

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman beluntas yang dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologis pada tanaman yang diteliti dengan kunci determinasi, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari terjadinya kesalahan saat pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil determinasi dapat dilihat pada kunci determinasi dibawah ini :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23a _____ **166. Asteraceae**
 1b-3b-33b-41b-82b-85b-96b-100b-102b-112b-114b-115a _____ **29. *Pluchea***
 1 _____ ***Pluchea indica* (L.) Less**

2. Pengambilan bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beluntas yang diambil dari Kediri, Jawa Timur pada bulan Januari tahun 2019. Pemilihan daun beluntas yaitu dengan daun yang muda dengan tujuan untuk mendapatkan komponen kimia yang lebih banyak. Pengambilan bahan dilakukan pada pagi hari karena pada pagi hari sedang berlangsung proses fotosintesis sehingga diharapkan pada daun muda ini setelah di destilasi mendapatkan minyak atsiri yang lebih banyak. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Esherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

3. Hasil isolasi minyak atsiri

Isolasi minyak atsiri daun beluntas menggunakan metode destilasi uap air. Metode ini merupakan metode yang sederhana dan murah. Kelebihan dari metode ini adalah penetrasi uap lebih merata dan masuk ke dalam jaringan tanaman, dan suhu yang dapat dipertahankan sampai 100⁰C. Keuntungan yang lain adalah waktu

penyulingan lebih singkat dan rendemen minyak atsiri yang dihasilkan lebih besar bila dibandingkan dengan destilasi air. Data rendemen yang diperoleh dari minyak atsiri daun beluntas yaitu 0,05%. Situmorang (2019) menyebutkan rendemen yang diperoleh pada destilasi minyak atsiri daun beluntas yaitu 0,26%. Rendemen yang diperoleh pada penelitian ini relatif lebih rendah. Perbedaan hasil rendemen minyak atsiri dapat dipengaruhi oleh daerah pertumbuhan tanaman beluntas, waktu petik daun beluntas sehingga dapat mempengaruhi hasil minyak atsiri yang diperoleh. Data perhitungan rendemen minyak atsiri daun beluntas dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel. 1. Rendemen minyak atsiri daun beluntas

Berat sampel basah (gram)	Volume minyak (ml)	Rendemen (%)
10000	5,0	0,05%

4. Pengamatan organoleptis minyak atsiri

Hasil pengamatan organoleptik minyak atsiri daun beluntas dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel. 2. Data hasil uji organoleptik minyak atsiri daun beluntas

No.	Jenis pengamatan	Hasil
1.	Warna	Hijau kekuningan
2.	Bau	Khas seperti jamu
3.	Bentuk	Cairan
4.	Rasa	Pahit

Berdasarkan hasil uji organoleptik minyak atsiri daun beluntas yang ditetaskan pada kaca arloji menunjukkan bahwa minyak atsiri daun beluntas berbentuk cairan berwarna hijau kekuningan dengan bau khas seperti jamu dan rasa yang pahit. Hasil uji dapat dilihat pada lampiran 5.

5. Identifikasi minyak atsiri

Tabel. 3. Data hasil identifikasi minyak atsiri daun beluntas

Senyawa	Pemeriksaan	Hasil	Pustaka
Minyak atsiri daun beluntas	1 tetes minyak atsiri ditetaskan pada kertas saring	Minyak atsiri menguap tanpa meninggalkan noda	Minyak atsiri tidak meninggalkan noda pada kertas saring (Gunawan dan mulyani 2004)
	1 tetes minyak atsiri di tetaskan pada permukaan air	Minyak atsiri menyebar pada permukaan air dan tidak keruh	Minyak atsiri meyebar pada permukaan air dan tidak keruh (Depkes 1979)

Hasil identifikasi minyak atsiri daun beluntas menunjukkan bahwa hasil sesuai dengan pustaka yaitu 1 tetes minyak atsiri di tetaskan pada kertas saring tidak akan meninggalkan noda (Gunawan dan Mulyani 2014), jika ditetaskan 1 tetes minyak atsiri pada permukaan air maka minyak atsiri akan menyebar dan tidak keruh (Depkes 1979)

6. Hasil penetapan indeks bias minyak atsiri daun beluntas

Tabel. 4. Data hasil penetapan indeks bias minyak atsiri daun beluntas

Sampel	Hasil indeks bias
Minyak atsiri daun beluntas	1,5486

Berdasarkan tabel diatas, menunjukkan bahwa nilai indeks bias minyak atsiri daun beluntas yaitu 1,5486. Indeks bias adalah perbandingan antara kecepatan cahaya dalam ruang hampa udara dibandingkan dengan kecepatan cahaya pada suatu medium. Alat untuk mengukur indeks bias adalah refraktometer, nilai pada refraktometer menunjukkan perbandingan antara sinus sudut datang dengan sinus sudut bias cahaya, putaran optik menunjukkan besar sudut pemutaran bidang polarisasi yang terjadi jika sinar terpolarisasi dilewatkan melalui cairan pada suhu (-5⁰C) sampai dengan 0⁰C (Guenther 1990).

Indeks bias minyak atsiri berhubungan erat dengan komponen-komponen yang tersusun dalam minyak atsiri yang dihasilkan. Komponen minyak atsiri dapat mempengaruhi nilai indeks biasnya. Semakin banyak komponen berantai panjang seperti sesquiterpen atau komponen bergugus oksigen tersuling, maka kerapatan medium minyak atsiri akan bertambah, sehingga cahaya yang datang akan lebih

sukar dibiaskan. Hal ini yang menyebabkan indeks bias minyak atsiri lebih besar (Wiyono *et al* 2000). Minyak atsiri yang mempunyai nilai indeks bias lebih tinggi lebih berkualitas dibandingkan dengan minyak atsiri yang indeks bias nya rendah (Rulianah 2012).

7. Penetapan kelarutan dalam etanol

Tabel. 5. Data hasil kelarutan minyak atsiri daun beluntas dalam etanol

Sampel	Kelarutan dalam etanol
Minyak atsiri daun beluntas	Tidak larut

Penetapan kelarutan dalam etanol merupakan nilai penetapan perbandingan banyaknya minyak atsiri yang larut dalam etanol. Setiap minyak atsiri memiliki nilai kelarutan dalam etanol yang spesifik sehingga dapat digunakan untuk menentukan kemurnian minyak atsiri. Hasil kelarutan minyak atsiri menunjukkan hasil bahwa minyak atsiri daun beluntas tidak larut dalam etanol 70%. Menurut Heath (1978) minyak atsiri yang konsentrasi senyawa terpenya tinggi sukar larut dalam etanol.

8. Analisa minyak atsiri daun beluntas secara kromatografi lapis tipis

Analisis kromatografi lapis tipis bertujuan untuk menentukan komponen senyawa yang dihasilkan minyak atsiri daun beluntas. Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada tabel 6, profil KLT senyawa minyak atsiri daun beluntas menunjukkan perbedaan hRF yang nyata dengan pembanding yaitu eugenol, pada sampel minyak atsiri terdapat 3 bercak dengan tinggi yang berbeda tetapi ada 1 bercak yang hRF nya mendekati dengan pembanding, artinya komposisi senyawa yang terdapat pada minyak atsiri daun beluntas tetap ada perbedaan yang nyata dengan pembanding yaitu eugenol. Pengujian analisa KLT dapat dilihat pada lampiran 18. KLT senyawa minyak atsiri menggunakan senyawa eugenol. Eugenol merupakan golongan senyawa fenol. Hasil analisis menggunakan GC-MS caryophyllen merupakan senyawa yang dominan. Caryophyllen merupakan golongan senyawa fenol. Eugenol dan Caryophyllen sama-sama merupakan fenol sehingga dapat dijadikan pembanding. Hasil klt setelah di semprot dengan anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan warna ungu apabila terdapat senyawa golongan fenol (Hernani *et al* 1990).

Tabel. 6. Data hasil analisis Kromatografi Lapis Tipis

Kode sampel	Kode bercak	hRF	Warna bercak		
			UV 254	UV 366	Anisaldehyd asam sulfat
A	A1	80,00	Peredaman	Ungu	Merah
	A2	55,56	Peredaman	Ungu	Ungu
	A3	26,67	Peredaman	Ungu	Ungu
B	B1	51,12	Peredaman	Ungu	Ungu

Keterangan A : Minyak atsiri daun beluntas

B: Pembanding eugenol

9. Analisa komponen senyawa penyusun minyak atsiri daun beluntas secara *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*

Uji analisis dengan GC-MS dilakukan untuk mengetahui komponen senyawa yang terkandung didalam minyak atsiri. Analisis komponen senyawa minyak atsiri daun beluntas dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*. Hasil analisis komponen senyawa minyak atsiri daun beluntas dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel. 7. Data hasil analisis GC-MS minyak atsiri daun beluntas

No	Waktu retensi (menit)	%Luas area	BM	Nama senyawa
1	10.201	4.2		1,1,4A-TRIMETHYL-5,6-DIMETHYLENE-DEAHYDRO-NAPHTH
2	10.515	7.63		2-CYCLOPENTYL-4-ISOPROPYLPHENOL
3	10.579	4.85		BERKHEYARADULEN
4	10.744	5.2		.delta.-Guaiene
5	10.819	14.24		Trans-Caryophyllene
6	11.279	15.17		NEOALLOOCIMENE
7	11.968	11.63		(-)-Caryophyllene oxide
8	12.304	16.84		TETRACYCLO[6.3.2.0E2,5.0E1,8]TRIDECAN-9-OL,4,4-DIMETHYL
9	12.62	11.37		AROMADENDRENEPOXIDE-(1)
10	14.9	8.87		2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl-,[R-[R*,R*-€]]-(CAS)Phyt

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Situmorang (2019) hasil analisa GC-MS pada minyak atsiri daun beluntas dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel. 8. Data hasil analisis GC-MS minyak atsiri daun beluntas Situmorang (2019)

No.	Waktu retensi (menit)	%Luas area	BM	Nama senyawa
1	25.143	2.54		Isolongifolene
2	25.729	14.35		α -Guaiene
3	27.940	25.85		β -Kariofilen
4	29.679	32.21		Kariofilen
5	28.827	1.71		β -Silinene
6	32.257	4.06		Kariofilen Oksida
7	34.000	3.72		Ledane
8	51.140	4.37		Di-n-Octyl Phthalate

Situmorang (2019) menyebutkan senyawa yang dominan pada minyak atsiri daun beluntas yaitu Kariofilen (32,21%), dan β -Kariofilen (25,85%) senyawa tersebut merupakan senyawa golongan sesquiterpen.

Hasil analisis minyak atsiri daun beluntas pada penelitian ini terdapat 10 senyawa. Komponen senyawa minyak atsiri daun beluntas dapat dilihat pada lampiran. Senyawa kimia yang paling dominan terdapat pada minyak atsiri daun beluntas yaitu TETRACYCLO[6.3.2.0E2,5.0E1,8]TRIDECAN-9-OL,4,4-DIMETHYL (16,84%); neoalloocimene (15,17%); dan Trans-Caryophyllene (14,24%). Senyawa yang didapatkan pada penelitian ini berbeda dengan senyawa yang dominan pada penelitian sebelum nya, tetapi senyawa yang dianalisis sama-sama merupakan senyawa golongan sesquiterpen. Senyawa golongan sesquiterpen diketahui memiliki efek antiinflamasi dan antibakteri, selain itu juga dikenal mempunyai aktivitas anestesik lokal (Erindyah dan Muryati 2002). Perbedaan komponen senyawa yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh daerah pertumbuhan tanaman beluntas dan waktu pemetikan daun beluntas (Rachmawati *et al* 2013).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* dalam biakan murni diambil masing-masing 1 ose kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 10ml media BHI dan di inkubasi selama 24 jam, lalu kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc. Farland 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada lampiran 11.

11. Identifikasi bakteri uji

a. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *E. coli* diinokulasikan pada media endo agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan terbentuknya koloni merah dengan kilap logam. Hal ini disebabkan karena bakteri *E. coli* dapat memfermentasi laktosa. Pada media endo agar selain mengandung laktosa media tersebut juga mengandung Natrium sulfid dan fushin sehingga apabila bereaksi dengan *Escherichia coli* ATCC 25922 akan memberikan kesan warna yang mengkilat (Cappucino *et al* 1983).

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada media VJA dengan penambahan kalium telurit sebanyak 3 tetes kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan membentuk koloni hitam dan disekitar koloni berwarna kuning. Koloni hitam ini disebabkan dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mampu mereduksi kalium telurit menjadi *metallic tellurium* sedangkan pembentukan warna kuning disekitar koloni disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mampu memfermentasikan manitol menjadi asam, dimana phenol red sebagai indikator dalam suasana asam akan merubah warna media dari merah menjadi kuning (Elvira *et al* 2017).

Hasil identifikasi *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada media agar darah yaitu terdapat koloni hijau transparan yang disebabkan oleh terjadinya lisis pada sebagian eritrosit. Hasil inokulasi membentuk hemolysis alfa (α), pada daerah yang transparan hijau tidak terbentuk sel darah merah. Hemolisis alfa disebabkan reduksi zat besi dalam hemoglobin, menjadikan koloni *Streptococcus* warna hijau dalam agar darah (Patterson 1996). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 9.

b. Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa bakteri berbatang pendek dan berwarna merah setelah prosen pewarnaan. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan bakteri Gram negatif. Pada Gram negatif, alkohol meningkatkan porositas dinding sel dengan melarutkan lipid lapisan luar. Jadi kompleks Kristal violet dapat lebih mudah dihilangkan dari

lapisan peptidoglikan yang tidak terikat dengan kuat. Oleh sebab itu pencucian alkohol memfasilitasi pelepasan Kristal violet untuk luntur yang membuat sel-sel menjadi kehilangan warna. Pada tahap terakhir pewarnaan di tetesi dengan Gram D atau safranin sehingga memberikan warna merah pada koloni bakteri gram negatif (Rahayu dan Gumilar 2017)

Pada pewarnaan Gram *Staphylooccus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menunjukkan bahwa bakteri berwarna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif karena pada bakteri gram positif mempunyai peptidoglikan yang lebih tebal sehingga dapat mempertahankan warna Kristal violet setelah di cuci dengan alkohol. Tujuan pewarnaan Gram untuk memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, untuk melihat struktur luar bakteri seperti dinding sel, menghasilkan sifat-sifat fisik dan kimia yang khas dari bakteri dengan zat warna, serta meningkatkan kontras mikroorganisme dengan sekitarnya (Pelczar & Chan, 2007)

c. Uji biokimia. Pada uji bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 uji biokimia yang dilakukan yaitu uji KIA, LIA, SIM, dan citrat. Uji KIA yang didapatkan adalah A/AG S- yang artinya adalah pada bakteri uji menunjukkan bakteri dapat memfermentasikan glukosa dan laktosa menjadi asam yang ditunjukkan dengan warna kuning pada permukaan atas media yang miring dan terdapat ruang kosong atau gas pada dasar media, dan bakteri uji tidak menghasilkan H₂S yang ditunjukkan dengan tidak ada warna hitam pada tabung reaksi. Uji KIA digunakan sebagai penguat dalam identifikasi bakteri. Uji LIA hasil yang didapatkan adalah K/K S- yang artinya adalah sampel menunjukkan sifat alkali yang ditunjukkan dengan warna ungu pada permukaan atas tabung reaksi dan tidak terdapat gas pada permukaan bawah tabung, dan tidak ada warna hitam yang artinya tidak ada sulfida pada bakteri uji. Uji SIM hasil yang didapatkan yaitu -++ yang artinya pada bakteri uji tersebut tidak terdapat sulfida sehingga tidak terdapat warna hitam pada bakteri uji tersebut, terdapat indol pada bakteri uji karena terdapat warna merah diatas permukaan media yang sudah ditetesi erlich A dan erlich B dan terdapat motilitas atau pergerakan dari bakteri dalam media yang ditunjukkan keruh pada daerah

sekitar tusukan bakteri uji. Uji Citrat hasil yang didapatkan yaitu bakteri uji menunjukkan hasil negatif karena pada tabung reaksi media citrat berwarna hijau yang artinya bakteri uji tidak menggunakan media citrat sebagai karbohidrat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji tidak termasuk golongan *Coliform*. Namun hasil uji citrat ini bersifat lemah dan yang menentukan kuatnya identifikasi bakteri adalah pada uji KIA (Arini dan Wulandari 2017)

Uji biokimia pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yaitu uji koagulase dan katalase. Hasil uji katalase pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu menunjukkan hasil positif yaitu terbentuknya gelembung gas pada tabung reaksi. Gelembung gas terjadi karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 memiliki enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , pada uji ini dapat digunakan untuk membedakan spesies *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pada bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 uji katalase bersifat negatif dengan ditandai nya tidak terbentuk gelembung gas pada saat ditambahkan H_2O_2 3%. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tidak mempunyai enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .

Hasil uji koagulase pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menunjukkan hasil yang positif dengan ditandainya gumpalan yang terjadi pada tabung reaksi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* bersifat koagulase karena dapat menggumpalkan plasma dengan terjadinya perubahan darah yang terdenaturasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* sehingga terbentuk gumpalan putih. Hasil gambar identifikasi secara katalase dan koagulase secara biokimia dapat dilihat pada lampiran 9.

12. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun beluntas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram

mempunyai tujuan untuk mengetahui diameter zona hambat di sekitar cakram yang dinyatakan dalam mm, daerah yang jernih disekitar cakram menunjukkan bahwa kandungan pada minyak atsiri daun beluntas mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Hasil uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun beluntas terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 9, 10 dan 11.

Uji Difusi menggunakan pelarut Tween 80 100% sebagai pelarut minyak atsiri yang diujikan pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175, sedangkan pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Tween 80 1% sebagai pelarut minyak atsiri. Tween 80 mempunyai sifat lipofil sehingga dapat bercampur dengan minyak dan sebagai *solubilizing agent* yang dapat meningkatkan kelarutan minyak atsiri. Selain digunakan sebagai pelarut Tween 80 100% dan 1% digunakan juga sebagai kontrol negatif. Hasil pengujian aktivitas pelarut dapat dilihat pada lampiran 10.

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol. Kloramfenikol merupakan antibakteri berspektrum luas yang dapat digunakan untuk menghambat bakteri Gram negatif maupun bakteri Gram positif. Mekanisme kloramfenikol yaitu bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein kuman, yang dihambat ialah enzim peptidil transferase yang berperan sebagai katalisator untuk membentuk ikatan-ikatan peptida pada proses sintesis protein kuman (Ganiswarna 1995).

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri pada *Escherichia coli* ATCC 25922

Sampel	Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata	SD
		I	II	III		
Minyak atsiri daun beluntas	12,5%	7.5	8.25	9	8.25	0.75
	25%	8	10	9.25	9.08	1.01
	50%	9	11.5	10.25	10.25	1.25
	K+	19.5	16	15.5	17.00	2.18
	Tween	0	0	0	0	0

Keterangan K+ : Kontrol positif kloramfenikol

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan hasil dapat dilihat pada tabel 9. Minyak atsiri daun beluntas dapat memberikan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi yang paling kecil yaitu pada konsentrasi 12,5% minyak atsiri daun beluntas tidak terlalu sensitif dengan hasil diameter zona hambatnya hanya 8,25 mm, sedangkan pada konsentrasi 25% diameter zona hambat yang dihasilkan lebih besar yaitu 10,25 mm. minyak atsiri daun beluntas dengan konsentrasi 50% hanya dapat menghambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan diameter zona hambat sebesar 10,25 mm. hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri yang digunakan semakin besar pula diameter zona hambat yang terjadi.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Sampel	Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata	SD
		I	II	III		
Minyak atsiri daun beluntas	12,5%	7.63	8.00	8.75	8.13	0.57
	25%	7.75	8.75	10	8.83	1.13
	50%	10.25	11.50	11.5	11.08	0.72
	K+	21.75	20.00	20	20.58	1.01
	Tween 1%	0	0	0	0	0

Keterangan K+ : Kontrol positif kloramfenikol

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan hasil dapat dilihat pada tabel 10. Minyak atsiri daun beluntas dapat

memberikan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi yang palig kecil yaitu pada konsentrasi 12,5% minyak atsiri daun beluntas tidak terlalu sensitif dengan hasil diameter zona hambatnya hanya 8,13 mm, sedangkan pada konsentrasi 25% diameter zona hambat yang dihasilkan lebih besar yaitu 8,83 mm. minyak atsiri daun beluntas dengan konsentrasi 50% hanya dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan diameter zona hambat sebesar 11,08 mm.

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri pada *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Sampel	Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata	SD
		I	II	III		
Minyak atsiri daun beluntas	12,5%	7.3	7.25	7.25	7.27	0.03
	25%	10.75	8.5	10	9.75	1.15
	50%	11.75	11	12.5	11.75	0.75
	K+	26.25	26.5	26.5	26.42	0.14
	Tween	0	0	0	0	0

Keterangan K+ : Kontrol positif kloramfenikol

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menunjukkan hasil dapat dilihat pada tabel 10. Minyak atsiri daun beluntas dapat memberikan aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi yang palig kecil yaitu pada konsentrasi 12,5% minyak atsiri daun beluntas tidak terlalu sensitif dengan hasil diameter zona hambatnya hanya 7,27 mm, sedangkan pada konsentrasi 25% diameter zona hambat yang dihasilkan lebih besar yaitu 9,75 mm. minyak atsiri daun beluntas dengan konsentrasi 50% hanya dapat menghambat bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan diameter zona hambat sebesar 11,75 mm.

Kemampuan minyak atsiri daun beluntas dalam menghambat pertumbuhan bakteri tergantung pada beberapa faktor antara lain konsentrasi minyak atsiri, kandungan senyawa aktif dalam minyak atsiri serta jenis bakteri (Nurnasari dan Wijayanti (2019). Pengujian antibakteri dengan tingkat konsentrasi yang berbeda

bertujuan untuk melihat pengaruh setiap konsentrasi minyak atsiri pada bakteri yang berbeda pula. Semakin besar suatu konsentrasi minyak atsiri semakin besar pula zona daya hambat yang terbentuk. Perbedaan daya hambat disebabkan oleh perbedaan sensitivitas organisme, mekanisme dan kesinergisan kerja antara senyawa aktif di dalam minyak atsiri (Silawati 2018).

Hasil uji aktivitas minyak atsiri daun beluntas pada *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus mutans* menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang paling besar atau paling sensitif ditunjukkan pada bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi minyak atsiri 50% dengan diameter zona hambat sebesar 11,75 mm. Aktivitas antibakteri dikatakan kuat jika mempunyai diameter zona hambat antara 11-20 mm, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, dan diameter zona hambat 5mm atau kurang termasuk kategori lemah (Putra *et al* 2017). Pada penelitian ini diameter zona hambat pada bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan konsentrasi minyak atsiri daun beluntas 50% adalah 11,75 mm hal ini menunjukkan diameter zona hambat tersebut termasuk kuat.

Bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus mutans* memiliki dinding sel yang lebih sederhana, terdiri dari komponen peptidoglikan dan asam teikoat. Sedangkan bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* memiliki dinding sel yang lebih tebal karena terdiri dari peptidoglikan dan lebih banyak mengandung lipid. Bakteri Gram negatif juga mempunyai sistem membran luar berupa bilayer yang terdiri dari fosfolipid dan lipopolisakarida yang bersifat nonpolar. Hal ini menyebabkan senyawa antibakteri lebih sulit untuk masuk ke dalam sel sehingga aktivitas antibakterinya lebih lemah dibandingkan dengan bakteri gram positif (Nurnasari dan Wijayanti 2019).

Dari hasil GC-MS senyawa minyak atsiri yang dominan yaitu TETRACYCLO[6.3.2.0E2,5.0E1,8]TRIDECAN-9-OL,4,4-DIMETHYL; NEOALLOOCIMENE; dan Trans-Caryophyllene. Senyawa tersebut dapat digunakan sebagai antibakteri salah satu senyawa yang dapat digunakan sebagai

antibakteri yaitu Trans-Caryophyllene. Trans-Caryophyllene merupakan senyawa minyak atsiri golongan seskuiterpen yang diketahui memiliki efek antibakteri (Erindyah dan Muryati 2002). Senyawa seskuiterpen memiliki sifat hidrofob sehingga dapat mengganggu integritas sel bakteri dengan cara menurunkan cadangan ATP intrasel, menurunkan pH sel, terabsorpsi dan terpenetrasi ke dalam sel bakteri, kemudian bakteri akan mengalami prespitasi dan denaturasi protein, dan akan melisiskan membrane sel bakteri (Putri *et al* 2017).

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis statistik, untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan daya hambat yang signifikan dari ketiga bakteri tersebut. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik dengan menggunakan *Kruskal Wallis* digunakan untuk membandingkan bakteri manakah yang dapat terhambat pertumbuhannya pada setiap konsentrasi 12,5%; 25%; dan 50% dengan melihat diameter zona hambat yang paling besar. Hasil analisis *Kruskal wallis* dapat dilihat pada lampiran 20.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik menggunakan *Kolmogorov-smirnov* kemudian dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan zona hambat pada bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus mutans* mendapatkan hasil ada atau tidak perbedaan yang signifikan. Hasil uji distribusi data menggunakan *Kolmogorov-smirnov* sebesar $0,123 > 0,05$ dapat disimpulkan data tersebut terdistribusi normal sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* hasil uji menunjukkan signifikansi sebesar $0,065 > 0,005$ berarti tidak ada perbedaan yang signifikan pada nilai zona hambat.