

## BAB VI PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan, dengan tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora L.Pers*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode dilusi tabung atau *tube dilution* untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Untuk menentukan besarnya KHM, parameter yang digunakan adalah tingkat kekeruhan suspensi pada media *Nutrient Broth* (NB), sedangkan untuk menentukan KBM menggunakan parameter penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP). Pada penelitian ini didapatkan KHM pada konsentrasi 17,5% dan KBM pada konsentrasi 20%.

### 6.1 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif dimana pada mikroskop akan tampak bentuk batang berwarna merah. *Klebsiella pneumoniae* adalah salah satu bakteri yang termasuk bakteri yang non motil dan bersifat fakultatif anaerob. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri yang dapat melakukan fermentasi laktosa. *Klebsiella pneumoniae* dapat merubah warna media agar *MacConkey* menjadi berwarna merah. Koloni *Klebsiella pneumoniae* besar sangat mukoid dan cenderung besatu bila lama dieramkan (Dzen dkk, 2010).

Pada penelitian ini, bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan berasal dari spesimen sputum yang diisolasi dari sputum pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan untuk penelitian, bakteri diuji

identifikasi terlebih dahulu untuk memastikan kemurnian bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari spesimen tersebut. Identifikasi mikroskopis berupa pengecatan Gram, kemudian identifikasi makroskopis berupa pembiakan bakteri pada media agar *MacConkey*, serta identifikasi biokimia menggunakan *Microbact*.

Hasil identifikasi secara mikroskopis dengan pengecatan Gram didapatkan gambaran bakteri berbentuk batang dan berwarna merah (Gram negatif). Pada uji identifikasi makroskopis pada agar *MacConkey*, didapatkan bentukan koloni yang mukoid dan berwarna merah yang dapat disimpulkan bahwa bakteri ini dapat memfermentasi laktosa. Serta, pada identifikasi biokimia yang dilakukan menggunakan *Microbact* hasilnya bakteri ini merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan tingkat positif 97,74%. Oleh karena itu, dapat dipastikan bahwa isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* murni.

Namun, dalam penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu validitas eksternalnya yang rendah karena hanya digunakan satu isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga penelitian ini belum dapat digeneralisasikan.. Penggunaan satu isolat bakteri belum memenuhi syarat generalisasi karena tiap isolat memiliki kepekaan yang berbeda terhadap bahan antibakteri. Untuk dapat digeneralisasikan, diperlukan penelitian lanjutan yang menggunakan beberapa isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang berbeda yang jumlahnya sesuai dengan rumus replikasi.

Terdapat beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk menguji efektivitas antibakteri suatu bahan alam lain terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian mengenai efektivitas madu terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 50% (Munfaidah, 2004). Pada penelitian lainnya mengenai efektivitas ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum* Linn.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 40%

(Lastrawan, 2006). Pada penelitian mengenai efek ekstrak etanol Jahe Emprit (*Zingiber Officinale Var Amarum*) terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 36% (Ardianti, 2010). Serta pada penelitian mengenai ekstrak metanol daun binahong (*Anredera cordifolia Ten.*) terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 14% (Fawzi, 2011). Sedangkan pada penelitian ini didapatkan KBM sebesar 20%, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun turi merah cukup efektif digunakan sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

## 6.2 Ekstrak Etanol Daun Turi Merah (*Sesbania grandiflora* L.Pers)

Ekstrak etanol daun turi merah dibuat dengan cara mengekstrak daun turi merah dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai penyarinya. Dimana daun turi merah didapat dari kebun milik Materia Medika Batu, sedangkan proses pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

Daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L.Pers) diketahui mengandung beberapa bahan aktif yaitu saponin, flavonoid, dan tanin yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Daun pada tanaman turi merah dapat tumbuh tanpa mengenal musim, dan tersedia dalam jumlah banyak di tiap pohonnya karena turi merah merupakan tumbuhan dengan daun majemuk dan menyirip ganda (Nasution dkk, 2010). Bahan aktif yang terkandung pada daun turi merah diketahui kadarnya lebih banyak dibandingkan pada turi putih (Suttie, 2001).

Zat aktif saponin, flavonoid, dan tanin yang terkandung pada daun turi merah bersifat larut dalam alkohol. Etanol merupakan salah satu jenis alkohol yang mengandung dua gugus karbon. Etanol digunakan sebagai pelarut bahan aktif pada daun turi merah karena pada umumnya sifat dari bahan pelarut yang menggunakan alkohol dan turunannya semakin panjang rantai karbon maka semakin tinggi daya toksisitasnya. Tetapi ada pengecualian dalam teori ini

adalah toksisitas etanol relatif lebih rendah daripada metanol ataupun isopropanol (Darmono, 2003). Oleh karena itu, penyarian bahan yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Namun pada penelitian ini metode ekstrak yang digunakan masih bersifat kasar, sebab belum dapat diketahui secara pasti kandungan bahan aktif dan persentase kadar masing-masing bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak daun turi merah, sehingga belum dapat diketahui secara pasti bahan aktif mana yang paling berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Untuk itu nantinya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar dapat diketahui secara pasti bahan aktif yang mana yang mempunyai peran tertinggi sebagai antibakteri.

Sifat antibakteri yang dimiliki daun turi sudah pernah diteliti sebelumnya. Penelitian mengenai dekok daun turi sebagai antijamur terhadap *Candida albicans* didapatkan KHM pada konsentrasi 30% dan KBM pada konsentrasi 40% (Arisusilo, 2005). Penelitian lain yang dilakukan oleh Vipin *et al* (2011) mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun turi terhadap *Escherichia coli*, *Basillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* yang menggunakan *disk diffusion method*, dimana hanya dapat digunakan untuk mengetahui KHMnya saja, didapatkan hasil KHM masing-masing pada konsentrasi 50 mg/ml, 25 mg/ml, 25 mg/ml, dan 12,5 mg/ml. Dari hasil penelitian di atas dapat dikatakan bahwa daun turi efektif digunakan sebagai antijamur dan antibakteri baik pada bakteri Gram negatif ataupun Gram positif. Namun, pada penelitian tersebut kurang spesifik apakah yang digunakan daun dari tumbuhan turi jenis turi merah atau turi putih, serta belum pernah dilakukan penelitian mengenai efektivitas daun turi khususnya daun turi merah terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun turi merah terhadap *Klebsiella*

*pneumoniae* dan dihasilkan KHM pada konsentrasi 17,5% dan KBM pada konsentrasi 20%.

### 6.3 Mekanisme Kerja dan Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Turi Merah

#### 6.3.1 Mekanisme Kerja Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Turi Merah

Daun turi merah mengandung bahan antibakteri berupa saponin, flavonoid, dan tanin. Saponin merupakan zat yang memiliki fungsi sebagai antibakteri, yang menurut literatur diketahui mekanisme kerjanya dengan cara mempengaruhi permeabilitas membran sel bakteri yang menyebabkan membran sitoplasma menjadi lisis. Flavonoid memiliki kemampuan untuk mengadakan reaksi dengan molekul intraseluler dan metabolisme sel. Flavonoid juga dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut dengan dinding sel sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri. Selain itu, flavonoid bersifat lipofilik, sehingga dapat membentuk kompleks dengan lipid di membran sel bakteri. Didukung juga dengan penelitian yang mendapatkan bahwa flavonoid mampu menghambat motilitas bakteri (Darsana dkk, 2012). Begitu juga dengan tanin yang juga berpotensi sebagai antibakteri, karena dapat menginaktivasi adhesin sel bakteri (molekul yang menempel pada hospes) yang terdapat pada permukaan sel, dan menghambat enzim transport protein melalui membran sel. Senyawa ini juga dapat membentuk kompleks dengan polisakarida pada dinding sel bakteri (Hayati dkk, 2009). Tanin juga dapat menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria dkk, 2009). Dari uraian diatas, dapat disimpulkan bahwa daun turi merah mengandung tiga bahan aktif yang bersifat antibakteri sehingga kombinasi dari tiga bahan aktif tersebut diharapkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan potensi antibakteri yang cukup tinggi.

### 6.3.2 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Turi Merah

Sebelum dilakukan penelitian dengan konsentrasi yang sudah ditentukan, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu. Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun turi merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* serta untuk menentukan rentang konsentrasi yang dapat digunakan dalam penelitian ini. Pada penelitian pendahuluan didapatkan hasil dimana bakteri tidak tumbuh lagi pada konsentrasi 19,5%. Oleh karena itu konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 15%, 16,25%, 17,5%, 18,75%, dan 20%, serta konsentrasi 0% sebagai kontrol bakteri dan konsentrasi 100% sebagai kontrol bahan.

Uji antibakteri ekstrak etanol daun turi merah terhadap *Klebsiella pneumoniae* diukur dengan menggunakan parameter tingkat kekeruhan suspensi pada media *Nutrient Broth* (NB) untuk menentukan nilai KHM dan penghitungan jumlah koloni bakteri pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) menggunakan *colony counter*. Pada penelitian ini, KHM didapatkan pada konsentrasi 17,5% (Gambar 5.4). KHM dapat diketahui dengan cara menilai tingkat kekeruhan suspensi dibandingkan dengan kontrol bakteri. Pada konsentrasi 17,5% tabung sudah mulai jernih atau sudah tidak menunjukkan kekeruhan, pada konsentrasi 18,75% dan 20% suspensi tampak semakin jernih. KHM ditentukan pada konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan kekeruhan, sehingga dapat disimpulkan bahwa KHM pada penelitian ini terletak pada tabung dengan konsentrasi 17,5%. Sedangkan KBM ditentukan pada konsentrasi terkecil dimana pertumbuhan koloni bakteri  $<0,1\%$  *original inoculum* (OI). Nilai rerata OI pada penelitian ini adalah 235 koloni, sehingga konsentrasi dimana koloni bakteri yang jumlahnya  $<0,1\%$  dari OI (0 koloni) pada empat kali pengulangan adalah pada konsentrasi 20% (Tabel 5.1).

Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri kemudian dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA (Analysis of Variance)*, uji korelasi *Pearson*, dan uji regresi linier. Sebelum dilakukan analisis data dari hasil penelitian dengan menggunakan *One-way ANOVA*, maka diperlukan pemenuhan atas beberapa asumsi data yaitu data harus mempunyai sebaran (distribusi) normal dan mempunyai ragam yang homogen (Dahlan, 2010).

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* pada data awal diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,847 ( $p > 0,05$ ) sehingga disimpulkan data variabel tersebut berdistribusi normal (Lampiran 3.1). Hasil uji homogenitas ragam (*Levene test*) didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,099 ( $p > 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa ragam data jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* pada media NAP relatif homogen (Lampiran 3.2). Berdasarkan hasil analisis *One-way ANOVA* (Tabel 5.2) diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ) sehingga  $H_1$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek antibakteri pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP (Lampiran 3.3). Pada analisis *Post Hoc (Tukey) test* didapatkan hasil bahwa konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terkecil yang paling efektif dalam menurunkan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* hingga tidak ada koloni yang tumbuh (Lampiran 3.4).

Berdasarkan hasil analisis uji Korelasi (Tabel 5.4), didapatkan  $p = 0,000$  dan  $r = -0,988$  (Lampiran 3.6). Hal ini berarti terdapat hubungan (korelasi) yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat ( $r$  antara 0,80 – 1,00) dan arah korelasi yang negatif (koefisien  $r$  negatif) artinya apabila semakin naik konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah maka jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* akan semakin menurun. Berdasarkan hasil analisis uji Regresi diperoleh model persamaan regresi  $Y = 476,558 - 25,915X$ , dimana  $Y$  adalah

jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP, sedangkan X adalah pemberian ekstrak etanol daun turi merah dengan konsentrasi tertentu. Selain itu, juga didapatkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 97,6% yang menyatakan besarnya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun turi merah terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP. Sedangkan sisanya ( $1-R^2$ ) sebesar 2,4% yang artinya keragaman jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP tersebut dipengaruhi faktor selain pemberian ekstrak etanol daun turi merah (Tabel 5.5). berdasarkan grafik linieritas didapatkan hubungan linieritas yaitu peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah cenderung akan menurunkan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP (Gambar 5.7).

Adapun fakta mengenai penurunan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah yang diperoleh dari hasil penelitian dan analisis data menggunakan statistik, serta diperkuat dengan adanya teori bahwa daun turi merah mengandung bahan aktif yang bersifat antibakteri, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun turi merah terbukti efektif bersifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh *Klebsiella pneumoniae*. Sehingga hal ini membuktikan bahwa hipotesis yang disusun sebelumnya adalah benar.

#### **6.4 Aplikasi Klinis Ekstrak Etanol Daun Turi Merah sebagai Antibakteri**

Aplikasi klinis yang diharapkan dari penelitian ini kedepannya adalah pemanfaatan ekstrak daun turi merah sebagai bahan dasar industri obat herbal (fitofarmaka) berupa sediaan obat oral yang dapat digunakan sebagai alternatif penggunaan antibakteri terhadap infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Namun, dalam membuat dan menemukan suatu antibakteri dari bahan alam dibutuhkan

proses yang kompleks sehingga nantinya didapatkan obat yang efektif, aman dan dengan toksisitas yang rendah.

Dalam penelitian dan pengembangan bahan baku obat, beberapa tahap biasanya dilakukan. Mulai dari tahap kegiatan awal (*primary stage*), pre-klinis, dan klinis. Pada tahap *primary stage*, dilakukan dengan kajian pustaka. Bagian penting dalam *primary stage* ini adalah bagaimana mempelajari hubungan antara struktur obat dengan aktivitasnya, sehingga pencarian senyawa aktif baru menjadi lebih terarah. Pada tahap pre-klinis terutama ditujukan untuk kajian kemanjuran (*efficacy*) dan keamanannya (*safety*). Kegiatannya meliputi skrining awal kandidat antibiotik (*in vitro*), uji aktivitas antibakteri (KHM, KBM), uji mutagenitas (uji *Ames*), uji potensi antibiotik (*Kirby Bauer method*), evaluasi sifat-sifat fisika kimia, penentuan toksisitas akut dan sub-akut, penentuan farmakokinetik (adsorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi), farmasetika dan pengembangan proses produksi skala besar (*mass production*). Uji pre-klinis merupakan persyaratan uji untuk calon obat, dari uji ini diperoleh informasi tentang efikasi (efek farmakologi), profil farmakokinetik, dan toksisitas calon obat. Setelah calon obat dinyatakan mempunyai kemanfaatan dan aman pada hewan coba (*in vivo*), maka selanjutnya diuji pada manusia (uji klinik). Sebelum dilakukan pengujian pada manusia, harus diteliti terlebih dahulu kelayakannya oleh komite etik (Kardono, 2004; BPOM, 2011).

Dari beberapa penelitian sebelumnya yang memaparkan berbagai bahan alam yang diuji terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro* telah diketahui efektivitasnya melalui nilai KBM dari masing-masing bahan alam. Dari berbagai macam bahan alam tersebut, penulis kedepannya ingin mengetahui perbandingan efektivitas ekstrak etanol daun turi merah dibandingkan dengan ekstrak etanol Jahe Emprit (*Zingiber Officinale Var Amarum*) secara *in vivo*. Karena jahe emprit merupakan tanaman yang murah dan mudah didapat, hampir

di setiap rumah yang memiliki kebun dengan tanaman obat keluarga (toga) pasti ditemukan tanaman jahe emprit sebab perawatannya sangat mudah dan tidak perlu perhatian khusus, yang nantinya dapat diketahui lebih efektif menggunakan ekstrak etanol daun turi merah atau ekstrak etanol jahe emprit sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* secara *in vivo*, sehingga dapat diperoleh aplikasi klinis dari bahan alam yang murah dan mudah didapatkan di lingkungan sekitar, yang mampu membunuh bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara optimal.

Dalam penelitian ini, yang dilakukan hanyalah meneliti pada tahap *primary stage* dengan cara kajian pustaka bahan alam yang terdapat pada daun turi merah dan sebagian tahap pre-klinis. Pada tahap pre-klinis dilakukan skrining bahan awal kandidat antibiotik dan uji aktivitas antibakteri dengan cara menilai KHM dan KBM menggunakan metode dilusi tabung yang dilanjutkan dengan uji *streaking*.

