

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Karakteristik sampel daun sirih merah (*Piper crocatum L.*)

Sampel daun sirih merah didapatkan dari pekarangan rumah yang berlokasi di wilayah Desa Sidakarya, Denpasar Selatan. Sampel daun sirih merah dipilih berdasarkan dengan kriteria penelitian. Setelah melalui proses pemilahan untuk memastikan kualitas sampel, jumlah sampel yang terkumpul mencapai 1,2 kg. Sampel dilanjutkan dengan tahap pengeringan selama sepuluh hari untuk mendapatkan hasil yang kering.



Gambar 6 Sampel daun sirih merah

Setelah pengeringan, dilakukan pemilihan kembali sampel daun sirih merah berdasarkan kriteria penelitian. Tahap selanjutnya adalah penghalusan sampel kering sehingga diperoleh simplisia berbentuk bubuk halus dengan berat akhir 157,17 g.



Gambar 7 Serbuk simplisia

Simplisia yang telah dihasilkan yang selanjutnya diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu perendaman dengan etanol 96% sebagai pelarut, dalam rasio 1:5 antara sampel dan pelarut, dengan menggunakan 150g bubuk simplisia dan 750 ml pelarut. Perendaman dilakukan selama 3×24 jam di ruangan yang terlindungi dari sinar matahari. Setelah perendaman selesai, maserat disaring menggunakan kain kasa steril dan ditampung pada erlenmeyer.



Gambar 8 Ekstrak pekat daun sirih merah

Maserat yang dihasilkan kemudian dievaporasi hingga menghasilkan ekstrak daun sirih merah pekat dengan berat akhir yaitu 16,71g. Hasil perhitungan rendemen ekstrak menunjukkan persentase sebesar 11,14% dengan warna hijau kehitaman.

2. Skrining fitokimia

Pada penelitian ini, dilakukan uji skrining fitokimia yang mencakup pengujian terhadap alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, serta steroid atau terpenoid. Berdasarkan hasil pengujian fitokimia, teridentifikasi adanya senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etanol daun sirih merah mengandung senyawa alkaloid yang terdeteksi dengan reagen Dragendorff, flavonoid, dan tanin. Data hasil uji skrining fitokimia disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5
Hasil Uji Skrining Fitokimia

Parameter uji	<u>Pereaksi</u>	Hasil	<u>Interpretasi</u> Hasil
Alkaloid	<u>Dragendorff</u>	<u>Berwarna jingga</u>	+
	Mayer	<u>Tidak terdapat endapan putih</u>	-
Flavonoid	<u>HCl pekat dan Mg</u>	<u>Berubah warna menjadi jingga kekuningan</u>	+
Tanin	<u>FeCl₃</u>	<u>Berubah warna menjadi hijau kehitaman</u>	+
Saponin	<u>Air panas dan HCl 2N</u>	<u>Busa tidak bertahan lama</u>	-
Steroid	<u>H₂SO₄ pekat</u>	<u>Tidak ada perubahan warna menjadi merah</u>	-

3. Diameter zona hambat

Dalam penelitian ini, didapatkan data diameter zona hambat antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian dilakukan menggunakan variasi konsentrasi, yaitu 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%, untuk memastikan efektivitasnya dalam menghambat bakteri. Data hasil pengukuran daya hambat antibakteri ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel 6 berikut.

Tabel 6
Diameter Zona Hambat

<u>Perlakuan</u>	<u>Diameter Zona Hambat (mm)</u>			<u>Rerata ± SD (mm)</u>	<u>Kategori</u>
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>		
<u>Etanol 96%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Antibiotik Chloramphenicol 30 mcg</u>	19	17	22	19,33 ± 2,52	<u>Kuat</u>
<u>Ektrak 15%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Ektrak 30%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Ektrak 45%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Ektrak 60%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Ektrak 75%</u>	0	0	0	0 ± 0	<u>Lemah</u>
<u>Ektrak 90%</u>	9	10	9	9,33 ± 0,58	<u>Sedang</u>

a. Diameter zona hambat antibiotik *Chloramphenicol* 30 mg

Pengujian daya hambat antibakteri dilakukan dengan menggunakan cakram disk antibiotik *Chloramphenicol* 30 mg sebagai kontrol, dengan uji sensitivitas antibiotik dilakukan dalam tiga kali pengulangan. Hasil pengukuran dengan jangka sorong mengindikasikan bahwa zona bening yang terdapat di sekitar cakram disk memiliki rerata diameter sebesar $19,33 \text{ mm} \pm 2,52$, yang mengindikasikan bahwa antibiotik *Chloramphenicol* memiliki efektivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

b. Diameter zona hambat etanol 96%

Pada penelitian ini, etanol dengan konsentrasi 96% berfungsi sebagai pelarut utama dalam proses ekstraksi serta sebagai kelompok kontrol. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan pada kelompok ini. Berdasarkan hasil pengamatan, tidak ditemukan adanya daerah hambat di sekeliling cakram uji pada ketiga pengulangan. Hal ini menunjukkan bahwa etanol 96% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

c. Diameter zona hambat konsentrasi ekstrak 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%

Dalam penelitian ini, ekstrak dengan variasi konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90% diuji untuk menentukan efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Tujuan dari pemilihan variasi konsentrasi yang berperan sebagai kelompok eksperimen ini adalah untuk mengidentifikasi tingkat efektivitas dalam menghambat bakteri. Setiap konsentrasi pada kelompok ini diuji sebanyak tiga

kali pengulangan untuk menunjukkan konsistensi hasil. Berdasarkan hasil pengujian, tidak ditemukan adanya zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75%, yang menunjukkan bahwa tidak terdapat aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Namun, pada konsentrasi ekstrak 90%, terbentuk zona hambat dengan rata-rata diameter sebesar $9,33 \text{ mm} \pm 0,58$, yang mengindikasikan adanya efek antibakteri pada konsentrasi tersebut.

- d. Analisis data statistik diameter zona hambat pada kontrol positif, kontrol negatif, dan konsentrasi ekstrak 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%

Analisis data statistik diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas dengan uji *Kolmogorof-Smirnof* (KS). Hasil uji *Kolmogorov Smirnov* pada data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum L*) didapatkan nilai signifikansi probabilitas (p) 0,000. Nilai probabilitas tersebut lebih kecil dari (p (0,000) $< \alpha$ (0,05)), yang berarti data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* tidak berdistribusi normal. Data hasil analisis statistik uji normalitas dengan uji *Kolmogorof-Smirnof* dapat dilihat pada Tabel 7 berikut.

Tabel 7
Hasil Uji Kolmogorov Smirnov Data Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

<u>Perlakuan</u>	<u>Rerata ± SD</u>	<i>P Value</i>
<u>Antibiotik</u> <i>Chloramphenicol 30 mcg</i>	19,33 ± 2,52	
<u>Etanol 96%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 15%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 30%</u>	0 ± 0	0,000
<u>Ekstrak 45%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 60%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 75%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 90%</u>	9,33 ± 0,58	

Karena data tidak berdistribusi normal maka uji dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil analisis dinyatakan terdapat perbedaan bermakna apabila nilai probabilitas (*p value*) < α (0,05). Hasil analisis *Kruskal Wallis* dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 8
Hasil Uji *Kruskal Wallis* Data Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak

<u>Perlakuan</u>	<u>Rerata ± SD</u>	<i>P Value</i>
<u>Antibiotik</u> <i>Chloramphenicol 30 mcg</i>	19,33 ± 2,52	
<u>Etanol 96%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 15%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 30%</u>	0 ± 0	0,002
<u>Ekstrak 45%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 60%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 75%</u>	0 ± 0	
<u>Ekstrak 90%</u>	9,33 ± 0,58	

Hasil uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai signifikansi 0,002, sehingga dinyatakan terdapat perbedaan yang bermakna zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah. Uji dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* dirangkum pada tabel 9 berikut ini

Tabel 9
Hasil Uji *Mann Whitney* Data Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

P	K-	K+	15%	30%	45%	60%	75%	90%
K-		*0,037	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	*0,034
K+	*0,037		*0,037	*0,037	*0,037	*0,037	*0,037	*0,046
15%	1.000	*0,037		1.000	1.000	1.000	1.000	*0,034
30%	1.000	*0,037	1.000		1.000	1.000	1.000	*0,034
45%	1.000	*0,037	1.000	1.000		1.000	1.000	*0,034
60%	1.000	*0,037	1.000	1.000	1.000		1.000	*0,034
75%	1.000	*0,037	1.000	1.000	1.000	1.000		*0,034
90%	1.000	*0,046	*0,034	*0,034	*0,034	*0,034	*0,034	

Keterangan: *Terdapat perbedaan bermakna ($p < \alpha (0,05)$)

Berdasarkan tabel 9 diatas diketahui bahwa terdapat 2 nilai yaitu $p < 0,05$ dan $p > 0,05$. Nilai $p < 0,05$ mengindikasikan terdapat perbedaan bermakna zona hambat pertumbuhan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* antar variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna zona hambat pertumbuhan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* antar variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah.

B. Pembahasan

1. Simplisia dan ekstrak pekat daun sirih merah (*Piper crocatum L.*)

Daun Sirih Merah yang digunakan sebagai sampel penelitian diperoleh dari pekarangan dua rumah berbeda yang berlokasi di wilayah Desa Sidakarya, Denpasar Selatan. Proses untuk pembuatan simplisia dilakukan melalui tahapan demi tahap, yaitu pemilahan sampel basah, pengeringan, pemilahan sampel kering, dan penghalusan. Pada tahap awal, sampel yang sudah dipilah dibiarkan terangin-anginkan sebelum melanjutkan ke proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara mengangin-anginkan sampel di ruang terbuka yang terlindungi dari paparan sinar matahari langsung. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk menjaga kualitas simplisia dengan mengurangi kadar air pada sampel dan menghentikan aktivitas enzimatik yang dapat merusak senyawa aktif. Selanjutnya, tahap penghalusan dilakukan untuk memperluas permukaan sampel. Proses ini bertujuan agar ekstraksi senyawa aktif menggunakan pelarut menjadi lebih efisien dan optimal.

Simplisia yang telah diperoleh diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut, dengan rasio sampel terhadap pelarut sebesar 1:5. Pemilihan metode maserasi didasarkan pada keuntungannya yang tidak memerlukan pemanasan, sehingga senyawa aktif yang rentan terhadap kerusakan akibat panas dapat terjaga kualitasnya. Selain dengan prosedur yang sederhana dan alat yang tergolong ekonomis, metode ini membutuhkan waktu lebih lama untuk mengeluarkan senyawa dari simplisia. Setelah tahap ekstraksi selesai dilakukan, tahapan terakhir untuk

menghasilkan ekstrak pekat adalah proses penguapan vacuum atau evaporasi. Pada tahap ini dilakukan penurunan tekanan pada alat, sehingga titik didih pada pelarut menjadi lebih rendah, Hal ini membuat pelarut menguap lebih cepat tanpa harus menggunakan suhu yang tinggi.

2. Skrining fitokimia

Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa yang diproduksi oleh tumbuhan dalam jumlah kecil (<10% dari total yang tersedia) dan berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap serangga, mikroorganisme, serta herbivora (Othman, Sleiman and Abdel-masih, 2019). Metabolit sekunder juga berperan dalam membangun interaksi ekologis antara tanaman dengan organisme lain serta berkontribusi pada kemampuan tanaman untuk beradaptasi dan bertahan terhadap perubahan lingkungan sepanjang siklus hidupnya. Tanaman sering menghadapi berbagai tekanan abiotik, seperti paparan logam toksik dan oksidatif, suhu ekstrem, banjir, salinitas, dan kekeringan. Untuk mengatasi situasi tersebut, tanaman mensintesis berbagai senyawa kimia dengan berat molekul rendah yang dikenal sebagai metabolit sekunder, termasuk alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan terpenoid (Rahman *et al.*, 2023).

Untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif yang terdapat pada suatu ekstrak tanaman dapat dilakukan dengan pengujian skrining fitokimia. Pada penelitian ini, uji skrining fitokimia yang dilakukan pada ekstrak daun sirih merah meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid atau terpenoid. Berdasarkan data hasil yang didapatkan pada pengujian kandungan fitokimia

menunjukkan bahwa terdapat senyawa metabolit sekunder yang positif terkandung dalam sampel ekstrak etanol daun sirih merah yaitu senyawa alkaloid dengan reagen Dragendorff, flavonoid, dan tanin.

Alkaloid yang terdeteksi dengan reagen Dragendorff merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur heterosiklik nitrogen, yang memungkinkan adanya interaksi dengan komponen sel bakteri. Adanya perbedaan hasil uji alkaloid antara reagen Dragendorff dengan hasil positif dan reagen Mayer dengan hasil negatif dapat disebabkan oleh perbedaan sensitivitas dan mekanisme reaksi masing-masing reagen terhadap alkaloid dengan struktur kompleks, terutama yang memiliki gugus heterosiklik nitrogen, sehingga lebih banyak alkaloid yang terdeteksi (Parbuntari *et al.*, 2018). Alkaloid diketahui dapat merusak peptidoglikan, yaitu komponen utama dinding sel bakteri, sehingga struktur dinding menjadi tidak sempurna dan menyebabkan kematian sel (Nur Handayani *et al.*, 2019).

Flavonoid dikenal memiliki aktivitas antibakteri dengan berbagai struktur aktif, seperti apigenin, galangin, pinocembrin, ponciretin, genkwanin, sophoraflavanone G, serta naringin, naringenin, epigallocatechin gallate, luteolin, quercetin, kaempferol, dan turunannya. Flavonoid memiliki sifat bakterisida, bukan dengan langsung membunuh bakteri, tetapi dengan menghambat agregasi mikroba dan mengurangi Unit Pembentuk Koloni (CFU). Efek yang ditimbulkan oleh flavonoid terjadi melalui penghambatan sintesis asam nukleat, gangguan fungsi membran sel, dan penghambatan metabolisme bakteri, sehingga bakteri kehilangan kemampuan untuk

berkembang dan bertahan hidup (Nur Handayani et al., 2019). Flavonoid juga dikenal dengan kemampuannya untuk melawan radikal bebas, mengurangi penyakit degeneratif, serta memiliki sifat anti-inflamasi, antikarsinogenik dan antimutagenik (Widiasriani, dkk., 2024).

Tanin merupakan senyawa fenolik polimerik yang terbagi menjadi dua jenis, yaitu tanin terhidrolisis, yang berbasis asam galat dan teresterifikasi dengan glukosa dan tanin terkondensasi, yang berasal dari molekul flavonoid tidak terikat, disebut proantosianidin. Tanin terhidrolisis mengandung gugus ester yang dapat terurai dalam kondisi asam, sedangkan tanin terkondensasi terdiri dari struktur flavonoid kompleks yang lebih stabil. Gugus fungsional utama dalam tanin, seperti -OH (hidroksil) dan -COOH (karboksil), berperan dalam interaksi dengan protein dan membrane sel bakteri, yang menyebabkan gangguan struktural yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Villanueva *et al.*, 2023)

3. Daya hambat antibakteri

Daya hambat antibakteri adalah salah satu parameter dalam menilai efektivitas suatu senyawa atau ekstrak alami sebagai zat antimikroba. Hal ini diukur melalui terbentuknya zona bening (clear zone) di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung senyawa atau ekstrak dan diletakkan pada media. Zona bening ini menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan antibakteri, dengan ukuran zona bening yang lebih besar mengindikasikan aktivitas antibakteri yang lebih kuat (Bian, Kandou and Rumondor, 2015). Metode difusi cakram (*Kirby-Bauer*) diterapkan dalam

pengujian daya hambat antibakteri ekstrak daun sirih merah pada media *Mueller Hinton Agar* terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Proses pengujian ini dimulai dengan pembuatan media agar. Bubuk media ditimbang terlebih dahulu untuk menemukan berat yang sesuai dengan rencana penelitian yang kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dan dihomogenkan serta dipanaskan dengan menggunakan hotplate. Saat sudah terlarut sempurna, dilakukan pengukuran pH pada media dengan pH stik untuk memastikan pH berada dalam keadaan optimal. Media yang sudah dalam keadaan optimal disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Sebelum menuangkan media yang sudah disterilisasi, media didiamkan terlebih dahulu hingga suhu mencapai kisaran 40-45°C. Ketika media sudah mencapai suhu 40-45°C, sebanyak ± 25 ml media dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri, kemudian dibiarkan hingga mengalami pematangan. Selanjutnya, dilakukan pengenceran variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah sesuai dengan tabel variasi konsentrasi pada penelitian ini. Ekstrak yang sudah diencerkan menjadi beberapa konsentrasi kemudian diaplikasikan pada *blank* disk dengan cara meneteskan masing-masing konsentrasi ekstrak menggunakan mikropipet sebanyak 20µL guna mengontrol volume ekstrak yang akan diserap oleh cakram kosong, lalu didiamkan hingga ekstrak terserap sempurna pada kertas cakram. Selagi menunggu penyerapan ekstrak pada kertas cakram, dapat dilanjutkan dengan pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada 10 ml larutan NaCl 0,9% steril dimasukkan koloni *Staphylococcus aureus* berumur 24 jam menggunakan ose secara aseptis lalu

dihomogenkan. Suspensi bakteri tersebut dikalibrasi kekeruhannya menggunakan McFarland densitometer hingga standar 0,5 McFarland. Proses dilanjutkan dengan inokulasi bakteri. *Cotton swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri hingga terlapisi secara merata. Tanpa diperas, *cotton swab* yang sudah dicelupkan pada suspensi bakteri, disebarkan secara merata pada permukaan media MHA dengan cara menggoreskan *cotton swab* menggunakan teknik *swabbing* dengan tiga sudut yang berbeda dan ditunggu sekitar 3-5 menit. Selanjutnya, letakkan cakram yang sudah diberikan variasi konsentrasi diatas permukaan media yang sudah diinokulasikan bakteri dengan menggunakan pinset steril pada bagian tengah media, dan tekan perlahan untuk memastikan cakram tertempel sempurna. Semua media yang sudah diletakkan kertas cakram baik kontrol positif, kontrol negatif maupun variasi konsentrasi, diinkubasi menggunakan incubator pada suhu $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dengan posisi tertutup dan terbalik. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong, dengan pengukuran dilakukan dari tepi ke tepi yang berseberangan.

a. Daya hambat antibiotik *Chloramphenicol* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan pendukung dalam uji daya hambat antibakteri ekstrak daun sirih merah terhadap *Staphylococcus aureus* atau yang biasa disebut kontrol. Kontrol ini bertujuan untuk memastikan kualitas dari isolat bakteri, menguji kemampuan difusi senyawa, serta mengevaluasi kualitas suspensi bakteri.

Selain itu, kontrol juga berfungsi untuk memastikan zona hambat yang terbentuk sesuai dengan uji dan kualitas dari media MHA yang digunakan. Digunakan antibiotik *Chloramphenicol* 30 mcg sebagai pembanding (kontrol) dalam penelitian ini.

Data hasil pengujian daya hambat antibakteri menunjukkan antibiotik *Chloramphenicol* menunjukkan rata-rata diameter daerah jernih sebesar 19,33 mm. Jika dikategorikan berdasarkan klasifikasi Davis and Stout (1971), daya hambat yang dihasilkan tergolong kuat karena masih ,berkisar antara 11 – 20 mm. Selain itu, berdasarkan standar CLSI, sensitivitas antibiotik dibagi menjadi tiga kategori: *susceptible*, *intermediate*, dan *resistant*. Dalam pengujian ini, *Chloramphenicol* sebagai kontrol masuk dalam kategori *intermediate*, Dimana akan menunjukkan aktivitas antibakteri yang cukup baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil tersebut juga memberikan Gambaran mengenai kualitas isolat bakteri yang diuji, karakteristik media yang digunakan, serta kemampuan difusi zat dalam media.

b. Daya hambat etanol 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Penelitian uji daya hambat anti bakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* L.) menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Setiap pelarut memiliki peran yang penting untuk menentukan jumlah serta jenis senyawa yang dapat di ekstraksi. Berdasarkan prinsip “*like dissolve like*” atau serupa melarutkan serupa, senyawa polar cenderung larut dalam pelarut polar, sementara senyawa non-polar akan lebih mudah terlarut dalam pelarut non-polar. Etanol 96% dipilih menjadi pelarut karena memiliki daya ekstraksi yang tinggi terhadap senyawa dengan tingkat kepolaran yang bervariasi,

baik non-polar, semi-polar, maupun polar (Utami and Putri, 2020). Etanol digunakan untuk melarutkan berbagai senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan steroid atau terpenoid, serta berfungsi sebagai bagian dari kontrol dalam pengujian. Dibandingkan dengan etanol berkonsentrasi lebih rendah, etanol 96% memiliki kemampuan penetrasi yang lebih baik ke dalam dinding sel, sehingga mampu mengekstrak senyawa aktif lebih optimal dan menghasilkan ekstrak dengan tingkat kepekatan yang lebih tinggi (Wendersteyt, Wewengkang and Abdullah, 2021).

Dalam penelitian ini, etanol 96% digunakan sebagai kelompok kontrol untuk mengevaluasi efek antibakterinya sebagai pelarut utama ekstrak. Pengujian menunjukkan bahwa cakram disk yang berisi etanol 96% tidak menghasilkan zona hambat dalam tiga kali pengulangan, yang mengindikasikan bahwa etanol 96% sebagai pelarut tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi efektivitas antimikroba pada etanol, seperti konsentrasi, durasi kontak, dan jumlah volume yang digunakan. Kesalahan baik dalam penyimpanan maupun penggunaan reagen, sering kali berkaitan dengan penurunan kualitas etanol sebagai pelarut yang juga dapat menyebabkan penurunan zona hambat. Seiring berjalannya waktu, penggunaan etanol secara berulang kali dengan keadaan etanol telah terbuka cenderung akan mengalami degradasi kualitas, akibat sifatnya yang mudah menguap, sehingga konsentrasinya dapat berkurang secara bertahap .

- c. Daya hambat ekstrak daun sirih merah konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil penelitian uji daya hambat antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* L.) menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* hanya terlihat pada konsentrasi 90%, dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 9,33 mm, yang tergolong dalam kategori sedang. Sementara itu, pada variasi konsentrasi 15, 30, 45, 60, dan 75%, tidak teramati adanya zona hambat yang signifikan, tidak terbentuk daerah bening di area sekitaran kertas cakram, mengindikasikan bahwa ekstrak daun sirih merah pada konsentrasi tersebut belum mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara efektif dengan metode difusi cakram. Tidak terbentuknya zona hambat pada sebagian besar konsentrasi ekstrak, bertentangan dengan hasil dari uji fitokimia yang menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid dan tanin pada ekstrak tersebut yang memiliki aktivitas antibakteri.

Faktor-faktor yang dapat menjelaskan ketidaksesuaian hasil ini sejalan dengan penjelasan yang diberikan dalam jurnal Wiegand *et al.*(2018) yang mengidentifikasi beberapa variabel yang memengaruhi hasil uji antibakteri. Pertama, waktu inkubasi, waktu inkubasi standar untuk uji antibakteri adalah 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efektivitas antibakteri sangat dipengaruhi oleh lamanya waktu inkubasi. Beberapa senyawa yang menunjukkan peningkatan penghambatan yang signifikan antara 8 hingga 24 jam., sementara senyawa lain mampu membasmi bakteri

sepenuhnya dalam waktu 6 jam. Kedua, jumlah inoculum awal atau konsentrasi awal bakteri, dimana pada konsentrasi yang lebih rendah menghasilkan efikasi antibakteri yang lebih tinggi, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat mengurangi efektivitas senyawa uji dan menghasilkan efikasi antibakteri yang lebih rendah. Ketiga, keadaan fisiologis bakteri, Dimana pada fase pertumbuhan bakteri dapat memengaruhi sensitivitas terhadap agen antibakteri. Keempat, konsentrasi nutrisi. Dalam pengujian standar, digunakan media dengan pengenceran tinggi agar pertumbuhan bakteri tidak terlalu cepat sehingga efek antibakterinya lebih mudah untuk diamati, namun jika nutrisi yang tersedia terlalu banyak, maka bakteri dapat tumbuh dengan subur dan cepat, sehingga daya hambat antibakteri pada sampel yang diuji menjadi berkurang. Semakin tinggi kandungan nutrisi pada media, semakin kuat pertumbuhan bakteri dan semakin berkurang efektivitas sampel antibakteri yang diuji.

4. Analisis statistik

Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dalam penelitian ini selanjutnya dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan *Software Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 27.0. Tahapan pertama dalam analisis statistik adalah pengujian distribusi data menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* (KS). Data penelitian dianggap berdistribusi normal jika memiliki nilai signifikansi probabilitas (*p value*) > α (0,05).

Kriteria keputusan uji *Kolmogorov Smirnov*

a. Jika *p value* > α (0,05), maka H_0 diterima (data berdistribusi normal).

b. Jika ($p \text{ value}$) $< \alpha$ (0,05), maka H_0 ditolak (data tidak berdistribusi normal).

Hasil analisis statistik uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnof* terhadap data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum L*) didapatkan nilai signifikansi probabilitas (p) sebesar 0,000. Nilai tersebut lebih kecil dari p (0,000) $< \alpha$ (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* tidak berdistribusi normal. Karena data tidak berdistribusi normal maka uji dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan bermakna jika nilai probabilitas ($p \text{ value}$) $< \alpha$ (0,05). Hasil uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai signifikansi 0,002. Nilai probabilitas tersebut lebih kecil dari p (0,002 $< \alpha$ (0,05), sehingga dinyatakan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik antar diameter zona hambat pada variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah. Untuk mengetahui pada konsentrasi mana saja terdapat perbedaan bermakna, uji dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan bermakna apabila nilai probabilitas ($p \text{ value}$) $< \alpha$ (0,05).

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* didapatkan 2 nilai yaitu $p < 0,05$ dan $p > 0,05$. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna zona hambat pertumbuhan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* antar variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan tidak terdapat

perbedaan bermakna zona hambat pertumbuhan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* antar variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah.

Nilai probabilitas $< \alpha (0,05)$ didapatkan pada uji *Mann Whitney* antara K- terhadap K+ dengan *p value* 0,037. Antara K+ terhadap konsentrasi 15, 30, 45, 60, dan 75% dengan *p value* 0,037, dan terhadap konsentrasi 90% dengan *p value* 0,046. Antara konsentrasi 15% terhadap 90% dengan *p value* 0,034. Antara konsentrasi 30% terhadap 90% dengan *p value* 0,034. Antara konsentrasi 45% terhadap 90% dengan *p value* 0,034. Antara konsentrasi 60% terhadap 90% dengan *p value* 0,034. Antara konsentrasi 75% terhadap 90% dengan *p value* 0,034, sedangkan pada uji *Mann Whitney* dengan nilai *p value* $1,000 < \alpha (0,05)$.

5. Keterbatasan penelitian

Terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini yang perlu diperhatikan. Salah satu keterbatasan utama adalah tidak terbentuknya zona hambat pada variasi konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75%, yang menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut belum cukup efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Zona hambat baru terbentuk pada konsentrasi 90% dengan kategori sedang, yang mengindikasikan bahwa efektivitasnya baru terlihat pada konsentrasi tinggi. Keterbatasan lainnya terletak pada proses ekstraksi dan pemilihan jenis pelarut, yang mungkin belum optimal dalam menyerap senyawa aktif dalam ekstrak secara maksimal. Selain itu, tidak dilakukan analisis kuantitatif terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid pada tiap konsentrasi, sehingga hubungan

antara kadar senyawa metabolit sekunder dengan potensi antibakterinya tidak dapat dianalisis secara menyeluruh. Dalam segi teknis pada prosedur kerja, faktor seperti ketebalan media agar yang kurang merata pada cawan petri, homogenisasi pada pengenceran yang kurang tepat dan maksimal, serta densitometer McFarland yang tidak pernah dikalibrasi sehingga pembacaan kekeruhan suspensi bakteri tidak stabil dapat memengaruhi hasil pada pembentukan zona hambat.