

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Penelitian uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilaksanakan dari tanggal 28 Mei sampai dengan 24 Juni 2024 di Laboratorium Mikrobiologi Bina Husada Kendari. Adapaun lokasi pengambilan sampel daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dilakukan di kebun warga Perumahan Swarna Dwipa, Jalan Ade Irma Nasution, Kelurahan Watubangga, Kecamatan Baruga, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara. Berikut adalah lokasi pengambilan sampel:



**Gambar 8.** Lokasi Pengambilan Sampel Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*)  
(Sumber: Google Maps, 2024)

#### B. Hasil Penelitian

Penelitian ini melihat uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, yang dilakukan dalam empat tahapan, yaitu:

##### 1. Proses Pengeringan

Tahap pertama adalah mempersiapkan daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) sekitar 4000 gram yang dikumpulkan secara bertahap dari lokasi kebun warga. Selanjutnya daun bandotan dibersihkan, dikeringkan menggunakan oven selama 150 menit, dan dihaluskan menggunakan blender khusus untuk bahan kering, lalu disaring hingga diperoleh 500 gram serbuk daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*).

##### 2. Proses Ekstraksi

Setelah memperoleh serbuk daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*), tahap kedua adalah melakukan ekstraksi daun bandotan dengan metode

maserasi menggunakan larutan etanol 96% selama 3×24 jam. Setelah proses maserasi selama 3×24 jam, maserat tersebut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat ini kemudian dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% menggunakan metode difusi sumuran.

### 3. Proses Peremajaan Bakteri

Tahap ketiga adalah peremajaan bakteri *Streptococcus mutans*. Media *Nutrient Agar* (NA) yang telah disterilkan dituangkan ±5 ml dalam tabung reaksi dan dimiringkan hingga padat menjadi media NA miring, lalu disisihkan dan dijaga agar tetap steril.

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mensterilkan jarum ose menggunakan pemanas bunsen dan dibiarkan sejenak, lalu digunakan untuk mengambil bakteri *Streptococcus mutans* dari biakan murni yang ada di tabung inokulasi. Bakteri tersebut kemudian diremajakan pada media agar NA miring dengan menggunakan metode gores atau *streak plate* dengan pola zig-zag di permukaan media, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator.

### 4. Proses Pembuatan Sumuran

Tahap keempat adalah membuat lubang sumuran pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri *Streptococcus mutans*. Setiap lubang kemudian diisi dengan ekstrak daun bandotan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, masing-masing sebanyak 70 µl. Setelah itu, media diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2×24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran kemudian diamati dan diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

Hasil penelitian dengan 5 (lima) variasi konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi sumuran, diamati lalu diukur secara duplo zona hambat berwarna bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran (Tabel 3).

**Tabel 3. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans***

No.	Perlakuan	Waktu Pengamatan	Diameter Zona Hambat (mm)		Rata-rata (mm)	Interpretasi
			P1	P2		
1.	Konsentrasi 20%	2×24 jam	0	0	0	Tidak ada daya hambat
2.	Konsentrasi 40%	2×24 jam	0	0	0	Tidak ada daya hambat
3.	Konsentrasi 60%	2×24 jam	0	0	0	Tidak ada daya hambat
4.	Konsentrasi 80%	2×24 jam	0	2,22	1,11	Resisten
5.	Konsentrasi 100%	2×24 jam	5,42	4,6	5,01	Resisten
6.	Kontrol Positif ( <i>Kloramfenikol</i> )	2×24 jam	20,85	21,4	21,12	Sensitif
7.	Kontrol Negatif (DMSO)	2×24 jam	0	0	0	Tidak ada daya hambat

(Sumber : Data Primer, 2024)

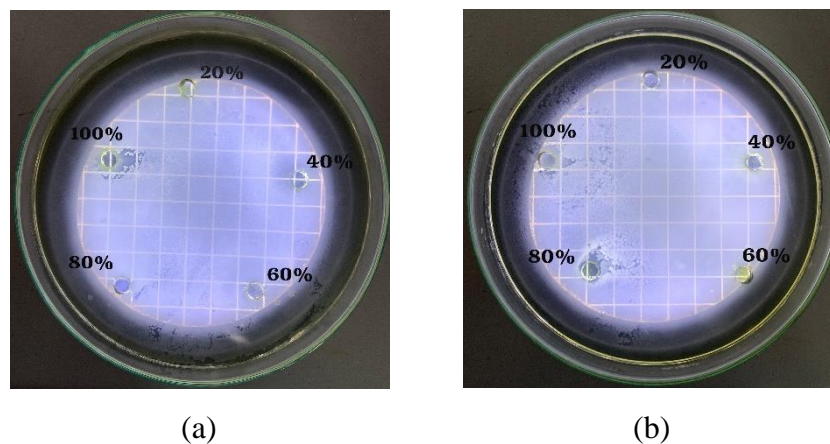
Keterangan : Resisten :  $\leq 17$  mm  
 Intermediet: 18-20 mm  
 Sensitif :  $\geq 21$  mm  
 P1 : Perlakuan 1  
 P2 : Perlakuan 2

Berdasarkan Tabel 3 di atas, terlihat bahwa rata-rata zona hambat tertinggi ditemukan pada kontrol positif sebesar 21,12 mm. Sedangkan pada sampel menggunakan daun bandotan, rata-rata zona hambat terlihat pada konsentrasi 80% sebesar 1,11 mm dan 100% sebesar 5,01 mm. Berdasarkan ketentuan CLSI (2021), zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 80% dan 100% termasuk kategori daya hambat yang resisten atau lemah yaitu  $\leq 17$  mm.

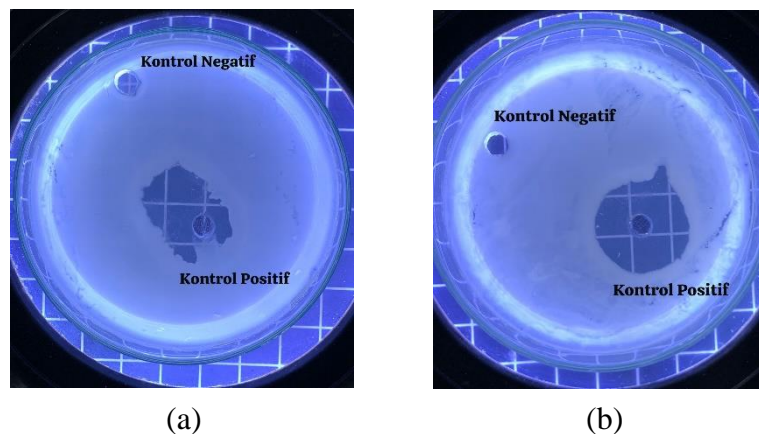
Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik *kloramfenikol* dan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO. Pada kontrol positif, zona hambat yang terbentuk termasuk dalam kategori daya hambat yang sensitif atau kuat terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan pada kontrol negatif tidak terdapat daya hambat yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa

DMSO sebagai kontrol negatif tidak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada Gambar 9 dan Gambar 10, terlihat lingkaran zona hambat yang mengelilingi lubang sumuran, yang menunjukkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, yang akan disimpulkan dalam bentuk angka pengukuran (milimeter).

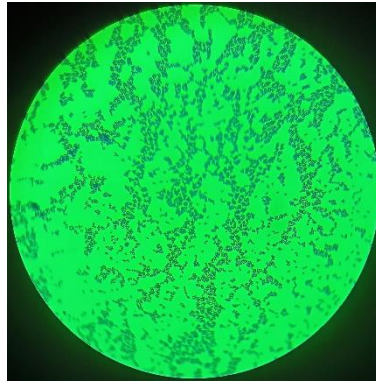


**Gambar 9.** Hasil Pengamatan Daya Hambat Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*) pada 5 Variasi Konsentrasi Perlakuan Pertama (a) dan Kedua (b) (Sumber: Data Primer, 2024)



**Gambar 10.** Hasil Pengamatan Daya Hambat Kontrol Positif (*Kloramfenikol*) dan Kontrol Negatif (DMSO) Perlakuan Pertama (a) dan Kedua (b) (Sumber: Data Primer, 2024)

Sedangkan pengamatan terhadap pewarnaan Gram pada bakteri *Streptococcus mutans*, diperoleh hasil identifikasi bakteri Gram positif, berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter sekitar 1  $\mu\text{m}$  (Asri & Hartatiek, 2017). Dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



**Gambar 11.** Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram Bakteri *Streptococcus mutans*  
(Sumber: Data Primer, 2024)

### C. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap, meliputi pengeringan daun bandotan, pembuatan ekstrak, pembuatan media, pembuatan konsentrasi ekstrak, pembuatan suspensi bakteri, pengujian daya hambat bakteri, hingga pengukuran zona hambat. Dalam penelitian ini, dilakukan metode pengeringan menggunakan oven pada suhu antara 50°C selama 150 menit, karena metode ini efektif dalam mengurangi kadar air dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat (Dharma dkk, 2020).

Pembuatan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dilakukan menggunakan metode maserasi. Dalam proses maserasi tidak melibatkan pemanasan yang dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang tidak tahan panas pada simplisia daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) (Jungjunan, 2022). Maserasi dilakukan dengan merendam sampel dalam pelarut etanol 96% di dalam wadah toples kaca yang ditutup rapat selama 3×24 jam. Sampel diaduk setiap 6 jam selama 5 menit untuk memastikan keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi tercapai lebih cepat dalam cairan. Adapaun penggunaan etanol sebagai pelarut dalam proses maserasi ini dikarenakan etanol mampu melarutkan hampir semua jenis zat, baik yang bersifat polar, semi-polar, maupun non-polar. (Sulistyarini dkk, 2020).

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media ini dipilih karena direkomendasikan oleh FDA dan WHO untuk uji antibakteri terutama pada bakteri aerob dan fakultatif aerob (Marliana dkk,

2022). MHA juga dikenal sebagai media *universal* yang kaya akan nutrisi yang mendukung pertumbuhan bakteri. Media ini mengandung *sulfonamide*, *trimethoprim*, dan inhibitor *tetrasiklin* dalam kadar rendah, serta memberikan kondisi pertumbuhan yang optimal bagi patogen (Handayani dkk, 2019).

DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) digunakan sebagai pelarut sampel dan kontrol negatif. Sebagai pelarut, DMSO mampu melarutkan hampir semua senyawa, baik yang polar maupun non-polar. DMSO tidak mempengaruhi mikroorganisme, termasuk dalam pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan (Handayani dkk, 2019).

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* pada penelitian ini dilakukan menggunakan larutan NaCl 0,9%. Larutan NaCl 0,9% dipilih karena kemiripannya dengan cairan tubuh. Suspensi bakteri disesuaikan kekeruhannya dengan standar *McFarland* untuk mempermudah perhitungan jumlah bakteri dan menilai kepadatan sel yang digunakan dalam pengujian antimikroba. Suspensi bakteri kemudian diolesi merata pada permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk memastikan hasil pengukuran zona hambat yang jelas dan akurat (Nicoloff dkk, 2019).

Penggunaan kontrol positif berfungsi sebagai pembanding dalam menentukan kemampuan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan kontrol negatif berfungsi untuk membuktikan bahwa pelarut tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri dari larutan uji (Wardaniati & Gusmawarni, 2021).

Penelitian ini menggunakan *kloramfenikol* sebagai kontrol positif dan diameter rata-rata zona hambat yang dihasilkan sebesar 21,12 mm, yang dikategorikan sensitif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Hal tersebut dikarenakan *kloramfenikol* merupakan antibiotik spektrum luas yang efektif melawan beberapa jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif, baik dalam lingkungan aerob maupun anaerob. Sesuai dengan mekanisme kerja *kloramfenikol* melibatkan struktur D(-) treo-isomer sebagai agen antibakteri

yang menghambat pembentukan rantai ikatan peptida, sehingga menyebabkan gangguan pada proses sintesis protein (Nurhayat, 2020). Sementara itu, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan hasil pengukuran zona hambat yang dihasilkan sebesar 0 mm, yang menunjukkan bahwa tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Hal ini karena larutan DMSO tidak mematikan atau menumbuhkan mikroorganisme, sehingga tidak mengganggu pengamatan aktivitas antibakteri saat pengujian *Streptococcus mutans* (Handayani dkk, 2019).

Berdasarkan hasil penelitian pada (Tabel 3), ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) pada konsentrasi 20%, 40%, dan 60%, tidak menunjukkan adanya zona bening (0 mm) di sekitar lubang sumuran. Sedangkan pada konsentrasi 80% dan 100%, ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan rata-rata diameter zona hambat masing-masing sebesar 1,11 mm dan 5,01 mm. Menurut ketentuan CLSI (2021), zona hambat  $\leq 17$  mm termasuk dalam kategori daya hambat yang resisten atau lemah.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Anggraini (2022), yang menguji daya hambat ekstrak metanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 10%, 20%, dan 30% menggunakan metode *kirby-bauer*. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun bandotan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* namun masih dalam kategori resisten atau lemah, yaitu dengan diameter zona hambat pada konsentrasi 10% sebesar 7,3 mm, konsentrasi 20% sebesar 8,1 mm, dan konsentrasi 30% sebesar 8,9 mm.

Ada berbagai faktor yang dapat memengaruhi ukuran diameter zona hambat yang terbentuk di lubang sumuran, seperti kecepatan difusi, ukuran molekul, stabilitas bahan antibakteri, sifat media agar yang digunakan, jumlah organisme yang diinokulasi, kecepatan tumbuh bakteri, konsentrasi bahan kimia, dan kondisi inkubasi (Yogi & Dewi, 2023).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi daya hambat, yaitu homogenitas ekstrak dan pelarut saat pengenceran. Jika pengenceran tidak merata,

konsentrasi aktif ekstrak tidak akan terjaga, yang dapat menyebabkan variasi dalam daya hambat yang dihasilkan. (Lutfiah dkk, 2023). Pada penelitian ini tidak menggunakan *stirer* untuk menghomogenkan ekstrak dan pelarut, sehingga proses pencampuran tidak berlangsung secara optimal dan mengakibatkan ekstrak dan pelarut tidak tercampur dengan merata.

Perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar juga dapat mempengaruhi daya hambat. Media tipis menghasilkan zona hambat lebih besar karena difusi lebih cepat, sedangkan media tebal menghasilkan zona hambat lebih kecil karena difusi lebih lambat. Ketebalan media yang tidak standar dapat menyebabkan hasil uji yang tidak konsisten dalam pengukuran zona hambat bakteri (Flanagan & Steck, 2017). Dalam penelitian ini, digunakan cawan petri berukuran 150×15 mm dengan media *Muller Hinton Agar* (MHA) yang umumnya memiliki ketebalan sekitar 4-5 mm. Namun, ketebalan MHA tidak diukur secara spesifik selama proses penelitian, sehingga tidak diketahui dengan pasti ketebalan media agar yang digunakan.

Selain itu, suhu inkubasi dapat mempengaruhi daya hambat bakteri. Suhu optimal untuk banyak kultur bakteri adalah 37°C, karena suhu ini mendukung pertumbuhan terbaik dan difusi antibiotik atau agen antibakteri lainnya yang paling akurat (Trianes dkk, 2022). Dalam penelitian ini, stabilitas suhu saat inkubasi tidak stabil karena lamanya jangka waktu pembukaan inkubator yang mempengaruhi suhu inkubator, sehingga adanya perubahan suhu terhadap setiap cawan. Selain itu, terdapat tiga atau lebih cawan media yang ditumpuk selama proses inkubasi.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah ketika *plate* dibungkus, akan terjadi goyangan pada *plate* yang bisa menyebabkan ekstrak tumpah dari lubang sumuran, sehingga berpotensi memengaruhi pembentukan zona hambat. Keadaan ini umumnya terjadi ketika cawan petri tidak dibungkus dengan baik atau terdapat variasi tekanan dalam cawan petri (Eloff, 2019). Pada penelitian ini, kertas yang digunakan untuk membungkus cawan petri tidak steril dan kurangnya ketelitian pada saat pembungkusan yang menyebabkan media goyang dan berpotensi ekstrak tumpah dari lubang sumuran.



Zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder seperti *flavonoid*, *saponin*, *tanin*, dan *alkaloid* yang terdapat dalam daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*), yang memiliki sifat antibakteri pada *Streptococcus mutans*. *Flavonoid* bekerja dengan membentuk senyawa kompleks, memengaruhi enzim biosintesis lemak bakteri, dan merusak kesehatan sel, mengurangi pembentukan biofilm. *Saponin* dengan gangguan permeabilitas sel dan pengaruh pada enzim biosintesis lemak bakteri, menunjukkan potensi sebagai agen antibakteri efektif (Mulyantini dkk, 2020).

*Tanin* berpotensi sebagai antibakteri dengan cara melekat pada membran sel bakteri, merusak dinding sel, dan mengganggu metabolisme bakteri. Sedangkan *alkaloid* bertindak sebagai antibakteri dengan menghentikan sintesis dinding sel, menyebabkan lisis dinding sel, dan menghambat pertumbuhan bakteri (Mulyantini dkk, 2020). Pada penelitian ini, kadar senyawa metabolit sekunder dalam daun bandotan seperti *flavonoid*, *saponin*, *tanin*, dan *alkaloid* belum diuji. Sehingga belum diketahui kadar mana yang secara spesifik memengaruhi efek penghambatan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Dari hasil pembahasan di atas, disimpulkan bahwa uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) pada konsentrasi 80% dan 100% menunjukkan resistensi terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, tetapi sensitif pada kontrol positif yaitu *kloramfenikol*. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh faktor-faktor seperti ketebalan media yang digunakan, kurangnya homogenitas ekstrak dan pelarut saat pengenceran, dan suhu inkubator yang tidak optimal. Hal tersebut yang dapat mempengaruhi daya hambat ekstrak daun bandotan menjadi tidak efektif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.