandung flavonoid golongan flavon, auron atau khalkon.

Identifikasi senyawa saponin dapat dilihat dari terbentuknya busa yang stabil. Glikosil merupakan senyawa yang terkandung dalam saponin, senyawa ini termasuk gugus polar yang memiliki sifat surfaktan alami, mengakibatkan saponin akan membentuk busa ketika digojog dengan kuat (Parbuntari *et al.*, 2018). Hasil penelitian yang telah dilakukan terbentuknya busa stabil dengan tinggi 3 cm setelah ditambahkan dengan larutan HCL 2N, menunjukkan bahwa positif mengandung saponin.

Identifikasi senyawa tanin digunakan akuades dan pereaksi FeCl_3 1%. FeCl_3 bereaksi membentuk gugus yang menyebabkan larutan berwarna menjadi kehitaman. Perubahan ini karena tanin dapat membentuk kompleks dengan FeCl_3 (Mukhriani *et al.*, 2019). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terbentuk warna biru kehitaman termasuk ke dalam golongan tanin terhidrolisis. Sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan Shubhreet *et al.*, (2019) ekstrak daun kayu putih mengandung tanin terhidrolisis. Selain itu pada penelitian ini dilakukan identifikasi senyawa terpenoid dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat, positif mengandung terpenoid terjadi perubahan warna hijau (Wardhani *et al.*, 2018). Didapatkan hasil positif terpenoid bahwa adanya perubahan warna hijau tua pada ekstrak daun kayu putih mengandung terpenoid.

Pada penelitian ini juga dilakukan identifikasi senyawa flavonoid di dalam daun kayu putih dengan KLT. Penelitian ini menggunakan fase diam plat silika GF₂₅₄ yang memiliki sifat relatif polar (Fikamilia & Mita, 2020). Plat diaktivasi terlebih dahulu dengan cara dipanaskan dalam oven dengan suhu 50°C dalam waktu 30 menit. Aktivasi plat KLT bertujuan menghilangkan kandungan air dalam plat

silika, sehingga daya serap optimal serta tidak menghambat proses elusi (Binugraheni *et al.*, 2022). Langkah selanjutnya yaitu menjenuhkan bejana dengan fase gerak hasil optimasi yaitu etil asetat:n-heksan 7:3 yang bersifat semi polar, penjenuhan fase gerak ditandai dengan kertas saring sebagai indikator kejenuhan. Penjenuhan bejana dilakukan untuk meratakan tekanan uap yang dihasilkan fase gerak guna mencapai pemisahan yang optimal (Dewi *et al.*, 2018). Senyawa flavonoid akan tampak warna kuning di bawah sinar UV.

Pemisahan senyawa menggunakan plat KLT diawali dengan pengoptimasian fase gerak. Tujuannya untuk menghasilkan pemisahan yang optimal. Ekstrak daun kayu putih menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid dan Rf sejajar dengan standar (kuersetin), maka senyawa tersebut adalah flavonoid dengan karakteristik yang sama seperti kuersetin (Wulandari *et al.*, 2022). Berdasarkan Gambar 10 dihasilkan bercak berwarna kuning dan pada Tabel 8 didapatkan nilai Rf kuersetin sebesar 0,812. Penelitian yang sudah dilakukan didapatkan hasil pengamatan pada sinar UV 366 nm terdapat nilai Rf yang mendekati standar kuersetin tetapi bercak yang di dapatkan terlihat berwarna merah sehingga tidak dapat disimpulkan ekstrak daun kayu putih mengandung flavonoid dengan metode KLT, diduga sampel ekstrak daun kayu putih mengandung senyawa selain flavonoid seperti klorofil, terpenoid ataupun senyawa lainnya. Klorofil memberikan bercak berwarna merah pada pengamatan sinar UV 366, klorofil mempunyai sifat non polar (Santosa dan Haresmita, 2015). Senyawa dengan nilai Rf sebesar 1,062 kemungkinan adalah senyawa non polar seperti klorofil, terpenoid, atau senyawa lainnya yang bersifat non polar. Sedangkan bercak dengan nilai Rf 0,562; 0,625; 0,712 mempunyai sifat relative lebih polar sehingga kemungkinan adalah senyawa golongan lain atau senyawa yang tertutupi oleh klorofil. Hal ini terjadi karena pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol bersifat universal yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Pada Gambar 10 didapatkan 4 bercak karena menggunakan fase gerak dengan sifat semi polar sehingga senyawa yang terelusi bukan hanya flavonoid tetapi ada kandungan lain yang terdapat dalam ekstrak daun kayu putih.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan tujuan membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak daun kayu putih terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan metode difusi cakram. Dilakukan sterilisasi alat dan bahan guna mencegah kemungkinan kontaminasi. Tanpa adanya sterilisasi, ada risiko alat dan materi yang digunakan terkontaminasi, yang dapat mengganggu proses pengamatan (Rahmawati, 2019). Dilakukan pembuatan media NA dan MHA. Media NA digunakan untuk peremajaan bakteri, karena media NA mengandung nutrisi yang mendukung pertumbuhan bakteri, media NA dibuat miring untuk memudahkan pengamatan dan penanaman bakteri. Sedangkan media MHA untuk uji antibakteri, media tersebut bersifat netral sehingga tidak menimbulkan pengaruh pada prosedur uji antibakteri serta memiliki kandungan nutrisi yang baik untuk kultur bakteri (Utomo *et al.*, 2018). Peremajaan bakteri dilakukan dengan tujuan mendapatkan isolat bakteri aktif sehingga pertumbuhannya dapat dioptimalkan (Sari *et al.*, 2022). Peremajaan bakteri diinkubasi pada suhu yang optimal untuk pertumbuhan bakteri yaitu suhu 37°C dalam waktu 24 jam. Setelah peremajaan bakteri dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil 3 ose hasil peremajaan bakteri disuspensikan menggunakan NaCl 0,9% bertujuan agar tekanan osmosis sel-sel bakteri sama dengan tekanan osmosis cairan tubuh sehingga tidak terjadi kematian sel (Azizah *et al.*, 2023). Suspensi bakteri di cek menggunakan turbidity meter hingga kekeruhan sama dengan standar *Mc Farland* 0,5 yang sering digunakan untuk uji antibakteri (Bhakti *et al.*, 2023). Diinokulasikan hasil suspensi bakteri sebanyak 100 µL ke dalam media MHA kemudian diratakan menggunakan batang-L.

Dilakukan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dilarutkan dengan DMSO 10%. Tujuan digunakan DMSO 10% untuk membuat seri konsentrasi ekstrak daun kayu putih, DMSO adalah pelarut organik yang memiliki kemampuan melarutkan dengan baik senyawa non polar maupun polar serta tidak bersifat antibakteri (Assidqi *et al.*, 2012). DMSO 10% juga digunakan sebagai kontrol negatif. Kontrol positif pada penelitian ini digunakan klorheksidin 0,2% yaitu dengan melarutkan 1 mL dalam 5 mL akuades. Tujuan menggunakan klorheksidin karena senyawa yang efektif dalam menghambat

pertumbuhan bakteri Gram positif seperti *Streptococcus mutans*. Klorheksidin bekerja dengan merusak permeabilitas dinding sel yang menyebabkan kebocoran pada sel bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan akhirnya mati (Balagopal & Arjunker, 2013). Kertas cakram yang akan digunakan di rendam pada setiap variasi konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif selama 5 menit. Kertas cakram yang sudah direndam diletakkan pada media MHA secara aseptik untuk diuji antibakteri. Dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C dalam waktu 24 jam dimana merupakan suhu yang optimum untuk pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* (Rollando, 2019). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengamati diameter yang zona hambat yang terlihat.

Uji aktivitas antibakteri didapatkan rata-rata diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 9 menunjukkan bahwa ekstrak daun kayu putih pada konsentrasi 20% sudah dapat memberikan respon hambatan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan tingkat aktivitas zona hambat kuat. Berdasarkan Tabel 9 rata-rata zona hambat yang dihasilkan berbeda-beda Menurut Maharani *et al.*, (2023) hal tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk ketebalan media agar, suhu inkubasi, kekeruhan suspensi bakteri, dan kecepatan penyerapan panas inkubator pada cawan petri yang berbeda tergantung ketebalannya. Diameter zona hambat dipengaruhi juga oleh konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambat, disebabkan karena semakin banyak senyawa aktif yang terkandung dalam konsentrasi ekstrak daun kayu putih (Magvirah *et al.*, 2019). Pada kontrol positif menunjukkan zona hambat rata-rata yaitu $24,74 \pm 0,430$ mm dengan kategori sangat kuat. Sejalan dengan penelitian Panesa *et al.*, (2018), yang menyatakan bahwa zona hambat klorheksidin 0,2% menunjukkan kategori sangat kuat. Pada kontrol negatif menunjukkan tidak terdapat zona hambat, selaras dengan penelitian yang di lakukan Al-Abd *et al.*, (2015) yang menyebutkan bahwa kertas cakram yang berisi DMSO 10% tidak menghasilkan zona hambat dan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun kayu putih tidak terpengaruh.

Analisis statistik parametrik dilakukan menggunakan uji *One-Way* ANOVA. sebelum uji statistik, dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene's* menggunakan perangkat lunak SPSS 22. Uji

normalitas pada Tabel 10 didapatkan data pada konsentrasi 20% sebesar 0,779; 40% sebesar 0,271; 60% sebesar 0,640; 80% sebesar 0,509; dan 100% sebesar 0,192 serta kontrol positif 0,526 yang artinya data terdistribusi normal. Uji homogenitas dan uji *One-Way* ANOVA dilakukan pada saat yang sama. Uji homogenitas diameter zona hambat menunjukkan nilai Sig. 0,283 > 0,05 maka disimpulkan data tersebut homogen. Data harus terdistribusi normal dan varian data harus homogen pada uji *One-Way* ANOVA. Pada uji *One-Way* ANOVA didapatkan nilai Sig. 0,000 < 0,05 nilai tersebut menunjukkan bahwa adanya perbedaan aktivitas antibakteri pada setiap kelompok perlakuan ekstrak daun kayu putih serta kelompok kontrol positif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Seri konsentrasi ekstrak daun kayu putih dan klorheksidin 0,2% berbeda signifikan yang artinya ekstrak daun kayu putih belum sekuat klorheksidin 0,2% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan dengan uji *Post Hoc*, didapatkan hasil pada setiap konsentrasi tidak berbeda signifikan dapat dilihat pada Lampiran 14. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan Hakim *et al.*, (2019) semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambat yang dihasilkan.

Pada penelitian ini terbukti bahwa ekstrak daun kayu putih mengandung senyawa senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. Menurut Al-Abd *et al.*, (2015) senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada ekstrak daun kayu putih yaitu alkalioid, flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid. Senyawa alkaloid memiliki kemampuan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan, akibatnya lapisan pada dinding sel tidak dapat terbentuk secara utuh sehingga sel mati. Flavonoid memiliki mekanisme membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga menyebabkan fosfolipid tidak dapat mempertahankan membran sel bakteri dan menyebabkan kematian. Saponin dapat menurunkan tegangan permukaan pada dinding sel bakteri, yang dapat menyebabkan kebocoran sel meningkat. Tanin memiliki mekanisme menghentikan sintesa peptidoglikan, membentuk dinding sel yang tidak sempurna, melisis sel karena tekanan osmotik maupun fisik yang akan mengakibatkan kematian sel bakteri. Terpenoid memiliki mekanisme merusak membran sel bakteri (Pertiwi *et al.*, 2022).