

## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Gambaran Umum Lokasi Penelitian**

Sampel daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) diambil di Kelurahan Ambalodange, Kecamatan Laeya, Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. Penelitian untuk menguji kemampuan ekstrak daun sintrong dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* dilakukan menggunakan metode Kirby-Bauer dan metode dilusi cair. Penelitian dilakukan pada tanggal 19-23 Juni 2024 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

#### **B. Hasil Penelitian**

Pada tahap awal penelitian dilakukan pengumpulan daun sintrong sebanyak 10 kg, kemudian daun tersebut dibersihkan dari kotoran yang menempel lalu dikeringkan memakai oven dengan suhu 60°C selama  $\pm$  3 jam. Setelah itu, daun dihaluskan menggunakan blender lalu diayak hingga menjadi serbuk halus. Serbuk halus daun sintrong kemudian ditimbang sebanyak 500 gram dan dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter. Maserat yang telah didapatkan kemudian disaring dan dipisahkan dari pelarutnya. Hasil akhir tahapan ini adalah diperolehnya 100 ml ekstrak daun sintrong.

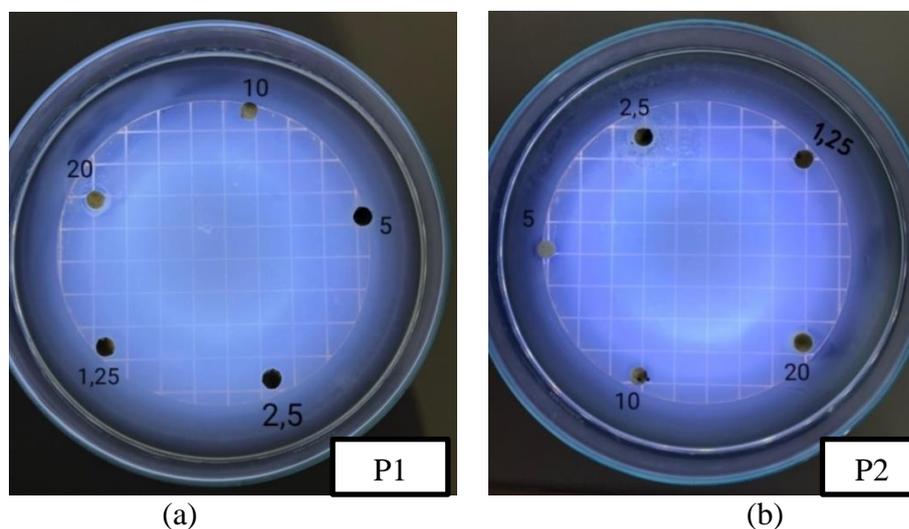
Ekstrak daun sintrong yang telah diperoleh dibuat menjadi lima konsentrasi yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20%. Pada konsentrasi 1,25% yaitu campuran 0,125 ml ekstrak daun sintrong dan 9,875 ml aquades. Konsentrasi 2,5% merupakan campuran antara 0,25 ml ekstrak daun sintrong dan 9,75 ml aquades. Konsentrasi 5% yaitu campuran antara 0,5 ml ekstrak daun sintrong dan 9,5 ml aquades. Konsentrasi 10% yaitu 1 ml ekstrak daun sintrong yang dilarutkan dengan 9 ml aquades. Konsentrasi 20% yaitu 2 ml ekstrak daun sintrong yang dilarutkan dengan 8 ml aquades. Lima variasi konsentrasi yang telah dibuat digunakan untuk uji daya hambat metode Kirby-Bauer. Pada metode dilusi cair digunakan lima konsentrasi yang sama dengan metode Kirby-Bauer, tetapi ekstrak daun sintrong dilarutkan dengan

aquades sebagai larutan induk kemudian diencerkan ke media cair yang disusun berturut-turut hingga konsentrasi terkecil (1,25%).

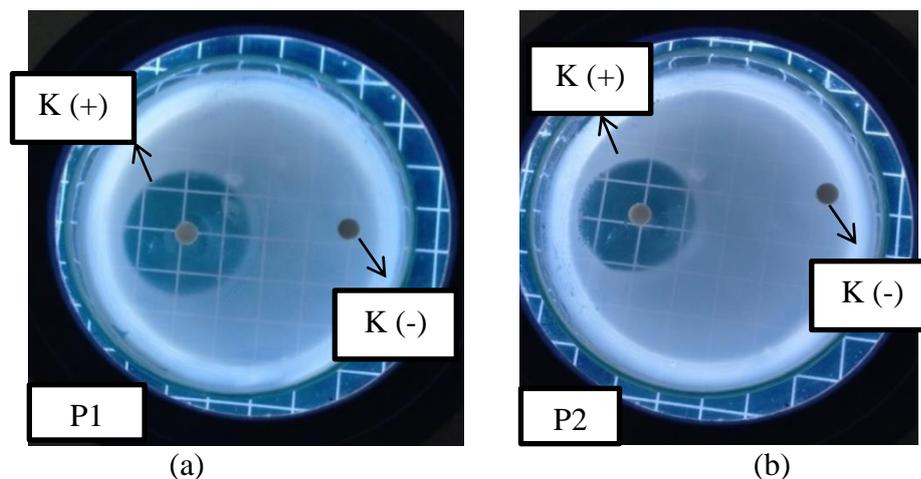
#### a. Metode Kirby-Bauer

Hasil penelitian uji daya hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* menggunakan metode Kirby-Bauer pada konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20% dengan menggunakan kontrol positif *kloramfenikol* dan kontrol negatif berupa aquades.

Bakteri *Bacillus sp* ditanam pada media Mueller Hinton Agar (MHA), kemudian cakram uji yang mengandung ekstrak daun sintrong dengan berbagai konsentrasi, kontrol positif dan kontrol negatif ditempatkan di permukaan agar. Kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan oleh zona transparan yang terbentuk di sekitar cakram, yang kemudian diukur menggunakan jangka sorong. Penelitian ini dilakukan dua kali untuk memastikan hasil yang konsisten. Adapun hasil hambatan yang terbentuk terlihat pada gambar (3 dan 4) dan disajikan dalam tabel (7):



**Gambar 3.** Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sintrong Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp* Menggunakan Metode Kirby-Bauer Percobaan Pertama (a) Dan Kedua (b) (Dokumentasi Pribadi, 2024)



**Gambar 4.** Hasil Uji Daya Hambat Kontrol Positif (*Kloramfenikol*) Dan Kontrol Negatif (*Aquades*) Metode Kirby-Bauer Percobaan Pertama (a) Dan Kedua (b) (Dokumentasi Pribadi, 2024)

**Tabel 7**  
**Hasil Pengukuran Zona Hambat Ekstrak Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp***

No	Perlakuan	Waktu	Diameter Zona Hambat (mm)		Rata-rata (mm)	Interpretasi
			P1	P2		
1	Konsentrasi 1,25%	1x24 jam	-	3,375	1,69	<i>Resistant</i>
2	Konsentrasi 2,5%	1x24 jam	-	5,6	2,80	<i>Resistant</i>
3	Konsentrasi 5%	1x24 jam	-	6,625	3,31	<i>Resistant</i>
4	Konsentrasi 10%	1x24 jam	3,125	7,8	5,46	<i>Resistant</i>
5	Konsentrasi 20%	1x24 jam	6,6	9,8	8,20	<i>Resistant</i>
6	Kontrol Positif ( <i>Kloramfenikol</i> )	1x24 jam	24,1	28,275	26,19	<i>Susceptible</i>
7	Kontrol Negatif ( <i>Aquades</i> )	1x24 jam	0	0	0	Negatif

(Sumber : Data Primer)

Keterangan :

1) Efektif (+), apabila terbentuk zona hambat bening. Nilai diameter zona hambat dianalisis berdasarkan kategori respon hambat yaitu:

- *Resistant* :  $\leq 14$  mm
- *Intermediate* : 15-19 mm
- *Susceptible* :  $\geq 20$  mm

2) Tidak efektif (-), apabila tidak terbentuk daerah zona hambat bening.

Berdasarkan data yang tercantum dalam tabel 7, hasil penelitian memperlihatkan bahwa pengujian daya hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) menggunakan metode Kirby-Bauer menghasilkan zona bening dengan rata-rata diameter sebagai berikut: konsentrasi 20% sebesar 8,20 mm, konsentrasi 10% sebesar 5,46 mm, konsentrasi 5% sebesar 3,31 mm, konsentrasi 2,5% sebesar 2,80 mm, dan konsentrasi 1,25% sebesar 1,69 mm. Sebagai pembanding, kontrol positif menggunakan kloramfenikol menunjukkan zona bening dengan rata-rata diameter 26,19 mm, sedangkan pada kontrol negatif tidak terlihat zona bening.

Menurut standar CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) tahun 2023, semua zona hambat yang terbentuk karena ekstrak daun sintrong dikategorikan sebagai hasil yang *resistant* sedangkan zona hambat pada kontrol positif termasuk dalam kategori *susceptible* pada pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* Berdasarkan tabulasi data, konsentrasi 20% menunjukkan zona hambat terbesar namun efektivitasnya masih terbatas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.*

Data dari Gambar 3 menunjukkan bahwa zona bening terbesar terjadi pada konsentrasi 20% dan yang terkecil pada konsentrasi 1,25% untuk ekstrak daun sintrong. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar zona hambat yang terbentuk. Meskipun demikian, kenaikan yang signifikan ini masih belum mencapai kategori *susceptible* seperti yang terlihat pada kontrol positif, sehingga ekstrak daun sintrong kurang efektif dalam menghambat bakteri *Bacillus sp* dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol.

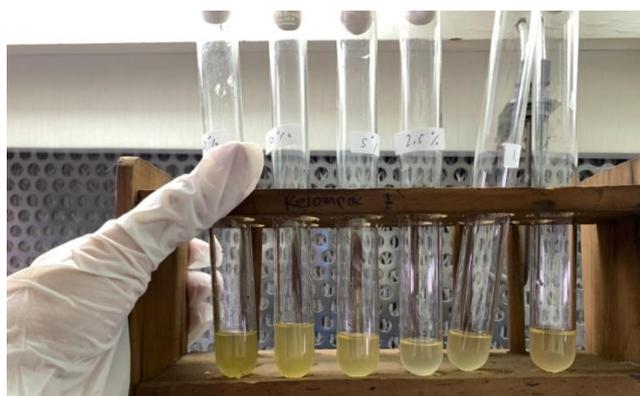
#### **b. Metode Dilusi Cair**

Metode dilusi cair menggunakan Brain Heart Infusion Broth (BHIB) sebagai medium untuk pertumbuhan bakteri. Tujuan metode ini adalah menemukan konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun sintrong terhadap bakteri *Bacillus sp.* Interpretasi hasil didasarkan pada kejernihan larutan pada tabung yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri dan

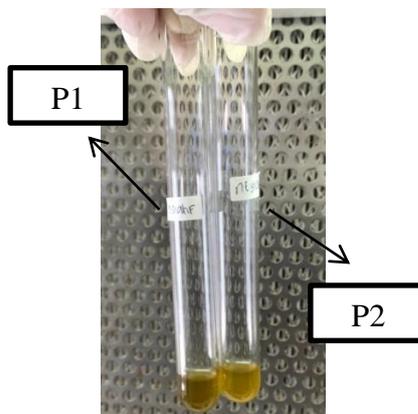
kekeruhan larutan dalam tabung yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (Alim dkk, 2022). Pengamatan terhadap pertumbuhan koloni bakteri dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam. Konsentrasi KHM ditentukan sebagai konsentrasi terkecil yang masih jernih tanpa tanda-tanda pertumbuhan bakteri. Penelitian ini dilakukan secara duplo dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil hambatan terlihat pada gambar (5, 6, 7) dan disajikan dalam tabel (8) :



**Gambar 5.** Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sintrong Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp* Menggunakan Metode Dilusi Cair Percobaan Pertama (Dokumentasi Pribadi, 2024)



**Gambar 6.** Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sintrong Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp* Menggunakan Metode Dilusi Cair Percobaan Kedua (Dokumentasi Pribadi, 2024)



**Gambar 7.** Hasil Uji Daya Hambat Kontrol Negatif Metode Dilusi Cair Percobaan Pertama dan Kedua (Dokumentasi Pribadi, 2024)

**Tabel 8**  
**Hasil Pengujian Metode Dilusi Cair Dari Ekstrak Daun Sintrong**  
**(*Crassocephalum crepidioides*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp***

No	Perlakuan	Waktu Pengamatan	Keterangan		Interpretasi
			P1	P2	
1	Konsentrasi 20%	1x24 jam	-	-	Tidak tumbuh bakteri
2	Konsentrasi 10%	1x24 jam	-	-	Tidak tumbuh bakteri
3	Konsentrasi 5%	1x24 jam	+	+	Tumbuh bakteri
4	Konsentrasi 2,5%	1x24 jam	+	+	Tumbuh bakteri
5	Konsentrasi 1,25%	1x24 jam	+	+	Tumbuh bakteri
6	Kontrol Positif	1x24 jam	+	+	Tumbuh bakteri
7	Kontrol Negatif	1x24 jam	-	-	Tidak tumbuh bakteri

(Sumber : Data Primer)

Keterangan :

1. Positif (+) jika hasil menunjukkan kekeruhan yang berarti ada pertumbuhan bakteri.
2. Negatif (-) jika hasil menunjukkan kejernihan atau tidak keruh yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan data yang tercantum dalam tabel 8, hasil penelitian menunjukkan bahwa uji daya hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) menggunakan metode dilusi cair mengindikasikan bahwa larutan uji pada konsentrasi 20% dan 10% menunjukkan kejernihan, menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada konsentrasi 5%, 2,5%, dan 1,25%, larutan uji menunjukkan kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun sintrong terhadap bakteri *Bacillus sp* terletak pada konsentrasi 10%. Hal ini ditandai dengan adanya kejernihan pada tabung dengan konsentrasi 10%.

**c. Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram Bakteri *Bacillus sp***



**Gambar 8.** *Bacillus sp* pada perbesaran 100x  
(Dokumentasi Pribadi, 2024)

Berdasarkan perbedaan struktur dinding sel, bakteri diklasifikasikan menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan tebal dengan senyawa asam teikoat. Sedangkan bakteri gram negatif memiliki jumlah peptidoglikan yang lebih sedikit namun memiliki membran luar yang terdiri dari lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida. Perbedaan komposisi dinding sel ini menyebabkan perbedaan dalam ketahanan antara bakteri gram positif dan gram negatif.

Salah satu teknik untuk mengidentifikasi bakteri adalah pewarnaan gram. Pewarnaan gram adalah metode penting dalam klasifikasi jenis-jenis bakteri berdasarkan sifat pewarnaannya. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu (violet), sedangkan bakteri gram negatif ditandai dengan warna

merah. Tujuan dari pewarnaan ini yaitu memberikan warna pada sel atau bagian-bagian bakteri, sehingga meningkatkan kontras dan memperjelas struktur selnya. Proses ini menggunakan larutan-larutan tertentu seperti kristal violet, larutan lugol, alkohol dan zat pewarna safranin atau air fuchsin. Bakteri gram positif berwarna ungu karena mampu mempertahankan zat pewarna kristal violet, sementara bakteri gram negatif berwarna merah karena kehilangan zat pewarna kristal violet setelah proses dekolorisasi menggunakan alkohol dan akan menyerap zat pewarna safranin atau air fuchsin (Aldina dkk, 2023).

Penelitian ini menggunakan metode pewarnaan gram untuk mengonfirmasi bahwa kultur bakteri uji yang digunakan benar-benar termasuk dalam genus *Bacillus sp.* Pewarnaan gram membantu dalam menentukan bentuk dan sifat bakteri terhadap pewarna.

Hasil pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, ditemukan bakteri *Bacillus sp* yang berbentuk batang dan menunjukkan warna ungu pada pewarnaan gram, menandakan bahwa bakteri ini termasuk dalam kategori gram positif. Secara umum, *Bacillus sp* adalah bakteri aerobik fakultatif yang katalase positif. Genus *Bacillus* berasal dari famili *Bacillaceae* dan umumnya termasuk dalam bakteri berbentuk batang dan gram positif. Beberapa spesies *Bacillus* memiliki sifat proteolitik, mampu menghasilkan enzim proteolitik seperti renin untuk mengentalkan susu, serta sifat lipolitik untuk memecah lipid (Rokhim, 2023).

### **C. Pembahasan**

Penelitian untuk menguji kemampuan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* dilakukan dengan beberapa langkah awal. Pertama, daun sintrong dipilih berdasarkan kriteria objektif, kemudian dibersihkan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama sekitar 3 jam. Setelah itu, daun dihaluskan dan dilakukan proses maserasi untuk menghasilkan ekstrak. Langkah berikutnya meliputi pembuatan media, persiapan konsentrasi ekstrak, serta suspensi bakteri. Pengujian daya hambat terhadap bakteri

dilakukan dengan metode Kirby-Bauer dan dilusi cair, menggunakan lima konsentrasi ekstrak daun sintrong (1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20%). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

Pengujian daya hambat ekstrak daun sintrong menggunakan metode maserasi yaitu teknik ekstraksi yang dilakukan dengan merendam bahan yang akan diekstraksi dalam pelarut organik selama jangka waktu tertentu. Proses perendaman ini menyebabkan pelarut berupa etanol 96% menembus dinding sel tanaman yang sedang diekstraksi, masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan melarutkannya. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut polar efektif dalam mengekstrak lebih banyak bahan aktif dibandingkan etanol dengan konsentrasi lebih rendah. Kelebihan lainnya adalah ekstrak yang dihasilkan memiliki kekentalan dan kemurnian yang tinggi sehingga memudahkan dalam proses identifikasi. Etanol 96% juga menguap dengan mudah, tersedia dengan harga terjangkau, mudah didapatkan dan relatif aman digunakan (Amini, 2019).

Pengujian efek hambatan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* dilakukan menggunakan dua teknik yaitu metode Kirby-Bauer dan dilusi cair. Pengujian dengan dua metode dilakukan untuk memperoleh informasi lengkap mengenai potensi aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme patogen penyebab penyakit. Metode Kirby-Bauer memberikan gambaran mengenai zona hambat ekstrak daun sintrong sedangkan metode dilusi cair menggambarkan seberapa sensitifnya bakteri terhadap ekstrak daun sintrong. Keunggulan metode Kirby-Bauer yaitu pengujian dapat dilakukan secara bersamaan dan efisien tanpa memerlukan banyak sumber daya manusia. Dengan demikian, variasi konsentrasi yang banyak dapat diuji dalam waktu yang relatif singkat. Sedangkan kelebihan metode dilusi cair adalah metode ini lebih sensitif karena bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri (Hasriyani dkk, 2020).

Metode Kirby-Bauer memilih menggunakan Mueller Hinton Agar (MHA) karena media ini berperan sebagai lingkungan optimal untuk pertumbuhan bakteri aerob dan anaerob, serta menyediakan nutrisi yang diperlukan. Media ini dianggap ideal untuk melakukan uji sensitivitas (Rahman dkk, 2022). Dalam penelitian ini, ketebalan media MHA diseragamkan dengan cara mengatur volume yang ditempatkan di dalam cawan petri.

Proses pengujian daya hambat bakteri dilakukan dengan menginkubasi media MHA yang telah tersuspensi bakteri dalam jangka waktu 24 jam didalam inkubator serta dilakukan dua kali percobaan dengan menggunakan *Kloramfenikol* sebagai kontrol positif dan *aquades* sebagai kontrol negatif. *Kloramfenikol* adalah antibiotik spektrum luas yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram negatif, baik aerob maupun anaerob, serta mikoplasma, rickettsia dan klamidia (Kemenkes, 2021). Antibiotik ini memiliki sifat bakteristatik karena menghambat sintesis protein melalui aktivitas peptidil transferase (Helmidanora dkk, 2023). Sedangkan *aquades* adalah pelarut yang digunakan dalam pembuatan pengenceran dan tidak memiliki aktivitas antibakteri. Kontrol positif berfungsi sebagai indikator pembandingan zona hambat pada berbagai konsentrasi perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya zona transparan disekitar kertas cakram, sedangkan kontrol negatif digunakan untuk memastikan bahwa tahapan yang dilakukan sudah sesuai dengan prosedur yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona transparan disekitar kertas cakram.

Hasil pengamatan data dalam tabel 7 menunjukkan bahwa kontrol positif (*kloramfenikol*) membentuk zona hambat dengan diameter sebesar 26,19 mm, yang menunjukkan kategori *susceptible* berdasarkan standar CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) tahun 2023. Pada kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat, menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* Selanjutnya, pada kelima konsentrasi yang diuji (1,25%, 2,5%, 5%, 10%, dan

20%), terdapat zona bening di sekitar kertas cakram. Pada konsentrasi 1,25%, rerata diameter zona hambat adalah 1,69 mm; pada konsentrasi 2,5%, rerata diameter adalah 2,80 mm; pada konsentrasi 5%, rerata diameter adalah 3,31 mm; pada konsentrasi 10%, rerata diameter adalah 5,46 mm dan pada konsentrasi 20%, rerata diameter adalah 8,20 mm.

Berdasarkan diameter zona hambat yang terukur, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar pula diameter zona hambatnya. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram menunjukkan bahwa daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) memiliki potensi sebagai agen antibakteri dengan adanya zona hambat terhadap bakteri *Bacillus sp.* Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Simanungkalit dkk (2020) yang menemukan bahwa rata-rata penghambatan pertumbuhan *Bacillus cereus* oleh ekstrak etanol daun sintrong menunjukkan tingkat kekuatan yang signifikan. Ukuran zona hambat cenderung meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi 20%, diameter penghambatan *Bacillus cereus* mencapai 12,3 mm, sedangkan pada konsentrasi 100%, diameter penghambatan mencapai 14,5 mm. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sintrong secara proporsional meningkatkan ukuran zona hambat karena jumlah zat antibakteri yang terlarut juga meningkat, menghasilkan daya hambat bakteri yang lebih tinggi.

Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan menggunakan metode dilusi cair untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM). Pada metode ini, digunakan Brain Heart Infusion Broth (BHIB) sebagai media yang mendukung pertumbuhan bakteri (Rahman dkk, 2022). Eksperimen dilakukan sebanyak dua kali dengan menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif digunakan untuk memastikan tidak adanya aktivitas hambat bakteri, yang ditunjukkan oleh kekeruhan larutan uji. Sedangkan kontrol negatif untuk memastikan aktivitas hambat terhadap bakteri, yang ditunjukkan oleh kejernihan larutan uji.

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi cair bertujuan untuk menemukan konsentrasi terendah dari ekstrak daun sintrong yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* Observasi dilakukan pada kelompok ekstrak dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, dan 20%. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa nilai KHM ekstrak daun sintrong terhadap bakteri *Bacillus sp* tercapai pada konsentrasi 10%, yang dapat diketahui dari kejernihan pada tabung pengujian.

Hambatan yang terbentuk disebabkan oleh senyawa-senyawa yang terdapat dalam daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*). Setiap senyawa tersebut memiliki kemampuan sebagai agen antibakteri dengan mekanisme yang bervariasi. Mekanisme kerja senyawa antibakteri dapat meliputi kerusakan pada dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah terbentuk, meningkatkan permeabilitas sitoplasma, menghambat kerja enzim, serta mengganggu sintesis asam nukleat dan protein (Malik dkk, 2022).

Bakteri *Bacillus cereus* merupakan salah satu jenis *Bacillus sp* yang dapat mengkontaminasi makanan. Ketika bakteri ini memasuki saluran pencernaan, dapat menyebabkan dua sindrom utama: sindrom emetik (muntah) dan sindrom diare. Sindrom emetik disebabkan oleh toksin cereulide yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus*. Toksin ini mempengaruhi sistem saraf pusat, menghasilkan gejala mual dan muntah. Cereulide tidak mudah dihilangkan dengan prosedur higienis standar dalam pengolahan makanan karena ketahanannya terhadap pH, panas dan proses proteolisis dalam makanan. Sindrom diare dan kram perut disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan oleh bakteri hidup di usus kecil. Enterotoksin ini meliputi enterotoksin hemolisin BL (HBL) dan enterotoksin non-hemolitik (NHE) dari endospora *Bacillus cereus*. HBL memiliki aktivitas hemolitik dan demonekrotik serta dapat meningkatkan sekresi cairan dalam usus. Sementara itu, NHE menyebabkan lisis osmotik dengan membentuk pori-pori transmembran. Dosis infeksi *Bacillus cereus* saat dikonsumsi adalah antara  $10^5$  hingga  $10^8$  sel per gram makanan (Apriliyansyah dkk, 2022).

Daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) dapat dimanfaatkan sebagai sayuran untuk mencegah keracunan pangan yang menyebabkan muntah dan diare karena mengandung senyawa antibakteri seperti polifenol, flavonoid, saponin dan tanin yang dapat membantu melawan bakteri penyebab keracunan pangan seperti *Bacillus sp* (Suci dkk, 2020). Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri, yaitu penetrasi ke dalam peptidoglikan dinding sel bakteri sehingga lapisan sel menjadi tidak utuh dan pertumbuhan bakteri terhambat. Polifenol menghambat bakteri dengan cara berperan sebagai toksin di dalam protoplasma yang mampu merusak dinding sel bakteri dan mengendapkan protein sel bakteri. Saponin yang terlihat seperti busa mampu mengganggu tegangan permukaan dinding sel. Ketika tegangan permukaan kacau, agen antibakteri dapat masuk ke dalam sel dan mengganggu metabolisme sehingga mengakibatkan kematian bakteri. Tanin bereaksi dengan protein untuk membentuk ion H<sup>+</sup> yang mengakibatkan pH menjadi asam, menyebabkan denaturasi protein dan menghasilkan kondisi asam. Keadaan asam tersebut dapat mengakibatkan inaktivasi enzim-enzim seluler, yang pada akhirnya mengganggu metabolisme sel bakteri sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian sel.

Hasil penelitian metode Kirby-Bauer dan dilusi cair menunjukkan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus sp*. Kelima konsentrasi pada metode Kirby-Bauer hasilnya tetap *resistant* atau lemah karena zona bening yang terbentuk hanya berdiameter  $\leq 14$  mm. Pada percobaan pertama didapatkan hasil kontrol positif membentuk zona bening sebesar 24,1 mm, konsentrasi 20% sebesar 6,6 mm, konsentrasi 10% sebesar 3,125 mm dan konsentrasi 5%, 2,5%, 1,25% serta kontrol negatif tidak membentuk zona bening. Sedangkan pada percobaan kedua diperoleh hasil kontrol positif sebesar 28,275 mm, konsentrasi 20% sebesar 9,8 mm, konsentrasi 10% sebesar 7,8 mm, konsentrasi 5% sebesar 6,625 mm, konsentrasi 2,5% sebesar 5,6 mm, konsentrasi 1,25% sebesar 3,375 mm dan kontrol negatif tidak membentuk zona bening.

Perubahan diameter zona bening pada saat percobaan pertama dan percobaan kedua dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi mikroba uji pada permukaan medium yang apabila konsentrasi mikroba semakin tinggi maka zona penghambatan akan semakin kecil. Pada penelitian ini, kekeruhan suspensi bakteri tidak diukur menggunakan alat densitometer tetapi hanya dibandingkan dengan kekeruhan standar McFarland menggunakan mata telanjang. Laju difusi antibakteri dan interaksi antibakteri dengan media serta kepadatan atau viskositas media biakan juga dapat mempengaruhi ukuran zona hambat (Sari dkk, 2022).

Zona hambat yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh karakteristik struktural *Bacillus sp.* *Bacillus sp* adalah jenis bakteri gram positif yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif. Hal ini menyebabkan dinding selnya menjadi lebih kaku. Karena keberadaan peptidoglikan ini, senyawa antibakteri lebih sulit untuk menembus dinding sel bakteri gram positif dibandingkan dengan bakteri gram negatif (Zahra dkk, 2022).

Suhu inkubasi juga bisa menjadi faktor yang memengaruhi ukuran zona hambat pertumbuhan bakteri. Untuk mencapai pertumbuhan yang optimal, inkubasi dilakukan pada suhu 35°C. Suhu dibawah 35°C dapat menyebabkan zona bening yang lebih besar, sedangkan suhu diatas 35°C dapat merusak difusi ekstrak. Dalam penelitian ini, suhu inkubasi yang digunakan adalah 37°C selama 1x24 jam. Suhu diatas 35°C dapat menyebabkan difusi ekstrak dan akhirnya memengaruhi efektivitas hambat dalam penelitian ini (Listuhayuni dkk, 2023).

Hasil pengamatan data pada tabel 8 menunjukkan kontrol positif keruh yang berarti ada pertumbuhan bakteri. Pada kontrol negatif jernih atau tidak keruh yang menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* Kemudian pada ke 5 konsentrasi yaitu konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20% yang di uji, di percobaan pertama terdapat tabung yang jernih yakni pada konsentrasi 10% dan 20% sedangkan konsentrasi 5%, 2,5% dan 1,25% tabungnya keruh. Pada

percobaan kedua konsentrasi 10% dan 20% menunjukkan kejernihan di tabungnya sedangkan 5%, 2,5% dan 1,25% menunjukkan kekeruhan.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa pada metode dilusi cair, baik pada percobaan pertama maupun percobaan kedua menunjukkan hasil yang serupa yaitu hambatan yang hanya terbentuk pada kontrol positif, konsentrasi 10% dan konsentrasi 20%, sehingga nilai KHM yang ditetapkan adalah 10%. Daya hambat ini dapat dipengaruhi oleh kandungan kimiawi yang terdapat di dalam daun sintrong. Perbedaan lokasi dan waktu pengambilan daun sintrong akan menghasilkan kandungan senyawa metabolit yang berbeda pula. Menurut Malik dkk (2022) kadar flavonoid daun sintrong yang berasal dari Kabupaten Konawe sebesar 6,751 mg/g lebih tinggi daripada daun bandotan yang hanya sebesar 2,898 mg/g. Pada penelitian ini, daun sintrong dipetik pada bulan Mei 2024 di Kelurahan Ambalodangge, Kecamatan Laeya, Kabupaten Konawe Selatan. Tidak dilakukannya uji kadar senyawa kimiawi menyebabkan kadar senyawa antibakteri pada daun sintrong yang diteliti tidak diketahui secara pasti. Hal ini dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh selama penelitian.

Kandungan unsur hara dalam tanah dan paparan sinar matahari juga dapat memengaruhi tingkat metabolit sekunder. Paparan sinar matahari yang diterima oleh tanaman dapat membantu proses produksi metabolit sekunder. Namun, jika paparan sinar matahari terlalu berlebihan, produksi metabolit sekunder akan menurun. Selain itu, kekurangan unsur hara dalam tanah juga dapat memengaruhi kualitas dan kuantitas metabolit sekunder (Zahra dkk, 2022).

Penelitian ini menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh lebih baik pada metode Kirby-Bauer dibandingkan metode dilusi cair. Hal ini disebabkan pada metode Kirby-Bauer ketebalan media MHA telah sesuai dengan literatur yaitu 4 mm. Zona hambat pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh ketebalan media. Ketebalan media ideal adalah sekitar 4 mm. Jika kurang dari 4 mm, difusi ekstrak berjalan lebih cepat. Sebaliknya jika lebih dari 4 mm, difusi ekstrak berjalan lebih lambat (Khafipah dkk, 2022).

Nilai KHM seharusnya ditunjukkan dengan penurunan pertumbuhan koloni sebesar 90% atau 1 log CFU/ml (Daris dkk, 2023). Akan tetapi, dalam penelitian ini penentuan KHM hanya mengandalkan pengamatan langsung pada tabung untuk melihat kekeruhan dan kejernihan larutan uji sehingga tidak dapat diketahui secara pasti penurunan pertumbuhan bakteri. Kekurangan metode pengamatan visual ini yaitu kemampuan subjektif mata setiap orang yang dapat menimbulkan kesalahan.

Kemampuan ekstrak daun sintrong dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* pada konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20% sesuai dengan penelitian terdahulu yang juga menggunakan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) sebagai antibakteri karena dapat membentuk zona bening meskipun dalam kategori *resistant*. Penelitian terdahulu oleh Suci dkk (2020) menunjukkan bahwa ekstrak daun sintrong pada konsentrasi 10% dan 30% masing-masing membentuk rerata zona bening yang tergolong *resistant* yaitu sebesar  $\pm 9,82$  mm dan  $\pm 10,82$  mm. Penelitian lain yang dilakukan oleh Maimunah dkk (2020) menunjukkan bahwa ekstrak dari daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) dapat berperan sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi efektif 10%, yang zona hambatnya termasuk *resistant* yaitu sebesar 6,5 mm.

Berdasarkan hasil penelitian, setelah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Zahra dkk (2022) yang menggunakan daun mengkudu untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* diketahui bahwa ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) memiliki kemampuan yang setara dengan daun mengkudu. Ekstrak daun sintrong membentuk zona bening yang termasuk dalam kategori *resistant*, serupa dengan zona bening yang dibentuk oleh ekstrak daun mengkudu. Hal ini disebabkan karena daun sintrong dan daun mengkudu mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin.

Secara keseluruhan penelitian memberikan hasil bahwa daun sintrong secara positif mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* meskipun zona hambatnya masih dalam kategori *resistant* (CLSI, 2023). Hal ini disebabkan oleh sifat bakteri, bakteri *Bacillus sp* merupakan bakteri gram

positif yang memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif sehingga membuat ekstrak daun sintrong yang kaya akan senyawa antibakteri agak sulit untuk menembus dinding sel bakteri gram positif.

Faktor lain yang mempengaruhi hambatan ekstrak daun sintrong terhadap bakteri *Bacillus sp* adalah konsentrasi mikroba uji pada permukaan medium, temperatur inkubasi, ketebalan media dan kandungan senyawa antibakteri yang ada pada daun.