

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek antimikroba dari ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Kadar Hambat Minimal (KHM) atau yang biasa dikenal dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah dari suatu antimikroba yang bisa mencegah tampilan keruh pada dilusi tabung yang menandakan bahwa pada kelarutan tersebut sifatnya adalah bakteristatik (Rollins and Joseph, 2000). KHM seringkali digunakan oleh peneliti untuk menentukan aktivitas *in vitro* dari antimikroba jenis baru (Andrews, 2006). Kadar Bunuh Minimal (KBM) atau yang biasa dikenal dengan *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) adalah konsentrasi minimal dari bahan antibiotik yang dapat membunuh inoculum dan dapat ditentukan dengan melakukan subkultur pada media agar dari uji dilusi pada penentuan KHM dan jumlah minimal dari KBM adalah yang dapat mengurangi 99,9% jumlah koloni bakteri di dalam inokulum dalam kurun waktu 24 jam melalui pengujian standar. Suatu bahan dikatakan sebagai bakterisid apabila KBM tidak lebih dari empat kali lipat KHM (French, 2006). Pada penelitian ini digunakan metode dilusi tabung, yaitu metode untuk melihat sensitivitas bahan antimikroba dan bekerja sebagai metode yang akurat untuk menentukan hubungan KHM dari suatu bakteri (Branch et al., 1965). Lalu dapat

menentukan KBM suatu bahan antimikroba setelah dilakukan kultur pada media agar dari hasil dilusi tabung tersebut.

Pada penelitian ini, untuk menentukan besar KHM, parameter yang digunakan adalah tingkat kekeruhan larutan pada media *Nutrient Broth* (NB). Untuk menentukan KBM, menggunakan parameter penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP). Sehingga, pada penelitian ini didapatkan KHM pada konsentrasi 25% dan KBM pada konsentrasi 27,5%.

6.1 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri Gram negatif, pada mikroskop akan tampak bentuk batang berwarna merah. *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 digunakan isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang telah dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri dilakukan uji identifikasi terlebih dahulu untuk mengkonfirmasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Identifikasi dilakukan dengan cara pewarnaan Gram, kemudian pembiakan bakteri pada media agar *MacConkey*, serta identifikasi biokimia menggunakan *Microbact*.

Hasil identifikasi dari pewarnaan Gram didapatkan gambaran bakteri berbentuk batang dan berwarna merah (Gram negatif). Pada uji identifikasi pembiakan pada agar *MacConkey*, didapatkan bentukan koloni yang mukoid dan berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri ini memfermentasi laktosa,

yang merupakan sifat dari bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Serta, pada identifikasi biokimia yang dilakukan menggunakan *Microbact* hasilnya bakteri ini merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan kadar 97,74%. Oleh karena itu, dapat dipastikan bahwa isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* murni.

Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang menguji efektivitas antimikroba suatu bahan alam lain terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian mengenai efektivitas madu terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 50% (Munfaidah, 2010). Pada penelitian lainnya mengenai efektivitas ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 2g/ml (Thalib, 2012). Serta pada penelitian mengenai efek gel lidah buaya (*Aloe vera*) terhadap *Klebsiella pneumoniae* didapatkan KBM pada konsentrasi 30% (Pramesti, 2011). Sedangkan pada penelitian ini didapatkan KHM sebesar 25% atau 0,832 g/ml dan KBM sebesar 27,5%, atau 0,916 g/ml, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun tempuyung cukup efektif digunakan sebagai antimikroba terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

6.2 Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)

Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun tempuyung dibuat dengan cara mengekstrak daun tempuyung dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Daun tempuyung didapat Materia Medika Batu dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

Tempuyung mengandung banyak senyawa kimia, seperti golongan flavonoid (kaemferol, luteolin-7-O-glukosida dan apigenin-7-O-glukosida), kumarin, auron, taraksasterol serta asam fenolat bebas (Balai Informasi

Teknologi LIPI, 2009). Kandungan flavonoid total dalam daun tempuyung 0,1044%, dengan jenis yang terbesar adalah apigenin-7-O-glikosida (IPTEKnet, 2005). Adapun senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun tempuyung adalah flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, glikosida, dan polifenol (Fariha, 2010).

Zat aktif saponin, flavonoid, dan tanin yang terkandung pada daun tempuyung bersifat larut dalam alkohol. Etanol merupakan salah satu jenis alkohol yang mengandung dua gugus karbon. Etanol digunakan sebagai pelarut bahan aktif pada daun tempuyung 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). Etanol juga digunakan sebagai pelarut karena lebih selektif dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, panas untuk pemekatan sedikit, dan mudah bercampur dengan air (Puryanto, 2009). Sehingga, pada penelitian ini, daun tempuyung diekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Namun dalam penelitian ini belum dapat diketahui secara tepat kandungan bahan aktif dan persentase kadar masing-masing bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak daun tempuyung yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut agar dapat diketahui secara pasti bahan aktif memiliki peran paling besar sebagai antimikroba.

Sifat antimikroba yang dimiliki oleh tumbuhan tempuyung sudah pernah diteliti sebelumnya. Penelitian mengenai uji ekstrak daun tempuyung terhadap bakteri *Escherichia coli* didapatkan daya hambat pada konsentrasi 50% dan terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* didapatkan daya hambat pada konsentrasi

60% (Fariha, 2010). Pengujian efek antimikroba dari tumbuhan tempuyung juga dilakukan terhadap patogen oral *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan nilai KHM pada 15.6 dan 62.5 µg/ml (Xia et al., 2010). Namun pada penelitian lain menunjukkan bahwa tumbuhan tempuyung tidak berfungsi sebagai antifungi (*C. albicans* dan *A. flavus*) karena komposisi kitin pada dinding sel jamur yang tidak ditemukan pada bakteri (Upadhyay et al., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa tumbuhan tempuyung dapat bersifat sebagai antimikroba terhadap bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif. Untuk melihat apakah dapat bersifat sebagai antimikroba terhadap bakteri Gram negatif lainnya, maka pada penelitian ini dilakukan pengujian efektivitas ekstrak etanol daun tempuyung terhadap bakteri Gram negatif *Klebsiella pneumoniae* dan dihasilkan KHM pada konsentrasi 25% atau 0,832 g/ml dan KBM pada konsentrasi 27,5% atau 0,916 g/ml.

6.3 Mekanisme Kerja dan Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Tempuyung

6.3.1 Mekanisme Kerja Ekstrak Etanol Daun Tempuyung

Daun tempuyung memiliki kandungan saponin, tanin, dan flavonoid yang merupakan bahan antimikroba. Saponin memiliki aktivitas antifungal dan antibakteri yang berspektrum luas. Saponin mempunyai kerja merusak membran plasma dari bakteri (Hopkins, 1995). Tanin berpotensi sebagai antimikroba 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). Flavonoid memiliki cara kerja untuk melakukan denaturasi protein, sehingga akan merusak

dinding sel dan membran sel bakteri. Selain itu pula, flavonoid berikatan dengan struktur lipid sehingga bisa merusak membran sel bakteri serta merusak DNA bakteri (Cowan, 1999). Meski kandungan saponin dan tanin tidak terlalu dominan, namun berdasarkan berbagai mekanisme tersebut, ekstrak daun tempuyung memiliki potensi sebagai antimikroba, termasuk salah satunya terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia*.

6.3.2 Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Tempuyung

Sebelum melakukan penelitian dengan beberapa variasi konsentrasi, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk mengetahui ekstrak etanol daun tempuyung memiliki hambatan atau tidak terhadap pertumbuhan koloni 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 27,5%. Oleh karena itu konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 17,5%, 20%, 22,5%, 25%, dan 27,5%, serta konsentrasi 0% sebagai kontrol bakteri dan konsentrasi 100% sebagai kontrol bahan.

Pengukuran efek antimikroba ekstrak etanol daun tempuyung terhadap *Klebsiella pneumoniae* menggunakan parameter tingkat kekeruhan larutan pada media *Nutrient Broth* (NB) untuk menentukan nilai KHM dan penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) menggunakan *colony counter*. Pada penelitian ini, KHM didapat pada konsentrasi 25% (Gambar 5.4). KHM ditentukan pada konsentrasi terendah yang tidak didapatkan pertumbuhan bakteri atau tidak didapatkan kekeruhan. Hal ini diketahui dengan membandingkan tingkat kekeruhan pada tabung yang berisi berbagai macam konsentrasi dengan kontrol bakteri. KBM ditentukan pada konsentrasi terendah

dimana pertumbuhan koloni bakteri $<0,1\%$ *original inoculum* (OI). Nilai rerata OI pada penelitian ini adalah 382×10^2 CFU/ml, sehingga konsentrasi dimana koloni bakteri yang jumlahnya $<0,1\%$ dari OI (0 koloni) pada empat kali pengulangan adalah pada konsentrasi 27,5% (Tabel 5.1).

Hasil hitungan pertumbuhan koloni bakteri kemudian dilakukan analisis menggunakan *One-way ANOVA* (*Analysis of Variance*), uji korelasi *Pearson*, dan uji regresi linier. Untuk analisis data menggunakan *One-way ANOVA*, data harus terdistribusi normal dan memiliki ragam yang homogen (Dahlan, 2010).

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* pada data awal diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,869 ($p > 0,05$) sehingga disimpulkan data variabel tersebut berdistribusi normal (Lampiran 1.1). Hasil uji homogenitas ragam (*Levene test*) didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,06 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa ragam data jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* pada media NAP relatif homogen (Lampiran 1.2). 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 antimikroba pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada NAP (Lampiran 1.3). Pada analisis *Post Hoc (Duncan) test* didapatkan hasil bahwa setiap perlakuan atau setiap konsentrasi ekstrak daun tempuyung memiliki perbedaan efek pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang signifikan antara yang satu dengan yang lainnya (Lampiran 1.4).

Berdasarkan hasil analisis uji Korelasi (Tabel 5.4), didapatkan $p = 0,000$ dan $r = -0,992$ (Lampiran 1.6). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan (korelasi) yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat (r

antara 0,80 – 1,00) dengan arah korelasi negatif (koefisien r negatif), yang berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung maka jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* akan semakin menurun. Berdasarkan hasil analisis uji Regresi diperoleh model persamaan regresi $Y=457,384 - 17,732 X$, dimana Y adalah jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP, sedangkan X adalah pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung. Selain itu, juga didapatkan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 98,4% yang menyatakan besarnya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun tempuyung terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP. Sedangkan sisanya ($1-R^2$) sebesar 1,6% yang artinya keragaman jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP tersebut dipengaruhi oleh faktor – faktor lain (Tabel 5.5). Berdasar grafik linieritas didapatkan hubungan linieritas yaitu peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung cenderung akan menurunkan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media NAP (Gambar 5.7).

Adanya penurunan jumlah pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun tempuyung yang telah dibuktikan melalui hasil penelitian dan analisis data menggunakan statistik, beserta didukung dengan berbagai teori adanya kandungan bahan aktif antimikroba pada daun tempuyung, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun tempuyung terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Sehingga hal ini membuktikan bahwa hipotesis yang disusun sebelumnya dapat diterima.

6.4 Aplikasi Klinis Ekstrak Etanol Daun Tempuyung sebagai Antimikroba

Selama ini ekstrak tumbuhan tempuyung dikenal masyarakat sebagai obat untuk diuretika dan asam urat, namun belum dikenal efek antimikroba dari tumbuhan tempuyung. Aplikasi klinis yang bisa dilanjutkan dari penelitian ini ke depannya adalah diharapkan adanya pemanfaatan ekstrak daun tempuyung sebagai bahan dasar industri obat sebagai alternatif antimikroba terhadap adanya infeksi dari *Klebsiella pneumoniae*. Namun proses untuk menjadikan ekstrak daun tempuyung menjadi sediaan obat yang bisa dikonsumsi masyarakat, harus melalui berbagai penelitian terlebih dahulu dan harus dilaksanakan penelitian lebih lanjut di laboratorium yang bersertifikat dengan fasilitas yang memadai.

