

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 1. Hasil determinasi tanaman pepaya (*Carica papaya* L.)

Determinasi tanaman pepaya dilakukan di Fakultas MIPA, bagian Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman pepaya. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman dengan literatur, menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan, dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Pengambilan bahan dan hasil pembuatan serbuk daun pepaya

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pepaya yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah diambil pada bulan Juli 2019. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun pepaya varietas Thailand dengan kondisi daun masih segar, berwarna hijau, serta terbebas dari hama dan penyakit. Pengambilan daun pepaya dilakukan pada pagi hari agar daun pepaya yang diambil masih segar dan kandungan senyawa aktifnya masih banyak. Daun dikumpulkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang melekat atau bahan-bahan asing lainnya yang tidak diperlukan, kemudian daun pepaya dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan pengotor yang melekat pada daun pepaya. Daun dikeringkan ke dalam oven pada suhu 40°C hingga daun kering yang ditandai dengan daun mudah hancur saat diremas. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik dalam daun pepaya. Daun pepaya kering disortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing, seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor-pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering. Daun kering diserbuk menggunakan blender sehingga dihasilkan serbuk kering daun pepaya, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun pepaya. Hasil pengeringan dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Hasil prosentase bobot pengeringan daun pepaya**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Prosentase (%)
8000,00	1200,00	15,00

Tabel 1 menunjukkan daun pepaya basah yang dibutuhkan untuk membuat serbuk daun pepaya adalah sebanyak  $\pm$  8000 gram. Daun pepaya yang telah dikeringkan diperoleh bobot kering sebesar 1200 gram. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun pepaya diperoleh hasil 15%. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2.

### 3. Penetapan organoleptis serbuk daun pepaya

Pengujian organoleptis serbuk daun pepaya yang diamati adalah bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk daun pepaya yaitu bentuk serbuk, berwarna hijau kecoklatan, memiliki bau khas, dan tawar atau tidak berasa. Gambar serbuk daun pepaya dapat dilihat pada lampiran 9.

### 4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun pepaya

Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan atau sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen (Depkes RI 2000). Hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pepaya**

No	Bobot serbuk (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	7
2	2	7,5
3	2	8
Rata-rata $\pm$ SD		7,5 $\pm$ 0,5

Tabel 2 menunjukkan hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pepaya sebesar 7,5%, artinya daun pepaya sudah memenuhi syarat pengeringan simplisia karena kurang dari 10%. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberi batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang selama proses pengeringan. Prosentase senyawa yang hilang selama proses pengeringan tidak hanya menggambarkan air yang hilang tetapi senyawa menguap lain juga ikut menghilang (Depkes RI 2000). Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk daun pepaya dapat dilihat pada lampiran 3.

## 5. Hasil pembuatan ekstrak daun pepaya

Maserasi dengan etanol 96% bertujuan untuk menarik dan mendorong senyawa yang terkandung pada serbuk daun pepaya. Penyaringan bertujuan untuk memisahkan ampas dengan filtrat, sehingga menghasilkan filtrat optimal yang terbebas dari ampas. Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak daun pepaya secara maserasi**

Berat serbuk (g)	Etanol (ml)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
800	12000	130,03	16,25

Tabel 3 menunjukkan bahwa dari proses maserasi 800 gram serbuk kering daun pepaya dengan pelarut etanol 96% sebanyak 12000 ml diperoleh ekstrak daun pepaya sebanyak 130,03 gram dan memiliki rendemen 16,25%. Rendemen menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak daun pepaya. Organoleptis ekstrak yaitu warna hijau kehitaman, konsistensi kental, dan berbau khas. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 5.

## 6. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun pepaya

Ekstrak daun pepaya dilakukan tes esterifikasi etanol. Hasil esterifikasi etanol dalam ekstrak daun pepaya dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun pepaya**

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester yang khas	Tidak tercium bau ester yang khas etanol

Tabel 4 menunjukkan hasil tes bebas etanol bahwa ekstrak daun pepaya sudah bebas dari pelarutnya yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas etanol. Uji bebas etanol bertujuan agar etanol yang terdapat pada ekstrak tidak mengganggu aktivitas antibiofilm dari ekstrak daun pepaya.

## 7. Penetapan kadar air ekstrak daun pepaya

Kadar air adalah pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara titrasi, destilasi, atau gravimetri (Depkes RI 2000). Hasil penetapan kadar air dengan destilasi *Sterling Bidwell* dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun pepaya dengan *Sterling Bidwell***

No	Penimbangan (g)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20,51	1,6	7,80
2	20,13	1,4	6,96
3	20,04	1,5	7,49
Rata-rata ± SD			7,42 ± 0,42

Tabel 5 menunjukkan hasil penetapan kadar air dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* diperoleh rata-rata 7,42%. Hasil ini sudah memenuhi syarat kadar air ekstrak daun pepaya yang baik yaitu kurang dari 30%. Penetapan kadar air bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air di dalam bahan, mencegah pembusukan oleh mikroba, dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu fisik ekstrak. Hasil perhitungan kadar air dapat dilihat pada lampiran 4.

### 8. Hasil pembuatan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air

Fraksinasi merupakan pemisahan golongan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar. Pelarut polar yang digunakan adalah air, pelarut semi polar yang digunakan adalah etil asetat, dan pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-heksan. Hasil penyarian dari ketiga pelarut tersebut digunakan dalam penelitian ini sebagai sampel uji. Perhitungan persen rendemen fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dapat dilihat pada lampiran 6, 7, dan 8. Hasil fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya dapat dilihat pada tabel 6, 7, dan 8.

**Tabel. 6 Prosentase fraksi *n*-heksan dari ekstrak daun pepaya**

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	10,13	6,45	63,67
2	10,04	6,21	61,85
3	10,03	6,28	62,61
Rata-rata ± SD			62,71 ± 0,91

Tabel 6 menunjukkan hasil rendemen fraksi *n*-heksan daun pepaya yang diperoleh dari 3 kali fraksinasi adalah 63,67% ; 61,85% ; dan 62,61% sehingga diperoleh rata-rata 62,71%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 6.

**Tabel. 7 Prosentase fraksi etil asetat dari ekstrak daun pepaya**

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	10,13	0,54	5,33
2	10,04	0,73	7,27
3	10,03	0,42	4,19
Rata-rata ± SD			5,60 ± 1,56

Tabel 7 menunjukkan hasil rendemen fraksi etil asetat daun pepaya yang diperoleh dari 3 kali fraksinasi adalah 5,33% ; 7,27% ; dan 4,19% sehingga diperoleh rata-rata 5,60%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 7.

**Tabel. 8 Prosentase fraksi air dari ekstrak daun pepaya**

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
1	10,13	2,92	28,83
2	10,04	2,60	25,90
3	10,03	2,91	29,01
Rata-rata ± SD			27,91 ± 1,75

Tabel 8 menunjukkan hasil rendemen fraksi air daun pepaya yang diperoleh dari 3 kali fraksinasi adalah 28,83% ; 25,90% ; dan 29,01% sehingga diperoleh rata-rata 27,91%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 7.

Hasil fraksinasi menunjukkan adanya perbedaan persen rendemen dengan bobot fraksi dimana fraksi *n*-heksan memiliki persen rendemen paling besar diantara fraksi lainnya. Perbedaan tersebut dimungkinkan oleh adanya perbedaan kepolaran dari masing-masing golongan senyawa kimia adalah kemungkinan sebagian besar senyawa dalam daun pepaya bersifat non polar. Hasil total rendemen ketiga fraksi yang diperoleh sebesar 96,22%. Rendemen menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalam fraksi daun pepaya.

## 9. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dengan pereaksi warna

Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak bertujuan memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam ekstrak daun pepaya. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, steroid/triterpenoid, dan saponin. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dapat dilihat tabel 9.

**Tabel 9. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dengan pereaksi warna**

Identifikasi	Hasil	Pustaka	Ket
Flavonoid	Warna merah pada lapisan amil alkohol	Warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol (Yunita <i>et al.</i> , 2009)	(+)
Alkaloid	Terbentuk endapan putih kuning dengan pereaksi Mayer dan endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendrof	Terbentuk endapan putih kuning dengan pereaksi Mayer dan endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendrof (Yunita <i>et al.</i> , 2009)	(+)
Tanin	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman (Vermerris <i>et al.</i> , 2009)	(+)
Steroid	Warna hijau biru	Warna merah hijau/hijau biru (Tiwari <i>et al.</i> , 2009)	(+)
Saponin	Terbentuk buih selama 10 menit setinggi 1-10 cm + HCl 2N buih tidak hilang	Terbentuk buih selama 10 menit setinggi 1-10 cm + HCl 2N buih tidak hilang (Novitasari dan Putri 2016)	(+)

Tabel 9 menunjukkan identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak daun pepaya dengan menggunakan tabung reaksi. Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 12. Hasil identifikasi kandungan kimia menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, dan saponin.

### 10. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dengan KLT

Identifikasi KLT bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi teraktif. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dengan KLT dapat dilihat tabel 10, 11, 12, dan 13.

**Tabel 10. Hasil identifikasi kandungan flavonoid ekstrak dan fraksi dengan KLT**

Identifikasi	Rf	Sesudah elusi			Sesudah disemprot			Ket
		Visual	UV 254nm	UV 366nm	Visual	UV 254nm	UV 366nm	
Ekstrak	0,96	Kuning	Peredaman	Kuning	Kuning	Peredaman	Kuning	(+)
Fraksi EA	0,96	Kuning	Peredaman	Kuning	Kuning	Peredaman	Kuning	(+)
Quersetin	0,96	Kuning	Peredaman	Kuning	Kuning	Peredaman	Kuning	(+)

Uji KLT flavonoid dilakukan dengan fase gerak BAA (1:4:5). Eluen ini menghasilkan spot noda pada ekstrak dan fraksi etil asetat dengan nilai Rf 0,96. Ekstrak dan fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid karena setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat pada sinar UV 366 nm tampak noda kuning menyala dan nilai Rf yang dihasilkan sejajar dengan nilai Rf baku quersetin. Penelitian Putu *et al.*, (2017) menunjukkan flavonoid yang terkandung dalam daun pepaya berada pada nilai Rf 0,93.

**Tabel 12. Hasil identifikasi kandungan alkaloid ekstrak dan fraksi dengan KLT**

Identifikasi	Rf	Sesudah elusi			Sesudah disemprot			Ket
		Visual	UV 254nm	UV 366nm	Visual	UV 254nm	UV 366nm	
Ekstrak	0,96	Hijau	Peredaman	Orange	Orange	Peredaman	Hitam	(+)
Fraksi EA	0,94	Hijau	Peredaman	Orange	Orange	Peredaman	Hitam	(+)
Kofein	0,96	Hijau	Peredaman	Hitam	Orange	Peredaman	Hitam	(+)

Uji KLT alkaloid dilakukan dengan fase gerak etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5). Eluen ini menghasilkan noda pada ekstrak dengan nilai Rf 0,96 dan fraksi etil asetat dengan nilai Rf 0,94. Ekstrak dan fraksi etil asetat positif mengandung alkaloid karena setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff terbentuk bercak coklat jingga berlatar belakang kuning dan nilai Rf yang dihasilkan sejajar dengan nilai Rf baku kofein (Harborne 1996).

**Tabel 12. Hasil identifikasi kandungan steroid ekstrak dan fraksi dengan KLT**

Identifikasi	Rf	Sesudah elusi			Sesudah disemprot			Ket
		Visual	UV 254nm	UV 366nm	Visual	UV 254nm	UV 366nm	
Ekstrak	0,86	Hijau	Peredaman	Ungu	Hijau	Peredaman	Ungu	(+)
Fraksi EA	0,84	Hijau	Peredaman	Ungu	Hijau	Peredaman	Ungu	(+)
Stigmasterol	0,86	Hijau	Peredaman	Ungu	Hijau	Peredaman	Ungu	(+)

Uji KLT steroid dilakukan dengan fase gerak kloroform - metanol (9:1). Eluen ini menghasilkan noda pada ekstrak dengan nilai Rf 0,86 dan fraksi etil asetat dengan nilai Rf 0,84. Ekstrak dan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa steroid karena setelah disemprot dengan pereaksi Liberman-Buchard terbentuk noda ungu dan nilai Rf yang dihasilkan sejajar dengan nilai Rf baku stigmasterol. Hasil ini sesuai dengan penelitian Putu *et al.*, (2017) bahwa steroid yang terkandung dalam daun pepaya berada pada nilai Rf 0,85.

**Tabel 13. Hasil identifikasi kandungan tanin ekstrak dan fraksi dengan KLT**

Identifikasi	Rf	Sesudah elusi			Sesudah disemprot			Ket
		Visual	UV 254nm	UV 366nm	Visual	UV 254nm	UV 366nm	
Ekstrak	0,84	Kuning	Peredaman	Hitam	Hitam	Peredaman	Hitam	(+)
Fraksi EA	0,88	Kuning	Peredaman	Hitam	Hitam	Peredaman	-	(+)
Asam Galat	0,92	Kuning	Peredaman	Hitam	Hitam	Peredaman	Hitam	(+)

Uji KLT tanin dilakukan dengan fase gerak metanol : air (6:4). Eluen ini menghasilkan noda pada ekstrak dengan nilai Rf 0,84 dan fraksi etil asetat dengan nilai Rf 0,88. Ekstrak positif mengandung senyawa tanin karena setelah disemprot dengan FeCl<sub>3</sub> 5% terbentuk noda berwarna hitam, sedangkan fraksi etil asetat tidak terbentuk noda hitam tetapi nilai Rf yang dihasilkan lebih mendekati baku sehingga diduga fraksi etil asetat juga mengandung tanin. Hasil ini sesuai dengan penelitian Putu *et al.*, (2017) bahwa tanin yang terkandung dalam daun pepaya berada pada nilai Rf 0,85. Hasil identifikasi dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat daun pepaya mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid. Gambar hasil identifikasi dengan KLT dapat dilihat pada lampiran 13.

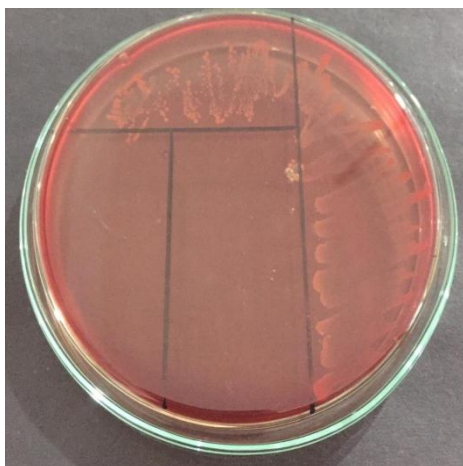
## 11. Hasil inokulasi *S. mutans* ATCC 25175 pada media BAP

Inokulasi dilakukan dengan tujuan untuk memindahkan dan meremajakan bakteri. Identifikasi *S. mutans* ATCC 25175 diinokulasi pada medium BAP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dari pengujian ini

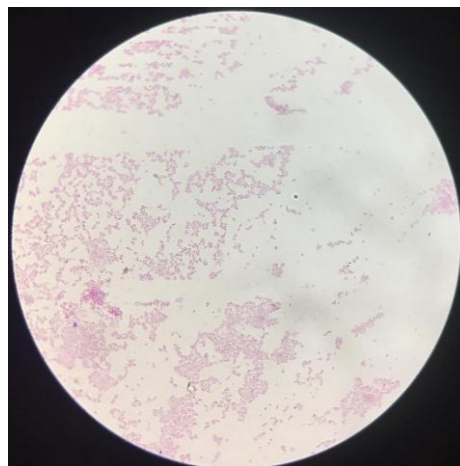
menunjukkan bahwa bakteri uji benar *S. mutans* ATCC 25175 dengan adanya pertumbuhan bakteri ditandai koloni bakteri berwarna kehijauan. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri bersifat alfa hemolisis disebabkan oksidasi zat besi dalam hemoglobin menjadikan koloni berwarna kehijauan dalam agar darah (Nugraha 2008). Hasil inokulasi *S. mutans* ATCC 25175 pada medium BAP dapat dilihat pada gambar 7.

## 12. Identifikasi *S. mutans* ATCC 25175

**12.1 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram pada bakteri bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut termasuk golongan Gram negatif atau Gram positif. Perbedaan respon terhadap mekanisme pewarnaan Gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Hasil pewarnaan Gram *S. mutans* ATCC 25175 menunjukkan Gram positif dimana pada mikroskop tampak berwarna ungu, berbentuk bulat dan membentuk rantai. Gram positif memiliki peptidoglikan yang lebih tebal dari Gram negatif. Bakteri Gram positif mengandung protein dalam prevalensi lebih rendah dan dinding selnya tebal. Pemberian kristal violet, iodin, dan etanol menyebabkan tidak terekstraksinya lipid sehingga memperkecil permeabilitas dinding sel Gram positif. Dinding selnya terdehidrasi dengan perlakuan alkohol menyebabkan pori-pori mengkerut, daya rembes dinding sel, dan membran menurun sehingga pewarnaan safranin tidak dapat masuk sehingga sel berwarna ungu (Pelezar dan Chan 2007). Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 7. Inokulasi pada media BAP



Gambar 8. Hasil pewarnaan Gram



**12.2 Identifikasi secara biokimia.** Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase dapat dilihat pada tabel 14.

**Tabel 14. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase**

Jenis uji	Prosedur	Hasil	Pustaka
Uji katalase	1 ose bakteri dalam objek glass + 3 tetes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%.	Tidak terbentuk gelembung gas	Terbentuk gelembung gas (Jawetz <i>et al.</i> , 2013)
Uji koagulase	Plasma + 1 ose bakteri dan diinkubasi suhu 37°C.	Hasil reaksi positif terjadi gumpalan	Hasil reaksi positif terjadi gumpalan (Lay 1994).

Tabel 14 menunjukkan hasil uji katalase dan koagulase *S. mutans* ATCC 25175. Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim katalase pada bakteri *S. mutans* ATCC 25175. Hasil positif uji katalase ditandai dengan adanya gelembung udara. *S. mutans* ATCC 25175 terjadi katalase negatif yang berarti tidak terbentuk gelembung udara ketika ditambah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Hal ini disebabkan karena *S. mutans* ATCC 25175 tidak mempunyai enzim katalase yang mampu menguraikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> sehingga hasil yang terbentuk tidak terdapat gelembung udara (Jawetz *et al.*, 2013). Uji koagulase digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim koagulase dalam menggumpalkan plasma darah. Hasil positif ditandai apabila terbentuk gumpalan. Hasil menunjukkan koagulase positif karena *S. mutans* ATCC 25175 mempunyai enzim koagulase yang mampu menggumpalkan plasma, terjadi perubahan plasma darah yang terdenaturasi oleh bakteri *S. mutans* ATCC 25175 sehingga terbentuk gumpalan. Enzim koagulase bekerja mengubah fibrinogen menjadi fibrin sehingga dapat menggumpalkan plasma darah. Gambar identifikasi dapat dilihat pada gambar 9 dan 10.



**Gambar 9. Hasil uji katalase**



**Gambar 10. Hasil uji koagulase**

### 13. Hasil uji aktivitas antibiofilm *S. mutans* ATCC 25175

**13.1 Penentuan panjang gelombang maksimal ( $\lambda_{maks}$ ).** Penentuan panjang gelombang maksimal lapisan biofilm pada rentang 450-650 nm dengan menggunakan alat *iMark BioRad microplate reader* menghasilkan panjang gelombang serapan maksimal 550 nm. Penentuan  $\lambda$  maks bertujuan untuk melihat perubahan absorbansi setiap satuan konsentrasi dimana absorbansi paling besar berada pada panjang gelombang maksimal, sehingga diperoleh kepekaan analisis yang maksimal (Gandjar 2012). Hasil penentuan panjang gelombang maksimal dapat dilihat pada tabel 15.

**Tabel 15. Hasil penentuan panjang gelombang maksimal ( $\lambda_{maks}$ )**

NO	ABSORBANSI		
	$\lambda$ : 490 nm	$\lambda$ : 550 nm	$\lambda$ : 630 nm
1	0,098	0,275	0,189
2	0,081	0,119	0,104
3	0,118	0,170	0,156
4	0,082	0,102	0,105
5	0,116	0,100	0,091
6	0,072	0,121	0,073
7	0,074	0,118	0,105
8	0,062	0,097	0,087
9	0,064	0,093	0,093
10	0,092	0,093	0,081
RATA-RATA	0,086	0,129	0,108

**13.2 Uji penghambatan pembentukan biofilm ekstrak dan fraksi daun pepaya secara *in vitro*.** Tujuan uji penghambatan pembentukan biofilm adalah untuk mendapatkan aktivitas dari daun pepaya dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Pembentukan biofilm pada penelitian ini diukur secara kuantitatif dengan metode kristal violet *assay*. Kristal violet akan mewarnai total biofilm yaitu sel bakteri dan matriks biofilm (Stiefel *et al.*, 2016). Kristal violet akan terlarut sebagai ion kristal violet dan ion klorida. Ion kristal violet yang bermuatan positif akan berikatan dengan gugus fosfat dari asam teikoat pada dinding sel bakteri yang bermuatan negatif (Tortora *et al.*, 2010). Ion kristal violet juga akan berikatan dengan komponen matriks biofilm bermuatan negatif seperti polisakarida dan DNA (Shukla *et al.*, 2017). Biofilm dilarutkan etanol dan dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm. Hasil OD penghambatan biofilm dapat dilihat pada tabel 16.

**Tabel 16. Hasil OD penghambatan pembentukan biofilm**

Konsentrasi	Ekstrak	Fraksi n-heksan	Fraksi Etilasetat	Fraksi Air
30 mg/ml	0,083	0,081	0,078	0,084
	0,082	0,08	0,079	0,086
	0,081	0,081	0,076	0,085
<b>Rata-rata</b>	<b>0,082</b>	<b>0,081</b>	<b>0,078</b>	<b>0,085</b>
60 mg/ml	0,07	0,068	0,065	0,072
	0,07	0,067	0,064	0,071
	0,071	0,069	0,067	0,071
<b>Rata-rata</b>	<b>0,071</b>	<b>0,068</b>	<b>0,065</b>	<b>0,071</b>
90 mg/ml	0,063	0,062	0,045	0,066
	0,064	0,061	0,043	0,063
	0,062	0,06	0,046	0,065
<b>Rata-rata</b>	<b>0,063</b>	<b>0,061</b>	<b>0,045</b>	<b>0,065</b>

Persentase penghambatan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dihitung dengan rumus sebagai berikut (Pratiwi *et al.*, 2015) :

$$\% \text{ Penghambatan Biofilm} = \left( 1 - \left( \frac{xODt - xODmc}{xODvc} \right) \right) \times 100\%$$

Keterangan :

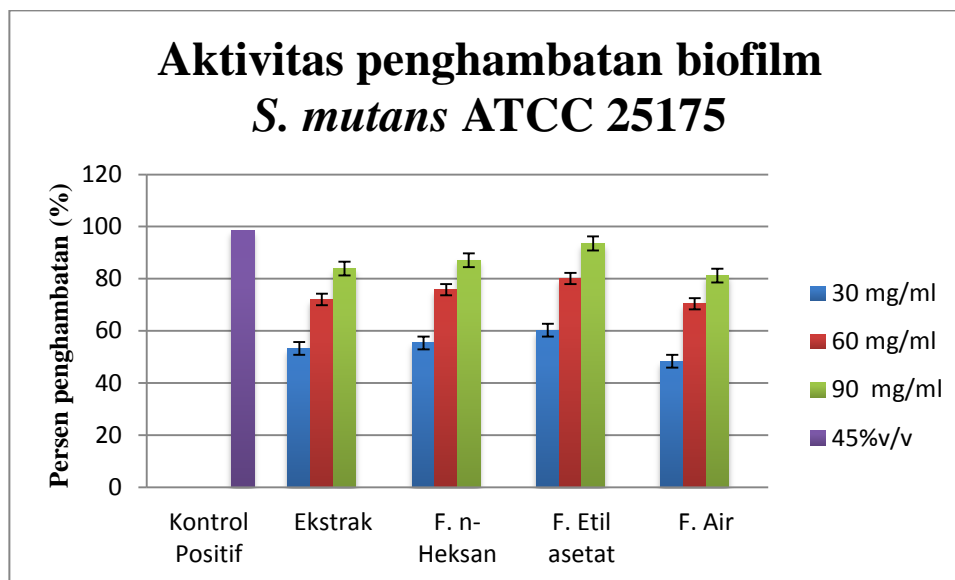
ODt = *Optical Density* sumuran yang diuji

ODmc = *Optical Density* kontrol media

ODvc = *Optical Density* kontrol pelarut

**Tabel 17. Hasil persen penghambatan pembentukan biofilm**

Konsentrasi	Ekstrak	Fraksi n-heksan	Fraksi Etilasetat	Fraksi Air
30 mg/ml	51,61	54,84	59,68	50,00
	53,23	56,45	58,06	46,77
	54,84	54,84	62,90	48,39
<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>53,23 ± 1.62</b>	<b>55,38 ± 0.93</b>	<b>60,21 ± 2.46</b>	<b>48,39 ± 1.62</b>
60 mg/ml	72,58	75,81	80,65	69,35
	72,58	77,42	82,26	70,97
	70,97	74,19	77,42	70,97
<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>72,04 ± 0.93</b>	<b>75,81 ± 1.62</b>	<b>80,11 ± 2.46</b>	<b>70,43 ± 0.94</b>
90 mg/ml	83,87	85,48	95,16	79,03
	82,26	87,10	91,94	83,87
	85,48	88,71	93,55	80,65
<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>83,87 ± 1.61</b>	<b>87,1 ± 1.62</b>	<b>93,55 ± 1.61</b>	<b>81,18 ± 2.46</b>



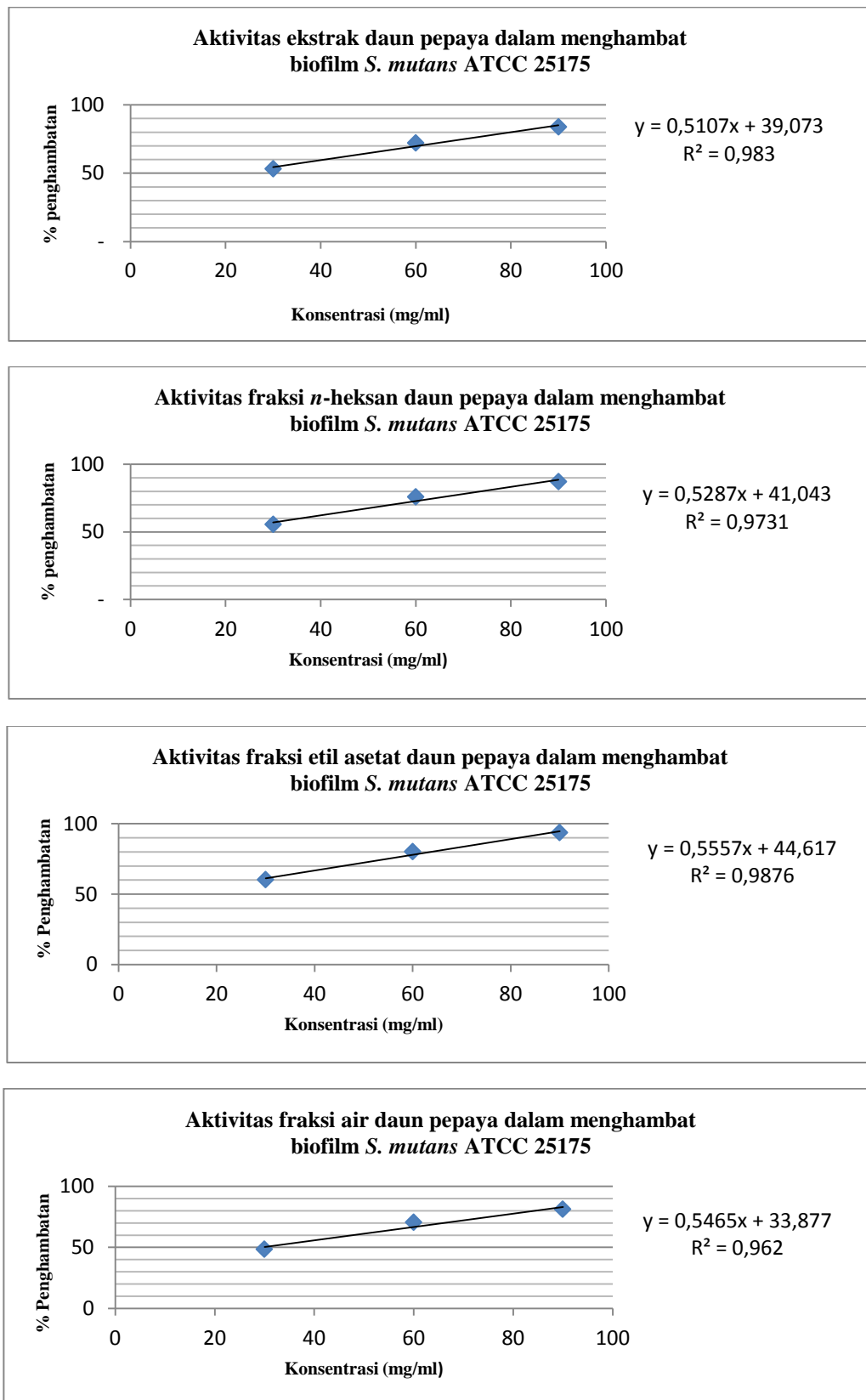
**Gambar 11. Histogram % penghambatan pembentukan biofilm**

Gambar 11 menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi daun pepaya dapat menghambat biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Prosentase penghambatan biofilm paling tinggi yaitu pada kontrol positif sebesar 98,39%, diikuti fraksi etil asetat 90 mg/ml sebesar 93,55%, fraksi *n*-heksan 90 mg/ml sebesar 87,10%, ekstrak 90 mg/ml sebesar 83,87%, dan fraksi air 90 mg/ml sebesar 81,18%. Hasil perhitungan % penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dapat dilihat pada lampiran 18.

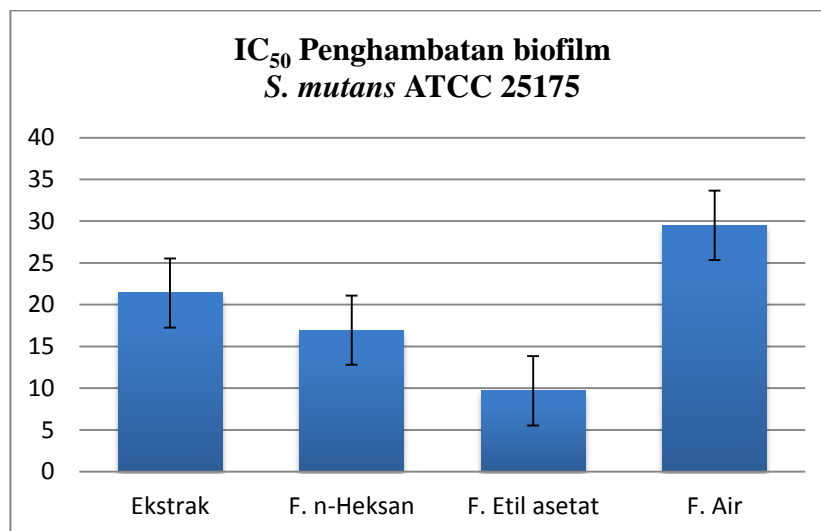
Uji aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dinyatakan dengan parameter  $IC_{50}$  (*Inhibitor Concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghambat biofilm sebesar 50%. Nilai  $IC_{50}$  ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghambatan biofilm. Persamaan regresi linier, harga  $r$  tabel dengan taraf kepercayaan 0,95. Harga  $IC_{50}$  berbanding terbalik dengan aktivitas penghambatan biofilm yaitu semakin besar  $IC_{50}$  maka aktivitas penghambatan biofilm semakin kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat biofilm sebesar 50% semakin besar. Hasil persamaan regresi linier dapat dilihat pada tabel 18.

**Tabel 18. Hasil  $IC_{50}$  biofilm *S. mutans* ATCC 25175**

Sampel	Regresi Linier	$IC_{50}$ (mg/ml)
Ekstrak	$Y = 0,5107x + 39,073$	21,40
Fraksi <i>n</i> -Heksan	$Y = 0,5287x + 41,043$	16,94
Fraksi etil asetat	$Y = 0,5557x + 44,617$	9,69
Fraksi air	$Y = 0,5465x + 33,877$	29,50



Gambar 12. Grafik persamaan regresi linier



**Gambar 13. Histogram nilai IC<sub>50</sub> biofilm *S. mutans* ATCC 25175**

Gambar 13 menunjukkan aktivitas ekstrak dan fraksi daun pepaya terhadap *S. mutans* ATCC 25175 ditentukan dengan nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> terkecil menunjukkan aktivitas paling efektif dalam menghambat pembentukan biofilm. Hasil % penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 memberikan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 9,69 mg/ml dari fraksi etil asetat. IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi fraksi etil asetat dapat menghambat 50% pembentukan biofilm. Nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, dan air adalah 21,4; 16,96; dan 29,4 mg/ml yang berarti keempat sampel sangat kuat menghambat biofilm *S. mutans* ATCC 25175 karena IC<sub>50</sub> < 50 mg/ml (Safa *et al.*, 2010). Hasil perhitungan nilai IC<sub>50</sub> dapat dilihat pada lampiran 19.

Analisis statistik diawali uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* hasilnya didapatkan nilai sig = 0,464. Data dikatakan memiliki distribusi yang normal bila nilai sig ≥ 0,05. Penelitian ini nilai sig ≥ 0,05, maka data persen penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 berdistribusi normal. Analisis dilanjutkan uji Homogenitas untuk menunjukkan data persen penghambatan biofilm bervariasi homogen atau tidak. Hasilnya didapatkan nilai sig = 0,196 (sig ≥ 0,05), maka data persen penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 bervariasi homogen sehingga dilanjutkan uji *Two Way* Anova. Hasil signifikansi dari data uji *Two Way* Anova adalah 0,000 ≤ 0,05 yang artinya keempat sampel ada perbedaan persen penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

Uji *Two Way* Anova digunakan untuk membandingkan perbedaan rata-rata antar konsentrasi. Data yang dianalisis dengan *Two Way* Anova adalah konsentrasi 30, 60, dan 90 mg/ml dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air. Kontrol negatif dan kontrol positif diikuti sertakan dalam analisis *Two Way* Anova. Data yang dihasilkan bertujuan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air, kontrol positif, dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat terbukti paling efektif terhadap aktivitas antibiofilm, karena mempunyai persen hambat paling besar yang berbeda signifikan dengan ekstrak dan fraksi yang lain namun belum sebanding dengan kontrol positif. Ekstrak dan fraksi *n*-heksan tidak ada beda signifikan begitu juga ekstrak dan fraksi air tidak ada beda signifikan, karena berada dalam subset yang sama sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak dengan fraksi *n*-heksan ataupun ekstrak dengan fraksi air mempunyai potensi yang sama dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Hasil analisis statistik dapat dilihat pada lampiran 20.

Sifat etil asetat yang semi polar menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar. Fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa yang diduga sebagai antibiofilm yaitu flavonoid, sehingga fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan persen hambat paling besar serta teraktif dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksan, dan fraksi air. Lee *et al.*, (2013) menyatakan bahwa flavonoid berpotensi menghambat pembentukan biofilm karena mampu menghambat pembentukan EPS dengan menghambat pembentukan gen penyandi yang mempunyai peranan penting dalam agregasi sel dan pembentukan EPS pada pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Golongan senyawa lain dalam fraksi etil asetat berdasarkan identifikasi KLT yang telah dilakukan adalah alkaloid, steroid, dan tanin diduga juga berperan menghambat pembentukan biofilm. Alkaloid menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghambat aktivitas *Quorum sensing* atau komunikasi antar sel, sedangkan steroid mampu mendenaturasi protein penyusun EPS (Park *et al.*, 2008).