

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil identifikasi tanaman daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*)

1.1. Determinasi tanaman sirih merah. tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) yang didapat dari daerah Ngawi. Determinasi tanaman sirih merah dilakukan di Laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

Identifikasi tanaman ini dimaksudkan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil identifikasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil Identifikasi infusa daun sirih merah

Organoleptis infusa daun sirih merah. Uji organoleptis meliputi : bentuk, warna, dan bau. Uji organoleptis merupakan cara pengujian dengan menggunakan indra manusia yang bertujuan untuk mendeskripsikan warna, bau, dan bentuk sediaan dan untuk mengetahui apakah infusa yang dibuat memang benar infusa daun sirih merah. Dari hasil uji organoleptis didapatkan hasil yang sudah sesuai dengan infusa daun sirih merah. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji organoleptis infusa daun sirih merah

Pengujian	Hasil organoleptis
	Infusa daun sirih merah
Bentuk	Larutan infusa
Warna	Coklat kehitaman
Bau	Khas daun sirih

3. Hasil identifikasi kandungan kimia infusa daun sirih merah

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia infusa daun sirih merah. Identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Identifikasi alkaloid dapat dilakukan dengan beberapa pereaksi pengendap. Pereaksi Mayer mengandung kalium iodida dan merkuri klorida, dengan pereaksi ini alkaloid akan memberikan endapan berwarna putih. Identifikasi flavonoid menggunakan pereaksi serbuk Mg, alkohol, asam klorida, dan amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna jingga pada amil alkohol.

Identifikasi tanin menggunakan pereaksi besi (III) klorida 1%, reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman. Identifikasi saponin ditunjukkan adanya buih setelah digojog kuat, dan buih yang tetap setelah ditambahkan HCL 2N. Hasil identifikasi kandungan kimia infusa daun sirih merah dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji kandungan kimia infusa daun sirih merah

Golongan senyawa	Hasil penelitian		Pustaka	Interpretasi data
	Infusa Sirih Merah			Infusa Sirih Merah
Alkaloid	Endapan coklat kehitaman		Endapan putih atau kuning, atau coklat sampai hitam dengan Dragendrof (Depkes 1989)	+
Flavonoid	Warna kuning jingga pada lapisan amil alkohol		Warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Depkes 1989)	+
Saponin	Terbentuk buih yang mantap + HCl buih tidak hilang		Terbentuk buih yang mantap selama ± 10 menit setinggi 1-10 cm + HCl 2 N buih tidak hilang (Depkes 1989)	+
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman		Terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Robinson 1995)	+

Keterangan :

+ : Terdapat golongan senyawa

- : Tidak terdapat golongan senyawa

Identifikasi yang telah dilakukan diperoleh hasil bahwa infusa daun sirih merah mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Gambar hasil

identifikasi kandungan kimia infusa daun sirih merah dapat dilihat pada lampiran 4.

4. Hasil pembuatan suspensi bakteri

Prinsip pembuatan suspensi bakteri uji yaitu pengambilan bakteri dari biakan murni kemudian distandardkan dengan Mc. Farland 0,5 yaitu setara dengan 10^8 CFU/ml bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, kemudian diencerkan dalam medium BHI dengan pengenceran 1:1000. Tujuan distandardkannya dengan Mc. Farland 0,5 yaitu untuk mengetahui kisaran jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suspensi bakteri, bila tidak distandardkan dengan Mc. Farland 0,5 dimungkinkan bakteri terlalu banyak atau terlalu sedikit sehingga mempengaruhi hasil penelitian.

5. Hasil identifikasi bakteri uji dengan cara makroskopis

Bakteri diinokulasi pada media *Pseudomonas Selektif Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari inokulasi ini yaitu untuk menumbuhkan bakteri uji yang diambil dari sediaan murni, sehingga bisa teramati koloni maupun warna spesifik dari bakteri uji. Hasil yang diperoleh yaitu positif dengan adanya penampakan koloni yang dihasilkan berwarna hijau dan berfluoresensi, hal ini dapat dipastikan bahwa bakteri uji termasuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil identifikasi bakteri uji dengan cara makroskopis dapat dilihat pada lampiran 6.

6. Hasil identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* tersebut termasuk golongan Gram negatif. Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna merah,

bentuk batang. Kristal Violet (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Mordant (lugol iodine/Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol 96%) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet-iodine tidak menempel pada dinding sel bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Identifikasi mikroskopis *Pseudomonas aeruginosa* dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 6.

7. Hasil identifikasi secara biokimia

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan medium yang terdiri dari, *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kliger's Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), dan citrat. Hasil identifikasi uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Identifikasi uji biokimia pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	--+	--+
KIA	K/K S(-)	K/K S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
CITRAT	+	+

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Motility*

KIA : *Kliger's Iron Agar*

LIA : *Lysin Iron Agar*

A : Kuning

K : Merah atau ungu

S : Hitam

+ : Reaksi positif
- : Reaksi negatif

G : Gas

Medium *Sulfide Indol Motilitas* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian SIM menunjukkan hasil sulfida negatif, artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida. Uji indol negatif disebabkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji indol menunjukkan hasil negatif setelah ditambahkan tiga tetes reagen erlich A dan B. Reagen erlich A dan B mengandung dimetilaminobenzaldehid dan jika positif akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media karena indol akan bereaksi dengan dimetilaminobenzaldehid sehingga membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas diperoleh hasil positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media SIM.

Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu S(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna merah, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1%, dan *phenol red* sebagai indikator, S(-) artinya uji hidrogen sulfida negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media KIA.

Medium *Lisin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak

mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, S(-) artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media *Lysin Iron Agar* (LIA).

Medium Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian citrat menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri dan terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Hal ini menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal, dalam medium Citrat terdapat indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 7.

8. Hasil uji aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara dilusi

Hasil dari infusa daun sirih merah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

No.	Konsentrasi (%)	Infusa daun sirih merah		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	100	+	+	+
3	50	+	+	+
4	25	+	+	+
5	12,5	+	+	+
6	6,25	+	+	+
7	3,125	+	+	+
8	1,562	+	+	+
9	0,781	+	+	+
11	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Berisi larutan infusa + BHI

Kontrol (+) : Berisi suspensi bakteri + BHI

Uji aktivitas antibakteri dari Infusa daun sirih merah dilakukan terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,781%.

Kontrol negatif dalam penelitian ini menggunakan Infusa konsentrasi 100% di tambah dengan media BHI, kontrol negatif digunakan sebagai pembanding tidak adanya pertumbuhan bakteri, serta untuk memastikan bahwa tidak adanya kontaminasi dari lingkungan saat melakukan penelitian. Kontrol positif yang digunakan adalah bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 ditambah dengan media BHI, kontrol positif digunakan sebagai pembanding adanya pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) tidak dapat ditentukan dari tabung hasil dilusi, karena warna yang dihasilkan terlalu keruh. Warna keruh bisa disebabkan dari infusa atau pertumbuhan bakteri, hasil dilusi diinokulasi menggunakan medium *Natrium Agar* dan diinkubasi selama 24 jam untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Morfologi *Pseudomonas*

aeruginosa pada media NA yaitu koloni bakteri berwarna putih, media yang digunakan warnanya tetap sama tidak berubah, bakteri berbentuk batang lonjong, keruh, menyebar, tepinya tidak rata, tidak berspora, koloni halus dan mukoid (Siswanto *et al.*, 2013)

Tabel 4 menunjukkan hasil uji aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah. Dari tabel di atas menunjukkan bahwa infusa daun sirih merah tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 karena pada uji dilusi di peroleh hasil positif ada nya pertumbuhan bakteri pada semua konsentrasi kecuali kontrol negatif.

Hal ini disebabkan karena dipengaruhi oleh metode penyarian yang digunakan. Penelitian ini menggunakan metode penyarian infundasi menggunakan pelarut aquadest. Infundasi merupakan proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Pemilihan metode infusa kurang efektif jika digunakan sebagai uji antibakteri karena dalam pembuatan infusa harus memiliki konsentrasi yang tinggi agar memiliki aktivitas antibakteri. Pemilihan metode ini didasari oleh sifat pengerjaan yang ekonomis dan sederhana sehingga lebih mudah diaplikasikan oleh masyarakat.

Pada penelitian ini, infusa daun sirih merah menggunakan pelarut aquadest secara kualitatif dapat menarik beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu saponin, tannin, alkaloid, fenol, minyak atsiri. Namun belum diketahui secara kuantitatif berapa kadar senyawa metabolit sekunder yang tersari. Hal ini yang menjadi salah satu dugaan tidak adanya efek antibakteri infusa daun sirih merah terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Bakteri gram negatif lebih tahan terhadap ekstraksi dengan pelarut aquadest, selain itu pelarut aquadest kurang mempunyai aktivitas antibakteri karena pelarut air berbeda dari pelarut lainnya yang mempunyai banyak komponen yang dapat berinteraksi secara antagonis dalam mengikat bahan aktif (Masika & Afolayan., 2002).

Faktor-faktor yang juga dapat mempengaruhi yaitu salah satunya faktor biologis yang dapat terjadi yaitu resistensi. Bakteri sangat mungkin untuk menjadi resisten selama pengujian antibakteri karena resistensi merupakan adaptasi yang dilakukan bakteri secara alami untuk tetap bertahan hidup. Resistensi ini merupakan faktor yang tidak dapat dikendalikan.

Faktor-faktor yang telah dijelaskan diatas merupakan beberapa dugaan yang dapat mempengaruhi hasil dari penelitian ini yaitu tidak ditemukannya aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

9. Hasil uji aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara difusi

Hasil dari infusa daun sirih merah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi untuk mengetahui diameter zona hambat dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian aktivitas antibakter infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

No.	Konsentrasi (%)	Replikasi		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	100	+	+	+
3	50	+	+	+
4	25	+	+	+
5	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Berisi suspensi ciprofloxacin

Kontrol (+) : Berisi aquadest

No.	Konsentrasi (%)	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata
		I	II	III	
1	Kontrol (-)	23	22	24	23
2	100	0	0	0	0
3	50	0	0	0	0
4	25	0	0	0	0
5	Kontrol (+)	0	0	0	0

Keterangan :

Kontrol (-) : Berisi suspensi ciprofloxacin

Kontrol (+) : Berisi aquadest

Uji aktivitas antibakteri dari Infusa daun sirih merah dilakukan terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi konsentrasi 100%; 50%; 25%, kontrol (-) penelitian ini menggunakan suspensi ciprofloxacin, kontrol negatif digunakan sebagai pembanding tidak adanya pertumbuhan bakteri, serta untuk memastikan bahwa tidak adanya kontaminasi dari lingkungan saat melakukan penelitian. Kontrol positif yang digunakan adalah aquadest, kontrol positif digunakan sebagai pembanding adanya pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan hasil pada penelitian ini, infusa daun sirih merah untuk konsentrasi 100%, 50%, 25% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan tidak terbentuknya zona jernih disekitar sumuran. Hal ini diduga karena infusa daun sirih merah tidak mampu merusak membran sel dan mengganggu proses fisiologis sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Struktur dinding sel gram negatif yang terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan harusnya lebih rentan terhadap pemberian antibiotik atau senyawa antibakteri

lainnya. Meskipun merupakan bakteri gram negatif, *Pseudomonas aeruginosa* memiliki daya tahan yang kuat terhadap lingkungan fisik dan bahan kimia daripada bakteri gram negatif lainnya (Radji M, 2011).

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi eksopolisakarida (EPS) berupa alginat yang berbentuk gel kental di sekeliling bakteri. Alginat memungkinkan bakteri untuk membentuk biofilm, yaitu kumpulan koloni sel-sel bakteri yang menempel pada suatu permukaan (Mayasari E, 2005). Menurut todar (2009), kecenderungan berkolonisasi dalam bentuk biofilm membuat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tahan terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lain.

Berbeda halnya dengan penelitian ini, infusa daun sirih merah tidak dapat menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, tapi pada uji skrining fitokimia didapatkan hasil positif dalam semua senyawa hal ini dikarenakan konsentrasi senyawa metabolit atau senyawa antibakteri pada infusa daun sirih merah yang dihasilkan sedikit sehingga tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi suatu antibakteri merupakan salah satu faktor penentu besar kecilnya kemampuan antibakteri tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji.

Faktor lain yang menyebabkan tidak adanya aktivitas antibakteri yaitu pelarut air yang digunakan tidak bisa menarik senyawa yang ada pada daun sirih merah sehingga tidak dapat menghambat dan dikarenakan jenis bakteri *Pseudomonas aeruginosa* itu sendiri tidak dapat dihambat dengan infusa daun sirih merah.