

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan Bahan Tanaman

1. Identifikasi tanaman pepaya dan tanaman pisang raja

Identifikasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) dan tanaman pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) sesuai dengan ciri morfologi, makroskopis dan mikroskopis yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.

Berdasarkan hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah benar tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) dan tanaman pisang raja (*Musa paradisiaca* L.). Hasil identifikasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan dan pembuatan serbuk daun pepaya dan bonggol pisang raja

2.1 Pengumpulan bahan. Daun pepaya dan bonggol pisang raja yang digunakan dalam penelitian diambil dari daerah Kopeng, Jawa Tengah pada bulan September 2018 dalam keadaan segar dan berwarna hijau, serta bonggol pisang raja yang diambil adalah bonggol pisang raja yang buahnya sudah masak.

2.2 Pengeringan daun pepaya dan bonggol pisang raja. Pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air pada daun dan bonggol pisang, sehingga tidak ditumbuhi kapang, bakteri atau mikroorganisme lainnya. Pengeringan juga bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik zat-zat yang terdapat dalam daun pepaya dan bonggol pisang raja. Daun pepaya dan bonggol pisang raja dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 5 hari kemudian dilakukan perhitungan masing-masing prosentase bobot kering serbuk terhadap bobot basah daun pepaya dan bonggol pisang raja dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Hasil persentase bobot basah terhadap bobot kering daun pepaya

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%^b/_b)
6000	2000	33,33

Tabel 2. Hasil persentase bobot basah terhadap bobot kering bonggol pisang raja

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%^b/_b)
5000	2000	40

Hasil persentase bobot basah daun pepaya sebesar 6000 gram dan diperoleh bobot kering 2000 gram. Persentase bobot kering daun pepaya terhadap bobot basah daun pepaya sebesar 33,33% b/b. Hasil bobot basah bonggol pisang raja sebesar 5000 gram dan diperoleh bobot kering sebesar 2000 gram dengan persentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 40% b/b. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering masing-masing daun dan bonggol dapat dilihat pada lampiran 9.

3. Hasil pembuatan ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya

3.1 Hasil pembuatan ekstrak etanol bonggol pisang raja. Serbuk bonggol pisang raja ditimbang sebanyak 500,00 gram dimasukkan dalam botol maserasi dengan 3750 ml etanol 70% dan didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Maserat disaring dengan kain flannel dan kertas saring kemudian dicuci menggunakan 1250 ml etanol 70% didiamkan selama 2 hari dengan sesekali digojog. Maserat disaring kembali menggunakan kain flannel dan kertas saring kemudian dipisahkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C sehingga menghasilkan rendemen ekstrak yang berbeda.

Tabel 3. Hasil perhitungan kadar rendemen ekstrak bonggol pisang raja

Bobot serbuk (gram)	Hasil ekstrak kental (gram)	Rendemen % (^b/_b)
500,00	58,60	11,72

Berdasarkan tabel 4, persentase rendemen ekstrak maserasi bonggol pisang raja yang diperoleh sebanyak 11,72% b/b. Organoleptis ekstrak warna coklat tua, bentuk kental dan berbau aromatik.

3.2 Hasil pembuatan ekstrak etanol daun pepaya. Serbuk daun pepaya ditimbang sebanyak 500,00 gram dimasukkan dalam botol maserasi dengan 3750 ml etanol 70% dan didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Maserat disaring dengan kain flannel dan kertas saring kemudian dicuci

menggunakan 1250 ml etanol 70% didiamkan selama 2 hari dengan sesekali digojog. Maserat disaring kembali menggunakan kain flannel dan kertas saring kemudian dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C sehingga menghasilkan rendemen ekstrak yang berbeda.

Tabel 4. Hasil perhitungan kadar rendemen ekstrak daun pepaya

Bobot serbuk (gram)	Hasil ekstrak kental (gram)	Rendemen % (^b / _b)
500,00	146,960	29,39

Berdasarkan tabel 5, persentase rendemen ekstrak maserasi daun pepaya yang diperoleh sebanyak 29,39% b/b. Organoleptis ekstrak warna hijau tua, bentuk kental dan berbau aromatik. Perhitungan kadar rendemen ekstrak bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya dapat dilihat pada lampiran 11.

3.3 Hasil pembuatan ekstrak kombinasi. Pembuatan ekstrak kombinasi dibuat dengan mengkombinasikan ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya dengan perbandingan 1:1, 1:3 dan 3:1. Kombinasi dari kedua ekstrak dibuat dengan menimbang masing-masing ekstrak kedalam vial yang sudah disterilkan dan diencerkan dengan DMSO 1%. Untuk perbandingan 1:1, ekstrak ditimbang masing-masing 1 gram dan dilarutkan menggunakan 2 ml DMSO 1%. Pada perbandingan 1:3, ekstrak bonggol pisang raja ditimbang 0,5 gram diencerkan dengan DMSO 1% sebanyak 1 ml dan ekstrak daun pepaya ditimbang 1,5 gram diencerkan dengan DMSO 1% sebanyak 3 ml. Pada perbandingan 3:1, ekstrak bonggol pisang raja ditimbang 1,5 gram dan ekstrak daun pepaya 0,5 gram. Pemakaian DMSO 1% dengan konsentrasi tersebut mampu melarutkan kombinasi ekstrak sehingga kandungan yang ada pada kedua ekstrak yang dikombinasikan dapat larut dan dapat berinteraksi dengan bakteri uji pada uji difusi dan dilusi. Perhitungan kombinasi ekstrak dapat dilihat pada lampiran 14.

4. Hasil karakteristik Ekstrak dan serbuk

4.1 Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak dan serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya. Ekstrak dan serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya masing-masing ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian susut pengeringan ekstrak dan serbuk diukur dengan menggunakan alat *Moisture balance*.

Tabel 5. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Replikasi	Bobot awal (gram)		Bobot akhir (gram)		Susut pengeringan (%)	
	BP	PY	BP	PY	BP	PY
1	2	2	1,88	1,89	9,0	9,0
2	2	2	1,87	1,89	9,3	8,7
3	2	2	1,87	1,89	9,3	8,7
Rata-rata					9,2	8,8

Tabel 6. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya

Replikasi	Bobot awal (gram)		Bobot akhir (gram)		Susut pengeringan (%)	
	BP	PY	BP	PY	BP	PY
1	2	2	1,82	1,81	8,1	7,0
2	2	2	1,81	1,81	8,4	7,6
3	2	2	1,81	1,81	8,4	7,6
Rata-rata					8,3	7,4

Keterangan :

BP : ekstrak dan serbuk bonggol pisang raja

PY : ekstrak dan serbuk daun pepaya

Berdasarkan tabel 5 dan 6, didapatkan hasil rata-rata perhitungan susut pengeringan ekstrak bonggol pisang raja yang dilakukan tiga replikasi yaitu sebesar 9,2% b/b dan ekstrak daun pepaya yang dilakukan tiga replikasi yaitu sebesar 8,8% b/b. Sedangkan untuk hasil penetapan susut pengeringan serbuk bonggol pisang raja yang dilakukan tiga replikasi yaitu sebesar 8,3% b/b dan serbuk daun pepaya yang dilakukan tiga replikasi yaitu sebesar 7,4% b/b. Dari hasil yang didapatkan untuk susut pengeringan ekstrak dan serbuk keduanya memenuhi syarat karena persentase susut pengeringan masing-masing ekstrak dan serbuk kurang dari 10%. Tujuan susut pengeringan yaitu untuk mengetahui kadar lembab yang ada didalam ekstrak dan serbuk. Susut pengeringan juga bertujuan untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Perhitungan penetapan susut pengeringan ekstrak dan serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya dapat dilihat pada lampiran 10.

4.2 Hasil penetapan kadar air. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluen jenuh air karena toluen memiliki titik didih lebih tinggi daripada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Proses enzimatik dapat dihentikan bila kadar air serbuk

kurang dari 10% dan kadar air ekstrak kurang dari 30% (Depkes RI 2008). Kemudian ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya ditimbang seksama masing-masing 10 gram dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan dengan toluen jenuh air. Sedangkan untuk serbuk ditimbang seksama masing-masing sebanyak 20 gram. Rangkaian alat dipasang dan dipanaskan selama 15 menit. Jika semua air sudah tersuling dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dibaca volume air dan toluen memisah sempurna dan dihitung kadar air dalam % v/b. Perhitungan kadar air dilakukan sebanyak tiga kali.

Tabel 7. Hasil penetapan kadar air ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Replikasi	Penimbangan (gram)	Volume air (ml)		Kadar air (% v/b)	
		EBP	EDP	EBP	EDP
1	10	1,9	1,8	19	18
2	10	1,9	1,8	19	18
3	10	2	1,9	20	19
Rata-rata				19,3	18,3

Keterangan :

EBP : ekstrak bonggol pisang raja

EDP : ekstrak daun pepaya

Hasil penetapan kadar air ekstrak bonggol pisang raja adalah 19,3% dan ekstrak daun pepaya adalah 18,3% yang artinya ekstrak sudah memenuhi syarat pengeringan karena kadar air kurang dari 30%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya terhindar dari pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimiawi yang dapat merusak mutu ekstrak.

Tabel 8. Hasil penetapan kadar air serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya

Replikasi	Penimbangan (gram)	Volume air (ml)		Kadar air (% v/b)	
		SBP	SDP	SBP	SDP
1	20	1,6	1,2	8	6
2	20	1,5	1,5	7,5	7,5
3	20	1,4	1,3	7	6,5
Rata-rata				7,5	6,6

Keterangan :

SBP : serbuk bonggol pisang raja

SDP : serbuk daun pepaya

Hasil penetapan kadar air serbuk bonggol pisang raja adalah 7,5% dan serbuk daun pepaya adalah 6,6% yang artinya serbuk sudah memenuhi syarat pengeringan karena kadar air kurang dari 10%. Hal ini menunjukkan bahwa serbuk bonggol pisang raja dan serbuk daun pepaya dapat terhindar dari

pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimiawi yang dapat merusak mutu serbuk.

4.3 Hasil uji bobot jenis. Tujuan dilakukan uji bobot jenis yaitu untuk mengetahui besarnya massa persatuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstra pekat atau kental yang masih bisa dihitung, dan untuk memberikan gambaran kandungan kimia tertentu. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer. Digunakan piknometer kering, bersih kemudian ditimbang untuk menetapkan bobot piknometer. Ekstrak ditimbang sebanyak 2,5 gram dilarutkan dengan menggunakan etanol kemudian dimasukkan ke dalam piknometer dan ditimbang. Uji dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Tabel 9. Hasil uji bobot jenis ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Replikasi	Sampel		Bobot jenis	
	Eks. bonggol pisang raja (gram)	Eks. daun pepaya (gram)	Eks. bonggol pisang raja	Eks. daun pepaya
1	2,5	2,5	1,0	1,0
2	2,5	2,5	1,0	1,0
3	2,5	2,5	1,0	1,0

Dari tabel di atas didapatkan hasil bobot jenis ekstrak bonggol pisang dan ekstrak daun pepaya sebesar 1,0 g/ml. Hal ini menggambarkan besarnya massa per satuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair atau kental dan untuk mengetahui kemurnian suatu zat yang ditentukan bobot jenisnya.

5. Hasil uji bebas etanol ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol ekstrak bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya. Hasil positif bebas etanol ditandai dengan tidak ada bau ester yang khas dari etanol pada saat pengujian. Uji bebas etanol dilakukan dengan tujuan untuk mencegah kesalahan dalam penelitian uji aktivitas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hal ini disebabkan karena etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil esterifikasi alkohol pada masing-masing ekstrak dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil tes bebas etanol ekstrak bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya

Esterifikasi	Hasil	
	Ekstrak bonggol pisang raja	Ekstrak daun pepaya
Alkohol	-	-

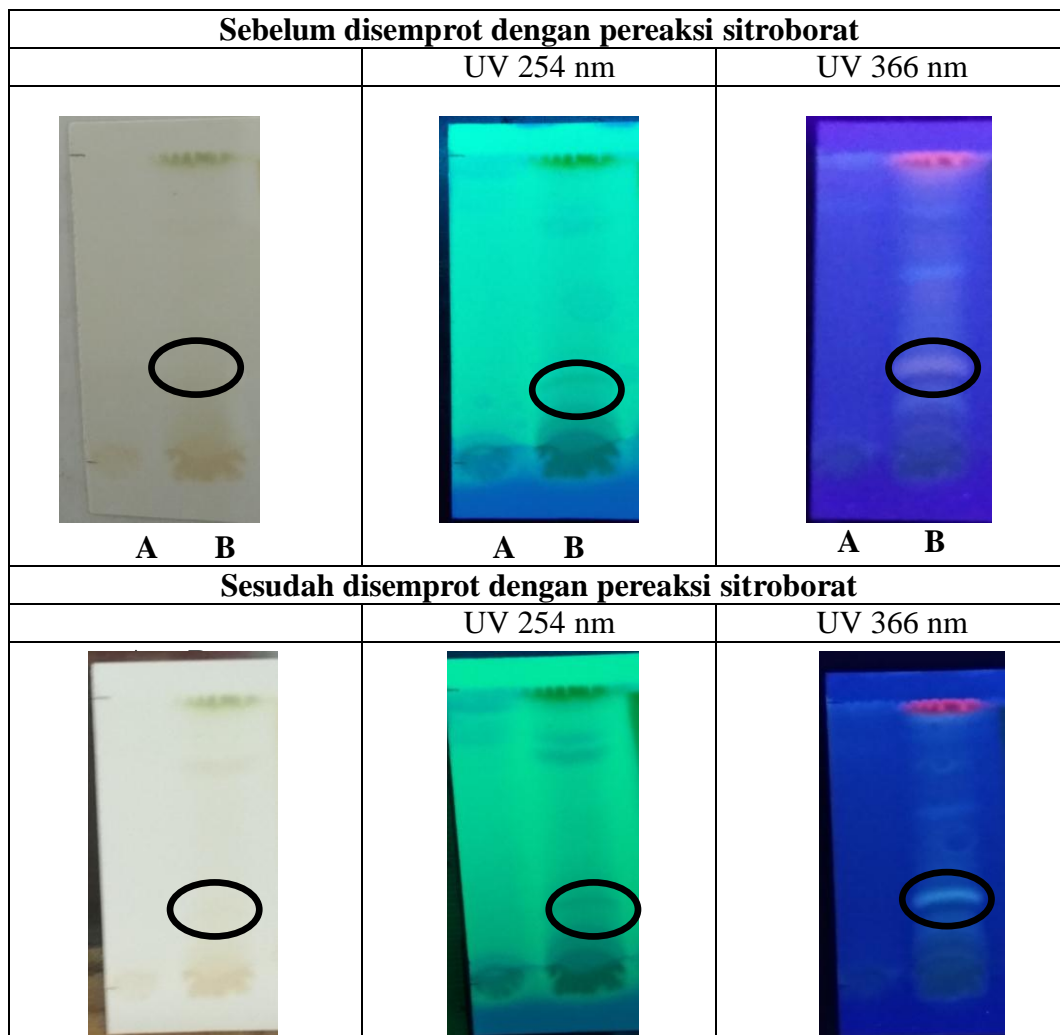
Keterangan :

(-) : tidak tercium bau khas ester

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam kedua tanaman tersebut dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan fase gerak dan penampak bercak yang sesuai dengan senyawa yang diuji.

6.1 Hasil identifikasi KLT senyawa flavonoid. Hasil identifikasi flavonoid menunjukkan floresensi kuning, hijau atau biru pada UV 254 nm dan pada UV 366 nm bercak akan berflouresensi biru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah diamati pada sinar UV 254 nm sebelum disemprot dengan pereaksi sitroborat bercak bonggol pisang raja tidak tampak dan bercak daun pepaya menunjukkan floresensi hijau. Sedangkan pada UV 366 nm bercak daun pepaya menunjukkan warna kuning gelap dan biru. Hasil uji diperjelas dengan reaksi semprot pereaksi sitroborat. Pada sinar UV 254 nm berfloresensi hijau namun pada bonggol pisang raja samar-samar. Sedangkan pada UV 366 nm bercak bonggol pisang raja tidak tampak dan pada daun pepaya semakin terlihat jelas berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol yang mengandung senyawa flavonoid adalah ekstrak etanol daun pepaya dengan nilai r_f sebesar 0,3.

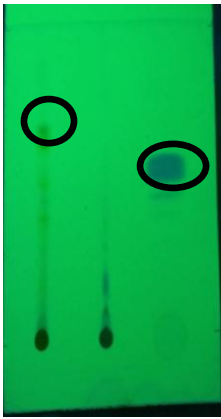
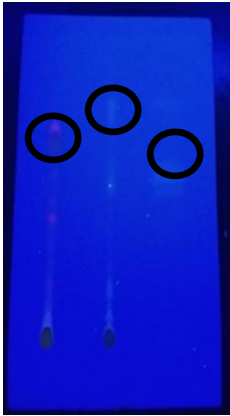
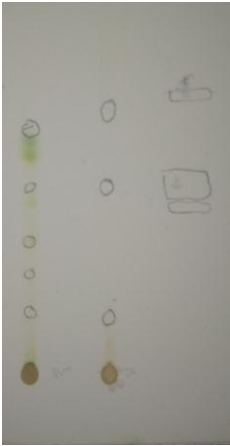
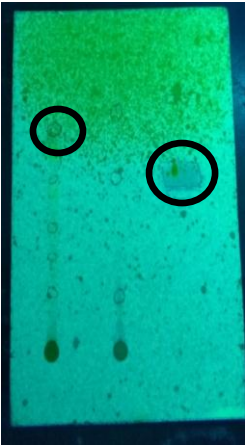
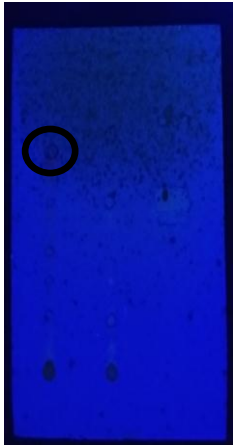


Gambar 7. Hasil identifikasi flavonoid ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak eti asetat: asam formiat: asam asetat glasial: air (100:11:11:27)

Keterangan :

- A. Bercak bonggol pisang raja
- B. Bercak daun pepaya

6.2 Hasil identifikasi KLT senyawa alkaloid.

Sebelum disemprot dengan pereaksi Dragendorff		
	UV 254 nm	UV 366 nm
		
	A B C	A B C
Setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff		
Visual	UV 254 nm	UV 366 nm
		
A B C	A B C	A B C

Gambar 8. Hasil identifikasi alkaloid ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluen: etil asetat: dietil amin (7:2:1)


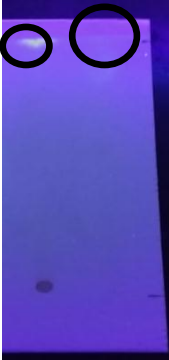



Keterangan :

- A. Bercak bonggol pisang raja
- B. Bercak daun pepaya
- C. Pembanding alkaloid

Hasil identifikasi menunjukkan senyawa alkaloid pada UV 254 nm bercak bonggol pisang raja tampak namun bercak daun pepaya tidak tampak, sedangkan

pada UV 366 nm bercak bonggol pisang raja berwarna biru dan bercak daun pepaya berwarna hijau biru. Kemudian lempeng disemprot menggunakan pereaksi dragendorff untuk memperjelas noda atau bercaknya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah lempeng disemprot dengan pereaksi dragendorff terdapat bercak berwarna jingga untuk bonggol pisang raja, sedangkan untuk daun pepaya tidak terlihat jelas pada UV 254 nm maupun UV 366 nm. Hal ini menunjukkan bahwa bonggol pisang raja dan daun pepaya mengandung senyawa alkaloid dengan nilai rf 0,65 untuk bonggol pisang dan 0,87 untuk daun pepaya, sedangkan untuk pembanding alkaloid berupa piperin sebesar 0,5.

6.3 Hasil identifikasi KLT senyawa saponin.

Sebelum disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard		
	UV 254 nm	UV 366 nm
		
	A B	A B
Setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard		
Visual	UV 254 nm	UV 366 nm
		
A B	A B	A B




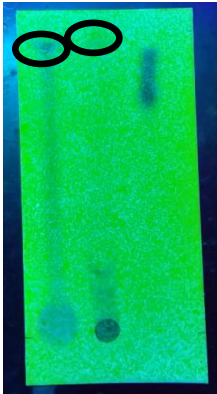

Gambar 9. Hasil identifikasi saponin ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform: metanol: air (64: 50: 1)

Keterangan :

- A. Bercak daun pepaya
- B. Bercak bonggol pisang raja

Hasil identifikasi menunjukkan pada UV 254 nm terdapat bercak warna coklat dari bonggol pisang raja dan agak kekuningan dari daun pepaya. Pada UV 366 nm bercak bonggol pisang raja berwarna kuning dan bercak daun pepaya tidak terlihat. Kemudian diperjelas dengan menggunakan pereaksi semprot liberman bourchat. Hasil uji yang didapatkan pada UV 254 nm dan UV 366 nm terdapat bercak namun bercak daun pepaya agak samar. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya mengandung saponin dengan nilai rf 0,81 untuk bonggol pisang dan 0,83 untuk daun pepaya.

6.4 Hasil identifikasi KLT senyawa tanin.

Sebelum diberi penampak bercak FeCl ₃ 1%		
	UV 254 nm	UV 366 nm
		
	A B C	A B C
Sesudah diberi penampak bercak FeCl ₃ 1%		
Visual	UV 254 nm	UV 366 nm
		
A B C	A B C	A B C

Gambar 10. Hasil identifikasi tanin ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat: asam formiat: toluene: air (6: 1,5: 3: 0,5)

Keterangan :

- A. Bercak daun pepaya
- B. Bercak bonggol pisang raja
- C. Bercak pembanding tanin

Hasil identifikasi menunjukkan senyawa tanin pada UV 254 nm ekstrak etanol daun pepaya dan bonggol pisang raja berwarna coklat kehitaman dan pada UV 366 nm ekstrak etanol daun pepaya berwarna biru dan bonggol pisang raja berwarna kuning atau jingga. Kemudian lempeng disemprot dengan menggunakan pereaksi FeCl₃ 1%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bercak daun pepaya berwarna kehitaman dan bercak bonggol pisang raja berwarna kecoklatan. Kemudian diamati dengan menggunakan UV 254 nm berwarna coklat kehitaman. Dan pada UV 366 nm bercak daun pepaya berwarna biru dan bonggol pisang raja berwarna kuning / jingga. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pepaya dan bonggol pisang raja positif mengandung senyawa tanin dengan nilai rf 0,81 untuk daun pepaya dan rf 0,83 untuk bonggol pisang raja.

B. Pengujian Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dalam biakan murni diambil 2 koloni, kemudian dimasukkan tabung yang telah diisi 2 ml media BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri yang didapat diamati kekeruhannya dan distandarkan dengan standar Mc. Farland $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Tujuan dilakukan standarisasi dengan Mc. Farland yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan dalam penelitian sama dan mengurangi kepadatan bakteri selama pengujian.

2. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.1 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara makroskopis. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, biakan bakteri diinokulasikan pada medium *Vogel Johnson Agar* yang sudah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan ditambahkan kalium tellurite 3% . Hasil positif menunjukkan warna koloni hitam dan warna medium disekitar koloni berwarna kuning. Hal ini terjadi karena bakteri *Staphylococcus aureus* memfermentasikan manitol menjadi asam dan warna kuning disekitar koloni disebabkan karena adanya indikator phenol red, sedangkan koloni warna hitam

disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* dapat mereduksi kalium tellurite menjadi metalik tellurite. Gambar hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara makroskopis dapat dilihat pada lampiran 3.

2.2 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tersebut termasuk golongan bakteri Gram positif. Hasil uji bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sel bakteri berwarna ungu, bentuk bulat bergerombol. Pada saat pengujian kristal violet (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri baik bakteri gram positif maupun gram negatif. Mordant (lugol iodine/ Gram B) menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh seluruh bakteri sehingga akan berwarna ungu. Gram C ditetaskan menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram positif yang memiliki banyak lapisan lemak, sehingga pori-pori sel bakteri mengerut karena bakteri gram positif memiliki lapisan yang tebal menyebabkan warna didalam sel bakteri terjebak, hal ini menyebabkan sel gram positif akan tetap menjadi ungu. Pada pewarnaan safranin atau (Gram D) sel gram positif yang awalnya berwarna ungu akan tetap berwarna ungu. Hasil penelitian menunjukkan positif bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan bentuk bulat bergerombol dan berwarna ungu. Gambar hasil identifikasi makroskopis bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 3.

2.3 Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara biokimia. Uji biokimia merupakan bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Pada uji biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terdiri dari dua uji yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan menggunakan objek glass dengan cara suspensi bakteri uji yang ditanam pada media cair diambil sedikit kemudian ditambahkan dengan 2 tetes hydrogen peroksida 3% dan ditunggu beberapa saat sampai terlihat pembentukan gelembung gas disekitar koloni. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan

adanya gelembung udara karena bakteri *Staphylococcus aureus* akan menguraikan H_2O_2 menjadi H_2 dan O_2 .

Uji koagulase dilakukan dengan cara menginokulasi koloni *Staphylococcus aureus* ke dalam media BHI 2 ml kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $37^\circ C$. Hasil inokulum tersebut diambil 0,2 ml kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang sudah disterilkan dan ditambahkan dengan 0,5 ml plasma kelinci lalu diaduk dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ diamati setelah 4 jam pertama dan dilanjutkan sampai 24 jam. Hasil positif bila pada tabung reaksi terdapat gumpalan plasma yang melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al* 2007). Hasil uji koagulase pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 11. Hasil pengamatan uji biokimia koagulase dan katalase

Jenis uji	Pustaka	Hasil pengamatan
Koagulase	Terbentuk gumpalan plasma	+
Katalase	Terbentuk gelembung gas	+

Keterangan :

+ : positif bakteri *Staphylococcus aureus*

: negatif bakteri *Staphylococcus aureus*

3. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.1 Secara difusi. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui adanya zona bening. Zona bening merupakan zona dimana tidak terdapat pertumbuhan bakteri karena adanya aktivitas antibakteri. Ekstrak bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya yang sudah didapatkan dilakukan uji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi untuk mengetahui perbandingan ekstrak kombinasi atau dalam bentuk ekstrak tunggalnya yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dalam beberapa perbandingan, yaitu ekstrak bonggol pisang raja tunggal, ekstrak daun pepaya tunggal, ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya perbandingan 1:1; 1:3 dan 3:1.

Pada pengujian ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif digunakan sebagai pembandingan terhadap aktivitas antibakteri dari ekstrak yang akan diujikan. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini yaitu antibiotik Ciprofloxasin 50 µg. Ciprofloxasin merupakan antibiotik golongan floroquinolon yang digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Mekanisme kerja dari antibiotik ini yaitu dengan cara menghambat DNA girase dan topoisomerase IV yang keduanya merupakan enzim yang sangat berperan dalam replikasi DNA bakteri. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sehingga dapat diketahui bahwa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah zat uji bukan pelarut. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO 1%.

Bakteri yang digunakan untuk pengujian adalah suspensi bakteri yang sudah disesuaikan atau distandarkan dengan kekeruhan *Mc Farland* 0,5 yang dianggap setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Metode difusi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan disk cakram. Cakram yang masih kosong direndam pada larutan uji selama kurang lebih 2 menit. Uji difusi dilakukan dengan cara mengulas suspensi bakteri pada cawan petri yang telah berisi media MHA kemudian didiamkan kurang lebih 3 menit supaya bakteri terdifusi pada media. Setelah itu diletakkan disk cakram yang telah berisi larutan uji kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Tabel 12. Hasil pengujian antibakteri ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya secara difusi

Sampel	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
	Replikasi			
	I	II	III	
Ekstrak bonggol pisang raja 50%	8	10	12,25	10,08 ± 2,12
Ekstrak daun pepaya 50%	8,75	9,5	10	9,41 ± 0,62
1 : 1	12	9,5	10,5	10,66 ± 1,25
1 : 3	7	7,25	8	7,41 ± 0,5
3 : 1	11	13,75	10	11,58 ± 1,94
Kontrol (+)	35,5	31,5	30,75	32,58 ± 2,55
Kontrol (-)	0	0	0	0

Keterangan :
 Kontrol (+) : Ciprofloxasin 50 µL
 Kontrol (-) : DMSO 1%

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya dengan perbandingan 3:1 memiliki aktivitas yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 11,58 mm. Dalam pengujian antibakteri metode difusi dengan terbentuk zona hambat berukuran kurang dari 5 mm maka dapat dikatakan bahwa penghambatan antibakteri dikategorikan lemah. Sedangkan apabila zona hambat yang terbentuk 5-10 mm maka dapat dikategorikan sedang, dan apabila terbentuk zona hambat berukuran 10-19 mm masuk kategori kuat dan 20 mm atau lebih dapat dikategorikan sangat kuat (Davis dan Stout 1971).

Dilihat dari data statistik ANOVA diameter zona hambat ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan nilai signifikansi $0.64 > 0.05$ maka data terdistribusi normal namun tidak homogen. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji Mann-Whitney Test dan diperoleh hasil signifikansi 0.05 dinyatakan data homogen. Hasil berdasarkan data statistik ekstrak yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah ekstrak kombinasi 3:1 yaitu dengan zona hambat sebesar 11,58 mm.

3.2 Secara dilusi. Setelah dilakukan pengujian antibakteri dengan metode difusi, maka selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pada uji dilusi dilakukan terhadap ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya dengan perbandingan kombinasi paling aktif yang sebelumnya telah diuji dengan metode difusi yaitu perbandingan 3:1. Metode dilusi merupakan metode yang terjadi interaksi secara langsung antara larutan uji dengan suspensi bakteri yang tersebar merata dalam media. Konsentrasi yang digunakan pada uji dilusi dimulai dari 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Uji dilusi juga menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan yaitu bakteri yang diujikan dan

kontrol negatif yang digunakan adalah ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya.

Tabel 13. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya dengan metode dilusi 3:1

No	Konsentrasi (%)	Replikasi		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	+	+	+
5	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan data KBM

(-) : tidak terdapat pertumbuhan bakteri

(+) : terdapat pertumbuhan bakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dengan dilihat dari kekeruhan pada tabung setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk mengetahui nilai KBM maka tabung yang jernih dilakukan subkultur pada media VJA selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi tertinggi tidak tumbuh menunjukkan nilai KBM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai KBM tidak dapat diamati, hal ini disebabkan karena tabung berwarna hitam yang disebabkan oleh adanya ekstrak sehingga tidak bisa dilihat apakah tabung berwarna jernih atau tidak. Pertumbuhan bakteri pada media ditandai dengan adanya koloni berwarna hitam dan sekitar koloni berwarna kuning. Pada konsentrasi 12,5% mulai menunjukkan nilai hambatnya kemudian dilakukan penggoresan pada media VJA untuk melihat daya hambatnya. Dari hasil penggoresan ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya 3:1 didapatkan hasil bahwa tabung yang jernih setelah di subkultur tumbuh bakteri adalah konsentrasi 12,5%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan daun pepaya (3:1) adalah 25% dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil kombinasi ini menghasilkan efek yang bersifat sinergisme karena kombinasi kedua ekstrak dapat saling memperkuat khasiatnya sehingga terjadi efek yang melebihi jumlah matematis.

Kemampuan bunuh bakteri *Staphylococcus aureus* dihasilkan oleh ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya dapat dipengaruhi oleh adanya

senyawa yang terkandung dalam tanaman sebagai antibakteri seperti tanin, flavonoid, saponin dan alkaloid. Senyawa dalam ekstrak bonggol pisang menurut Salau *et al.* tahun 2010 yang memiliki aktivitas antibakteri adalah tanin dan saponin. Sedangkan senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun pepaya menurut penelitian A'yun *et al.* tahun 2015 yang memiliki aktivitas antibakteri adalah alkaloid dan flavonoid. Diduga bahwa dalam penelitian ini penyebab yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi bonggol pisang raja dan ekstrak daun pepaya 3:1 lebih baik karena adanya senyawa dalam ekstrak yang memiliki mekanisme kerja berbeda sehingga ketika kedua ekstrak dikombinasikan menghasilkan hasil yang lebih baik daripada ekstrak tunggalnya atau ekstrak kombinasi 1:1 dan 1:3.

Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara merusak sel bakteri, denaturasi protein, inaktivasi enzim dan menyebabkan lisis (Minasari *et al.* 2016). Alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Juliantina 2008).

Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman. Tanin bersifat sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengerutkan dinding sel dan membran sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi fungsi materi genetik (Minasari *et al.* 2016). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen yang penting dalam sel bakteri. Saponin juga menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel.