

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* secara in vitro ini merupakan penelitian untuk mengetahui daya antibakteri dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan cara menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Penelitian uji daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Kadar hambat minimal (KHM) didapat dengan mengamati kekeruhan larutan pada tabung sub kultur yang sudah dilakukan inkubasi 37°C selama 24 jam. Perubahan yang terjadi ditandai dengan hasil biakan mulai tampak jernih bila dibandingkan dengan kontrol bahan (suspense bakteri dengan NaOCl 0,9%), yang artinya tidak ada pertumbuhan mikroba. Kadar bunuh minimal (KBM) dilihat dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media Trypticase Soy Agar (TSA) pada konsentrasi terendah yang diambil sebanyak satu ose dari tabung – tabung jernih pada penentuan kadar hambat minimal (KHM) yang dilakukan sebelumnya.

Hasil pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dapat dilihat pada Gambar 14 berikut :



Gambar 14. Perubahan kekeruhan pada uji dilusi ekstrak etanol daun sirih merah (konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%) setelah inkubasi selama 24 jam

Hasil pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* ditunjukkan data antara lain seperti yang nampak pada Tabel 1.

Tabung ke-	Bahan Uji	Replikasi ke -			
		1	2	3	4
1	Ekstrak 10%	+	+	+	+
2	Ekstrak 15%	+	+	+	-
3	Ekstrak 20%	-	-	-	-
4	Ekstrak 25%	-	-	-	-
5	Ekstrak 30%	-	-	-	-
6	(Ca(OH) ₂) 10% (-)	-	-	-	-
7	Aquades steril (-) *	-	-	-	-
8	Kontrol bahan (+)	+	+	+	+

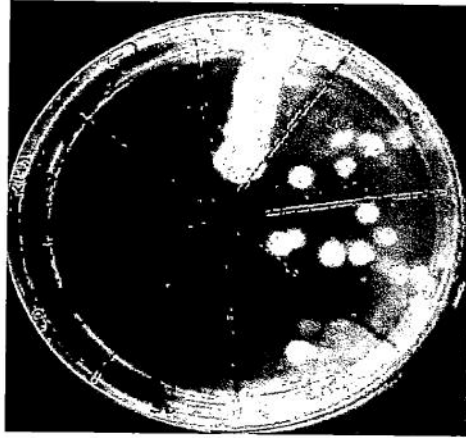
Tabel 1. Tingkat kekeruhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media BHI setelah diberi ekstrak daun sirih merah berbagai konsentrasi

Keterangan Tabel :

- (*) Pada tabung ke 7 hanya berisikan aquades steril tanpa diberi tambahan suspensi bakteri. Hal ini bertujuan untuk memperoleh kejernihan larutan dan dapat dibandingkan dengan tabung yang lain.
- a. Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga ekstrak etanol daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri dilihat berdasar warna larutan mulai tampak jernih.
 - b. Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga ekstrak etanol daun sirih merah tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri dilihat berdasarkan warna larutan yang tampak keruh.

Tabel tersebut menunjukkan konsentrasi yang mengalami kekeruhan yaitu pada konsentrasi 10% dan 15%. Sedangkan yang tidak mengalami kekeruhan yaitu pada konsentrasi 20%, 25%, 30%. Berdasarkan pengujian tersebut dapat dikatakan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak daun sirih merah adalah konsentrasi 20%.

Selanjutnya ditentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dengan menginokulasikan larutan dari tabung reaksi ke media Trypticase Soy Agar (TSA) sebanyak satu ose tiap satu konsentrasi, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Hasil penggoresan dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA) setelah diinkubasi selama 24 jam.

Hasil pengujian dilusi padat ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri bakteri *Enterococcus faecalis* dapat dinyatakan dalam Tabel 2 berikut ini :

Ose ke-	Bahan Uji	Cakram ke -			
		1	2	3	4
1	Ekstrak 10%	+	+	+	+
2	Ekstrak 15%	+	+	+	+
3	Ekstrak 20%	+	+	+	+
4	Ekstrak 25%	-	-	-	-
5	Ekstrak 30%	-	-	-	-
6	(Ca(OH) ₂) 10% (-)	-	-	-	-
7	Aquades steril (-)*	-	-	-	-
8	Kontrol bahan (+)	+	+	+	+

Tabel 2. Hasil pengujian dilusi padat ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri bakteri *Enterococcus faecalis*

Keterangan Tabel :

- (*) Pengolesan ke 7 berasal dari tabung berisikan aquades steril yang diperoleh dari uji dilusi sebelumnya. Aquades steril tersebut tidak diberikan suspensi bakteri sehingga dipastikan tidak terjadi pertumbuhan pada media Trypticase Soy Agar (TSA)
- a. Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA)
 - b. Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA)

Tabel 2 menunjukkan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu pada konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah 25%, yang dilihat dari tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA) pada konsentrasi terendah.

B. Pembahasan

Bakteri *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri fakultatif anaerob gram positif berbentuk kokus yang memiliki dinding sel dengan peptidoglikan tebal, namun apabila terjadi kerusakan maupun ada hambatan pada pembentukannya maka akan terjadi kematian sel tersebut. Salah satu bahan yang memiliki keefektifan sebagai antibakteri yaitu daun sirih merah, yang khasiat daunnya telah banyak digunakan. (Dhita Tri, 2013). Penelitian daya antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah memiliki daya antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri pada dasarnya dapat dilakukan dalam dua cara, yaitu metode difusi cakram dan dilusi. Pada metode difusi cakram, penilaian aktivitas antibakteri dilihat dari pengukuran zona inhibisi yang dipengaruhi kelarutan dan difusi bahan yang diuji sehingga kurang efektif

dalam menginhibisi mikroorganismenya. Sedangkan metode dilusi oleh Ferreira *et al.*, 2012, telah dilakukan untuk mengamati aktivitas antibakteri dan dinyatakan lebih efektif karena bahan coba langsung berkontak dengan mikroorganismenya (Ferreira, 2002). Nilai KHM diperoleh dengan mengamati perubahan kekeruhan suspensi bakteri yang telah diinkubasi 37°C selama 24 jam dan nilai KBM diperoleh dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media Trypticase Soy Agar (TSA) sehingga hasil penelitian akan lebih representatif. Atas dasar inilah peneliti memilih metode dilusi untuk menguji daya antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Kadar hambat minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah ekstrak yang mampu menghambat bakteri yang ditandai dengan kejernihan pada tabung dibandingkan dengan kontrol bahan. Kadar bunuh minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah yang masih mampu membunuh bakteri yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar padat (Purwantini dkk.,2011).

Menurut Jawetz *et al.*, (2008) mekanisme kerja sebagian besar zat antimikroba dapat dibagi menjadi empat cara, yaitu :

1. Penghambatan sintesis dinding sel

Bakteri mempunyai dinding sel yang mempertahankan bentuk dan ukuran mikroorganismenya, yang mempunyai tekanan osmotik internal yang tinggi. Cedera pada dinding sel atau inhibisi pada pembentukannya dapat menyebabkan sel menjadi lisis.

2. Penghambatan fungsi membrane sel

Sitoplasma semua sel yang hidup diikat oleh membran sitoplasma, yang bekerja sebagai transport aktif, sehingga mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi itu terganggu akan menyebabkan kerusakan dan kematian sel.

3. Penghambatan sintesis protein (yaitu, hambatan translasi dan transkripsi bahan genetic). Sintesis protein merupakan hasil akhir dari dua proses utama, yaitu transkripsi atau sintesis asam ribonukleat yang *DNA-dependent* dan translasi atau sintesis protein yang *RNA-dependent*.

4. Penghambatan sintesis asam nukleat

Struktur molekul DNA erat kaitannya dengan dua peran utama yaitu duplikasi dan transkripsi.

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*). Daun sirih merah dibuat menjadi ekstrak dimaksudkan agar penelitian berjalan dengan baik dan memperoleh hasil yang validitasnya baik, khususnya dalam uji dilusi yang membutuhkan sediaan cair. Sediaan berbentuk cair ini mempermudah daun sirih untuk masuk ke dalam tabung reaksi, dapat dicairkan ke berbagai konsentrasi yang diinginkan dengan campuran aquades steril dan dengan mudah bercampur dengan suspensi bakteri. Selanjutnya kekeruhan larutan dapat diamati dengan jelas.

Ekstraksi merupakan metode yang sering digunakan untuk memisahkan komponen atau senyawa dari tumbuhan. Pemisahan komponen atau senyawa tumbuhan dimulai dari proses maserasi. Selama proses maserasi, sel daun sirih merah mengalami kondisi jenuh sehingga sel – selnya akan

mengeluarkan senyawa – senyawa aktif yang kemudian diikat oleh pelarut etanol tersebut. Pelarut etanol digunakan dengan alasan karena sifatnya yang dapat melarutkan seluruh bahan aktif yang terkandung dalam suatu bahan alami, baik bahan aktif yang bersifat polar, semipolar maupun non polar. Selain itu pelarut etanol diketahui lebih aman daripada pelarut metanol karena tidak bersifat toksik.

Dalam hal ini, senyawa aktif daun sirih merah yang berkhasiat sebagai antibakteri adalah fenol, flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin. Fenol dan deviratnya mempunyai daya antibakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan sel dan denaturasi protein. Adanya fenol yang merupakan senyawa toksik mengakibatkan struktur tiga dimensi protein terganggu dan terbuka menjadi struktur acak tanpa adanya kerusakan pada struktur kerangka kovalen. Hal ini mengakibatkan protein berubah sifat namun deretan asam amino protein tersebut masih tetap. Selanjutnya aktivitas biologisnya menjadi rusak sehingga protein tidak dapat melakukan fungsinya. Dengan terdenaturasinya protein sel maka semua aktivitas metabolisme sel dikatalis oleh enzim sehingga bakteri tidak dapat melakukan fungsinya (Nurrokhman, 2006).

Flavonoid berfungsi sebagai bakterostatik dengan cara merusak membran sel bakteri karena sifatnya yang lipofilik selain itu juga berfungsi sebagai antiinflamasi. Alkaloid berperan sebagai antimikroba karena sifatnya yang dapat berikatan dengan DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA itu sendiri, akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA yang akhirnya akan menyebabkan kematian sel. Selain itu alkaloid juga bersifat detoksifikan yang dapat menetralkan racun. Saponin

sebagai deterjen yang memiliki molekul ampifatik (mengandung bagian hidrofilik dan hidrofobik) yang dapat melarutkan protein membrane. Ujung hidrofobik saponin berikatan dengan region hidrofobik protein membrane sel dengan menggeser sebagian besar unsure lipid yang terikat. Akibatnya, sel bakteri menjadi lisis. Tannin merupakan polifenol yang larut dalam air, mekanisme antibakterinya yaitu dengan cara menghambat enzim ekstra seluler mikroba, mengambil alih substrat yang dibutuhkan pada pertumbuhan mikroba, atau bekerja langsung pada metabolisme dengan cara menghambat fosforilasi oksidasi (Dhita Tri, 2003).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rahmadita Sekar Saraswati (2011), infusa daun sirih merah sudah menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 6,25%.

Penelitian daun sirih merah juga dilakukan oleh Prof. DR.dr.Sanarto Santoso, Sp.MK (K) (2009) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* pada konsentrasi 15%.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh peneliti. Berdasar penelitian ini diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dengan konsentrasi 20% (KHM), ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan pada media cair. Sedangkan KBM dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terdapat pada konsentrasi 25%, ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri di media agar TSA.

Daya antibakteri juga ditunjukkan oleh larutan *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 10% yang pada penelitian ini berperan sebagai kontrol negatif. Pasta *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) seberat 1 gram diencerkan dengan 1 ml aquades. Perbandingan 1 : 1 ini menghasikan sediaan cair dengan kandungannya zat aktif yang masih sama dengan sediaan pasta tanpa menghilangkan zat aktif yang ada. Pada konsentrasi 10% ini, tidak ditemui adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media agar padat. Hal ini terjadi kemungkinan karena kemampuan kalsium hidroksida dalam mengkondisikan suasana dan pH lingkungannya oleh karena keberadaan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion hidroksil (OH^-). Ion kalsium (Ca^{2+}) dapat berikatan dengan karbon dioksida menjadi kalsium bikarbonat sehingga bakteri kekurangan supply CO_2 . Ion hidroksil (OH^-) akan mengganggu permeabilitas membrane sel, menaikkan pH lingkungan sehingga menghambat aktivitas enzim bakteri untuk oksidasi enzim lain dan protein sel, juga mengganggu DNA bakteri dan menghambat replikasi DNA. Sediaan kalsium hidroksida yang berbentuk pasta dilarutkan menjadi konsentrasi 10% dengan aquades steril. Pada tahap ini, kehadiran aquades semakin mensinergiskan aktivitas disosiasi menjadi ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion hidroksil (OH^-) sehingga dalam konsentrasi 10% kalsium hidroksida sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* (Banurea,2008).

Saat ini pemakaian Ca(OH)_2 dalam bidang endodontic dapat dilakukan dalam dua bentuk yaitu Ca(OH)_2 berupa pasta dan Ca(OH)_2 berupa bentuk point. Kalsium hidroksida pasta memiliki kesulitan dalam penggunaannya dan sering menghasilkan penempatan yang inadekuat dan pembersihan yang *incomplete* (tidak menyeluruh) untuk melakukan obturasi bila dibandingkan bentuk point. Elbert, (1998), pada penelitian *in vivo* menunjukkan tidak ada perbedaan antara penggunaan kalsium hidroksida pasta maupun point. Ca(OH)_2 telah dipergunakan secara luas sebagai bahan dressing intrakanal antar kunjungan sehubungan dengan sifat antibacterial dan kemampuan denaturasi protein yang memudahkan dissolusi jaringan pulpa (Chew, 2003)

Penelitian yang dilakukan oleh Feby Endrieny, 2008, berjudul “Efek Antibakteri Kitosan Blankas (*Limulus polyphemus*) Bermolekul Tinggi Terhadap *Fusobacterium nucleatum* (Penelitian *in vitro*)” menggunakan pasta kalsium hidroksida Ca(OH)_2 dengan konsentrasi 0,5% dan 1% sebagai control positif. Dari penelitian tersebut, kalsium hidroksida konsentrasi 1% sudah mempunyai daya antibakteri yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh peneliti dimana kalsium hidroksida konsentrasi 10% bisa dijadikan control negatif yang memberikan efek bakterisidal atau kadar bunuh minimum, dimana tidak ditemukannya pertumbuhan mikroorganisme pada media agar padat.

Berdasarkan pembahasan menunjukan bahwa mekanisme dari *fenol*, *flavonoid*, *alkaloid*, *saponin* dan *tannin* yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) memiliki peran sebagai daya

antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Mekanisme kerja zat aktif tersebut dengan menghambat sintesis dinding sel, menghambat fungsi membrane sel dan menghambat sintesis protein. Daya antibakteri ini ditunjukkan dengan hasil penelitian yang membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) mempunyai kadar hambat minimal (KHM) yaitu 20% dan kadar bunuh minimal (KBM) yaitu 25% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Pemakaian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai bahan *dressing* masih perlu dipertimbangkan karena sifat biokompabilitas dan biodegradasinya sangat baik karena merupakan produk alami. Konsentrasi KHM dan KBM yang besar disebabkan penelitian dilakukan secara *in vitro* harus membunuh bakteri 99,9% -100% dan aplikasinya menggunakan bahan pelarut. Oleh karena itu penelitian ini perlu dilanjutkan dengan penelitian *in vivo* untuk menentukan berapa nilai KHM dan KBM daun sirih merah yang aman jika dipakai sebagai bahan *dressing* saluran akar.