

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi daun sirih

Determinasi daun sirih merah dilakukan di Bakai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu dan untuk daun sirih hijau dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman yang akan diteliti, selain itu untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil serta untuk menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman obat lain. Dapat dilihat pada lampiran 3.

A. Pembuatan infusa

Infusa yang digunakan merupakan hasil panen daun sirih merah dan daun sirih hijau yang dipilih yang berusia seragam yang dilihat dari warna daunnya dengan ukuran yang homogen. Daun sirih merah dan hijau diambil dari daerah Jatisrono, Wonogiri. Cara pembuatan infusa daun sirih yaitu, daun ditimbang sebanyak 100 gram pada masing-masing daun sirih kemudian daun dicuci dengan air mengalir bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel selanjutnya daun dirajang/dipotong-potong. Kemudian dipanaskan air pada panci infusa yang sudah berisi aquades sebanyak 200 ml selanjutnya dimasukkan tanaman sirih kedalam panci dan diamati suhu hingga mencapai suhu 90⁰C selanjutnya ditunggu selama 15 menit dengan sesekali diaduk, apabila sudah mencapai dengan waktu yang ditentukan dimatikan kompor ditiriskan/disaring infusa menggunakan kain flannel sampai bobot infusa 100 ml (Depkes RI, 2000).

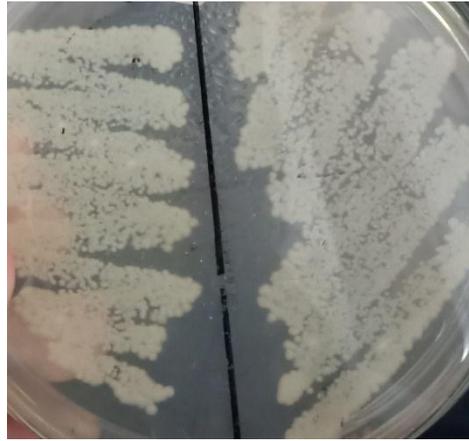
Selanjutnya masing-masing infusa dibuat seri konsentrasi yaitu 60%, 80% dan 100% dari infusa daun sirih hijau dan daun sirih merah. Kegunaannya untuk mengetahui seberapa besar zona hambat pada konsentrasi tersebut. Selain itu sebagai pembanding pada daya hambat infusa sirih tersebut. Dapat dilihat pada lampiran 6.

B. Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

1. Identifikasi morfologi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

. *Klebsiella pneumoniae* dengan cara kultur murni *Klebsiella pneumoniae* disubkultur (diremajakan) dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri *Klebsiella pneumoniae* kedalam media NA yang telah disterilisasi menggunakan autoklaf lalu dibiarkan memadat, kemudian media diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Media NA yang sudah diinkubasi selama 24 jam diamati mulai dari bentuk, warna dan banyaknya bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

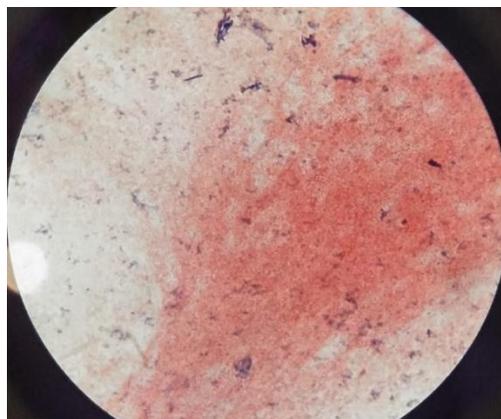
Hasil dari pengamatan morfologi *Klebsiella pneumoniae* yaitu koloni pada media padat tumbuh koloni mucoid, koloni putih keabuan dan permukaan mengkilap, sudut elevasi cembung (Anderson, K.F., Lonsway, D.R. & Rasheed, J.K., 2007). Dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 1. Identifikasi morfologi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

2. Identifikasi pewarnaan gram bakteri *Klebsiella pneumonia*

Pewarnaan Gram dilakukan bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri uji yang digunakan yaitu *Klebsiella pneumonie* ATCC 10031 termasuk dalam golongan bakteri gram negatif. Bakteri uji *Klebsiella pneumonie* ATCC 10031 diperoleh hasil dengan warna merah, bentuk batang kecil. *Klebsiella pneumoniae* adalah organisme batang pendek. Bentuk batang pendek dengan ukuran 0,5-1,5 mikron. Memiliki selubung yang lebarnya 2 sampai 3 kali ukuran kuman. Mudah dibiakkan pada media sederhana. Prinsip pewarnaan Gram adalah kemampuan dinding sel terhadap zat warna dasar (Kristal violet) setelah pencucian alkohol 96%. Bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena dinding selnya mengikat Kristal violet lebih kuat, sedangkan sel Gram negatif mengandung lebih banyak lipid sehingga pori-pori mudah membesar dan Kristal violet mudah larut saat pencucian alkohol (Fardiaz, 1989). Dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 2. Pewarnaan Gram Bakteri *Klebsiella pneumonia*

3. Identifikasi uji biokimia bakteri *Klesiella pneumonia*

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Uji Biokimia Bakteri *Klesiella pneumoniae*

No	Uji biokimia	<i>Klesiella pneumoniae</i>
1.	SIM Sulfur Indol Motility	negatif/- negatif/- negatif/-
2.	KIA Lereng/dasar Sulfur	kuning/kuning negatif/-
3.	LIA Lereng/dasar Sulfur	ungu/ungu negatif/-
4.	citrate	positif/+

Keterangan :

SIM : Sulfida Indol Motility

KIA : Kliger Iron Agar

LIA : Lysin Iron Agar

+ : Reaksi positif

- : Reaksi negative

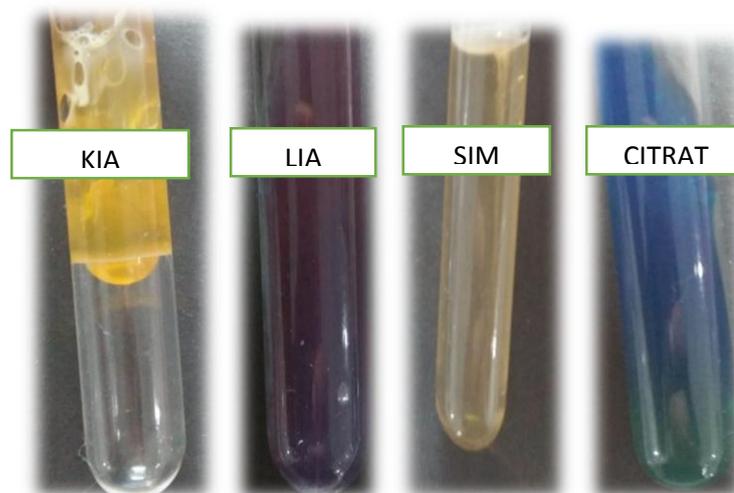
Hasil pengujian pada SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfide indol dan motilitas. Uji sulfide (-) karena tidak dapat mereduksi *thiosulfate* sehingga tidak menghasilkan *hydrogen* sulfat sehingga menyebabkan media tidak berwarna hitam. Uji indol (-) karena tidak terbentuk cincin merah pada media setelah ditambah reagen *Erlich* A dan B 3 tetes ini berarti uji indol negatif, bakteri *Klesiella pneumoniae* ATCC 10031 tidak terbentuk cincin indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptonase menjadi indol dan asam piruvat sehingga menunjukkan bakteri tidak memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan parametil amino bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas negatif karena tidak ada pertumbuhan bakteri disekitar bekas tusukan, hal ini

menunjukkan tidak adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini tidak memiliki flagel (Bibiana, 1994).

Hasil uji pada medium KIA untuk mengetahui fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfide. Hasil yang diperoleh menunjukkan A/AS⁻ G, artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, S (-) artinya H₂S negatif ditunjukkan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung laktosa dan glukosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% glukosa dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam (Brooks *et al.*, 2008; Lehman, 2013).

Medium LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfide. Pengujian LIA setelah diinkubasi 24 jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil K/KS, K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekaboksilasi lisin menyebabkan raksi basa (warna ungu) diseluruh media karena warna pembenihan ini mengandung bromkresol ungu dari warna coklat menjadi warna ungu, (S⁻) artinya uji H₂S negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam (Brook *et al.*, 2008; Hart, 1997).

Hasil pengujian pada medium citrat yaitu sebagai satu-satunya sumber karbon. Enzim sitrat yang dihasilkan bakteri memecah sitrat yang berasal dari natrium sitrat dalam media menjadi piruvat yang selanjutnya akan direduksi pada proses fermentasi. Uji sitrat menggunakan indikator bromthymol blue. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri dan terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi biru yang disebabkan oleh peningkatan pH medium di atas 7,6 karena adanya ammonia yang dihasilkan yang berasal dari monoammonium phosphate yang terdapat pada medium. Biakan diinokulasi pada media simon sitrat agar dengan inokulum yang tipis kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Jika hasil positif terjadi perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru yang bermakna pertumbuhan bakteri pada medium sitrat menghasilkan keadaan alkalis dan bakteri telah menggunakan sitrat. *Klebsiella pneumoniae*. Memberikan reaksi positif terhadap penggunaan sitrat (Elmer, 2006). Dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 3. Uji biokimi bakterI *Klebsiella pneumoniae* SIM KIA LIA CITRAT

D. Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

Bakteri uji *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 dalam biakan murni diambil satu sampai dua ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) secara aseptis yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan Mc. Farland agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada lampiran 7.

E. Hasil pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah dan daun sirih hijau secara *difusi disk*

Hasil infusa daun sirih merah dan daun sirih hijau dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 dengan metode *difusi disk*. Konsentrasi infusa daun sirih merah dan daun sirih hijau adalah 60%, 80%, 100%, dengan kontrol (+) berupa antibiotik ciprofloxacin yang berbentuk cakram dan kontrol (-) berupa aquades. Terbentuknya zona hambat menunjukkan daya aktivitas antibakteri pada infusa daun sirih hijau dan merah dapat dilihat pada pengujian infusa terhadap bakteri uji yang di biakkan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk mengetahui tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 pada media MHA. Dapat dilihat pada table 2.

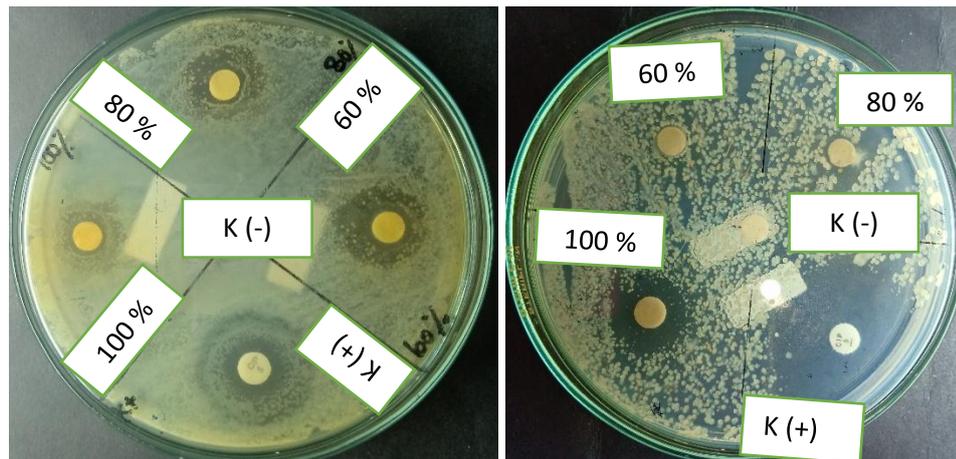
Tabel 2. Diameter zona hambat terhadap *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

No	konsentrasi	diameter zona hambat						rata-rata (mm)	
		infusa sirih merah (mm)			infusa sirih hijau (mm)			merah	hijau
		I	II	III	I	II	III		
.	60%	0	0	0	11	15	8	0	11,3
2.	80%	0	0	0	8	11	7	0	8,6
3.	100%	16	18	8	10	9	10	14	9,7
4.	kontrol (-)	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	kontrol (+)	32	31	13	18	11	14	25,3	14,3

Keterangan :

K (-) : Aquades

K (+) : Antibiotik Ciprofloxacin



a. Sirih hijau

b. Sirih merah

Gambar 4. Hasil zona hambat pada infusa daun sirih hijau dan daun sirih merah

Penelitian ini diperoleh bahwa infusa daun sirih merah memiliki zona hambat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Infusa daun sirih merah menunjukkan hasil terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 100%. Sedangkan pada infusa daun sirih hijau memiliki konsentrasi zona hambat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, ditunjukkan pada konsentrasi 60%, 80%, 100%. Hasil penelitian menggunakan metode *difusi disk* menunjukkan bahwa kedua infusa tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Akan tetapi hasil yang paling bagus diperoleh dari infusa daun sirih hijau karena semua konsentrasinya dapat membunuh bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini berkaitan dengan kandungan senyawa kimia dari kedua infusa tersebut seperti ester, flavonoid, alkaloid, dan asam benzoat (Foo *et al.*, 2015) yang memiliki efek antimikroba kuat.

Selain itu daun sirih juga mengandung minyak atsiri. Minyak atsiri (fenol) diketahui terdiri dari gugus hidroksil (-OH) dan karbonil. Minyak atsiri ini akan berinteraksi dengan sel bakteri dengan cara adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan lemah

dan segera mengalami penguraian. Hal ini akan diikuti masuknya fenol ke dalam sel dan menyebabkan denaturasi dan presipitasi protein. Pada kadar tinggi, fenol dapat menyebabkan koagulasi protein sehingga sel membran mengalami lisis (Parwata, 2008). Kemungkinan besar pada konsentrasi 60% dan 80% pada infusa daun sirih merah terjadi kontaminasi sehingga mengakibatkan zona hambat yang dihasilkan kecil terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*, selain itu karena penggoresan tidak rata sehingga bakteri yang dihambat sedikit.

Penelitian ini menggunakan metode *difusi disk* sebagai perantara dalam pengujian aktivitas antibakteri. Zona hambat hasil biakan infusa daun sirih merah dan hijau terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 dapat dilihat pada tabel 2.

Hasil pengujian ini menggunakan antibiotik ciprofloxacin sebagai kontrol positif dengan kontrol negatif aquades sebagai pelarut pada pembuatan infusa daun sirih merah dan daun sirih hijau. Hasil pengujian antibakteri infus sirih terhadap *Klebsiella pneumoniae* dilakukan pengulangan tiga kali. Dari data tersebut maka dapat disimpulkan pada infusa daun sirih merah dapat menghambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 100% dengan rata-rata besar zona hambat 14mm. Sedangkan pada infusa daun sirih hijau dapat menghambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 60%, 80% dan 100% dengan masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata zona hambat yaitu 60% sebesar 11,3mm, 80% sebesar 8,6mm, dan 100% sebesar 9,7mm. Sedangkan pada kontrol positif yaitu antibiotik ciprofloxacin menghambat pertumbuhan bakter *Klebsiella pneumoniae* dengan rata-rata besar zona hambat pada sirih merah 25,3mm dan pada

sirih hijau 14,3mm pada kontrol negatif aquades tidak dapat menghambat bakteri *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031.

Dari data table 2 dapat disimpulkan bahwa pada infusa daun sirih merah dan hijau dari berbagai macam konsentrasi lebih besar zona hambatnya yaitu pada infusa daun sirih merah dengan rata-rata 14mm pada konsentrasi 100%. Sedangkan pada kontrol positifnya yaitu antibiotik ciprofloxacin lebih besar rata-rata zona hambat sirih merah yaitu 25,3mm. Berdasarkan table 3 bahwa infusa daun sirih merah dan daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 tetapi berdasarkan nilai rata-rata dapat disimpulkan bahwa infusa daun sirih merah lebih bagus daya zona hambatnya terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.