# EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP *Staphylococcus aureus SECARA IN VITRO*

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**


**Oleh :**

**Khairunnisa**

**155070101111026**


**PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Khairunnisa

NIM : 155070101111026

Program Studi : Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah jiblakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Desember 2018

Yang membuat pernyataan

Khairunnisa

NIM. 155070101111026

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis kepada Allah Yang Maha Esa yang telah memberikan berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Efek Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antimikroba Terhadap *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*". Atas selesainya tugas akhir ini, rasa bersyukur dan terima kasih juga penulis haturkan kepada:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan untuk menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes selaku ketua jurusan program studi pendidikan dokter yang telah memberikan penulis kesempatan belajar di Program Studi Pendidikan Dokter
3. dr. Tri Wahju Astuti, M.Kes, Sp.P (K) selaku ketua program studi sarjana kedokteran yang telah memberikan penulis kesempatan belajar di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
4. dr. Dewi Erikawati, M.Si sebagai pembimbing pertama yang selalu sabar sejak awal membimbing penulis dari pembuatan judul hingga selesainya tugas akhir ini dan semoga diberikan kesehatan dan keharmonisan keluarga selalu.
5. Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K) sebagai pembimbing kedua yang telah menyempatkan waktunya untuk menyempurnakan pemahaman saya mengenai penelitian dan proses pembuatan skripsi dan semoga diberi kesehatan dan kebahagiaan selalu.

6. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc sebagai penguji pertama yang mau turut serta dalam menyempurnakan naskah tugas akhir penulis dan semoga semakin lancar dalam berkarir dan akademik.
7. Mba Betty Anggraeni dan segenap tim pengelola tugas akhir yang telah mengerjakan urusan administrasi sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan lancar.
8. Bu uci, rekan analis, dan admin laboratorium mikrobiologi yang telah membantu proses penelitian dari awal hingga akhir.
9. Kedua orang tua, Syaiful Bahri Harahap dan Taufeni taufik serta kedua saudara Habibi dan Ilham yang telah banyak mendukung, memelihara, dan mendoakan penulis.
10. Nurul Atika, Cyntia putri, Arika Latashia selaku teman penelitian yang selalu mendukung, membantu, dan memotivasi penulis dalam pengerjaan tugas akhir.
11. Noviena nurrahmi, Adinda putri nadira, Putry adenia, Sheila oklia, Dea aninditha, Maria rinonce dan EB MSCIA 2016/2017 selaku teman dekat yang selalu mengingatkan dan memberikan dukungan dalam mengerjakan tugas akhir ini
12. Semua pihak lainnya yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini tidaklah paling sempurna dan ilmu pengetahuan akan terus berkembang. Oleh karena itu penulis menerima dengan senang hati setiap kritik dan saran mengenai tugas akhir ini.

Dengan ini, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan. Demikian yang dapat penulis sampaikan, terima kasih.

Malang, 18 Desember 2018

Penulis

# ABSTRAK

Khairunnisa. 2018. **Efek Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai AntimikrobaTerhadap *Staphylococcus aureus Secara In Vitro.*** Tugas Akhir. Program Studi Sarjana Kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si, (2) Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K).

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu agen penyebab infeksi terbanyak dan cepat menjadi resisten terhadap antimikroba. Hal ini merupakan penyebab masalah terbesar pada terapinya. Daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai bahan pengganti obat yang memiliki senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri sebagai antimikroba. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dan membuktikan efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode dilusi agar dengan 4 kali pengulangan. Terdapat 5 kelompok dengan 4 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, dan kontrol negatif berisi ekstrak konsentrasi 0%. Kadar Hambat Minimal (KHM) diperoleh dengan tidak terlihatnya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* di media *Mueller Hinton* agar pada konsentrasi terendah dari kelompok uji. Hasil penelitian menunjukan bahwa KHM ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* pada konsentrasi 1.5 %. Hasil uji *Spearman* didapatkan hubungan yang signifikan ($p<0,05$) dengan korelasi yang sangat kuat (R: -0.975). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

**Kata kunci**: *Staphylococcus aureus,* daun sirih merah, antimikroba, dilusi agar.

## ABSTRACT

Khairunnisa. 2018. **The Effect of Ethanol Extract Red Betel Leaf (*Piper crocatum*) as an Antimicrobial on *Staphylococcus aureus In Vitro*.** Thesis. Medical Education Study Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Advisors: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si, (2) Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K).

*Staphylococcus aureus* is one of the agents that causes the most infections and quickly becomes resistant to antimicrobials. This is the biggest cause of problems in therapy. Red betel leaf (*Piper crocatum*) as a substitute for drugs that have active compounds such as alkaloids, flalvonoid, tannin, and essential oils as antimicrobials. The purpose of this study was to determine and prove the effect of ethanol extract of red betel leaf (*Piper crocatum*) as an antimicrobial on *Staphylococcus aureus* in vitro. This study uses a dilution method with 4 repetitions. There were 5 groups consisting 4 groups with concentrations of 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, and negative controls (0%). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were obtained with no visible growth of *Staphylococcus aureus* in *Mueller Hinton* media in the lowest concentration of the test group. The results showed that MIC of ethanol extract of red betel leaf (*Piper crocatum*) at a concentration is 1.5%. The result from Spearman test a significant relationship ($p<0.05$) with a very strong correlation was obtained (R : -0.975). The conclusion of this study is the ethanol extract of red betel leaf (*Piper crocatum*) can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria in vitro.



**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, red betel, antimicrobials, dilution method.

## DAFTAR ISI

Halaman

**JUDUL** ..... **i**
**HALAMAN PENGESAHAN** ..... **ii**
**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN** ..... **iii**
**KATA PENGANTAR** ..... **iv**
**ABSTRAK** ..... **vii**
**ABSTRACT** ..... **viii**
**DAFTAR ISI** ..... **ix**
**DAFTAR TABEL** ..... **xii**
**DAFTAR GAMBAR** ..... **xiii**
**DAFTAR SINGKATAN** ..... **xiv**
**DAFTAR LAMPIRAN** ..... **xv**
**BAB 1 PENDAHULUAN** ..... **16**
1.1 Latar Belakang ..... 16
1.2 Rumusan Masalah ..... 20
1.3 Tujuan Penelitian ..... 20
1.3.1 Tujuan Umum ..... 20
1.3.2 Tujuan Khusus ..... 20
1.4 Manfaat Penelitian ..... 20
1.4.1 Manfaat Akademik ..... 20
**BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA** ..... **21**
2.1 *Staphylococcus aureus* ..... 21
2.1.1 Klasifikasi ..... 21
2.1.2 Morfologi ..... 22
2.1.3 Patogenesis ..... 23
2.1.4 Metabolit Bakteri ..... 24
2.1.5 Metabolit Non-toksin ..... 24

2.1.6 Eksotoksin.....25
2.1.7 Enterotoksin.....26
2.1.8 Katalase.....26
2.1.9 Toksin Sindrom Syok Toksik (TSST).....26
2.1.10.Resistensi Antibiotik.....27
2.2 Sirih Merah.....29
2.3 Kegunaan.....33
**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....36**
3.2 Hipotesis Penelitian.....37
**BAB 4 METODE PENELITIAN.....38**
4.1 Rancangan Penelitian.....38
4.2 Sampel Penelitian.....38
4.3 Jumlah Pengulangan.....38
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....39
4.5 Variabel Penelitian.....39
4.5.1 Variabel Bebas.....39
4.5.2 Variabel Tergantung.....39
4.6 Definisi Operasional.....40
4.7 Alat dan Bahan Penelitian.....41
4.7.1 Alat-alat Untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah.....41
4.7.2 Bahan-bahan Untuk Pembuatan E kstrak Daun Sirih Merah.....41
4.7.3 Alat-alat Untuk Pewarnaan Gram Bakteri.....42
4.7.5 Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Agar.....42
4.8 Prosedur Penelitian.....43
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah.....43
4.8.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*.....44
4.8.3 Pembuatan Suspensi Uji *Staphylococcus aureus*.....47
4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Daun Sirih Merah.....48
4.8.5 Alur Kerja Penelitian.....50
4.9 Pengolahan Data.....51

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....53**
5.1 Hasil Penelitian.....53
5.1.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*.....53
5.1.2 Hasil Penelitian Pendahuluan.....57
5.2 Analisis Data.....64
5.2.1 Uji Normalitas.....64
5.2.2 Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis.....65
5.2.3 Uji Korelasi *Spearman*.....66
5.2.4 Uji Mann-Whitney.....68
**BAB 6 PEMBAHASAN.....69**
**BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....74**
7.1 Kesimpulan.....74
7.2 Saran.....74
**DAFTAR PUSTAKA.....76**
**LAMPIRAN.....81**

# DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Kronologi Infeksi *S. aureus* dan Resistensinya.....27

Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan Penelitian Selama Bulan Desember 2017 Desember 2018.....52

Tabel 5.1 Hasil skoring Pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*)..... 63

Tabel 5.2 Hasil Uji Mann-Whitney signifikansi dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*).....68

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 *Staphylococcus aureus* yang Dilihat dari Mikroskop Elektron.....22

Gambar 2.2 Daun Sirih Merah.....30

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....36

Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian.....50

Gambar 5.1 Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Pengecatan Gram dengan perbesaran 1000x.....53

Gambar 5.2 Hasil katalase *Staphylococcus aureus* positif.....54

Gambar 5.3 Hasil koagulase *Staphylococcus aureus* positif.....54

Gambar 5.4 Uji Disk Cefoxitin *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar.....55

Gambar 5.5 Ekstrak etanol daun sirih merah.....56

Gambar 5.6 Hasil Penelitian Pendahuluan.....58

Gambar 5.7 Hasil Penelitian Perapatan.....59

Gambar 5.8 Hasil Penelitian Inti.....61

Gambar 5.9 Kepadatan koloni bakteri.....62

Gambar 5.10 Hasil uji Kolmogorov Smirnov & Shapiro-Wilk.....65

Gambar 5.11 Hasil Uji Kruskal-Wallis.....66

Gambar 5.12 Hasil Uji korelasi *spearman*.....67

## DAFTAR SINGKATAN

| | |
|---|---|
| MH | : *Mueller Hinton* |
| KBM | : Kadar Bunuh Minimum |
| KHM | : Kadar Hambat Minimum |
| OD | : *OD (Optical Dencity)* |
| *S.aureus* | : *Staphylococcus aureus* |

Universitas Brawijaya

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat Keaslian Ekstrak Daun Sirih Merah *(Piper crocatum)*.....81

Lampiran 2. Surat Keterangan Simplisia Materia Medik.....82

Lampiran 3. Hasil Uji Non-Parametrik Mann-Whitney.....83

# BAB 1
# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen, dan bersifat sangat dinamis. Secara umum proses terjadinya penyakit melibatkan tiga faktor yang saling berinteraksi yaitu : faktor penyebab penyakit (agen), faktor manusia atau pejamu (*host*), dan faktor lingkungan. Penyakit infeksi merupakan penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata biasa, hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop (Boucher, 2008; Darmadi, 2008).

Angka kejadian infeksi nosokomial yang dilaporkan WHO (2002) pada empat region dunia yaitu Eropa, Mediterania Timur, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat berturut-turut adalah 7,7%, 11,8%, 10%, dan 9% dengan rata-rata kejadian 8,7%. Sedangkan di negara berkembang terdapat lebih dari 40% pasien terserang infeksi nosokomial. Dengan infeksi daerah operasi sebesar 24% menjadi infeksi nosokomial kedua terbanyak setelah infeksi saluran kemih. Bakteri penyebab *Surgical Site Infections* (SSI)/Infeksi Daerah Operasi (IDO) terbanyak adalah *Staphylococcus aureus*. Hal ini mengakibatkan rawat inap yang berkepanjangan dan meningkatnya risiko kematian (Anderson, 2011). Sementara itu di Indonesia, tepatnya Jakarta pada periode tahun 1986-1993 terjadi peningkatan angka kejadian infeksi *Staphylococcus aureus* hampir empat kali lipat dari 2,5% menjadi 9,4% (Kodim, 2010). Menurut penelitian yang dilakukan Dudy D. Nurkusuma di Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang, terdapat 23 kasus infeksi luka pasca operasi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*

(Nurkusuma *et al*., 2010). Tidak hanya di Indonesia, di negara maju seperti Inggris, diperkirakan satu dari lima pasien pasca operasi esofagektomi terinfeksi *Staphylococcus aureus* di *University Hospital of Wales* (Bowrey DJ *et al.*, 2007). Angka insiden infeksi daerah operasi (IDO) sebanyak 67 kasus di Jawa Timur pada tahun 2011 hingga 2013 yang disebabkan oleh *S.aureus* (Sari dan Satyabakti, 2015).

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat, biasanya tersusun dalam bentuk rangkaian tak beraturan seperti anggur. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis atau sepsis dengan supurasi di tiap organ. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi oleh *Staphylococcus aureus* dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses serta dapat menyebabkan berbagai macam infeksi seperti pada jerawat, bisul, atau nanah. Infeksinya juga dapat berupa furunkel yang ringan pada kulit sampai berupa suatu piema yang fatal. *Staphylococcus aureus* mempunyai kemampuan berkembangbiak dan dapat menyebar luas dalam jaringan tubuh serta dapat memproduksi beberapa zat ekstraseluler yang dapat menimbulkan berbagai penyakit. *Staphylococcus aureus* cepat menjadi resisten terhadap beberapa antimikroba dan ini merupakan masalah besar pada terapi (Jawetz *et al*., 2013).

Menurut Khunaifi (2010) timbulnya *strain* bakteri yang resisten terhadap antibiotik pada penyakit infeksi merupakan masalah penting. Kekebalan bakteri terhadap antibiotik menyebabkan angka kematian semakin meningkat. Sedangkan penurunan infeksi oleh bakteri-bakteri patogen dapat menurunkan angka kematian. Selain itu cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi

berbagai antibiotik juga dapat menimbulkan masalah resistensi. Pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik memerlukan produk baru yang memiliki potensi tinggi. Penelitian zat yang berkhasiat sebagai antibakteri perlu dilakukan untuk menemukan produk antibiotik baru yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat. Penggunaan antimikroba yang tidak rasional telah menyebabkan banyak mikroba patogen beradaptasi dengan lingkungannya dan menjadi resisten terhadap obat tersebut. Meningkatnya masalah resistensi menyebabkan kebutuhan akan obat antimikroba baru yang dapat mengatasi masalah resistensi juga meningkat, oleh karena itu pencarian antimikroba baru termasuk dari tanaman terus dilakukan (Khunaifi, 2010).

Tanaman obat yaitu tanaman yang berupa daun, batang, buah, bunga dan akarnya yang memiliki khasiat sebagai obat dan digunakan sebagai bahan mentah dalam pembuatan obat modern maupun obat- obatan tradisional. Pemanfaatan tanaman obat sebagai bahan baku obat, terutama obat tradisional mencapai lebih dari 1000 jenis, dimana 74% diantaranya merupakan tumbuhan liar yang hidup di hutan (Masniani *et al.*, 2006).

Sirih merupakan tanaman yang telah banyak digunakan sebagai obat di Asia Tenggara. Sirih di Indonesia ada beberapa jenis, yang dibedakan berdasarkan bentuk daun, rasa dan aromanya, yaitu sirih hijau, sirih banda, sirih cengkih, sirih hitam dan sirih merah. *Piper crocatum* atau sirih merah merupakan salah satu tanaman obat potensial yang sudah dikenal sejak dahulu, diketahui memiliki berbagai macam khasiat obat untuk berbagai jenis pernyakit, seperti

diabetes, kanker, asam urat, hipertensi, dan lain sebagainya. Berbagai kandungan aktif di dalamnya dipercaya memiliki manfaat untuk kesehatan. Sirih merah dapat kita temukan di sepanjang tahun di Indonesia karena pemeliharaan tanaman sirih merah tidak membutuhkan perawatan yang sulit. Sirih merah dapat tumbuh tanpa pemupukan dan hanya bergantung pada jumlah air dan cahaya matahari yang cukup sekitar 60-75% (Utami, 2013).

Menurut Syariefa (2006) dari seluruh bagian tanaman sirih merah yang mengandung unsur-unsur zat kimia yang bermanfaat untuk pengobatan terutama daunnya. Daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, senyawa polifenol, tanin dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai daya antimikroba (Sudewo, 2010). Menurut Ardiansyah (2003) usaha untuk mencari sumber antimikroba baru, yang berasal dari bahan alami atau tanaman indigenus yang terdapat di Indonesia terus dilakukan. Selain dapat dijadikan obat herbal juga dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh suatu mikroorganisme yang telah resisten terhadap obat kimia (Barbut, 2002; Ebadi, 2002; Ardiansyah, 2003; Syariefa, 2006).

Selain itu efek ekstrak daun sirih merah juga sudah diteliti oleh Suswati (2012) terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae* dengan hasil penelitian terbentuk Kadar hambat minimal (KHM) sebesar 6,25%. Serta dibuktikan juga oleh Prahastiwi (2014) dengan yang meneliti tentang Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum ruiz & pav*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* Atcc 14745 Dan *Shigella flexneri* Atcc 12022 Serta Mekanisme Penghambatannya dengan hasil penelitian terbentuknya KHM sebesar 6,25%.

Dasar inilah yang akan digunakan penulis sebagai acuan dalam pemilihan konsentrasi yang akan digunakan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mempunyai efek antimikroba terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?.

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui dan membuktikan efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus.*

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Memberikan informasi sebagai dasar penelitian atas manfaat daun sirih merah sebagai antimikroba.
2. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat dari ekstrak daun sirih merah sebagai antimikroba terhadap *S.aureus*.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat menjadi pilihan terapi adjuvant dalam mengobati infeksi *Staphylococcus aureus.*
2. Menambah sumber antimikroba yang berasal dari tumbuhan alami.

# BAB 2
# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Staphylococcus aureus

### 2.1.1 Klasifikasi

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang berbentuk kokus gram positif. Termasuk ke dalam *Famili micrococcaceae* yang ditandai dengan adanya enzim sitokrom yang memberikan tes positif pada tes benzidin dan katalase, dengan *Genus Staphylococcus* yang dalam suasana *anaerob* dapat mengadakan fermentasi glukosa yang menghasilkan asam laktat dan keadaan *aerob* mengadakan fermentasi gliserol (Roekistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016). Spesies *Staphylococcus* terdiri dari 40 jenis, berikut 4 spesies yang memiliki arti penting secara klinis *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus lugdunensis*, dan *Staphylococcus saprophyticus* (Jawetz *et al.*, 2013).

Taksonomi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Domain : *Bacteria*

Kerajaan : *Eubacteria*

Filum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacilli*

Ordo : *Bacillales*

Famili : *Micrococcaceae*

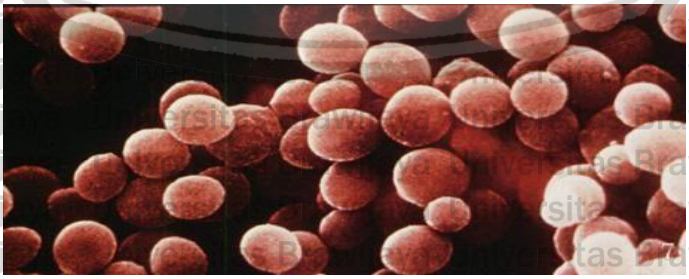
Genus :*Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

### 2.1.2 Morfologi

*Staphylococcus* berbentuk bulat/kokus/spheres dengan berdiameter 0,4-1,2 µm, yang tersusun bergerombol seperti buah anggur, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak dan tahan dalam lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi yang tinggi (halofilik). Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37ºC, dengan PH optimal untuk pertumbuhan 7,4 tetapi membentukan pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 ºC) (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *Staphylococcus aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri. Berbagai derajat hemolisis disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dan kadang-kadang oleh spesies stafilokokus lainnya (Jawetz *et al.,* 2013). *Staphylococcus aureus* merupakan normal flora biasanya ditemukan di jalan nafas, kulit, dan membran mukosa (Todar, 2012).



**Gambar 2.1. *Staphylococcus aureus* yang Dilihat dari Mikroskop Elektron** (Todar, 2012).

Keterangan : Bentuknya Coccus/bulat, Ukurannya berdiameter 0,8 – 1 µm. Susunannya 2-2, 4-4. Bergerombol seperti buah anggur.

### 2.1.3 Patogenesis

*Staphylococcus aureus* menyebabkan infeksi supuratif (menghasilkan pus) yang bermacam-macam pada manusia. Bakteri ini dapat menyebabkan lesi kulit *superficial* seperti bula dan furunkel ; infeksi yang lebih serius seperti pneumonia, mastitis, phlebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomyelitis, dan endocarditis. *Staphylococcus aureus* juga merupakan salah satu penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit yang dapat berasal dari luka operasi ataupun dari alat medis. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan keracunan makanan dengan melepaskan *enterotoxin* pada makanan, dan menyebabkan *toxic shock syndrome* dengan melepaskan *superantigen* ke aliran darah (Todar, 2012).

*Staphylococcus aureus* melepaskan berbagai faktor virulensi diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Protein di permukaan yang mempromosi kolonisasi dari jaringan *host*.
2. Invasins (Leukocidin, Kinase, Hyaluronidase) yang mempromosi penyebaran bakteri di jaringan.
3. *Surface factors* (kapsul, protein A) yang menginhibisi fagositosis.
4. *Biochemical properties* (karotenoid, katalase) yang mempengaruhi pertahanan hidup di dalam fagosit.
5. *Immunological disguise* (Protein A, koagulase)
6. Toksi yang merusak membran (Hemolysin, Leukotoxin, Leukocidin) yang melisiskan membrane dari sel eukariotik.
7. *Exotoxin* (SEA-G, TSST, ET)
8. Resistensi dari antimikroba (Todar, 2012).

Kebanyakan dari penyakit yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* patogenesisnya dikarena banyak faktor. Namun, terdapat hubungan antara *strain* yang diisolasi dari beberapa penyakit tertentu dengan ekspresi faktor virulensi yang menunjukan bahwa setiap faktor virulensi mempunyai peran dalam beberapa penyakit. Pada manusia, infeksi kulit dikarenakan *Staphylococcus aureus* sering terjadi namun letak infeksi ini biasanya tetap terlokalisasi di *port of entry*. Tempat masuknya bakteri ini bisa dari folikel rambut, atau dari luka di kulit yang biasanya karena tusukan jarum ataupun luka operasi. Apabila terdapat benda asing contohnya jahitan pada luka operasi yang sudah dikolonisasi oleh *Staphylococcus aureus* menyebabkan infeksi sulit untuk dikontrol. Tempat masuk bakteri lainnya adalah saluran pernafasan yang menyebabkan Stapnylococcal pneumonia (Todar, 2012).

Respon tubuh dari infeksi *Staphylococcus aureus* adalah inflamasi yang ditandai dengan peningkatan suhu pada lokasi infeksi, kemerahan, bengkak, akumulasi pus, dan nekrosis jaringan. Di sekitar area inflamasi, dapat terbentuk *fibrin clot*. Beberapa infeksi kulit yang lebih serius dapat terjadi yaitu furunkel atau impetigo. Infeksi pada tulang karena *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan osteomyelitis. Infeksi yang sangat serius dapat terjadi apabila bakteri masuk ke dalam aliran darah. Hal ini dapat menyebabkan bakteremia yang dapat menyebar menjadi internal *abscess,* lesi kulit, infeksi di paru-paru, jantung, meningen, dan ginjal (Todar, 2012).

### 2.1.4 Metabolit Bakteri

*Staphylococcus* menghasilkan bahan metabolit yang dapat diklasifikasikan dalam tiga bentuk yaitu metabolit non-toksin, eksotoksin, dan

enterotoksin (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

**2.1.5 Metabolit Non-toksin**

A. Antigen Permukaan : yang memiliki fungsi sebagai mencegah fagositosis, mencegah reaksi koagulase dan mencegah melekatnya bakteriofaga (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

B. Koagulase : antigen protein yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus,* bersifat sebagai *clotting agent* proteolitik dan osteolitik. Tes koagulase memiliki peranan penting menentukan patogenisitas bakteri. Pada umumnya *Staphylococcus aureus* memberikan hasil koagulase yang positif (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

   Enzim ini dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat, karena adanya faktor koagulase reaktif dalam serum yang bereaksi dengan enzim tersebut. Esterase yang dihasilkan dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan, sehingga terbentuk deposit fibrin pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis ( Tortora, 2013).

C. Hialuronidase : dihasilkan oleh 93,6% galur dengan koagulase positif yang memiliki sifat invasif (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

D. Stafilokinase : dihasilkan oleh 80% galur dengan koagulase positif dan negati, bekerja sebagai aktvator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent* (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

E. Protease : bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi, termasuk jaringan tulang (Roeskistiningsih,

dan Fitri,B.S., 2016).

**2.1.6 Eksotoksin**

Eksotoksin *Staphylococcus* bersifat mematikan, tidak tahan panas dan dapat menyebabkan nekrosis lapisan dermis.

A. Toksin alfa : bersifat mematikan, tidak tahan panas, dan dapat menyebabkan nekrosis lapisan dermis. Toksin alfa dipakai untuk menentukan virulensi (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

B. Toksin beta : dapat menimbulkan lisis terhadap eritrosit pada hewan (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

C. Toksin delta : bersifat non-toksik, dapat merusak sel eritrosit manusia dan kuda (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

**2.1.7 Enterotoksin**

Dihasilkan pada 30% galur dengan koagulase positif. Sering menjadi penyebab keracunan makanan terutama pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Menelan 25 µg akan menyebabkan muntah dan diare (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

**2.1.8 Katalase**

Katalase adalah enzim yang merusak fibrin yang berperan pada daya tahan bakteri terhadap proses fagositosis. Tes adanya aktivtias katalase menjadi pembeda genus *Staphylococcus* dari *Streptococcus* (Tortora, 2013).

**2.1.9 Toksin Sindrom Syok Toksik (TSST)**

Sebagian besar galur *S.aureus* yang diisolasi dari penderita sindrom syok toksik menghasilkan eksotoksin pirogenik. Pada manusia, toksin ini

menyebabkan demam, syok, ruam kulit, dan gangguan multisistem organ dalam tubuh. Diperkirakan toksin ini meransang sel-sel imunokompeten dalam jumlah yang cukup banyak, digolongkan sebagai super antigen (Roeskistiningsih, dan Fitri,B.S., 2016).

### 2.1.10. Resistensi Antibiotik

Resistensi antibiotik adalah kemampuan mikroorganisme untuk bertahan dari pengaruh suatu antibiotik. Resistensi antibiotik merupakan tipe spesifik dari resistensi obat. Ketika sebuah gen berubah, maka bakteri dapat mengirimkan informasi genetik secara horisontal ke bakteri lainnya melalui pertukaran plasmid. Bakteri yang membawa beberapa gen resistensi disebut *multiresistant* atau *superbug* (Biantoro, 2008).

Pemberian antibiotik diberikan sesuai dengan indikasi dan spektrumnya berdasarkan jenis mikroorganismenya. Tidak selayaknya memberikan antimikroba spektrum luas tanpa mengetahui pasti kausanya. Pemeriksaan kultur dan sensitivitas masih menjadi *gold standar*. Pola bakteri di bagian-bagian tubuh manusia juga diperlukan untuk dasar pertimbangan pemberian antibiotik.

**Tabel 2.1 Kronologi Infeksi *S. aureus* dan Resistensinya** (Biantoro, 2008).

| Tahun | Kejadian |
|---|---|
| 1940 | Penicillin diperkenalkan |
| 1942 | Muncul *S. aureus* resisten penicillin |
| 1959 | Metisilin diperkenalkan, sebagian besar strain *S. aureus* di rumah sakit dan masyarakat resisten penicillin |
| 1961 | Muncul MRSA |
| 1963 | Muncul wabah MRSA di rumah sakit yang pertama |
| 1968 | Ditemukan *strain* MRSA yang pertama di rumah sakit Amerika |

| | |
|---|---|
| 1970-an | Penyebaran klonal MRSA secara global, kejadian MRSA yang sangat tinggi di Eropa Utara |
| 1980-an | Penurunan kejadian MRSA yang dramatis dengan adanya program "*search and destroy*" di Eropa Utara |
| 1996 | VRSA dilaporkan di Jepang |
| 1997 | Muncul VISA, dilaporkan adanya infeksi CA-MRSA yang serius |
| 2002 | Terjadi infeksi VRSA yang pertama di Amerika |
| 2003 | Peningkatan kejadian MRSA hampir 60% di ICU, wabah CA-MRSA dilaporkan terjadi di banyak tempat dan berimplikasi pada wabah di rumah sakit |
| 2006 | >50% infeksi kulit stafilokokus muncut di bagian gawat darurat yang disebabkan CA-MRSA, peningkatan HA-MRSA, perbedaan keduanya secara epidemiologi semakin sulit |
| 2007 | "The Year of MRSA" |

Mekanisme resistensi bakteri dapat terjadi melalui beberapa cara :

1. Organisme memiliki gen pengkode enzim, seperti β- laktamase, yang menghancurkan agen antibakteri sebelum agen antibakteri dapat bekerja.
2. Bakteri dapat memiliki pompa penembus yang menghambat agen antibakteri sebelum dapat mencapai tempat perlekatan target dan memberikan efeknya.
3. Bakteri memiliki beberapa gen yang mempengaruhi jalur metabolisme yang pada akhirnya menghasilkan perubahan pada dinding sel bakteri yang tidak lagi mengandung tempat perlekatan agen antibakteri, atau bakteri bermutasi yang membatasi akses dari agen antimikroba ke tempat perlekatan target intraseluler melalui *down regulation* gen porin (Tenover,

2006).

*S. aureus* merupakan salah satu bakteri yang dapat memproduksi enzim β-laktamase. Enzim ini akan menghilangkan daya antibakteri terutama golongan penisilin seperti metisilin, oksasilin, penisilin G dan ampisilin. Adanya enzim tersebut akan merusak cincin β-laktam sehingga antibiotik menjadi tidak aktif. *Strain S. aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik metisilin disebut *Metichilin-Resistant Staphylococcus aureus* (*MRSA*) (Sulistyaningsih, 2010).

## 2.2 Sirih Merah

### 2.2.1 Klasifikasi

Sinonim; *Chavica auriclata* Miq., *Chavica betle* Miq.; *Piper pinguispicum* DC. Klasifikasi tanaman sirih merah adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisio : Maqnoliophyta

Class : Maqnoliopsida

Ordo : Piperales

Famili : Piperaceae

Genus : Piper

Spesies : Piper crocatum Ruiz dan Pav (Juliantina *et al.,* 2009).

### 2.2.2 Diskriptif Tanaman

1. Batang

Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Permukaanya kasar dan bila terkena cahaya akan cepat mengering. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Di setiap buku tumbuh bakal akar (Sudewo, 2010).

2. Daun

Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata, dan permukaannya mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih (Sudewo, 2010).

3. Akar

Akar daun sirih merah (Piper crocatum Ruiz dan Pav) adalah akar tunggang yang bentuknya bulat dan berwarna coklat kekuningan (Sudewo, 2010).

4. Tempat Hidup

Sirih merah tidak dapat tumbuh subur di daerah panas. Sementara itu, di tempat berhawa dingin sirih merah dapat tumbuh dengan baik. Jika terlalu banyak terkena sinar matahari, batangnya cepat mengering, tetapi jika disiram secara berlebihan akar batang cepat membusuk. Tanaman sirih merah akan tumbuh dengan baik jika mendapatkan 60-70% cahaya matahari (Sudewo, 2010).

**Gambar 2. 2 Daun Sirih Merah** (Sudewo, 2010)

Keterangan : Berbentuk menyirip, dengan bagian depan bewarna hijau ke abu-abuan dan bagian belakang bewarna merah keungu-unguan

### 2.2.3 Kandungan kimia

Daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, senyawa polifenol, tanin dan minyak atsiri (Sudewo, 2010).

#### 1.4.2.1 Flavonoid

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut. Lalu merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid juga berperan dalam inhibisi pada sintesis DNA – RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat, flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energi (Bobbarala, 2012).

Senyawa Flavonoid bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik, dan anti-inflamasi. Senyawa flavonoid merupakan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas menguntungkan bagi kesehatan. Salah satunya bagus untuk mencegah penyakit kanker. Flavonoid melindungi struktur sel, meningkatkan penggunaan vitamin c, mempercantik kulit, mencegah

peradangan, dan digunakan sebagai antibiotik (Utami, 2013).

**2.2.3.2 Alkaloid**

Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina *et al.*, 2008). Selain itu, menurut Gunawan (2009), menyatakan bahwa di dalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang menggandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino. Menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA lalu mengalami kerusakan dan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian sel pada bakteri. Alkaloid berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Handayani, 2012).

**2.2.3.3 Tanin**

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria *et al.,* 2009). Tanin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifasikan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan menggangu transportasi protein pada pada lapisan dalam sel (Mercy *et al.*, 2013). Menurut Sari dan Sari (2011), tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

Tanin diketahui sebagai salah satu bahan aktif yang terkandung dalam daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan berfungsi untuk penyembuhan sakit perut khususnya diare. Selain itu tanin dan sapotanin dapat di pakai sebagai antimikroba ( Mardiana, 2012). Kandungan tanin juga dapat mengurangi sekresi cairan pada vagina (Handayani, 2012).

**2.2.3.4 Minyak atsiri**

Minyak atsiri juga berperan sebagai antibakteri dengan cara menghambat proses terbentuknya membran atau dinding sel bakteri. Hal ini bisa terjadi karena minyak atsiri memiliki gugus hidroksil yang berikatan yang berikatan melalui proses absorpsi melalui ikatan hidrogen (Agusta, 2009).

Minyak atsiri mengandung eugenol yang tergolong turunan senyawa fenol yang mempunyai efek antibakteri dan bekerja dengan merusak membran sel. Mekanisme antibakteri karena pengikatan senyawa fenol dengan sel bakteri, kemudian akan mengganggu permeabilitas membran dan proses transportasi. Hal ini mengakibatkan hilangnya kation dan makromolekul dari sel sehingga pertumbuhan sel akan terganggu. Pada konsentrasi yang rendah senyawa fenol akan menyebabkan denaturasi protein dan pada konsentrasi tinggi yang menyebabkan koagulasi protein sehingga sel akan mati (Maryati, 2007).

**2.3 Kegunaan**

Efek zat aktif yang terkandung dalam sirih merah dapat merangsang syaraf pusat dan daya pikir. Disamping itu juga mempunyai efek ejakulasi dini, antikejang, antiseptik, analgetik, anti ketombe, antidiabetes, pelindung hati, antidiare, mempertahankan kekebalan tubuh, dan penghilang bengkak. Daun sirih merah juga mampu mengatasi radang pada paru, radang pada tenggorok,

radang pada gusi, radang payudara, hidung berdarah, dan batuk berdarah (Sudewo,2010).

## 2.4 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antimikroba

Pada prinsipnya tes kepekaan terhadap antimikroba adalah penentuan terhadap bakteri penyebab penyakit yang kemungkinan menunjukkan resistensi terhadap suatu antimikroba atau kemampuan suatu antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang tumbuh *in vitro*, sehingga dapat dipilih sebagai antimikroba yang berpotensi untuk pengobatan ( Jawetz *et al*., 2013). Uji kepekaan antimikroba (*antimicrobial susceptibility testing*) dilakukan pada isolat mikroba yang didapatkan dari spesimen pasien untuk mendapatkan agen antimikroba yang tepat untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroba tersebut ( Endrian *et al*., 2007). Pengujian dilakukan di bawah kondisi standar, dimana kondisi standar berpedoman kepada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Standar yang harus dipenuhi yaitu konsentrasi inokulum bakteri, media perbenihan *(Muller Hinton*) dengan memperhatikan pH, konsentrasi kation, tambahan darah dan serum, suhu inkubasi, lamanya inkubasi, dan konsentrasi antimikroba (NCCLS, 2005).

### 2.4.1 Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif, antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu, yang kemudian ditanami bakteri yang akan dites. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan MIC (minimal inhibitory concentration) (Koneman, 2006).

A. Dilusi agar

Pada teknik dilusi agar, antibiotik sesuai dengan pengenceran akan ditambahkan ke dalam agar, sehingga akan memerlukan perbenihan agar sesuai jumlah pengenceran ditambah satu perbenihan agar untuk kontrol tanpa penambahan antibiotik, konsentrasi terendah antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri merupakan MIC antibiotik yang diuji (Koneman, 2006).

B. Dilusi perbenihan cair

Dilusi perbenihan cair terdiri dari makrodilusi dan mikrodilusi. Pada prinsipnya pengerjaannya sama hanya berbeda dalam volume. Untuk makrodilusi volume yang digunakan lebih dari 1 ml, sedangkan mikrodilusi volume yang digunakan 0,05 ml sampai 0,1 ml. Antimikroba yang digunakan disediakan pada berbagai macam pengenceran biasanya dalam satuan µg/ml, konsentrasi bervariasi tergantung jenis dan sifat antibiotik, misalnya sefotaksim untuk uji kepekaan terhadap *Streptococcus pneumonia*, pengenceran tidak melebihi 2 µg/ml, sedangkan untuk *Escherichia coli* pengenceran dilakukan pada 16 µg/ml atau lebih (Koneman, 2006).

**2.4.2 Metode Difusi**

Cakram kertas, yang telah dibubuhkan sejumlah tertentu antimikroba, ditempatkan pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Tingginya konsentrasi dari antimikroba ditentukan oleh difusi dari cakram dan pertumbuhan organisme uji dihambat penyebarannya sepanjang difusi antimikroba (terbentuk zona jernih disekitar cakram), sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri yang sensitif terhadap antimikroba. Ada hubungan

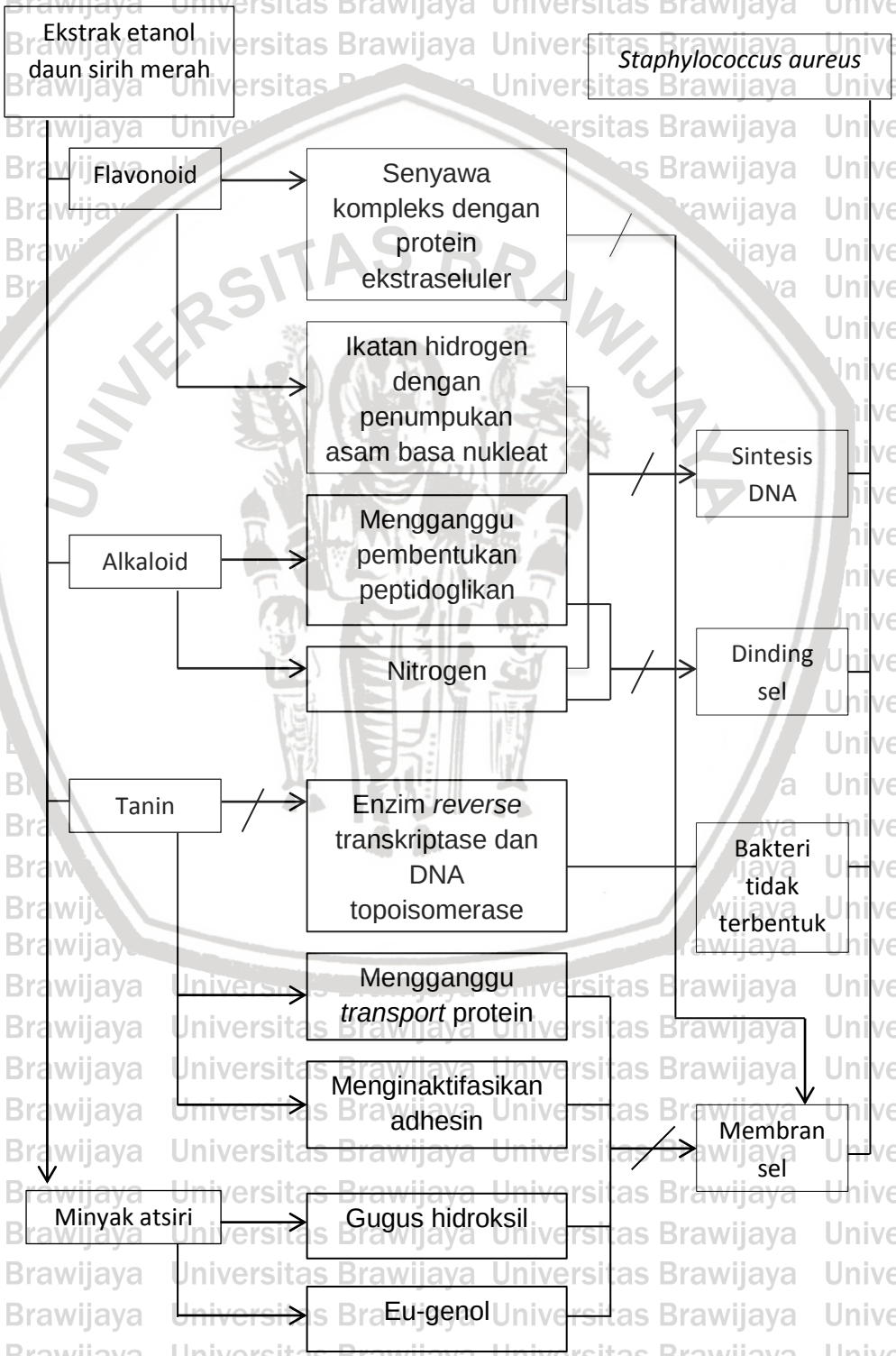
persamaan yang hampir linear (berbanding lurus) antara log MIC, seperti yang diukur oleh metode dilusi dan diameter zona daya hambat pada metode difusi (Koneman, 2006).

Hasil dari tes kepekaan, mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam dua atau lebih kategori. Sistem yang sederhana menentukan dua kategori, yaitu sensitif dan resisten. Meskipun klasifikasi tersebut memberikan banyak keuntungan untuk kepentingan statistik dan epidemiologi, bagi klinisi merupakan ukuran yang terlalu kasar untuk digunakan. Dengan demikian hasil dengan tiga klasifikasi yang biasa digunakan, (sensitif, intermediet, dan resisten) seperti pada metode Kirby-Bauer (Koneman, 2006).

# BAB 3

# KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

## 3.1 Kerangka Konsep




**Gambar 3.1Kerangka konsep penelitian**

Keterangan :

→ = Menyebabkan

⊘→ = Menghambat

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun sirih merah yang mengandung bahan aktif seperti flavonoid, tanin, alkaloid, minyak atsiri. Tanin memiliki kemampuan untuk membuat bakteri tidak terbentuk dengan cara menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase serta mengganggu *transport* protein dan menginaktifasikan adhesin agar tidak terbentuknya membran sel bakteri. Selain tanin terdapat zat kimia yang lain yang dapat mengambat pembentukan membran sel bakteri seperti flavonoid dan minyak atsiri. Flavonoid menghambat pembentukan membran sel bakteri dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler, flavonoid juga memiliki ikatan hidrogen dengan penumpukan asam basa nukleat yang akan menghambat sintesis DNA bakteri.

Minyak atsiri memiliki gugus hidroksil dan eu-ganol yang dapat menghambat membran sel bakteri. Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk. Nitrogen yang terdapat di dalam senyawa alkaloid dapat menghambat sintesis DNA bakteri. Dengan adanya kandungan diatas yang dimiliki oleh ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* diharapkan dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

## 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

# BAB 4

# METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental laboratorik *in vitro* dengan rancangan *true experiment-post test only group design* untuk membuktikan potensi antimikroba ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus.* Untuk mengetahui hal tersebut, akan dilakukan dengan menggunakan metode dilusi agar untuk melihat kemampuan hambatan ekstrak terhadap bakteri uji.

## 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum).* Proses ekstraksi dilaksanakan di Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* diambil dari *stock culture* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri akan diidentifikasi ulang sebelum penelitian. Daun sirih merah didapatkan dari toko Batu Materia Medika kota Batu.

## 4.3 Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini menggunakan 4 macam konsentrasi, maka perhitungan besar sampel dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut:

$p(n-1) \geq 15$

$4(n-1) \geq 15$

$4n-4 \geq 15$

$4n \geq 19$

$n \geq 4$

Keterangan :

p : perlakuan

n : Banyak pengulangan

Jumlah pengulangan yang ideal menurut hitungan rumus Federer diatas sebanyak 4 kali pengulangan.

**4.4 Tempat dan Waktu Penelitian**

Pada penelitian ini proses ekstraksi dilaksanakan di Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang pada bulan Agustus tahun 2018 dan untuk uji sensitivitasnya akan dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Agustus - Oktober tahun 2018.

**4.5 Variabel Penelitian**

**4.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* dengan konsentrasi tertentu (dalam %), yaitu 0.5 %, 1%, 1.5%, 2%, dan kontrol negatif.

**4.5.2 Variabel Tergantung**

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dinilai dengan sistem skoring.

## 4.6 Definisi Operasional

1. Serbuk daun sirih merah adalah daun sirih merah segar yang sudah diproses dengan dipotong-potong, dikeringkan lalu di haluskan.
2. Ekstrak daun sirih merah adalah hasil dari metode maserasi berbentuk serbuk, dengan pelarut etanol 96%, proses penyaringan dan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak daun sirih merah pekat.
3. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri dengan koloni yang berbentuk bulat, berwarna putih agak kekuningan dengan permukaan yang cembung, pewarnaan Gram menunjukkan sel bakteri bersifat Gram positif dan berbentuk bulat, serta menunjukkan reaksi positif pada uji katalase dan koagulase.
4. Penelitian eksplorasi adalah penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan pada penelitian inti. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian eksplorasi adalah : 0%, 1%, 5%, 10%.
5. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun sirih merah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus.* Hal ini ditandai dengan tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada Mueller Hinton Agar setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37$^{o}$C.
6. Penilaian KHM dilakukan dengan sistem skoring, dengan melibatkan 3 orang penilai secara independen. Berikut ini merupakan sistem skoring yang digunakan dalam penelitian ini (Paranoan, 2017) :

   a.+3: Koloni bakteri tumbuh rapat / terdapat jarak antar koloni ≤ 0.5 mm.

b.+2: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar koloni 0.5-1 mm

c.+1: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar Koloni ≥ 1 mm.

d.0: Tidak tampak pertumbuhan koloni bakteri.

7. Kontrol negatif adalah Mueller Hinton Agar *plate* yang tidak mengandung ekstrak etanol daun sirih merah setelah diteteskan dengan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu konsentrasi 0%.
8. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 0%, 0.5 %, 1%, 1.5%, dan 2%.

## 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.7.1 Alat-alat Untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

1. Gelas Erlenmeyer (2)
2. Corong gelas (1)
3. Kertas saring (1)
4. Labu evaporator (1)
5. Labu penampung etanol (1)
6. Pendingin spiral/ rotatory evaporator (1)
7. Selang Water pump (1)
8. Vacuum pump
9. Botol hasil ekstrak

### 4.7.2 Bahan-bahan Untuk Pembuatan E kstrak Daun Sirih Merah

1. Daun sirih merah (*Piper crocatum)*
2. Etanol 96%

3. Aquades

**4.7.3 Alat-alat Untuk Pewarnaan Gram Bakteri**

1. Gelas objek
2. Penutup objek
3. Kertas/tisu penghisap
4. Bunsen
5. Korek api
6. Alat penjepit
7. Mikroskop

**4.7.4 Bahan-bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri**

1. Bakteri *Staphylococcus aureus*
2. Kristal violet
3. Lugol
4. Alkohol 96%
5. Safranin
6. Aquades
7. Minyak imersi

**4.7.5 Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Agar**

1. Mikropipet
2. Pipet plastik steril ukuran 1 ml
3. *Spectrophotometer*
4. Inkubator
5. Ekstrak daun sirih merah
6. Vortex

7. Pembenihan cairan yang distandarisasi (NaCl, *broth*)
8. Mueller Hinton Agar
9. Plate kosong dan steril

## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

1. Daun sirih merah dalam bentuk serbuk seberat 100 gram ditimbang dalam neraca analitik
2. Daun sirih merah tersebut diletakkan dalam thimble atau selongsong tempat sampel dan dimasukkan dalam ekstraktor sokhlet.
3. Labu yang sudah berisi etanol 96% lalu dihubungkan dengan sokhlet.
4. Kondensor dihubungkan juga dengan sokhlet dan dipasang selang air.
5. Buka aliran air sehingga selang air akan terisi dan berfungsi sebagai pendingin. Nyalakan alat pemanas listrik yang ditempatkan di bawah labu dan proses ekstraksi dimulai.
6. Uap dari hasil didihan pelarut atau etanol 96% akan berjalan melalui sokhlet menuju kondensor, dan di sana akan kembali menjadi fase cair karena terdapat proses pendinginan yang disebabkan oleh adanya aliran air. Fase cair ini nantinya akan menetes ke thimble dan melarutkan lemak sampel sehingga sari atau tetesan ekstrak akan mengalir menuju labu. Proses ini berlangsung selama kurang lebih ± 5 jam.
7. Pelarut atau etanol 96% dipisahkan dari ekstrak dengan cara melepas thimble dan dilanjutkan dengan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi sokhlet sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi lebih pekat selanjutnya dengan memindahkan ekstrak ke dalam botol timbang.

8. Kemudian untuk memastikan bahwa hasil ekstrak sudah tidak terkandung pelarut atau etanol 96%, hasil ekstrak harus dioven dengan suhu 70°C - 80°C hingga aroma etanol tidak tercium dan diperoleh bobot konstan, sehingga didapatkan ekstrak kental (konsentrasi 100%) (Retno, 2012)

### 4.8.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

#### 4.8.2.1 Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atasapi lalu dibiarkan dingin.
2. Satu tetes akuades steril diteteskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum steril, diambil sedikit bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada medium kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah ditetkorelaeskan terlebih dulu pada gelas onyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga kali diatas api. Sediaan siap diwarnani
5. Tuang sediaan pada gelas objek dengan Kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
6. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
7. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
8. Tuang sediaan dengan safranin selama 1⁄2 menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.

9. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap. Kemudian ditetesi minyak imersi.
10. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.
11. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang teramati dibawah mikroskop merupakan bakteri *coccus* Gram positif (Noorhamdani *et al.*, 2016).

**4.8.2.2 Tes Katalase**

1. Ambil gelas objek yang bersih
2. Buat suspensi bakteri di atas gelas objek
3. Teteskan 1 tetas $H_2o_2$ 3% di atas gelas objek
4. Campur merata pada suspensi bakteri
5. Pada gelas objek akan di temukan bentukan gelembung udara yang menandakan tes katalase (+) (Sukmawati, 2010)

**4.8.2.3 Tes Slide Koagulase**

1. Teteskan satu ose plasma darah dengan EDTA pada gelas objek yang kering dan bersih (gelas objek A).
2. Teteskan air distilasi / air salin sebagai kontrol pada gelas objek B.
3. Ambil sedikit biakan kuman dengan ose. Buat suspensi dengan masing-masing gelas objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik.
4. Hasil positif ditandai dengan adanya penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada gelas objek A dan tidak ada penggumpalan pada gelas objek B. Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*.
5. Hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua gelas objek. Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus* koagulase negatif (Sukmawati, 2010).

**4.8.2.4 Tes cefoxitin**

1. Menggunakan metode *disc diffusion* (*Kirby Bauer method*) dan pedoman menurut tabel yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014.
2. Koloni bakteri *S.aureus* dan MRSA yang terpisah dan murni diambil dengan ose steril kemudian dilarutkan dalam 2 ml larutan NaCl fisiologis sampai mencapai konsentrasi 0.5 Mc Farland atau setara dengan kepadatan sel bakteri sebesar $1,5x10^8$ bakteri/ml.
3. Lidi kapas steril dimasukkan kedalam tabung larutan NaCl tersebut untuk mengambil inokulum bakteri dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit.
4. Selanjutnya, larutan NaCl fisiologis yang telah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator, lidi kapas ditekan pelan ke permukaan bagian dalam dinding tabung yang berisi larutan NaCl tersebut, dipastikan tidak ada kelebihan cairan, kemudian lidi kapas ditarik keluar dari tabung.
5. Lidi kapas digoreskan di atas Agar Mueller Hinton untuk membuat *streaking* pada permukaan Agar tersebut. Pembuatan *streaking* ini bertujuan untuk menumbuhkan koloni bakteri *S.aureus* dan MRSA pada seluruh permukaan Agar.
6. Agar Mueller Hinton dibiarkan mengering selama 2 menit, kemudian kertas cakram antibiotik *cefoxitin* diletakkan di atas Agar Mueller Hinton dengan jarak sebesar 24mm dari bagian tengah kertas cakram satu antibiotik ke antibiotik lainnya.
7. Agar Mueller Hinton diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam setelah semua kertas cakram antibiotik terpasang.
8. Hambatan pertumbuhan bakteri di atas Agar Mueller Hinton selanjutnya

diamati di sekitar cakram antibiotik.

9. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri untuk setiap jenis cakram antibiotika.
6. Hasil pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri tersebut kemudian disesuaikan dengan tabel pengukuran kepekaan antibiotik yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014, sehingga dapat ditentukan apakah bakteri yang diujikan masih sensitif atau sudah resisten terhadap suatu antibiotik.
7. Bakteri *Staphylococcus aureus* dikatakan sensitif terhadap cefoxitin apabila didapatkan zona hambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berdiameter ≥22mm dan MRSA ≤21mm (Sukmawati, 2010).

**4.8.3 Pembuatan Suspensi Uji *Staphylococcus aureus***

Dilakukan dengan pemeriksaan dengan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair/ *Nutrient broth,* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar $10^8$ CFU/ml yang setara dengan *optical density* (OD) = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan :

V1 = volume bakteri yang akan di tambah pengecer

N1 = nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V2 = volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N2 = OD

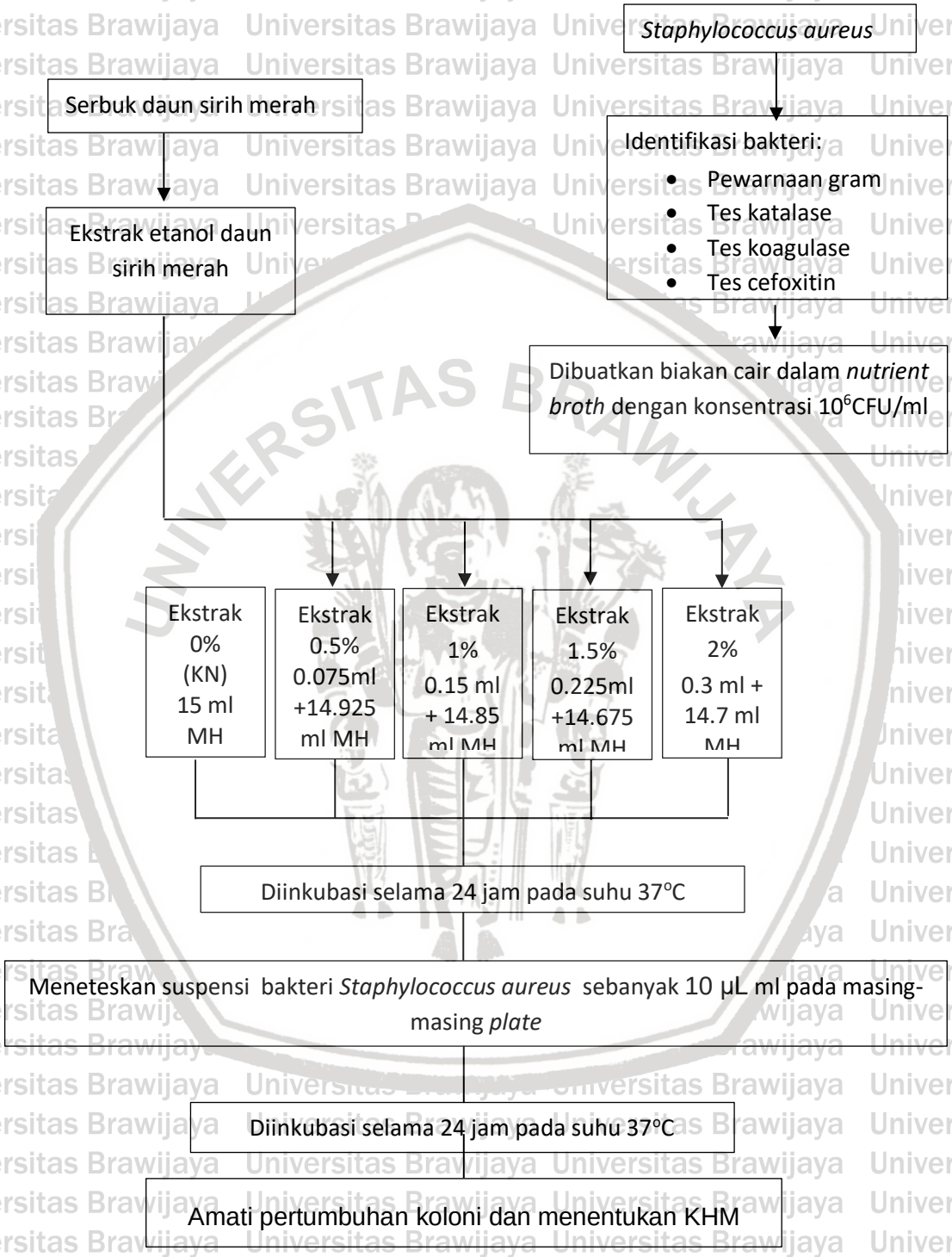
Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri yang akan ditambah dengan pengeceran untuk mendapatkan bakteri dengan $10^8$ CFU/ml sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi $10^8$ CFU/ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengeceran sebanyak 100 kali sehingga diperoleh suspensi bakteri 10 ml dengan konsentrasi $10^6$ CFU/ml.

**4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Daun Sirih Merah**

1. Menyediakan 5 plate steril, diantaranya 4 plate dengan konsentrasi berbeda sebagai plate uji bakteri dan 1 plate sebagai kontrol negatif.
2. Memasukkan 15 ml *Mueller-Hinton Agar* ke dalam *plate* 1 yang diberi label 0% sebagai kontrol negatif.
3. Memasukkan 14.925 ml *Mueller-Hinton Agar* ke *plate* 2 lalu menambahkan 0.075 ml ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 0.5% dan memberi label 0.5% pada *plate* tersebut.
4. Memasukkan 14.85 ml *Mueller-Hinton Agar* ke *plate* 3 lalu menambahkan 0.15 ml ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 1% dan memberi label 1% pada *plate* tersebut.
5. Memasukkan 14.675 ml *Mueller-Hinton Agar* ke *plate* 4 lalu menambahkan 0.225 ml ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 1.5% dan memberi label 1,5% pada *plate* tersebut.

6. Memasukkan 14.7 ml *Mueller-Hinton Agar* ke *plate* 5 lalu menambahkan 0.3 ml ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 2% dan memberi label 2% pada *plate* tersebut.
7. Semua *plate* didiamkan beberapa saat hingga agar tersebut mengeras.
8. Setelah agar dalam semua *plate* mengeras, *plate* dibagi menjadi 4 bagian menggunakan spidol permanen dan penggaris.
9. Menginkubasi *plate* 1-5 pada suhu 37°C selama 24 jam di inkubator
10. Pada hari kedua, semua *plate* dikeluarkan dari inkubator kemudian masing-masing *plate* ditetesi dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* $10^8$ CFU/mL sejumlah 10 µL sebanyak empat kali pada masing-masing daerah yang telah dibagi untuk mendapatkan empat kali pengulangan.
11. Semua *plate* tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di inkubator.
12. Pada hari ketiga, lakukan pengamatan pada pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing konsentrasi. Penilaian pertumbuhan koloni bakteri dilakukan dengan sistem skoring sesuai pada definisi operasional.

### 4.8.5 Alur Kerja Penelitian




**Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian**

**4.9 Pengolahan Data**

Penelitian ini menggunakan data jenis ordinal, yaitu bentuk kualitatif skoring pertumbuhan bakteri pada *plate*. Sehingga pada penelitian ini menggunakan uji analisis non-parametrik.

Metode uji analistik yang digunakan adalah analisis Uji Statistik Non Parametrik. Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah perbedaan ko nsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hipotesis ditegakkan dengan menggunakan $H_0$ dan $H_1$. $H_0$ adalah tidak adanya perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. $H_1$ adalah adanya perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. $H_0$ diterima apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). $H_0$ ditolak apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$).

Uji korelasi *spearman* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan dari pemberian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Korelasi negatif menunjukkan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mengakibatkan penurunan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus.* Korelasi positif menunjukkan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mengakibatkan pertmabhan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus.* Serta besaran kontribusi

pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mengakibatkan penurunan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan dalam bentuk persentase.

Uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbandingan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbentuk dengan pemberian beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah *(Piper crocatum).* Apabila pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media *Mueller Hinton* Agar kelompok konsentrasi a dan b memiliki nilai p kurang dari 0,05 artinya terdapat perbedaan yang signifikan.

**4.10 Jadwal Kegiatan**

**Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan Penelitian Selama Bulan Desember 2017 – Desember Tahun 2018**

| No. | Kegiatan | Des | Jan | juli | Agus | Sept | Okt | Nov | Des |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Penyusunan Proposal | | | | | | | | |
| 2. | Seminar proposal | | | | | | | | |
| 3. | Ekstraksi | | | | | | | | |
| 4. | Uji Sensitivitas | | | | | | | | |
| 5. | Analisis Data | | | | | | | | |
| 6. | Penyusunan tugas akhir | | | | | | | | |
| 7. | Seminar Hasil | | | | | | | | |

Keterangan : Kotak hitam menandakan waktu pelaksanaan kegiatan dilakukan.

# BAB 5

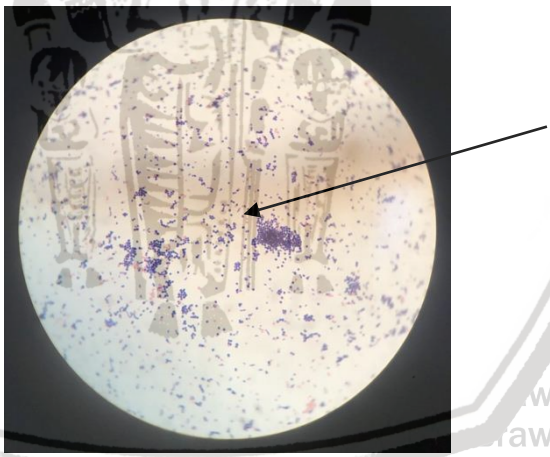
# HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

### 5.1.1 Identifikasi Staphylococcus aureus

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan berasal dari *stock culture* yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri tersebut terlebih dahulu diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, tes katalase, tes koagulase, dan uji disk cefoxitin.

#### 5.1.1.1 Pewarnaan Gram



**Gambar 5.1 Hasil Pengecatan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus.***

Keterangan : Pewarnaan gram dengan pembesaran lensa objektif sebesar 100x atau pembesaran total 1000x didapatkan bakteri berbentuk bulat dengan gram positif.

Pada **Gambar 5.1** ditemukan bakteri berbentuk kokus dengan koloni bertumpuk tumpuk seperti anggur yang bewarna ungu yang menunjukkan bakteri Gram positif dan ciri-ciri tersebut sesuai dengan bentuk *Staphylococcus aureus*.

### 5.1.1.2 Uji Katalase

**Gambar 5.2 Hasil Katalase *Staphylococcus Aureus* Positif**

Keterangan : Tanda panah menunjukkan terbentuknya gelembung pada kertas *stephaurex* yang menandakan bahwa tes katalase positif.

Pada **Gambar 5.2** menunjukkan hasil uji katalase yang positif dengan ditandai terbentuknya gelembung udara dengan cepat dan banyak setelah koloni ditetesi hidrogen peroksida ($H_2O_2$) 3%. Bakteri kokus Gram positif yang menghasilkan tes katalase positif tersebut adalah golongan *Staphylococcus sp*.

### 5.1.1.3 Uji Koagulase

**Gambar 5.3 hasil koagulase *Staphylococcus aureus* positif**

Keterangan : Tanda panah menunjukkan terbentuknya gumpalan seperti pasir pada kertas *stephaurex* positif yang menandakan bahwa tes koagulase positif.

Tes koagulase adalah tes lanjutan yang dilakukan setelah tes katalase positif untuk mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, dimana hanya spesies bakteri tersebut yang menghasilkan tes koagulase positif di antara genus bakteri *Staphylococcus sp*., dikarenakan mempunyai enzim koagulase. Pada penelitian ini pada **Gambar 5.2** didapatkan bentukan endapan seperti pasir-pasir kecil berwarna putih keabu-abuan, maka dinyatakan tes koagulase positif, yang menandakan bahwa isolat tersebut adalah spesies *Staphylococcus aureus.*

**5.1.1.4 Uji Disk Cefoxitin**

**Gambar 5.4 Uji Disk Cefoxitin *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar**

Keterangan : Tanda panah menunjukan zona inhibisi sebesar 28 mm yang menandakan bahwa bakteri sensitif antibiotik. *Staphylococcus aureus* (SA), *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (*MRSA*).*

Uji ini dilakukan untuk membedakan antara bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (*MRSA*)* dan *Staphylococcus aureus* dengan cara menempelkan cakram antibiotik cefoxitin pada Mueller Hinton Agar yang sebelumnya sudah ditanami oleh koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (*MRSA*)*, kemudian diinkubasi selama

24 jam pada suhu 37$^0$C. Berdasarkan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014, *Staphylococcus aureus* dikatakan sensitif terhadap antibiotik cefoxitin apabila diameter zona hambat yang terbentuk ≥22mm dan resisten ≤21mm.

Pada **Gambar 5.4** menunjukkan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* membentuk zona inhibisi sebesar 28 mm yang memiliki arti bahwa masih sensitif dengan antibiotik cefoxitin. Sementara pada koloni bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (*MRSA*)* tidak memiliki zona inhibisi yang berarti resisten terhadap antibiotik cefoxitin.

Dari hasil keempat uji di atas, dapat disimpulkan isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus.*

**5.1.1.5 Hasil Ekstrak Daun Sirih Merah**

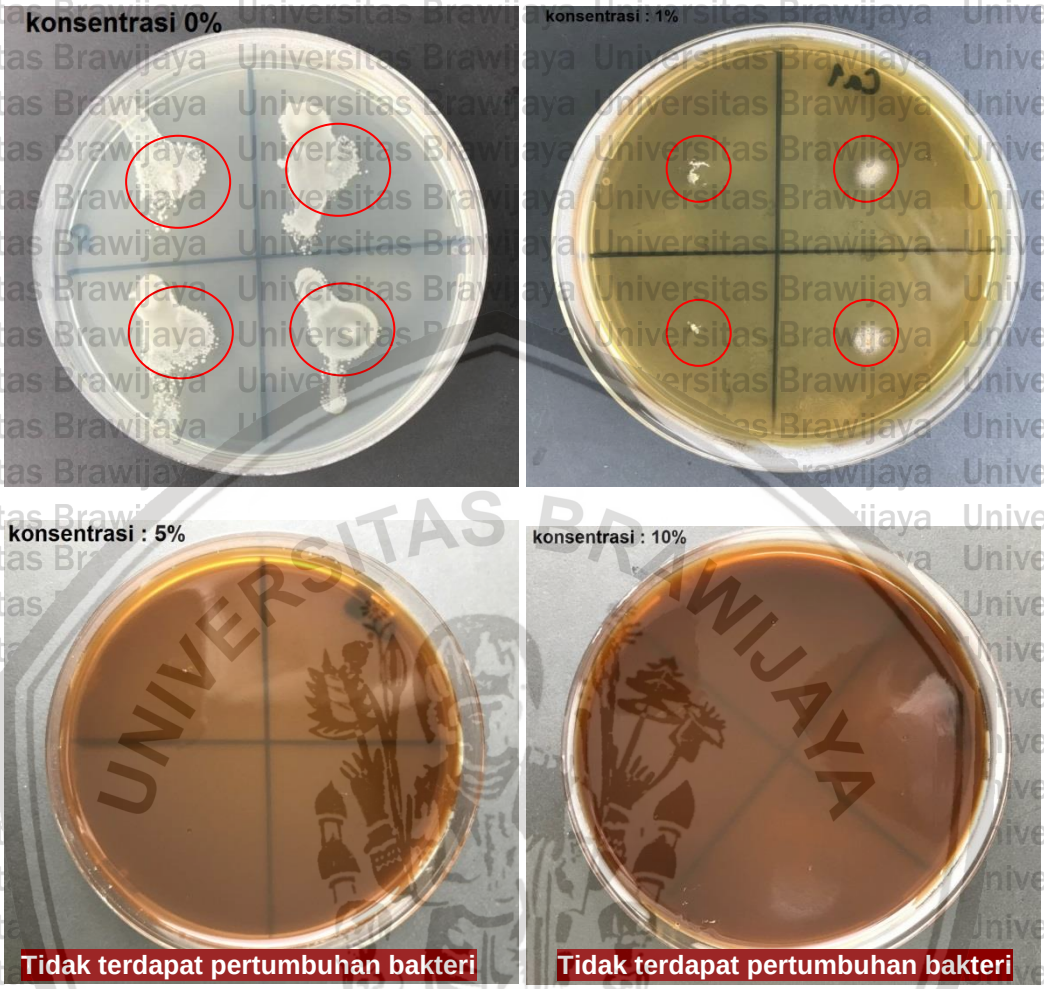
**Gambar 5.5 Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah**

Keterangan : Ekstrak berwarna cokelat gelap dengan konsistensi cair

**Gambar 5.5** menunjukan hasil ekstraksi etanol daun sirih merah yang berwarna cokelat gelap dengan konsistensi cair. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang 250 gram menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

### 5.1.2 Hasil Penelitian Pendahuluan

Tujuan melakukan penelitian pendahuluan adalah untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah yang akan digunakan dalam penelitian inti dengan metode dilusi agar. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian pendahuluan adalah 0%, 1%, 5%, dan 10%. Pemilihan konsentrasi pendahuluan dikarenakan peneliti membutuhkan 5 konsentrasi untuk penelitian inti yang dan dimulai dari konsentrasi terendah. Tidak adanya pertumbuhan bakteri yang terbentuk di Mueller Hinton Agar menunjukan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan koloni. Dari penelitian pendahuluan dihasilkan tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 5% dan 10% (**Gambar 5.6**).

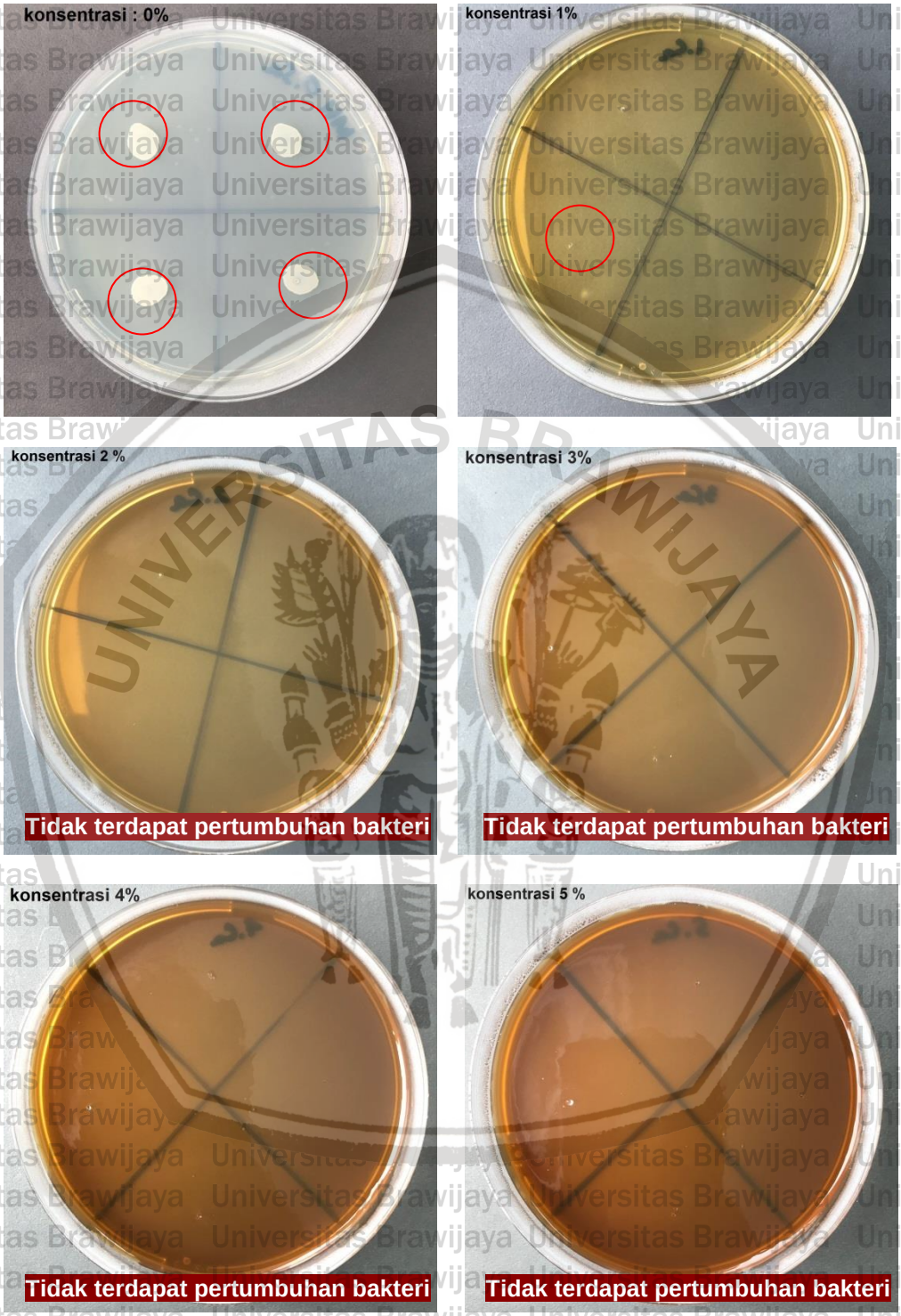



**Gambar 5.6 Hasil Penelitian Pendahuluan**

Keterangan : Di dalam lingkaran merah adalah koloni bakter*i Staphylococcus aureus.* Terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 0% dan 1%, namun tidak terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 5% dan 10%.

Hasil penelitian pendahuluan :

Setelah itu dilakukan penelitian perapatan menggunakan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% untuk menentukan kosentrasi yang akan digunakan pada penelitian inti. Hasil dari penelitian perapatan tidak didapatkan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 2%, 3%, 4% dan 5%. (**Gambar 5.7**). Maka, selanjutnya untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, dan 2%.



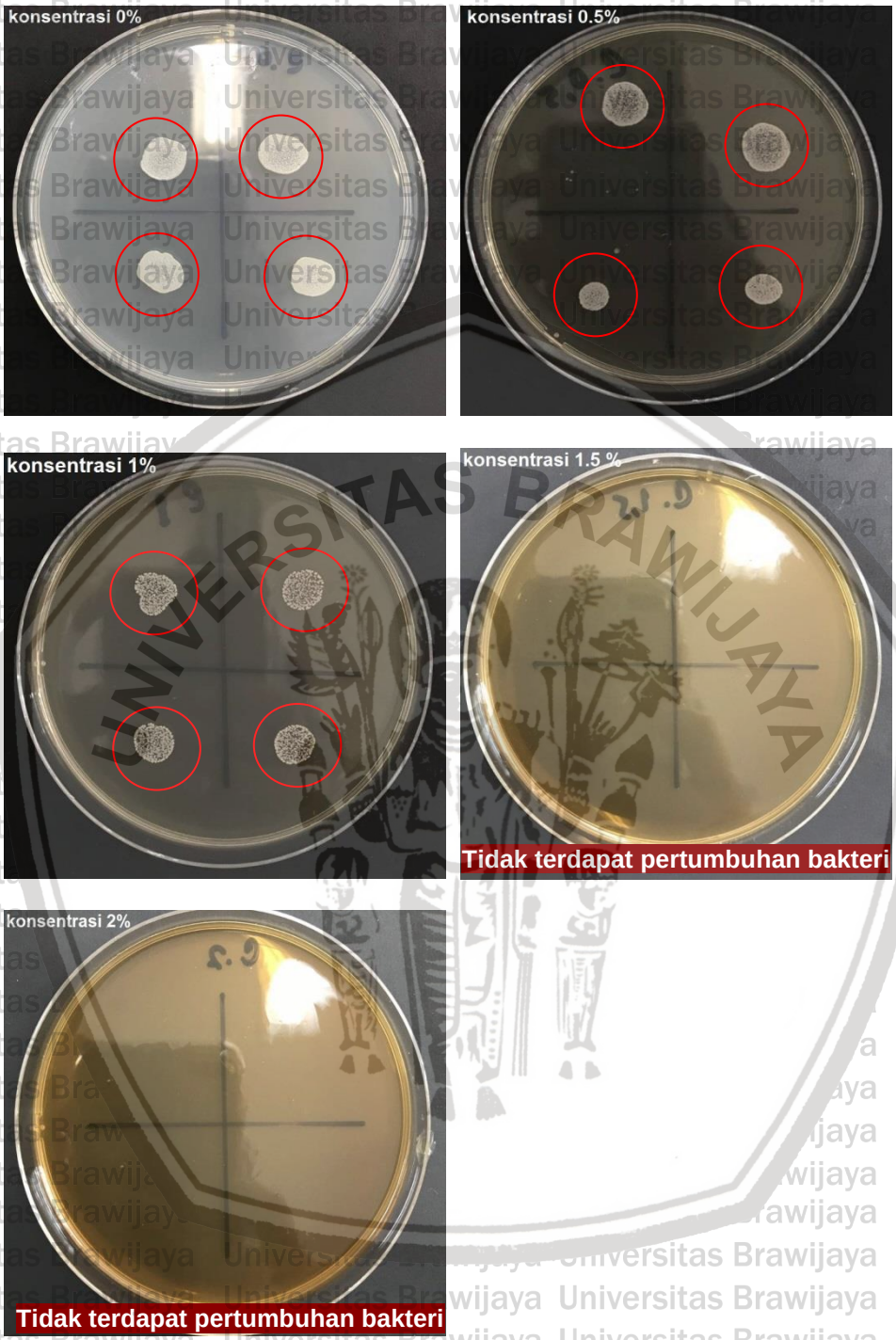

**Gambar 5.7 Hasil Penelitian Perapatan**

Keterangan : Di dalam lingkaran merah adalah koloni bakteri *Staphylococcus aureus.* Terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 0% dan 1%, namun tidak terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 2%, 3%, 4% dan 5%.

### 5.1.3 Hasil Penelitian Inti

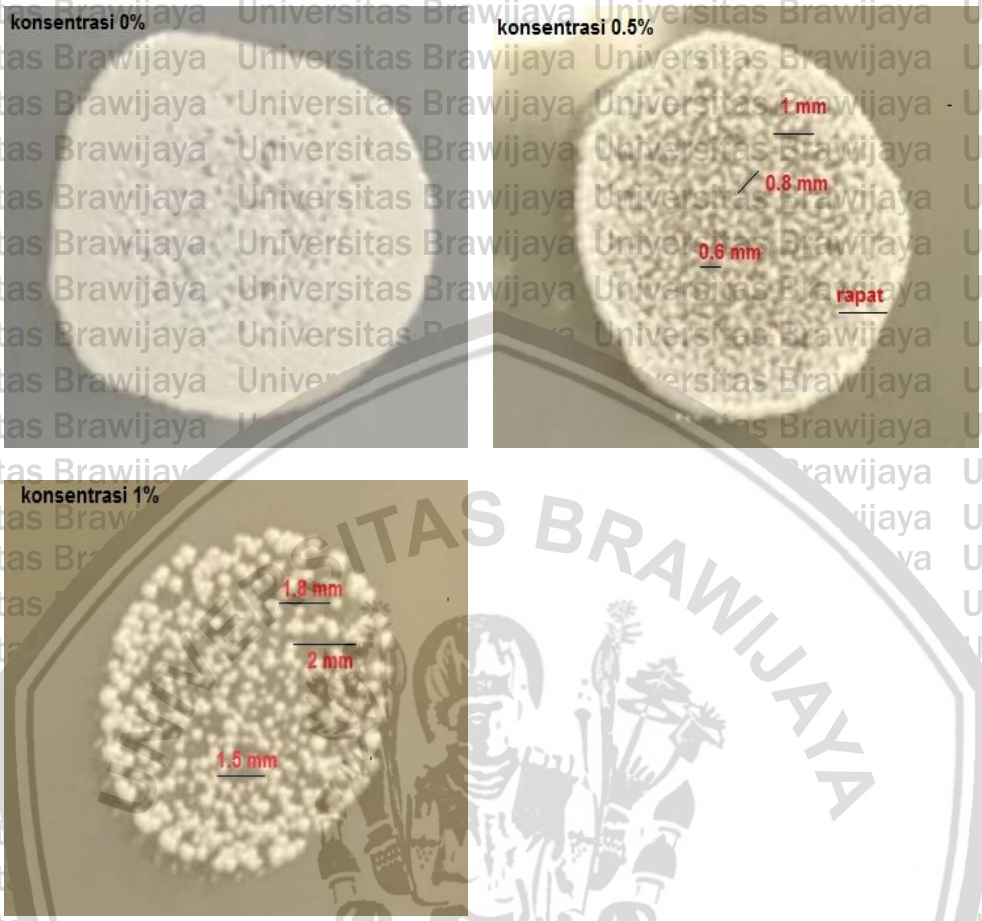
Efektivitas antimikroba ekstrak etanol daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diuji dengan metode dilusi agar. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 0.5%, 1%,1.5%, dan 2%. Medium *Mueller Hinton* Agar yang telah dicampur dengan ekstrak etanol daun sirih merah yang memiliki ketebalan 4 mm. Ditetesi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37$^{o}$C.

Jarak antar koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dengan bentuk bulat diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm. Tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan daya antimikroba yang dihasilkan oleh ekstrak. Berdasarkan **Gambar 5.8** hasil dari penelitian inti terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 0%, 0.5%, dan 1%, serta tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1,5 dan 2%.




**Gambar 5.8 Hasil Penelitian Inti**

Keterangan : Di dalam lingkaran merah adalah koloni bakteri *Staphylococcus aureus.* Terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 0%, 0.5%, dan 1%, namun tidak terdapat koloni bakteri pada konsentrasi 1.5 %, dan 2%.




**Gambar 5.9 Kepadatan koloni bakteri *Staphylococcus aureus***

Keterangan : Data tersebut diambil menggunakan kamera dan diukur menggunakan jangka sorong . Dari data tersebut dibuat skoring :

+3: Koloni bakteri tumbuh rapat / terdapat jarak antar koloni ≤ 0.5 mm
+2: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar koloni 0.5 - 1 mm
+1: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar koloni ≥ 1 mm
0: Tidak tampak pertumbuhan koloni bakteri

Hasil perhitungan skoring ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* dapat dilihat di **Tabel 5.1.**

**Tabel 5.1 Hasil skoring Pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)***

| Konsentrasi | | Pengulangan Bakteri | | | | Rata-rata |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0% | A | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 |
| | B | +3 | +3 | +3 | +3 | |
| | C | +3 | +3 | +3 | +3 | |
| 0.5% | A | +2 | +2 | +3 | +3 | +2 |
| | B | +2 | +2 | +2 | +3 | |
| | C | +2 | +2 | +2 | +3 | |
| 1% | A | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | B | +1 | +1 | +1 | +1 | |
| | C | +1 | +1 | +1 | +1 | |
| 1.5% | A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | C | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2% | A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | C | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Keterangan:
A: Pengamatan dilakukan oleh peneliti
B: Pengamatan dilakukan oleh analis laboratorium Mikrobiologi FKUB
C: Pengamatan dilakukan oleh non peneliti dan non analis
+3: Koloni bakteri tumbuh rapat / terdapat jarak antar koloni ≤ 0.5 mm
+2: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar koloni 0.5 - 1 mm
+1: Koloni bakteri tumbuh renggang dengan jarak antar koloni ≥ 1 mm
0: Tidak tampak pertumbuhan koloni bakteri

Pada **Gambar 5.9** terlihat pada konsentrasi 0% berdasarkan skoring koloni bakteri tumbuh rapat yaitu sebesar +3. Pada konsentrasi 0.5% dan 1% koloni bakteri terdapat jarak yang semakin besar sehingga hasil skoring menunjukkan sebesar +2 dan +1. Hal ini menunjukkan terdapat penurunan jumlah bakteri sejalan dengan ditingkatkannya konsentrasi ekstrak etanol daun

sirih merah *(Piper crocatum)*. Pada konsentrasi 1.5% dan 2% tidak terlihat pertumbuhan bakteri. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal/terendah larutan ekstrak etanol daun sirih merah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini ditandai dengan tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada medium agar *plate* setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37$^{o}$C. Pada penelitian ini Kadar Hambat Minimum (KHM) tercapai pada konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah *(Piper crocatum)* sebesar 1.5%.

## 5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan SPSS versi 20 *for windows*. Data yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk ordinal, sehingga uji statistik yang digunakan adalah :

### 5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas yang digunakan adalah uji kolmogorov smirnov dikarenakan jumlah data yang digunakan ≥ 50, uji kolmogorov smirnov adalah membandingkan distribusi data dengan distribusi normal baku. Jika signifikansi < 0,05 berarti terdapat perbedaan yang signifikan, dan jika signifikansi >0,05 maka tidak terjadi perbedaan yang signifikan. Penerapan pada uji Kolmogorov Smirnov adalah jika signifikansi di bawah 0,05 memiliki arti data yang akan diuji mempunyai perbedaan yang signifikan dengan data normal baku, berarti data tersebut distribusinya tidak normal.

**Tests of Normality**

| | Kolmogorov-Smirnov[a] | | | Shapiro-Wilk | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Koloni Bakteri | .240 | 15 | .020 | .827 | 15 | .008 |

a. Lilliefors Significance Correction

**Gambar 5.10 Hasil uji Kolmogorov Smirnov & Shapiro-Wilk**

Keterangan : p<0.05 = signifikan, p>0.05 = tidak signifikan

Hasil Uji Normalitas pada penelitian ini memiliki nilai signifikansinya adalah 0.02, yang memiliki arti data tersebut distribusinya tidak normal. Sehingga uji statistik selanjutnya menggunakan uji Non-Parametrik.

### 5.2.2 Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis

Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah perbedaan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hipotesis ditegakkan dengan menggunkan $H_0$ dan $H_1$.

$H_0$ adalah tidak adanya perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. $H_1$ adalah adanya perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. $H_0$ ditolak dan $H_1$ diterima apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p \leq 0,05$). $H_0$ diterima dan $H_1$ ditolak apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p \geq 0,05$).

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank |
|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0% | 3 | 14.00 |
| | 0,5% | 3 | 11.00 |
| | 1% | 3 | 8.00 |
| | 1,5% | 3 | 3.50 |
| | 2% | 3 | 3.50 |
| | Total | 15 | |

**Test Statistics[a,b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Chi-Square | 14.000 |
| df | 4 |
| Asymp. Sig. | .007 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

**Gambar 5.11 Hasil Uji Kruskal-Wallis**

Keterangan : p<0,05 = signifikan dan p>0,05 = tidak signifikan

Pada **Gambar 5.11** menunjukkan hasil Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis pada penelitian ini memiliki nilai signifikansi sebesar 0.007, sehingga dapat ditarik kesimpulan hipotesis $H_0$ ditolak dan $H_1$ diterima berarti, yang memiliki arti bahwa terdapat perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### 5.2.3 Uji Korelasi *Spearman*

Uji korelasi *spearman* digunakan untuk mengetahui kekuatan dan bentuk hubungan dari pemberian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berikut merupakan klasifikasi nilai korelasi *spearman* (Sugiyono, 2011) :

- 0- 0,199 = sangat rendah
- 0,20 - 0,3999 = rendah
- 0,40 - 0,5999 = sedang
- 0,60 - 0,799 = kuat
- 0,80 - 1,000 = sangat kuat

**Correlations**

| | | | Konsentrasi | Koloni Bakteri |
|---|---|---|---|---|
| Spearman's rho | Konsentrasi | Correlation Coefficient | 1.000 | -.975** |
| | | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | | N | 15 | 15 |
| | Koloni Bakteri | Correlation Coefficient | -.975** | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | | N | 15 | 15 |

**. Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

**Gambar 5.12 Hasil Uji korelasi *spearman***

Keterangan : p<0.05 = signifikan, (r) : 0.975 = sangat kuat, korelasi negatif

Pada **Gambar 5.12** menunjukkan hasil Uji korelasi *spearman* pada penelitian ini didapatkan r = -0.975 dan p=0.000. Nilai hasil korelasi Spearman menunjukkan arah korelasi negatif dengan kekuatan sangat kuat. Hasil uji korelasi menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang diuji maka semakin menurun pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil koefisien korelasi pada penelitian ini adalah 0.975, apabila dimasukkan ke dalam rumus ( $R^2$ x 100) % = 95,06%, sehingga berarti konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* mengakibatkan penurunan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 95,06%. Sisa sebesar 4,94% menunjukkan konstribusi dari external yang tidak dapat diteliti.

### 5.2.4 Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney digunakan untuk mengetahui perbandingan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbentuk dengan pemberian beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah *(Piper crocatum).* Berikut merupakan penjabaran hasil dari **Lampiran 3** :

Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar konsentrasi 0% memiliki perbedaan yang signifikan dengan

kelompok konsentrasi 0.5%, 1%, 1.5% dan 2% (p<0,05). Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar konsentrasi 0.5% memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok konsentrasi 1%, 1.5% dan 2% (p<0,05). Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar konsentrasi 1% memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok konsentrasi 1.5% dan 2% (p<0,05).

Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar konsentrasi 1.5% tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 2% (p>0,05). Dapat disimpulkan dengan **Tabel 5.2**

**Tabel 5.2 Hasil Uji Mann-Whitney signifikansi dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*)**

| | **0%** | **0.5%** | **1%** | **1.5%** | **2%** |
|---|---|---|---|---|---|
| **0%** | | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| **0.5%** | 0.025 | | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| **1%** | 0.025 | 0.025 | | 0.025 | 0.025 |
| **1.5%** | 0.025 | 0.025 | 0.025 | | 1.000 |
| **2%** | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 1.000 | |

Keterangan : p<0.05 = signifikan, p>0.05 tidak signifikan

# BAB 6

# PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dan membuktikan efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* sebagai antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan metode dilusi agar. Untuk mengetahui efek antimikroba dilihat dari Kadar Hambat Minimum (KHM) setelah pemberian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Penelitian hanya dapat menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tidak dapat mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari bakteri.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* dan bakteri uji *Staphylococcus aureus* yang diambil dari *stock culture* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri akan diidentifikasi ulang sebelum penelitian dengan pewarnaan Gram, tes katalase, tes koagulase, *dan* uji *disk* cefoxitin. Pada pengecatan Gram ditemukan bakteri berbentuk kokus bergerombol dengan susunan seperti anggur, berwarna ungu yang merupakan bakteri kokkus Gram positif. Pada hasil uji katalase pada bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukan hasil positif dengan ditandai terbentuknya gelembung udara setelah koloni ditetesi hidrogen peroksida ($H_2O_2$) 3% yang menunjukkan bakteri tersebut memiliki enzim sitokrom oksidase. Tes koagulase adalah tes lanjutan yang dilakukan setelah mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus sp* setelah tes katalase. Pada hasil tes koagulase yang positif terbentuk endapan seperti pasir-pasir kecil berwarna putih keabu-abuan yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim koagulase, yang berarti bakteri tersebut adalah spesies

*Staphylococcus aureus*. Pada uji *disk* cefoxitin terbentuk zona inhibisi dengan diameter 28 mm yang menandakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diujikan sensitif dengan cefoxitin (*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*). Hasil identifikasi yang telah dilakukan membuktikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus.*

Simplisia daun sirih merah diperoleh dari Batu Materia Medika. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Keunggulan metode ini ialah paling sederhana dan ekonomis untuk mendapatkan ekstrak daun sirih merah. Proses ekstraksi dilakukan di laboratorium Teknik Kimia PoliTeknik Negeri Malang. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* yang didapatkan bewarna cokelat gelap dengan konsistensi cair.

Berdasarkan penelitian Sudrajat *et al*., (2011) senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun sirih merah adalah alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan tanin yang memiliki fungsi sebagai antimikroba. Sedangkan senyawa flavonoid akan merusak dinding sel dari bakteri lalu masuk ke dalam inti sel bakteri dan bereaksi dengan DNA sel bakteri dengan mekanisme perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada flavonoid akan terjadi reaksi pada DNA tersebut, sehingga inti sel bakteri akan mengalami lisis. Kemampuan tanin sebagai bahan antimikroba diduga karena tanin akan berkaitan dengan dinding sel bakteri, sehingga akan menginaktifkan kemampuan menempel bakteri, menghambat pertumbuhan, dan dapat membentuk ikatan komplek dengan polisakarida (Kursia *et al*., 2016). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri diduga bekerja merusak dinding sel bakteri dengan jalan mengganggu komponen peptidoglikan sel bakteri sehingga lapisan dinding sel

mengalami kerusakan menyebabkan isi sel keluar/sel lisis dan bakteri mengalami kematian (Arsyik, 2012). Mekanisme lain dari alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri sehingga menghambat pembentukan DNA dan RNA bakteri (Karou, 2005).

Penelitian dimulai dengan penelitian pendahuluan yaitu penelitian eksplorasi dengan konsentrasi : 0%, 1%, 5%, dan 10%. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 5% dan 10%, sehingga dilakukan penelitian untuk perapatan konsentrasi, dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%, dengan hasil tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 2%, 3%, 4% dan 5%, selanjutnya dilakukan penelitian inti dengan konsentrasi : 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2% dengan empat kali pengulangan. Hasil penelitian inti menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kosentrasi 1.5% dan 2%. KHM dari penelitian ini adalah 1,5%.

Hasil penelitian ini kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas Kolmogorov Smirnov yang pada penelitian ini memiliki nilai signifikansi di bawah 0,05 yang berarti, data yang diuji mempunyai perbedaan yang signifikan dengan data normal baku, menandakan data tersebut berdistribusi tidak normal. Analisa selanjutnya menggunakan uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis, uji Mann-Whitney dan uji korelasi *Spearman*. Pada uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis pada penelitian ini memiliki nilai signifikansi sebesar 0.007 sehingga berarti, terdapat perbedaan efek antimikroba pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Selanjutnya uji Mann-Whitney pada penelitian ini terdapat pertumbuhan

koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar pada beberapa konsentrasi memiliki perbedaan yang signifikan, namun pada konsentrasi 1.5% dengan konsentrasi 2% tidak memiliki perbedaan yang signifikan (p>0,05). Uji korelasi *Spearman* pada penelitian ini didapatkan r = -0.975 dan p=0.000. Nilai hasil korelasi Spearman menunjukkan arah korelasi negatif dengan kekuatan sangat kuat. Hasil uji korelasi menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) maka semakin menurun pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil dari penelitian ini dapat didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Demetrio (2015) yang menyatakan bahwa daun sirih memiliki efek sebagai antimikroba terbaik dibandingkan 12 tanaman herbal lainnya dalam melawan bakteri Gram positif dan negatif yang sudah resisten. Juga penelitian Suswati (2012) mengenai Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* dengan hasil penelitian terbentuk Kadar hambat minimal (KHM) sebesar 6,25%. Serta dibuktikan juga oleh Prahastiwi (2014) dengan yang meneliti tentang Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum ruiz & pav*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* Atcc 14745 Dan *Shigella flexneri* Atcc 12022 Serta Mekanisme Penghambatannya dengan hasil penelitian terbentuknya KHM sebesar 6,25%. Khan dan Kumar (2011) juga membuktikan bahwa daun sirih merah dapat merusak inti dan membran plasma sel dari bakteri lain yaitu *Streptococcus mutans* yang juga merupakan bakteri kokus Gram positif. Selain *Streptococcus mutans* pada penggunaan ekstrak etanol daun sirih merah memiliki efek sebagai antibakteri pada *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus bifidus* (Kusuma *et al*., 2017).

Kelebihan menggunakan metode dilusi agar adalah mudah, murah, waktu untuk pelaksanaan singkat, dan membutuhkan ekstrak dengan jumah yang sedikit. Penelitian ini hanya dapat mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) namun tidak dapat mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM), sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut menggunakan metode lain seperti dilusi tabung dengan metode ekstraksi yang bisa mengurangi kepekatan warna ekstrak untuk mengetahui KBM. Keterbatasan dari penelitian ini adalah peneliti hanya menguji efektivitas ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus,* sedangkan untuk *strain Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) belum diketahui efektivitasnya, sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hal tersebut. Keterbatasan kedua penelitian ini adalah belum diketahuinya efek lama penyimpanan ekstrak terhadap kandungan zak aktif ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum)*.

Keterbatasan lainnya adalah belum mengetahui zat aktif dari daun sirih merah (*Piper crocatum)* yang paling berpengaruh terhadap pertumbuhan *S.aureus.* Berdasarkan keterbatasan tersebut dapat dilakukan eksplorasi uji hambat dengan metode lain seperti menggunakan isolasi zat aktif dari daun sirih merah (*Piper crocatum)*. Penelitian tersebut dapat mengetahui secara pasti zat aktif mana dari daun sirih merah (*Piper crocatum)* yang paling berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus.* Selain itu, penelitian ini masih dilakukan secara *in vitro*, sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut menggunakan metode *in vivo* pada hewan coba maupun uji klinis pada manusia.

# BAB 7

# KESIMPULAN DAN SARAN

## 7.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan metode dilusi agar.
2. Semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah *(Piper crocatum*), maka semakin menurun jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah *(Piper crocatum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pada konsentrasi 1,5%.

## 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode lain.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri MRSA.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum).*

4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa aktif dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* yang memiliki potensi antimikroba paling tinggi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus.*
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh lama simpan ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
6. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum)* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode *in vivo* pada hewan coba.

## DAFTAR PUSTAKA


Agusta, A. 2009. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Bandung: Penerbit ITB.20.

Akiyama, H., K. Fujii., O. Yamasaki., T. Oono., dan K.Iwatsuki. 2001. *Antibacterial Action of Several Tannin against Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48: 487 – 491.

Anderson DJ. 2011. Surgical site infections. Infect Dis Clin North Am; 25 (1): 135-53

Ardiansyah. 2003. *Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (Plucea indicaL.)*. Tesis Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.

Arsyik, I., Hadi, K. 2012. Identifikasi metabolit sekunder dan aktivitas antibakteri ekstrak daun sungkai (Peronema canescens jack.) Terhadap beberapa bakteri patogen J. Trop. Pharm. Chem. Vol 2. No. 1.

Barbut, S. 2002. PoultryProducts Processingan Industry Guide. GRC Press. Washington, DC. .

Biantoro, I. 2008. *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. (Tesis). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 7-26.

Bobbarala, V. 2012. *Antimicrobial Agents*. Intech, Croatia.

Boucher HW, Corey GR. 2008. *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2008; 46.

Bowrey DJ, Evans MD, Clark GWB. *Impact of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infection on Outcome after Esophagectomy*. World J Surg. 2007; 31: 326-331

Cushnie, T.P.T., dan A.J. Lamb. 2005. *Antimicrobial Activity of Flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents. 26: 343 – 356.

Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya.* Jakarta. Salemba Medika.6.

Deby A.M., Fatimawali., Weny I.W. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (Coleus atropurpureus [L] Benth) Terhadap Staphylococcus aureus, Escherichia coli dan Pseudomonas aeruginosa Secara In-Vitro*. Program Studi Farmasi UNSRAT. Manado. 14.

Demetrio L, Valle J., Andrade JI, Puzon JM, Cabrera EC, Rivera WL. 2015. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippines medicinal plants against multidrugs-resistant bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 5(7):532-540.

Ebadi, M. 2002. *Pharmacodynamic Basic of Herbal Medicine: Alkaloids: Manuka and Fungal Diseases: Flavonoids*. New York: CRC press. 179-84.

Ebadi, M. 2002. *Pharmacodynamic Basic of Herbal Medicine: Alkaloids: Manuka and Fungal Diseases: Flavonoids*. New York: CRC press. 179-84.

Endriani R, Supardi I, Sudigdoadi S, Wartadewi. 2007. Penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM), konsentrasi bunuh minimal (KBM) dan waktu kontak ekstrak bawang putih (A. sativum) dibandingkan dengan eugenol terhadap S. mutans secara in vitro. JIK.

Gunawan I.G.W, Gede B. & N. L. Sutrisnayanti, 2009.Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (Phyllanthus NiruriLinn). Jurnal Kimia2 (1): 31-39.

Handayani, L. 2012. *Menaklukan Kanker Serviks dan Kanker Payudara Dengan 3 Terapi Alami.* Jakarta. PT.AgroMedia Pustaka. 98.

Jawetz, E., Mulnich, J.L. and Adelberg, E, A. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran.* Alih bahasa Huriawati hartanto. Edisi ke-23. CV. EGC Penerbit Buku Kedokteran Jakarta.

Juliantina, R., Farida, Dewa, A.C., Bunga, N., Titia, N., Endarwati, T.B. 2009. "Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram positif dan Gram Negatif". Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia.

Karou, D., Savadogo, Aly. 2005 Antibacterial activity of alkaloids from Sida acuta. African Journal of Biotechnology.4(12): 1452-1457.

Khan JA, Kumar N. 2011. Evaluation of Antibacterial Properties of Extracts of *Piper crocatum* Leaf. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 11(01): 1-3.

Khunaifi, M. 2010. *Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong (Anredera cordifolia (Ten) Steenis) terhadap bakteri Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa.* Thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. 13.

Kodim, N. 2010. *Resistensi Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus pada Luka Pasca Operasi: Kecerobohan yang Memprihatinkan*. Jurnal Medika: edisi 05 vol 36 diakses dari http://jurnalmedika.com/edisi-terbaru/184-editorial/274-resistensi-methicillin-staphylococcus-aureus-pada-luka-pasca-operasi-kecerobohan-yang-memprihatinkan

Koneman EW. 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Edisi ke-6. Philadephia: Lippincott Williams & Wilkins.

Kursia, S., J. S. Lebang, B. Taebe, A. Burhan, W. O. R. Rahim dan Nursamsiar. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (Paper betle L.) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermis. IJPST 3(2): 72-77.

Kusuma F, Tjitraresmi A, Susanti G. 2017. Antibacterial Effect Of Red *Piper Betle* Leaf (*Piper Crocatum* Ruiz And Pav.) Ethanolic Extracts To *Lactobacillus Acidophilus* And *Lactobacillus Bifidus* Growth Inhibition. II-Indonesian Conference on Clinical Pharmacy

Kusuma, S.A.F. 2009. *Staphylococcus aureus*. Makalah Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran.

Malang, p. 193-195

Mardiana, lina. 2012. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit.* Penebar Swadaya. Jakarta. 119.

Maryati. 2007. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun kemangi (Ocimum *basilicum L.) terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.* Jurnal Penelitian Sains & Teknologi, Vol. 8. : 30-38.

Masniari P., Chairul, Iyep Komala, Siti S., Susan M.N. 2006. *Aktivitas Antimikroba dan Fitokimia dari Beberapa Tanaman Obat*. Jurnal Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. 974.

Mercy, N., A.Jemmy., Vanda. 2013. *Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (Pometia pinnata) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus secara In vitro.* Jurnal Mipa Unsrat Online 2 (2) 128-132.

Moeljanto dan Mulyono. 2003. *Khasiat dan manfaat daun sirih: obat mujarab dari masa ke semasa.* Jakarta. PT.AgroMedia. 8-16.

Nair R, Chanda S. 2008. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betle* leaf extract. Indian J Pharm Sci. 70(3):390-393.

NCCLS. 2005. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Penssylvania:

Noorhamdani, Santoso S., Sumarno, Dzen S.M., Roekistiningsih, Winarsih S., *et al*., 2016, Bakteriologi Medis, 2nd Ed., Laboratorium Mikrobiologi FKUB,

Nuria, M.C., A. Faizatun., dan Sumantri. 2009. *Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (Jatropha cuircas L) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, dan Salmonella typhi ATCC 1408*. Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian. 5: 26 – 37.

Nurkusuma, Dudy R., Heyder, F., Wahjono, H. 2010. *Faktor yang Berpengaruh terhadap Kejadian Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pada Kasus Infeksi Luka Pasca-operasi di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi, Semarang*. Medika Journal. Vol. 36. No. 05. p. 300-305.

Paranoan, A. 2017. *Efek Pemberian Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa blimbi L) Terhadap Candida albicans In Vitro.* Skripsi. Program studi kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.

Prahastiwi, R.D. 2014. *Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum ruiz & pav) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus cereus Atcc 14745 Dan Shigella flexneri Atcc 12022 Serta Mekanisme Penghambatannya.*

*Skripsi.* Program Studi Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Sunan Kalijaga. Yogyakarta

Roeskistiningsih, F dan Bethania, S. 2016. *Bakteriologi Medik.* Malang. Laboratorium Mikrobiologi FKUB. 119-120.

Sari, E.W.P dan Satyabakti, Prijono. 2015. *Perbedaan Risiko Infeksi Nosokomial Saluran Kemih Berdasarkan Kateterisasi Urin, Umur, dan Diabetes Melitus*. Jurnal Berkala Epidemiologi,Vol. 3, No. 2 : 205–216.

Sari, F.P., dan S. M. Sari. 2011. *Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (Jatropha multifida Linn)* sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.

Sastroamidjojo, S., 1997, Obat Asli Indonesia, Dian Rakyat, Jakarta, 5-10.

Sudewo, B. 2010. *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*, 22, 35-36, PT Agromedia Pustaka, Jakarta.

Sudrajat, D.S dan Djoko, M. 2011. Bioekologi dan potensi senyawa bioaktif sirihhutan (Piper aduncum, L) sebagai sumber bahan baku larvasida nyamuk Aedes aegypti, L Mulawarman Scientifie.10(1): 63-74.

Sugiyono. 2011. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R & D*. Bandung: Alfabeta.

Sukmawati. 2010.*Solasi Staphylococcus aureus Pada Luka Infeksi Post Operasi Serta Penentuan Staphylococcus aureus Resisten Terhadap Methicillin.* Skripsi. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Sulistyaningsih. 2010. *Uji kepekaan beberapa sediaan antiseptik Terhadap bakteri Staphylococcus aureus dan Staphylococcus aureus resisten metisilin (MRSA)*. Tesis. Universitas Padjajaran. Bandung.

Suswati, I. 2012. Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Terhadap Pertumbuhan (*Streptococcus pneumoniae*). Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.

Syariefa, E. 2006. *Resep sirih Wulung untuk Putih Merona Hingga Kanker Ganas*, dalam Majalah Trubus No.434, tahun XXXVII Januari 2006, hlm 88.

Tenover, 2006, *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria*, The American Journal of Medicine, 119 (6), 3-10.

Todar, K. PhD. 2012. *Staphylococcus aureus and Staphylococcal disease*. TODAR'S ONLINE TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY (http://textbookofbacteriology.net/staph.html, Diakses pada 11 Januari 2017).

Tortora, Gerard J. 2013. *Microbiology : an introduction*. 11th ed. United States of America. Pearson Education, Inc.

Utami, prapti. 2013. *The Miracle of Herbs.* Jakarta Selatan. AgroMedia. 76.

World Health Organization. 2002. Prevention of Hospital-Acquired Infections, A practical guide, 2ndEdition, Department of Communicable Disease Surveillance and Response.

Yustina S.H., 2001. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Tumbuhan Lantana camara L.,* Tesis Program Studi Farmasi Jurusan Ilmu-Ilmu Matematika dan Pengtahuan Alam, program Pasca Sarjana Univesitas Gajah Mada, Yogyakarta. Hal: 9-10.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Surat Keaslian Ekstrak Daun Sirih Merah *(Piper crocatum)***

**POLITEKNIK NEGERI MALANG**
**JURUSAN TEKNIK KIMIA**
**UNIT PRODUKSI**
Jl. Soekarno – Hatta No. 09 Telp (0341) 404420 – 404424 Malang, 65101
Contact Person : Zulriadi (0341) 9158630 HP. 0813 3456 8567

No : 173 / UP-TK / EK / VIII /2018
Perihal : Surat Keterangan
Lampiran : 1 Lembar

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ir. Sri Rulianah, MTP
NIP : 196302111988032001
Jabatan : Ketua Unit produksi
Jurusan Teknik Kimia
Politeknik Negeri Malang

Dengan ini menerangkan bahwa :

1. Nama : Khairunnisa
   Nim : 155070101111026
2. Nama : Nurul Atika
   NIM : 155070101111027

Jurusan : Program Studi Kedokteran
Instansi : Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Benar telah melakukan Ekstrak Daun Sirih Merah dengan Metode Maserasi pada tanggal 25 – 30 Juli 2018 di Laboratorium Teknik Kimia, Jurusan Teknik Kimia - Politeknik Negeri Malang

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 30 Juli 2018
Ketua Unit Produksi,

UNIT PRODUKSI
JURUSAN TEKNIK KIMIA
POLITEKNIK NEGERI MALANG

Ir. Sri Rulianah, M.TP
NIP.196302111988032001

**Lampiran 2. Surat Keterangan Simplisia Materia Medika**

**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**
**DINAS KESEHATAN**
**UPT MATERIA MEDICA BATU**
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
**KOTA BATU** 65313

Nomor : 074 / 287A / 102.7 / 2018
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Sirih Merah**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : KHAIRUNNISA
NIM : 155070101111026
Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanamansirih merah
   Kingdom : Plantae
   Sub Kingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
   Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
   Divisi : Angiospermae/ Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
   Kelas : Dicotyledonae/ Magnoliopsida (Berkeping dua)
   Bangsa : Piperales
   Suku : Piperaceae
   Marga : Piper
   Jenis : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.
   Sinonim : *Steffensia crocata* (Ruiz & Pav.) Kunth
   Kunci Determinasi : 1b–2b–3b–4b–6b–7b–9a–41b–42b–43b–54b–59b–61–62b–63a–64a.
2. Morfologi : Habitus: Perdu, merambat. Batang: Berkayu, bulat, berbuku-buku, beralur, hijau. Daun: Tunggal, ujung meruncing, bulat panjang, pangkal bentuk jantung, tepi rata, panjang 5-8 cm, lebar 2-5 cm, bertangkai, permukaan halus, pertulangan menyirip, warna bagian bawahnya merah mengkilap. Akar: Tunggang, bulat, coklat kekuningan.
3. Nama Simplisia : Piperis crocati Folium/ Daun Sirih Merah.
4. Kandungan : Alkaloid, terpenoid, isprenoid, flavonoid, saponin, cyanogenik, tanin,glukosida, glucasonilate, senyawa polevenolad dan asam amino non protein.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
   - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
   - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 07 Agustus 2018
Kepala UPT Materia Medica Batu

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR UPT MATERIA MEDICA BATU DINAS KESEHATAN

Dr. Husin B.M., Drs., Apt., M.Kes.
NIP.196[illegible]102 199103 1 003

**Lampiran 3. Hasil Uji Non-Parametrik Mann-Whitney**

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 0,5% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 1% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 1,5% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 2% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0,5% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 1% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0,5% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 1,5% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 0,5% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 2% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 1% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 1,5% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 1% | 3 | 5.00 | 15.00 |
| | 2% | 3 | 2.00 | 6.00 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 6.000 |
| Z | -2.236 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .025 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .100[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

## NPar Tests
## Mann-Whitney Test

**Ranks**

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---|---|---|---|---|
| Koloni Bakteri | 1,5% | 3 | 3.50 | 10.50 |
| | 2% | 3 | 3.50 | 10.50 |
| | Total | 6 | | |

**Test Statistics[b]**

| | Koloni Bakteri |
|---|---|
| Mann-Whitney U | 4.500 |
| Wilcoxon W | 10.500 |
| Z | .000 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | 1.000 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | 1.000[a] |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok