

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Penyiapan Bahan Uji

Penyiapan bahan uji meliputi pengambilan dan pengumpulan biji pepaya hitam (*C.papaya* L.), determinasi tumbuhan uji, pengolahan bahan menjadi serbuk simplisia, pemeriksaan kadar air simplisia tumbuhan uji, penapisan fitokimia simplisia tumbuhan uji, dan ekstraksi biji buah pepaya hitam (*C.papaya* L.) dengan etanol sebagai pelarut menggunakan metode maserasi.

Pengambilan dan pengumpulan biji pepaya hitam (*C.papaya* L.) diperoleh dari kebun pepaya di daerah Subang, Jawa Barat. Determinasi tumbuhan uji dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH), Institut Teknologi Bandung (ITB). Hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Carica papaya* L. dengan nama umum pepaya, hasil dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan uji, karena penggunaan obat yang berasal dari bahan alam melibatkan kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya dan aktivitas biologi kandungan kimia tersebut. Hasil penapisan dapat dilihat pada **Tabel V.1**

**Tabel V.1** Hasil Penapisan Fitokimia Biji Buah Pepaya (*C.papaya* L.)

Golongan senyawa	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	+
Polifenolat	-
Kuinon	-
Triterpenoid dan steroid	-
Monoterpen dan sesquiterpen	-

**Ket:** (+) = Ditemukan kandungan senyawa yang diuji

(-) = Tidak ditemukan kandungan senyawa yang diuji

Berdasarkan **Tabel V.1** hasil penapisan fitokimia menunjukkan kandungan kimia biji buah pepaya hitam (*C.papaya* L.) adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Menurut Peter, *et al* (2014) dan Sulihandana, dkk (2010) ekstrak etanol biji buah pepaya hitam (*C.papaya* L.) mengandung alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, triterpenoid, protein, asam lemak, fosfolipid (fosfotidilkolin dan kardiolipin), karpain, beta-sitosterol, karisin, dan enzim mirosin. Kandungan biji buah pepaya hitam (*C.papaya* L.) yang diduga berpotensi sebagai antibakteri adalah fenol, alkaloid, flavonoid dan saponin.

Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui batasan maksimal atau rentang besarnya kandungan air dalam tumbuhan uji. Kandungan air yang berlebihan pada tumbuhan uji dapat mempercepat pertumbuhan mikroba dan mempermudah terjadinya hidrolisa kandungan kimia simplisia. Standar kadar air simplisia yang memenuhi syarat adalah 2-10%. Kadar air simplisia biji pepaya hitam (*C. papaya* L.) yang diuji adalah 8,698%, yang berarti memenuhi standar (Depkes, 1995).

Proses ekstraksi/penyarian simplisia tumbuhan uji yaitu 650 gram biji pepaya hitam (*C. papaya* L.) dilakukan menggunakan metode maserasi selama 5 kali 24 jam menggunakan 16,5 L pelarut etanol dengan pengadukan kurang lebih selama 1 jam. Metode maserasi dipilih karena merupakan metode yang mudah dilakukan, murah, dan peralatan yang digunakan sederhana. Maserasi dilakukan selama 5 kali 24 jam agar diperoleh filtrat lebih banyak dan maksimal, karena jumlah simplisia sedikit. Didapatkan filtrat 12,4 L, ekstrak kental hasil evaporasi sebanyak 120,67 gram dan rendemen ekstrak 18,565%.

Proses perendaman menyebabkan cairan penyari berpenetrasi masuk ke dalam dinding sel, kemudian melarutkan metabolit sekunder di dalam sel. Metabolit sekunder akan larut dan keluar dari sel karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Keadaan hipertonis di dalam sel menyebabkan pelarut dari luar sel yang keadaannya hipotonis masuk ke dalam sel, lalu pelarut yang keluar membawa serta metabolit sel terlarut dari dalam sel. Proses ini terus berlanjut hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel. Untuk menghindari terjadinya kejenuhan pelarut, maka dilakukan pergantian pelarut berkala setiap 24 jam sekali. Proses pengadukan juga dilakukan untuk mengurangi proses kesetimbangan dan jenuhnya pelarut. Etanol digunakan sebagai pelarut karena bersifat semipolar cenderung polar, sesuai dengan kisaran kepolaran golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin sehingga diharapkan dapat menarik senyawa-senyawa tersebut dengan maksimal (Harborne, 1987).

## 5.2. Penentuan Konsentrasi Pemanding

Penelitian ini menggunakan kloramfenikol sebagai antibiotika pemanding. Mekanisme kerja kloramfenikol adalah menghambat peptidil transferase pada fase pemanjangan, dengan demikian akan mengganggu sintesis protein. Setelah pemakaian oral, kloramfenikol akan diabsorpsi dengan cepat dari usus lebih dari 90%, di dalam hati sebagian besar akan mengalami glukuronidasi dan di ekskresi melalui ginjal. Waktu paruhnya sekitar 3-5 jam (Mutschler, 1991). Kloramfenikol adalah antibiotika bakteriostatik spektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram positif dan negatif baik anaerob maupun aerob. Pada beberapa bakteri yang sangat rentan terhadap kloramfenikol seperti *H.influenzae*, *N.meningitis*, dan beberapa galur bakteroides, kloramfenikol menjadi bersifat bakterisida (Katzung, 2010).

Penentuan konsentrasi pemanding dilakukan dengan cara orientasi pemanding untuk mendapatkan konsentrasi minimum obat yang dapat membentuk diameter hambat terhadap bakteri uji *E.coli* dan *Salmonella typhi* dengan cara pengenceran bertingkat. Dibuat larutan stok 2500 ppm terlebih dahulu dari kapsul kloramfenikol dengan dosis 250 mg. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat: 1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, dan 200 ppm. Hasil orientasi pemanding dapat dilihat pada **Tabel V.2**

**Tabel V.2** Hasil orientasi pembanding dengan lima konsentrasi berbeda

Pembanding	Konsentrasi (ppm)	Diameter Hambat (cm) $\pm$ SD	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Kloramfenikol	200	2,03 $\pm$ 0,141	1,73 $\pm$ 0,152
	400	2,48 $\pm$ 0,085	2,04 $\pm$ 0,287
	600	2,79 $\pm$ 0,199	2,46 $\pm$ 0,067
	800	3,16 $\pm$ 0,238	2,66 $\pm$ 0,117
	1000	3,36 $\pm$ 0,314	2,89 $\pm$ 0,095

Ket: Diameter perforator 6mm= 0,6 cm

Berdasarkan hasil **Tabel V.2** konsentrasi pembanding yang digunakan adalah kloramfenikol 400 ppm, karena pada konsentrasi tersebut didapatkan hasil diameter hambat yang tidak terlalu besar tetapi dapat diamati setelah beberapa kali pengujian aktivitas antibakteri. Beberapa kali pengujian yang dilakukan memberikan hasil bervariasi pada konsentrasi 200 ppm, sehingga digunakan pembanding dengan konsentrasi 400 ppm.

Ekstrak uji tidak larut sempurna pada DMSO, maka ekstrak uji dilarutkan pada pelarut ekstraksinya yaitu etanol. Oleh karena itu etanol digunakan sebagai kontrol negatif. Jika muncul diameter hambat pada etanol, maka diameter diameter hambat ekstrak uji akan dikurangi dengan diameter etanol. Tetapi ternyata tidak ditemukan diameter hambat pada hasil pengujian kontrol.

### **5.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi***

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji buah pepaya (*C.papaya* L.) dilakukan terhadap bakteri *E.coli* dan *Salmonella typhi*. Pengujian terhadap *E.coli* dilakukan pada cawan petri dengan media Nutrien Agar (NA) yang

merupakan media universal untuk menumbuhkan berbagai jenis bakteri. Pengujian terhadap *Salmonella typhi* dilakukan pada cawan petri dengan media Mac Conkey Agar (MCA) yang merupakan media selektif dan diferensial yang digunakan untuk mengisolasi bakteri gram negatif, khususnya yang dapat memfermentasi gula. *Salmonella typhi* adalah salah satu bakteri yang dapat memfermentasi gula, khususnya glukosa dan maltosa. Hal ini menyebabkan pH media menurun sehingga warna merah pada media diserap oleh bakteri, maka akan terlihat koloni berwarna merah muda pada media, dan media berubah warna menjadi merah muda hingga orange (Allen, 2012).

Waktu pengamatan disesuaikan dengan waktu tumbuh optimum bakteri uji *S.typhi* yang merupakan bakteri aerob dan anaerob fakultatif, dan *E.coli* yang merupakan bakteri anaerob fakultatif. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan mengukur diameter hambat yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi uji, konsentrasi antibiotik, dan kontrol negatif etanol (Pelczar, 2010).

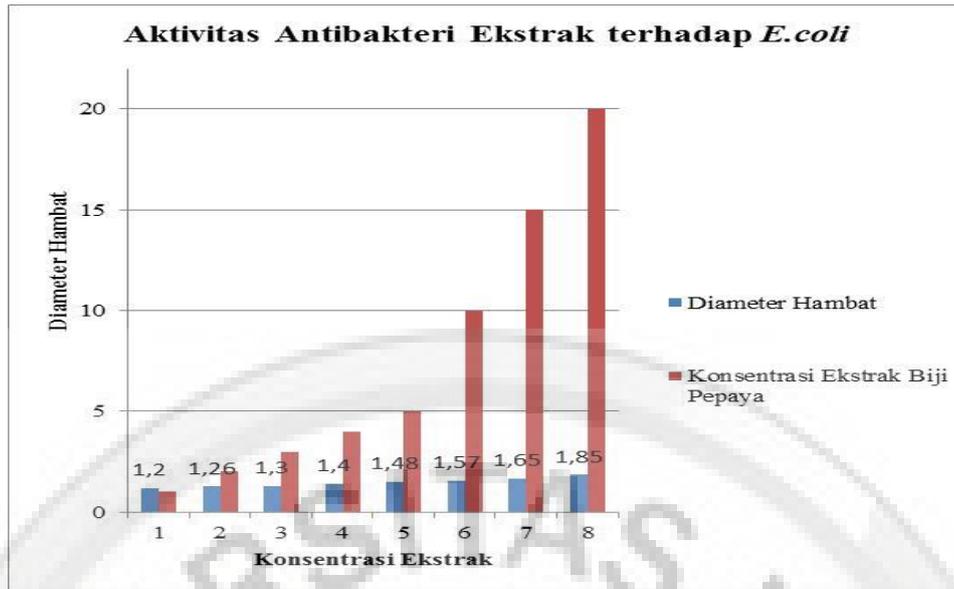
Pengamatan terhadap dihasilkannya diameter hambat ekstrak uji terhadap bakteri *E.coli* dapat dilihat pada **Lampiran 2, Gambar 1, Gambar 2, Gambar 3,** dan **Gambar 4**. Hasil pengujian dan pengukuran diameter hambat dapat dilihat pada **Tabel V.3 dan Gambar V.1**.

**Tabel V.3.** Hasil pengujian dan pengukuran Diameter Hambat Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya L*) terhadap *Escherichia coli*

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Diameter Hambat (cm) $\pm$ SD
Etanol	0
Biji Pepaya 1%	1,20 $\pm$ 0,022
Biji Pepaya 2%	1,26 $\pm$ 0,018
Biji Pepaya 3%	1,30 $\pm$ 0,126
Biji Pepaya 4%	1,40 $\pm$ 0,023
Biji Pepaya 5%	1,48 $\pm$ 0,025
Biji Pepaya 10%	1,57 $\pm$ 0,015
Biji Pepaya 15%	1,65 $\pm$ 0,02
Biji Pepaya 20%	1,85 $\pm$ 0,108
Pembanding (kloramfenikol 400 ppm)	2,48 $\pm$ 0,085

**Ket:** Diameter perforator 6mm= 0,6 cm

Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan, ekstrak etanol biji buah pepaya hitam (*C. papaya L.*) terbukti menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan menghasilkan diameter hambat pada konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15% dan 20%. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol biji buah pepaya hitam (*C. papaya L.*) terhadap *E.coli* adalah pada konsentrasi 1% sebesar 1,2033 cm. Grafik hasil pengujian dan pengukuran diameter hambat dapat dilihat pada **Gambar V.1.**



**Gambar V.1.** Grafik Diameter Hambat Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya L.*) terhadap *Escherichia coli*

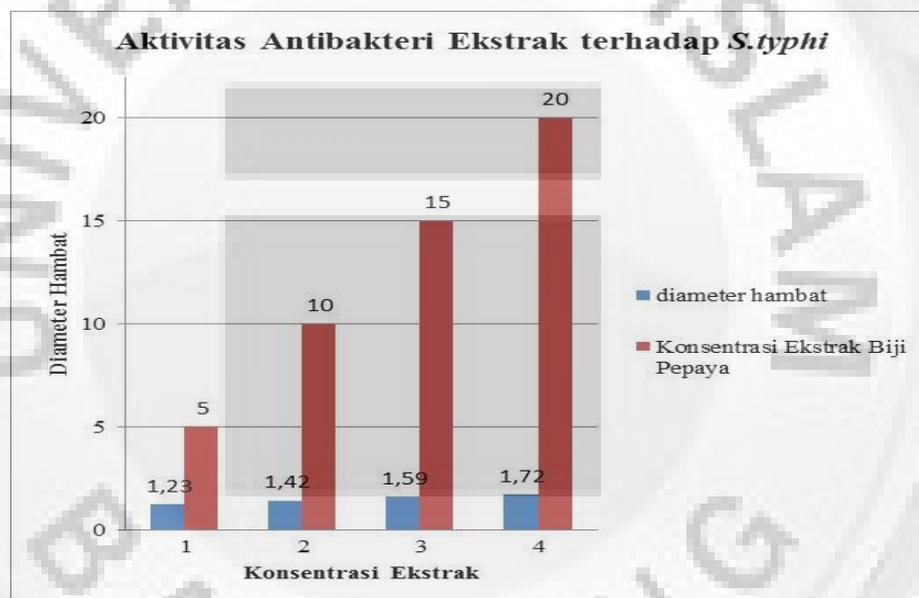
Pengamatan terhadap dihasilkannya diameter hambat ekstrak uji terhadap bakteri *S.typhi* dapat dilihat pada **Lampiran 3, Gambar 6, Gambar 7, Gambar 8, dan Gambar 9**. Hasil pengujian dan pengukuran diameter hambat dapat dilihat pada **Tabel V.4 dan Gambar V.2**.

**Tabel V.4.** Hasil pengujian dan pengukuran diameter hambat Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya L.*) terhadap *Salmonella typhi*

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Diameter Hambat (cm) ± SD
Etanol	0
Biji Pepaya 1%	0
Biji Pepaya 2%	0
Biji Pepaya 3%	0
Biji Pepaya 4%	0
Biji Pepaya 5%	1,23 ± 0,075
Biji Pepaya 10%	1,42 ± 0,031
Biji Pepaya 15%	1,59 ± 0,033
Biji Pepaya 20%	1,72 ± 0,159
Pembanding (kloramfenikol 400 ppm)	2,04 ± 0,287

Ket: Diameter perforator 6mm= 0,6 cm

Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan, ekstrak etanol biji buah pepaya hitam (*C. papaya L.*) terbukti menghambat pertumbuhan bakteri *S.typhi* dengan menghasilkan diameter hambat pada konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol biji buah pepaya hitam (*C. papaya L.*) terhadap *S.typhi* adalah pada konsentrasi 5% sebesar 1,2275 cm. Grafik hasil pengujian dan pengukuran diameter hambat dapat dilihat pada Gambar V.2.



**Gambar V.2.** Grafik Diameter Hambat Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya L.*) terhadap *Salmonella typhi*

Ekstrak etanol biji pepaya (*C. papaya L.*) terbukti efektif menghambat pertumbuhan *E.coli* dan *S.typhi* dengan KHM masing-masing 1% dan 5%. Aktivitas antibakteri ekstrak berefek lebih baik pada *E.coli* dibandingkan dengan *S.typhi* terbukti dengan dihasilkannya KHM pada konsentrasi 1% dan diameter hambat yang dihasilkan lebih besar.

*E.coli* mempunyai antigen O (lipopolisakarida), H (flagel), dan K (kapsul) sedangkan *S.typhi* memiliki antigen O dan K (Radji, 2010 dan Irianto, 2014). Lipopolisakarida melindungi bakteri Gram Negatif dari lisis yang diperantarai oleh komplemen sel dan merupakan stimulator pelepasan sitokin yang poten. Flagel merupakan organ pergerakan bakteri, membuat organisme mampu untuk menemukan sumber nutrisi dan menembus mukus pejamu (Gillespie, 2009). Kapsul pada bakteri dapat mencegah fagositosis, sebagai cadangan nutrisi untuk bertahan hidup (Radji, 2010).

Perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri juga dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri. Bakteri Gram Negatif mengandung lipid, lemak, atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi (11-22%) dibandingkan bakteri Gram Positif (1-4%). Dinding sel bakteri Gram Negatif lebih tipis, yaitu 10-15 nm berlapis tiga (multi) sedangkan dinding sel bakteri Gram Positif lebih tebal yaitu 15-80 nm berlapis tunggal (mono). Kandungan peptidoglikan bakteri Gram Negatif jauh lebih sedikit, dan peptidoglikan ini mempunyai ikatan silang yang jauh kurang ekstensif dibandingkan dengan bakteri Gram Positif (Pelczar, 2010).

Kandungan senyawa metabolit sekunder dari biji buah pepaya (*C. papaya* L.) dan komponen penyusun *E.coli* dan *S.typhi* berhubungan erat dengan mekanisme antibakteri senyawa metabolit sekunder tersebut. *E.coli* dan *S.typhi* dengan kandungan peptidoglikan lebih sedikit dan dinding sel lebih tipis menjadi lebih mudah untuk dirusak (Pelczar, 2010).

Mekanisme kerja fenol sebagai antibakteri yaitu dengan mendenaturasi protein sel. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel sehingga sel menjadi lisis (Pelczar, 2010).

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Darsana, 2012). Selain itu, alkaloid bekerja dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan dan menghambat enzim topoisomerase yang mempunyai peran sangat penting dalam proses replikasi, transkripsi, dan rekombinasi DNA dengan cara memotong dan menyambungkan untai tunggal atau untai ganda DNA (Campbell, 2010).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa pada asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Letak gugus hidroksil di posisi 2',4' atau 2',6' dihidroksilasi pada cincin B dan 5,7 dihidroksilasi pada cincin A berperan penting pada aktivitas antibakteri flavonoid.

Hal ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan lisosom (Cushnie, 2005).

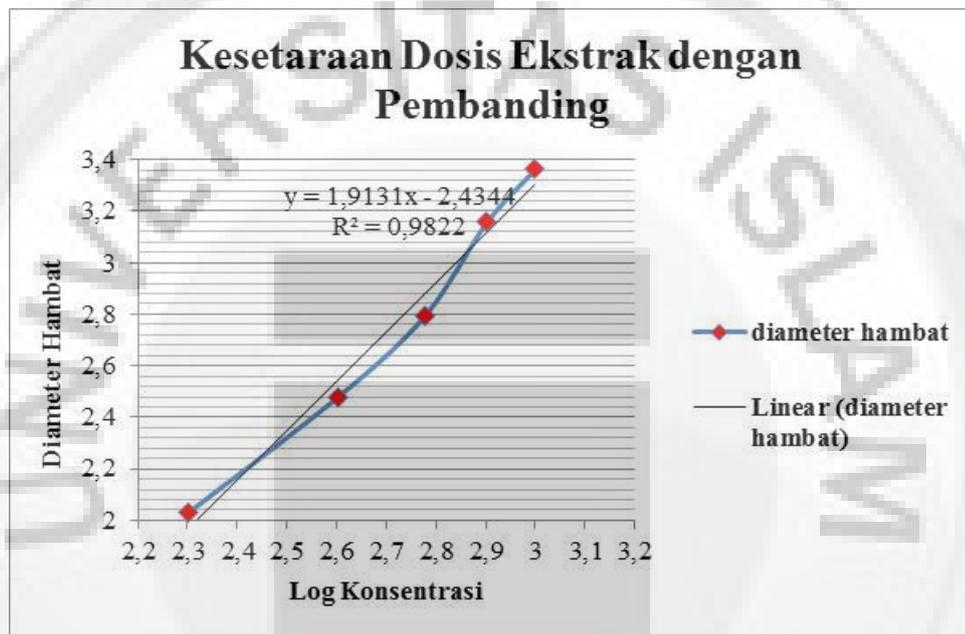
Kedua, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat fungsi membran sel yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga dapat merusak membran sel dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Penelitian lain membuktikan flavonoid mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim ATPase dan fosfolipase. Ketiga, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat metabolisme energi yaitu dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat sitokrom C reduktase sehingga proses metabolisme dan biosintesis makromolekul terhambat (Cushnie, 2005).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan cara menyebabkan kebocoran protein dan enzim di dalam sel. Saponin dapat berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida (Cavalieri, 2005).

Kemampuan antibakteri tanin kemungkinan berkaitan dengan kemampuan untuk menginaktivasi adhesin mikroba, enzim dan transport protein pembungkus sel. Tanin juga membentuk kompleks dengan polisakarida (Cowan, 1999).

#### 5.4. Penentuan Nilai Kesetaraan Ekstrak Biji Buah Pepaya (*C. papaya* L.) terhadap Antibiotik Kloramfenikol

Hasil hasil pengukuran diameter hambat pembanding kloramfenikol terhadap *E.coli* dapat dilihat pada **Gambar V.3**.



**Gambar V.3.** Grafik Kesetaraan Dosis Antara Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya* L.) pada *Escherichia coli* Terhadap Antibiotika Pembanding

Berdasarkan hasil pada **Gambar V.3** menunjukkan bahwa diameter hambat meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasinya. Kemudian dari persamaan garisnya didapatkan antilog x sebagai kesetaraan konsentrasi antibiotik dengan ekstrak uji. Digunakan ekstrak biji pepaya (*C. papaya* L.) 20% sebagai untuk pengukuran kesetaraan. Hasilnya, 1 ppm ekstrak uji setara dengan  $10^8 \times 10^{-5}$  ppm antibiotika pembanding (kloramfenikol).

Hasil pengukuran diameter hambat pembanding kloramfenikol terhadap *S.typhi* dapat dilihat pada **Gambar V.4**.



**Gambar V.4.** Grafik Kesetaraan Dosis Antara Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*C. papaya* L.) pada *Salmonella typhi* Terhadap Antibiotika Pembanding

Berdasarkan hasil pada **Gambar V.4** menunjukkan bahwa diameter hambat meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasinya. Kemudian dari persamaan garisnya didapatkan antilog x sebagai kesetaraan konsentrasi antibiotik dengan ekstrak uji. Digunakan ekstrak biji pepaya (*C. papaya* L.) 20% sebagai untuk pengukuran kesetaraan. Hasilnya, 1 ppm ekstrak uji setara dengan  $86,71 \times 10^{-5}$  ppm antibiotika pembanding (kloramfenikol).