

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun mimba telah dilakukan determinasi dengan hasil berdasarkan surat keterangan nomor 057/UN27.9.6.4/Lab/2023 ialah benar daun mimba sesuai dengan spesiesnya *Azadirachta indica* A. dari familia *Meliaceae* dengan kunci determinasi 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29a-1b-3b-4b-7b-10b-13b-15a. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Hasil Pembuatan dan Identifikasi Serbuk

1. Hasil Pengambilan Bahan

Daun mimba (*Azadirachta indica*.A) diperoleh di Kelurahan Rhee, Nusa Tenggara Barat pada bulan Februari 2023. Pengujian digunakan bagian daun yang berwarna hijau dan tidak terlalu tua, diambil pada pagi hari saat daun melakukan fotosintesis, tidak rusak dan berlubang, serta tidak berjamur dan tidak mengandung kuman, yang diambil secara acak pada satu kawasan pada beberapa pohon di daerah Kelurahan Rhee, Nusa Tenggara Barat. Daun yang sudah dipanen dilakukan sortasi basah, pencucian serta perajangan untuk tujuan menghilangkan kotoran dari daun serta partikel yang melekat (Sutriandi *et al.*, 2016). Hasil gambar pengambilan bahan dapat dilihat pada lampiran 2.

2. Hasil Pengeringan Daun Mimba

Proses pengeringan simplisia bertujuan mengurangi kadar air yang terkandung pada daun mimba (*Azadirachta indica*.A) serta mencegah terjadinya pembusukan dari simplisia. Pengeringan daun dilakukan dengan menggunakan sinar matahari langsung yang ditutupi oleh kain hitam, setelah proses pengeringan kemudian dilakukan sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan simplisia daun dari benda asing serta memisahkan daun yang sudah kering dan belum kering. Daun mimba segar diperoleh sebanyak 5,100 g kemudian dikeringkan sehingga diperoleh bobot daun mimba kering sebanyak 2,000 g. Hasil rendemen yang diperoleh dari pengeringan yaitu 39,21%. Hasil perhitungan rendemen pengeringan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
5,100	2,000	39,21 %

Bobot basah yang dimaksudkan adalah daun mimba yang sudah melalui proses sortasi basah, perajangan, serta pencucian dan diperoleh bobot 5,100 gram. Daun mimba yang sudah melalui proses pengeringan selama ± 10 hari kemudian dilakukan sortasi kering dan diperoleh bobot simplisia kering 2,000 gram. Sesuai dengan penelitian Ira (2021) melakukan pengeringan daun mimba dengan bobot basah 2,500 gram menggunakan matahari selama ± 7 hari dan memperoleh bobot kering sebanyak 980 gram dengan rendemen 39,2%.

3. Hasil Pembuatan Serbuk Daun Mimba

Daun Mimba kering kemudian ditumbuk menggunakan blander untuk memperoleh serbuk mimba serta dilakukan pengayakan serbuk kasar dengan mesh 40 untuk memperoleh serbuk halus, dan diperoleh berat serbuk sebanyak 1,810 g. Pembuatan bubuk untuk meningkatkan kontak permukaan dengan pelarut, sehingga dalam proses ekstraksi senyawa yang terkandung dalam daun dapat terekstraksi dengan optimal. Serbuk halus yang diperoleh persentase hasil berdasarkan massa bubuk relatif terhadap berat daun kering dihitung demikian bahwa hasil 50% diperoleh. Hasil perhitungan rendemen tepung dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil perhitungan rendemen bobot serbuk terhadap bobot kering

Sampel	Bobot kering (g)	Bobot serbuk (g)	Rendemen (%)
Daun mimba	2,000	1,810	90,5 %

Daun mimba kering dengan bobot 2,000 gram dihaluskan menggunakan blander kemudian di ayak menggunakan mesh no 40 dan diperoleh berat serbuk sebanyak 1,810. Terdapat serbuk yang hilang sebanyak 190 gram, serbuk yang hilang diduga tertinggal pada alat penghalus serbuk, tertiuip angin pada saat pemindahan dari blander ke wadah, atau jatuh pada saat proses penghalusan serta pengayakan dilakukan. Pada penelitian Ira (2021) melakukan pembuatan serbuk daun mimba dari bobot 980 gram hingga memperoleh bobot serbuk 500 gram dan dengan hasil rendemen 51 %.

4. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Serbuk

Penentuan susut kering serbuk daun mimba dilakukan dengan menggunakan alat moisture balance dengan suhu 105°C. Penyusutan kering dimaksudkan untuk mengetahui kadar air yang ditunjukkan dengan perubahan berat susut. Hasil uji penyusutan serbuk pengering

memiliki rata-rata sebesar 5,1%, sehingga kadar kelembaban serbuk daun mimba dapat dikatakan baik karena % kadar <10% (Kemenkes RI, 2013). Hasil susut pengeringan dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Serbuk

Sampel	Replikasi	Bobot serbuk (g)	Susut Pengeringan (%)	Rata-rata \pm SD
Serbuk	1	2,12	5,5 %	5,1 % \pm 0,4
Daun	2	2,00	4,7 %	
Mimba	3	2,05	5,1 %	

Pengujian susut pengeringan menggunakan *moisture balance* merupakan metode pengujian penentuan kadar air secara thermogravimetri. Hasil susut pengeringan dengan rata-rata kadar kelembaban serbuk daun mimba adalah 5,1%. Pada penelitian Andhiarto *et al* (2020) mendapatkan hasil susut pengeringan serbuk daun mimba yaitu 5,3% dan dinyatakan memiliki kadar air yang baik karena <10%.

5. Hasil Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Mimba

Daun mimba yang sudah menjadi serbuk dilakukan penetapan kadar air, hal ini bertujuan agar mengetahui batas maksimal besarnya air yang terkandung dalam serbuk mimba. Pengujian kadar air serbuk daun mimba dilakukan dengan metode *Sterling-Bidwell* menggunakan destilasi toluene (*azeotropi*) yang memiliki prinsip menggunakan toluene jenuh air. Penetapan kadar air serbuk diperoleh 5,5 %, sehingga dapat dikatakan memenuhi syarat karena \leq 10% (Depkes RI, 2017). Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Mimba

Replikasi	Bobot serbuk (gr)	Volume yang diperoleh (mL)	Persentase kadar air (%)
1	20,078	1,1	5,50
2	20,007	1,0	5,00
3	20,077	1,2	6,00
Rata-rata \pm SD			5,5 \pm 0,5

Penetapan kadar air dengan metode *Sterling-Bidwell* dilakukan dengan tujuan untuk meyakinkan batas maksimal besaran air yang terkandung dalam serbuk daun mimba. Pada penelitian Andhiarto *et al* (2020) melakukan uji penetapan kadar air dengan kadar maksimal 4,9% yang dinyatakan baik karena \leq 10%. Syarat kadar air serbuk umumnya menurut Farmakope Herbal Indonesia edisi II yaitu \leq 10%, sehingga dari hasil diatas dinyatakan bahwa memiliki kadar air yang baik.

C. Pembuatan Ekstrak dan Identifikasi Daun Mimba

1. Hasil Pembuatan Ekstrak

Serbuk yang sudah dihaluskan kemudian diekstraksi menggunakan metode perendaman. Metode perendaman dipilih karena selain alat sederhana yang digunakan untuk mengekstrak, yaitu metode maserasi mampu menarik semua metabolit sekunder yang terdapat pada daun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Hasil ekstraksi ditentukan berdasarkan hasil rendemen, penentuan rendemen bertujuan agar mengetahui perbandingan simplisia terhadap ekstrak, hasil rendemen memungkinkan penentuan jumlah ekstrak simplisia pada berat tertentu (Depkes RI, 2000). Ekstrak daun mimba yang diperoleh dari filtrasi maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga memperoleh ekstrak kental. Hasil rendemen yang didapatkan yaitu 6,5797%. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil Pembuatan Ekstrak

Bobot serbuk (g)	Bobot wadah kosong (g)	Bobot wadah + ekstrak (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1,000	150,203	216,000	65,797	6,5797

Hasil serbuk halus di dapatkan berat bobot bersih 1,810 gram. Serbuk yang digunakan pada pembuatan ekstrak hanya sebesar 1,000 gram menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 hari. Maserat yang didapatkan dari proses ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 65,797 gram. Pada penelitian Ira (2021) melakukan ekstraksi daun mimba dengan metode maserasi dari bobot serbuk 500 gram di ekstraksi selama 3 hari dan memperoleh ekstrak kental sebanyak 25 gram dengan persentase rendemen yaitu 5%.

Hasil yang pada saat pengujian dengan hasil penelitian Ira tidak jauh berbeda, hal ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang dilakukan sudah benar, sedangkan perbedaan yang ada disebabkan karena lokasi pengambilan daun, musim, tempat tumbuh tanaman, serta waktu pengambilan. Hasil rendemen yang didapatkan kecil yaitu 6,57%, hal ini dapat disebabkan karena berbagai faktor seperti waktu, suhu, pengadukan, pelarut serta metode yang digunakan.

2. Hasil Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Mimba

Penentuan kadar air daun mimba ditentukan dengan metode gravimetri dengan tujuan mengetahui kadar air dalam ekstrak (Depkes RI, 2017). Pengujian kadar air ekstrak daun mimba dapat dinyatakan

memenuhi syarat sesuai dengan FHI yaitu tidak $> 0,25\%$ pada pemanasan pertama dan kedua berturut-turut (Depkes RI, 2017). Hasil penentuan kadar air dalam ekstrak disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Mimba

Replikasi	Bobot kurs kosong	Bobot kurs + ekstrak sebelum dikeringkan (g)	Bobot ekstrak awal (g)	Bobot kurs + ekstrak sesudah dikeringkan (5 jam) (gr)	Bobot kurs + ekstrak sesudah dikeringkan (1 jam) (gr)	Bobot ekstrak setelah dioven	Kadar Air (%)
I	40,5410	42,6595	2,1185	42,4000	42,3840	1,843	0,64
II	40,7076	42,8862	2,1786	42,5884	42,5598	1,8522	0,76
III	43,0598	45,9358	2,8760	45,4765	45,4408	2,381	0,99
Rata-rata \pm SD						0,79 \pm 0,1779	

3. Hasil Uji Bebas Etanol Ekstrak

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan tujuan agar mendapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi etanol (Wulandari, 2017). Ekstrak yang digunakan pada saat pengujian antibakteri sebaiknya tidak mengandung etanol, karena ditakutkan etanol akan menjadi senyawa yang membasmi bakteri dan bukan ekstrak daun mimba. Hasil pengujian bebas etanol dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil Uji Bebas Etanol Ekstrak Daun Mimba

Identifikasi	Prosedur	Hasil	Keterangan
Uji Bebas Etanol	Ekstrak + $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{SO}_4$ pekat dipanaskan	Tidak ada bau ester	(-)

Pengujian bebas etanol didapatkan hasil bahwa ekstrak daun mimba tidak mengandung etanol ditandai dengan tidak tercium bau ester. Bau ester dihasilkan dari reaksi asam karboksilat dan alkohol ketika dipanaskan bersama dengan bantuan katalis asam ditandai dengan bau khas ester. Ekstrak harus bebas dari etanol karena bersifat hidroskopis. Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, selain itu etanol sendiri bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga perlu dilakukan uji bebas etanol (Sugiarti L, 2021).

4. Hasil Identifikasi Senyawa Kandungan Kimia

Ekstrak daun mimba dilakukan uji identifikasi kandungan senyawa bertujuan agar mengetahui dan memastikan ekstrak daun mimba mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin,

steroid dan triterpenoid. Hasil pengujian dari fitokimia dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil Skrining Fitokimia

Pemeriksaan	Hasil	Pustaka	Interprestasi Data
Alkaloid (<i>Bourchard LP</i>)	Terbentuk endapan coklat	Terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam (Sulistiyani, 2018)	+
Alkaloid (<i>Mayer</i>)	Terbentuk endapan putih	Terbentuk endapan berwarna putih atau kuning (Sulistiyani, 2018)	+
Flavonoid	Terbentuk warna jingga	Terbentuk warna merah, kuning, atau jingga (Sumerlin <i>et al.</i> , 2018)	+
Saponin	Terbentuk busa konstan	Terdapat buih dengan tinggi 1-10 cm yang konstan (Depkes RI, 2013)	+
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman (tannin katekol) atau biru kehitaman (tannin galat) (Sasrawan <i>et al.</i> , 2013)	+
Steroid dan Triterpenoid	Terbentuk warna hijau	Steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru atau hijau, Triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah sampai ungu kehitaman (Taena, 2022)	-

Keterangan :

- (+) : Positif atau mengandung senyawa
- (-) : Negatif atau tidak mengandung senyawa

Hasil uji fitokimia dari tabel didapatkan daun mimba memiliki beberapa senyawa aktif yang berguna sebagai antibakteri seperti senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid, serta dinyatakan tidak memiliki senyawa triterpenoid. Hasil uji ini sesuai dengan penelitian Ramdhani *et al* (2017) yang menyatakan bahwa daun mimba memiliki senyawa aktif seperti flavonoid, saponin, steroid, fenol, alkaloid, serta tanin.

Uji alkaloid dengan pereaksi mayer memiliki prinsip ialah terdapat endapan disebabkan dengan adanya pergantian ligan peraksi mayer yang mengandung kalium iodide dan merkuri iodide sehingga dari reaksi tersebut menghasilkan kalium alkaloid yang berupa endapan berwarna putih (Ramadhian *et al.*, 2017). Uji alkaloid dengan peraksi bourchard LP mendapatkan hasil terbentuk endapan coklat. Endapan yang terbentuk terjadi karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion logam K^+ dengan alkaloid sehingga terbentuk kompleks kalium

alkaloid yang mengendap (Nafisah *et al.*, 2014). Uji flavonoid mendapatkan hasil terbentuk warna jingga, flavonoid umumnya larut dalam etanol karena bersifat polar. Penambahan klorida untuk memprotonasi flavonoid untuk membentuk garam flavonoid, dan penambahan bubuk magnesium terbentuk warna jingga atau merah menyatakan adanya flavonoid akibat terjadi reduksi HCl dan magnesium (Sumerlin *et al.*, 2018).

Uji saponin mendapatkan hasil buih yang konstan, timbulnya busa pada pengujian saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih di dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Wardhani RAP, 2015). Uji tannin mendapatkan hasil hijau kehitaman yang menandakan terbentuknya senyawa kompleks antara tannin dengan Fe^{3+} , dimana $FeCl_3$ digunakan untuk menentukan sampel mengandung gugus fenol. (Ramadhian *et al.*, 2017). Uji steroid mendapatkan terbentuk warna hijau, hal ini karena steroid jika direaksikan dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat akan menghasilkan warna hijau atau biru. Reaksi ini terjadi antara steroid dengan asam asetat anhidrat adalah reaksi asetilasi gugus $-OH$ pada steroid. Penambahan asam asetat anhidrat untuk membentuk turunan asetil, asetil mampu membentuk larutan warna. Perubahan warna yang terbentuk karena terjadinya oksidasi pada senyawa triterpenoid/steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Nafisah *et al.*, 2014).

D. Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri

1. Hasil Pengambilan Sampel Sputum

Sampel sputum diperoleh dari pasien pneumonia dengan diagnosis pneumonia HAP, terdapat resiko MDR, terdapat aspirasi, batuk produktif mampu menghasilkan sputum, sputum berwarna karat, serta leukosit >10.000 . Pengambilan sampel sputum pada pasien dilakukan oleh staf rumah sakit dengan memberi arahan kepada pasien, dengan langkah mula-mula pasien berkumur dengan air, kemudian pasien batuk berdahak hingga sputum terkumpul $\pm 4-5$ ml yang ditampung dalam pot urine steril. Sampel yang diperoleh kemudian dilakukan pengecekan dan pengujian oleh pihak rumah sakit dan sisa sputum disimpan pada suhu dingin, sputum didapatkan di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi, Jawa Tengah. Sampel diambil 2 orang pasien dengan diagnosis pneumonia HAP. Kedua pasien tersebut

merupakan pasien yang diduga terinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*.



Gambar 7. Sampel Sputum (Dokumentasi Pribadi)

2. Kultur Sputum Bakteri

Kultur sputum dilakukan pada media MCA, pemilihan media MCA karena merupakan salah satu media selektif dan digunakan pada bakteri Gram negatif serta media memiliki gram empedu memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (Poetry *et al.*, 2019). Proses kultur dilakukan di LAF dan menggunakan alat yang sudah di sterilisasi terlebih dahulu. Sputum di kultur dengan cara membuat goresan zig-zag menggunakan ose bulat pada media agar yang sudah di bagi menjadi 3 bagian, kemudian di inkubator selama 24 jam. Hasil didapatkan yaitu pada media agar terdapat koloni yang berwarna merah muda adalah bakteri Gram negatif seperti *Klebsiella pneumoniae*. Koloni yang diduga mengandung bakteri *Klebsiella pneumoniae* dilakukan uji identifikasi, hal ini bertujuan untuk menyakinkan bahwa koloni tersebut merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.



Gambar 8. Kultur Sputum (Dokumentasi Pribadi)

Hasil kultur sputum didapatkan dua warna koloni yang berbeda, warna merah pada media diduga merupakan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Terbentuknya warna merah pada media terjadi jika bakteri mampu memfermentasi laktosa, salah satunya adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* sedangkan warna kuning atau pudar terbentuk jika bakteri tidak mampu memfermentasi laktosa hingga menjadi asam. Penelitian

Acharya (2022) menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* pada media MCA ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna merah.

3. Hasil Pembuatan Suspensi Bakteri

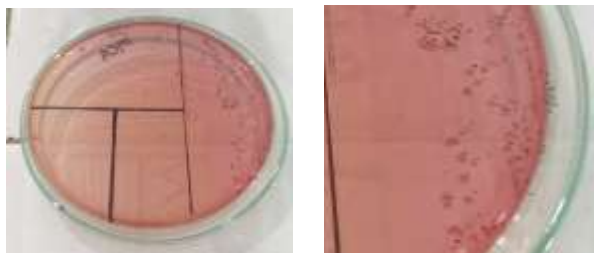
Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni yang sesuai dengan standar yang digunakan, dengan mengambil 1 ose bakteri yang dilarutkan dalam 5 mL larutan NaCl 0,9%. Pengujian pembuatan suspensi bakteri menggunakan standar *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ sel/mL) (Poetry *et al.*, 2019). Suspensi bakteri dibuat digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dan dipastikan selalu dibuat baru agar jumlah bakteri dalam suspensi tetap sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5. Hasil pembuatan suspensi bakteri dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Hasil uji pembuatan suspensi bakteri (Dokumentasi Pribadi)

4. Identifikasi Bakteri Uji

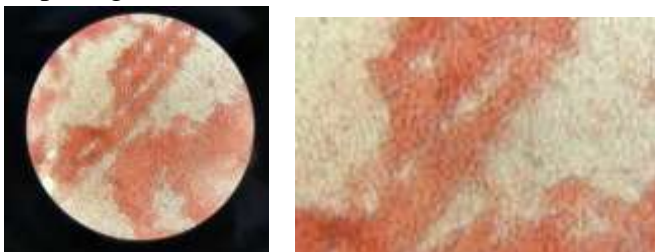
4.1. Identifikasi Morfologi Bakteri. Identifikasi morfologi bertujuan agar mendapatkan dan memastikan kebenaran bakteri melalui inokulasi bakteri pada media MCA. Hasil inokulasi bakteri yang diduga bakteri *Klebsiella pneumoniae* yaitu koloni berwarna merah muda, hal ini dikarenakan terjadi fermentasi laktosa ditandai dengan warna merah jambu pada media yang mengandung zat warna *neutral red* yang merupakan indikator pH dapat digunakan membedakan bakteri coliform laktosa fermenter dan non laktosa fermenter. Penelitian Fauziah S, (2016) diperoleh hasil yang sama yaitu terdapatnya koloni bakteri berwarna merah muda atau merah jambu pada media MCA. Hasil gambar uji identifikasi morfologi dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Uji Identifikasi Morfologi (Dokumentasi Pribadi)

4.2. Identifikasi Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram.

Identifikasi bakteri secara perwarnaan gram bertujuan untuk memastikan bakteri termasuk dalam jenis bakteri Gram negatif atau Gram positif, memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri serta meyakinkan bahwa bakteri yang diuji adalah *Klebsiella pneumoniae* yang ditandai dengan sel bakteri berbentuk batang berwarna merah. Hasil citra uji identifikasi dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Hasil Pewarnaan Gram (Dokumentasi Pribadi)

Pewarnaan sel bakteri secara gram merupakan salah satu prosedur yang penting dan paling banyak digunakan dalam klasifikasi bakteri. Melalui metode ini, bakteri dapat dibedakan menjadi dua kelompok besar, yaitu bakteri gram positif yang berwarna ungu pada akhir pewarnaan dan gram negatif yang berwarna merah pada akhir pewarnaan. Terjadinya perbedaan kedua golongan tersebut ialah setelah diberi zat pewarna, berhubungan dengan struktur dan komposisi dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif pada umumnya lebih tipis dari bakteri gram positif, serta persentase kandungan lipid gram negatif lebih tinggi dari bakteri gram positif. Pada eksperimen pengecatan menunjukkan bahwa perlakuan dengan alkohol mengekstrak lipid, yang menyebabkan porositas atau permeabilitas dinding sel meningkat. Sehingga, kompleks karbol gentian violet dan lugol dapat disari keluar dan bakteri gram negative terwarnakan (Pelezar & Chan, 2007).

Hasil identifikasi pewarnaan gram didapatkan bahwa bakteri merupakan bakteri Gram negatif di tandai dengan warna merah yang terlihat dan merupakan bakteri dengan bentuk batang pendek. Penelitian Acharya (2022) menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif ditandai dengan bakteri berwarna merah dan merupakan bakteri dengan bentuk batang pendek.

5. Identifikasi Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan salah satu jenis uji identifikasi bakteri yang umum dilakukan. Uji ini dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologis koloni bakteri hasil isolasi. Biokimia bakteri berkaitan

dengan proses metabolisme sel bakteri (Rahmayati, 2021). Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil Identifikasi Uji Biokimia

Media	Hasil
SIM	---
KIA	A / AG ^{S-}
SCA	+
LIA	K / K ^{S-}

Keterangan :

--- = Negatif sulfida, lereng tidak berwarna merah setelah diberi Erlich A dan B, negative motilitas.

A / AG^{S-} = Bagian lereng dan dasar berwarna kuning ditulis dengan simbol A, media terangkat ke atas ditulis G, serta sulfida negative tidak terbentuk warna hitam dengan symbol S-.

+ = Diperoleh warna biru yang artinya mengandung citrat

K / K^{S-} = Bagian lereng berwarna ungu diberi simbol K, bagian dasar berwarna ungu diberi simbol K, serta tidak terbentuk warna hitam sulfida diberi simbol S-.

5.1. Identifikasi SIM (Sulfide Indol Motilitas). Identifikasi SIM bertujuan guna mengetahui terdapat sulfide indol pada bakteri atau menentukan apakah bakteri dengan enzim triptofanase mampu mengoksidasi asam amino triptofan dan membentuk indole. Uji ini juga bertujuan untuk mengetahui motilitas atau pergerakan bakteri. Adanya indol ditandai dengan terbentuk warna merah pada cincin permukaan biakan bakteri serta motilitas ditandai dengan pergerakan bakteri dari garis inokulum menyebabkan terjadinya kekeruhan pada media. Hasil pengujian dinyatakan bahwa *Klebsiella pneumonia* tidak memiliki pergerakan motilitas dari media atau non-motil, serta pada uji indol dinyatakan negatif (-) karena tidak terbentuk warna merah pada cincin permukaan biakan bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian Hatmaningtyas *et al.*, (2013) yang menemukan bahwa *Klebsiella pneumonia* negatif (-) pada uji indol dan motilitas. Hasil pengujian SIM dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Uji Biokimia SIM (Dokumentasi Pribadi)

5.2. Identifikasi KIA (Kliger Iron Agar). Identifikasi KIA bertujuan untuk mengetahui terdapatnya fermentasi karbohidrat dan sulfida pada bakteri. Fermentasi karbohidrat ditandai dengan terbentuk warna kuning pada media serta positif sulfida di tandai dengan terbentuk warna hitam pada media. Hasil pengujian menandakan positif (+) terdapatnya fermentasi karbohidrat oleh bakteri yang ditandai dengan perubahan dari merah menjadi kuning, sedangkan pada sulfide mendapat hasil negatif (-) karena tidak terdapat gas dan tidak terbentuk warna hitam pada media. Hal ini sejalan dengan penelitian Ima F *et al.*, (2015) diperoleh hasil yang sama, perubahan yang didapatkan menunjukkan bahwa bakteri *Klebsiella pneumonia* memfermentasi glukosa dalam suasana asam. Gambar hasil pengujian biokimia KIA dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Hasil Uji Biokimia KIA (Dokumentasi Pribadi)

5.3. Identifikasi SCA (Simmon Citrat Agar). Identifikasi SCA bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dasar. Kepositifan sitrat ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru pada media, perubahan ini bermakna bahwa medium menghasilkan keadaan yang alkalis serta bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber dasar karbon. Hasil pengujian menunjukkan reaksi positif (+) terhadap uji sitrat yang ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Hal ini sesuai dengan penelitian Hatmaningtyas *et al* (2015) bahwa *Klebsiella pneumonia* menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil pengujian SCA dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Hasil Uji Biokimia SCA (Dokumentasi Pribadi)

5.4. Identifikasi LIA (Lysine Iron Agar). Identifikasi LIA bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri mampu dalam mendeaminasi atau mendekarboksilasi lisin dan pembentukan sulfida. Bakteri yang mengalami lisin ditandai dengan perubahan warna merah atau ungu pada lereng media, sedangkan terdapatnya sulfida ditandai dengan adanya gas dan warna hitam pada media. Hasil pengujian didapatkan bahwa bakteri uji positif (+) mengalami dekarboksilasi lisin dengan perubahan media menjadi warna ungu pada lereng media, serta tidak terdapatnya sulfida atau negatif (-). Hasil ini sesuai dengan penelitian Ima *et al.*, (2015) bahwa bakteri *Klebsiella pneumoniae* tidak dapat menghasilkan gas dan mampu mendekarboksilasi lisin. Hasil pengujian LIA dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 14. Hasil Uji Biokimia LIA (Dokumentasi Pribadi)

6. Hasil Pengujian Daya Hambat Ekstrak Daun Mimba

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun mimba terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* isolat sputum dengan metode difusi cakram yaitu *disc* direndam pada ekstrak daun mimba dengan variasi konsentrasi yang berbeda. Pengujian ini dimaksudkan untuk menentukan diameter zona hambat dari ekstrak daun mimba dengan variasi konsentrasi 6, 12, dan 24%. Pemilihan konsentrasi ini didasari pada penelitian sebelumnya didapatkan konsentrasi efektif yaitu 12,5% dan memiliki zona hambat dengan kategori kuat (Uli Ayini *et al.*, 2014). Ekstrak dilarutkan menggunakan DMSO 10% yang sudah diencerkan dengan konsentrasi awal yaitu DMSO 100%, penggunaan pelarut ini karena salah satu pelarut bersifat universal yang sering digunakan pada pengujian antibakteri. Ciprofloxacin digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik golongan fluroquinolon serta terapi antibiotik pada pasien pneumonia untuk infeksi bakteri MDR.

Hasil pengujian antibakteri dengan variasi konsentrasi 6, 12 dan 24% pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* isolat sputum, tidak

memberikan daya hambat atau zona bening pada media sehingga dilakukan peningkatan konsentrasi menjadi 30, 36 dan 42%. Hasil pengujian antibakteri dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil Pengujian Antibakteri

Replikasi	Diameter Zona Hambat				
	K ⁻	Ekstrak 30%	Ekstrak 36%	Ekstrak 42%	K ⁺
I	0	9,00	11,50	18,00	26,00
II	0	8,50	11,00	16,50	26,00
III	0	7,50	11,50	17,50	25,00
Rata-rata ±	0 ± 0	8,33 ± 0,76	11,33 ±	17,33 ±	25,66 ±
SD			0,28	0,76	0,57

Keterangan :

K⁻ : DMSO 10%

K⁺ : Ciprofloxacin

Data hasil pengujian antibakteri menggunakan metode difusi cakram pada tabel 11 menunjukkan zona hambat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Kategori respon zona hambat dapat dilihat pada tabel 3, sehingga pada konsentrasi 30% dengan zona hambat 8,33 mm masuk dalam kategori tidak ada respon hambat pertumbuhan karena <10 mm. Konsentrasi 36% dengan zona hambat 11,33 mm tergolong rendah (10-15 mm) dan konsentrasi 42% dengan zona hambat 17,33 mm tergolong sedang (16-19 mm). Kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 10% tidak menunjukkan zona hambat yang jelas berarti tidak mempunyai aktivitas antibakteri, sedangkan kontrol positif menggunakan ciprofloxacin menunjukkan zona hambat sebesar 25,66 mm termasuk dalam kategori kuat karena lebih >20 mm sehingga ciprofloxacin memiliki aktivitas antibakteri yang baik.

Data uji daya hambat antimikroba dianalisis dengan uji Kruskal Wallis dengan hasil memberikan nilai signifikansi (sig.) 0,009 < 0,05 sehingga dapat dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan. Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis*, karena terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mencari perbedaan yang bermakna secara statistik pada masing-masing kelompok uji dengan cara membandingkan data kedua kelompok tersebut. Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan bahwa masing-masing kelompok uji memiliki perbedaan yang signifikan karena didapatkan nilai asymp sig. <0.05, sehingga dari setiap kelompok uji dapat dikatakan memiliki efek antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

Hasil analisis pada uji *Kruskal Wallis* didapatkan range konsentrasi uji paling baik adalah 42%, dimana konsentrasi tersebut

memiliki perbedaan bermakna dengan konsentrasi 30 dan 36%. Konsentrasi 42% memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol positif dengan diameter hambat yang lebih kuat. Konsentrasi 42% dinyatakan sebagai konsentrasi paling bagus akan tetapi belum atau tidak dapat setara dengan kontrol positif.

Zona hambat terbentuk pada uji antibakteri karena daun mimba mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid, yang berpotensi sebagai antibakteri. Alkaloid bertindak sebagai antimikroba dengan mengganggu komponen peptidoglikan, menyebabkan kerusakan dinding sel dan kegagalan pembentukan dengan sempurna, serta senyawa ini dapat menyebabkan mematikan sel dengan menghambat enzim topoisomerase yang terdapat pada bakteri (Novita *et al.*, 2022). Flavonoid memiliki mekanisme antibakteri dengan cara menghancurkan membran sel bakteri, ribosom dan memiliki kemampuan menghambat sintesis asam nukleat selama proses metabolisme yang dapat menyebabkan kematian sel bakteri (Lingga *et al.*, 2015). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme merusak dan mengganggu permeabilitas membran sel sehingga sitoplasma mengalami kebocoran sel dan menjadi tidak stabil berdampak sel bakteri menjadi mati (Novita *et al.*, 2022).

Tanin berperan sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat serta mengganggu permeabilitas membran sitoplasma hingga pertumbuhan sel bakteri terhambat dan mampu terjadinya kematian sel pada bakteri (Cut *et al.*, 2017). Steroid memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme senyawa steroid berinteraksi dengan membran fosfolipid pada sel bakteri, fosfolipid yang dimiliki oleh sel bakteri memiliki sifat permeabel yang mudah di tembus oleh senyawa lipofilik hingga mampu menurunkan kemampuan sel dalam melakukan pertahanan dan menyebabkan mudah terjadi lisis pada sel (Sapara *et al.*, 2018).

Kontrol positif menggunakan ciprofloxacin dengan mekanisme kerja antibiotik ciprofloxacin akan masuk ke dalam sel berdifusi pasif melalui kanal protein yang berisi air pada dinding sel bakteri secara intraseluler sehingga dapat menghambat replikasi DNA menggunakan enzim girase (topoisomerase II) dalam proses pertumbuhan bakteri (Mycek, 2011). Sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 10% dan tidak menampakkan adanya zona hambat, yang artinya DMSO tidak memiliki senyawa atau zat yang mampu berperan sebagai

antibakteri. Pemilihan DMSO sebagai pelarut karena merupakan senyawa yang mampu melarutkan semua senyawa dengan baik, polar maupun non polar. Selain itu, ekstrak daun mimba juga merupakan ekstrak yang lebih mudah larut dalam pelarut organik dibandingkan aquadest. Hal ini sesuai dengan penelitian Sapto dan Farida (2012) yang mendapatkan bahwa mimba lebih mudah larut dengan pelarut organik dibandingkan air.