

## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Gambaran Umum Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo. Penelitian ini dilaksanakan 7 - 30 Juni 2024. Sampel daun bidara yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun bidara tua, setelah itu dilakukan pengujian di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo.

#### **B. Hasil Penelitian**

##### **1. Hasil Identifikasi Bakteri Uji**

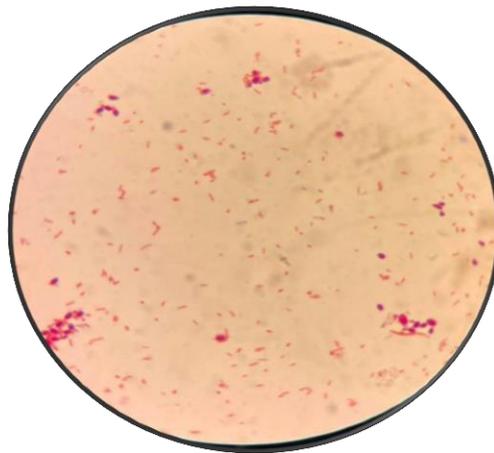
###### **a. Pewarnaan Gram**

Identifikasi bakteri uji dilakukan melalui pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan setelah tahapan inokulasi bakteri pada media MHA, yang bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif.

Pada pewarnaan gram, hasil bakteri uji diperoleh berwarna merah muda dan berbentuk batang. Secara mikroskopis, bakteri *Pseudomonas* setelah diamati dibawah mikroskop memiliki bentuk batang dan berwarna merah muda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wajdi *et al.* (2017b) yang menjelaskan bahwa *Pseudomonas* berbentuk batang, motil dan berukuran  $0,6 \times 2 \mu m$ . Bakteri ini termasuk kedalam golongan gram negatif dan dapat muncul dalam bentuk tunggal, berpasangan atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek.

Jika dilihat dibawah mikroskop, bakteri gram negatif akan berwarna merah muda, karena kehilangan kompleks warna karbol gentian violet iodium dengan pembilasan alkohol, lalu terwarnai oleh pewarna tandingan air fuksin. Bakteri gram positif akan berwarna ungu, karena dapat menahan kompleks pewarna primer karbol gentian violet iodium sampai akhir prosedur pewarnaan (Ramadhan, 2015a).

Perbedaan reaksi kedua golongan bakteri tersebut terhadap pewarnaan gram disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel penyusun bakteri tersebut. Bakteri gram negatif memiliki lapisan ptiptidoglikan yang tipis, ketebalan peptidoglikan dinding sel bakteri gram negatif hanya 10% dari total komposisi dinding sel bakteri. Gram negatif berwarna merah muda, karena mengandung banyak lipid yang larut dalam alkohol pada saat pembilasan. Larutnya lipid memperbesar pori-pori dinding sel dan menyebabkan proses pemucatan berangsung cepat. Sedangkan gram positif memiliki dinding sel tebal yang akan menyusut pada saat pembilasan alkohol, sehingga pori-porinya menutup dan mencegah keluarnya kompleks pewarna primer pada saat pemucatan (Ramadhan, 2015b).



**Gambar 1.** *Pseudomonas* secara mikroskopis (perbesaran **100** kali)

- b. Uji Biokimia (*Triple Sugar Iron Agar*, *Sulfida Indole Motility* dan Katalase)

Hasil uji biokimia yang dilakukan dengan cara melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat, menghasilkan gas, memproduksi asam, menghasilkan indol, serta motilitasnya. Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat fisiologis koloni bakteri hasil isolasi. Proses metabolisme sel bakteri berhubungan dengan proses biokimia. Bakteri tidak dapat diidentifikasi dengan mengetahui morfologinya saja, tetapi sifat fisiologi bakteri juga harus diketahui. Sifat fisiologis sangat

penting untuk mengidentifikasi bakteri. Karakteristik morfologis bakteri tampak serupa atau bahkan tidak dapat dikenali. Sifat-sifat tersebut dapat ditentukan dengan uji biokimia pada koloni bakteri dan menentukan jeni bakteri. Tes biokimia dilakukan dengan reagen uji (Pakpahan *et al.*, 2013a).

Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuannya dalam mengurai dekstrosa, laktosa, sukrosa dan melepaskan sulfida. Uji TSIA juga dapat menentukan apakah bakteri menghasilkan gas atau tidak. Media yang digunakan terdiri dari dua bagian yaitu bagian miring disebut *slant* dan bagian belakang disebut *butt*. Adanya  $H_2S$  pada saat pembentukan gas terlihat dengan adanya gelembung pada medium atau medium yang naik keatas pipa (Parija, 2012). Hasil identifikasi *Pseudomonas* terlihat bahwa bagian *slant* berwarna merah dan bagian *butt* juga berwarna merah. Hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut tidak dapat memfermentasikan semua karbohidrat.

Uji *Sulfida Indole Motility* (SIM) terdiri atas tiga pengujian. Pengujian pertama adalah uji produksi sulfida atau  $H_2S$ . Hasil uji  $H_2S$  pada isolat bakteri menunjukkan fraksi yang kecil. Isolat bakteri dapat bereaksi dengan *Fe* membentuk warna hitam.  $FeS$  kehitaman tersebut disebabkan terbentuknya logam sulfida ( $H_2S +$ ), yaitu  $MZ - 3$ ,  $CS - 2$  dan  $CS - 4$ . Uji hidrogen sulfida ( $H_2S$ ) dilakukan untuk pengamatan kemampuan bakteri dalam proses metabolisme asam amino alanin dan  $H_2S$ , sementara itu isolat bakteri yang tidak dapat bereaksi dengan *Fe* membentuk  $FeS$ , diidentifikasi tanpa warna hitam (Lumantouw *et al.*, 2013a). *Pseudomonas* pada penelitian tidak berwarna hitam (negatif) yang berarti bakteri ini tidak dapat bereaksi dengan *Fe* untuk membentuk  $FeS$ . Pengujian kedua adalah uji indol. Uji indol menentukan apakah enzim *Tryptophanase* terdapat pada bakteri sehingga memungkinkan bakteri mengoksidasi asam amino triptofan membentuk indol. Kehadiran

indol dapat dideteksi dengan penambahan reagen *Ehrlich/Kovac* yang mengandung *paradimetilamina benzaldehida*. Hasil uji indol negatif (-), menunjukkan tidak adanya formasi merah seperti lapisan cincin pada permukaan biakan. Hasil positif (+) dilambangkan dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan kultur bakteri (Lumantouw *et al.*, 2013b). Pengujian ketiga adalah motilitas. Uji motilitas digunakan untuk menentukan gerakan bakteri. Hasil uji motilitas ditemukan negatif (-) apabila tempat tusukan berwarna putih lurus pada bekas tusukan. Hasil positif (+) bila pada bekas tusukan terdapat warna putih seperti akar menyebar. Uji motilitas ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diinokulasi memiliki flagella sehingga mereka dapat bergerak (Pakpahan *et al.*, 2013b). Pada penelitian terlihat bahwa uji motilitas negatif.

Uji katalase bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri memproduksi enzim katalase. Hasil uji katalase positif apabila terdapat gelembung udara setelah bakteri ditetesi larutan  $H_2O_2$  (katalase +) dan hasil negatif apabila tidak terdapat gelembung (Pakpahan *et al.*, 2013c).

## 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri *Pseudomonas* dibuat dengan cara biakan bakteri diambil menggunakan kawat ose. Kemudian disuspensikan dalam 5 ml NaCl 0,9% dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan sesuai standar *McFerland* 0,5 yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah suspensi.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar *Kirby-Bauer* dimaksudkan untuk mengetahui berapa besar zona bening yang terbentuk disekitar *paper disk* yang telah dicelupkan pada ekstrak daun bidara. Pada pengujian ini digunakan kontrol positif *clindamycin* dan kontrol negatif menggunakan aquades.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*. Hasil penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas

Halu Oleo dengan menggunakan 5 konsentrasi ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*).

Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat yang terbentuk yang ditandai dengan zona bening disekitar *paper disk*, dapat dilihat pada tabel berikut:

**Tabel 1.** Hasil Penelitian Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas*

No	Perlakuan	Waktu Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)		Rata-rata (mm)	Interpretasi
			P1	P2		
1	Konsentrasi 20%	1 × 24 jam	2,65	2,05	2,35	Resisten
2	Konsentrasi 40%	1 × 24 jam	4,1	2,6	3,35	Resisten
3	Konsentrasi 60%	1 × 24 jam	6,35	5,4	5,88	Resisten
4	Konsentrasi 80%	1 × 24 jam	6	5,95	5,98	Resisten
5	Konsentrasi 100%	1 × 24 jam	6,8	5,9	6,35	Resisten
6	Kontrol Positif ( <i>Clindamycin</i> )	1 × 24 jam	20,8	20,55	20,68	Sensitif
7	Kontrol Negatif (Aquades)	1 × 24 jam	-	-	-	Tidak ada

**Sumber:** (Data Primer, 2023)

Keterangan:

Resisten :  $\leq 12 \text{ mm}$  P1: Pengujian 1

Intermediate :  $13 - 14 \text{ mm}$  P2: Pengujian 2

Sensitif :  $\geq 15 \text{ mm}$

Berdasarkan tabel diatas, hasil penelitian uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Pseudomonas* yang dilakukan dengan dua kali pengujian pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dikategorikan memiliki respon daya hambat resisten. Kontrol positif yaitu

antibiotik *clindamycin* yang digunakan sebagai pembanding terhadap daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) memiliki respon daya hambat sensitif terhadap bakteri *Pseudomonas*.

Pengamatan hasil penelitian dilakukan dengan memperhatikan zona bening disekitar *paper disk* yang menunjukkan adanya daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas* yang dapat dilihat pada gambar berikut:



**Gambar 2.** Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*) Konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% serta kontrol positif dan Kontrol negatif Pengujian 1



**Gambar 3.** Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*) Konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% serta kontrol positif dan Kontrol negatif Pengujian 2

### 3. Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian tentang uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* dengan menggunakan 5 varian konsentrasi yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%, dimana masing-masing konsentrasi dilakukan dua kali pengujian dan menggunakan kontrol positif yaitu *clindamycin* dan kontrol negatif yaitu aquades.

Penggunaan kontrol positif dan kontrol negatif dalam penelitian ini yaitu sebagai pembanding untuk menentukan kemampuan ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*. Rata-rata hasil pengukuran zona hambat kontrol positif yaitu *clindamycin* dengan dua kali pengujian adalah 20,68 mm yang dikategorikan sensitif terhadap bakteri *Pseudomonas* yang menunjukkan bahwa *clindamycin* efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*. Sedangkan hasil pengukuran zona hambat pada kontrol negatif yaitu aquades dengan dua kali pengujian adalah tidak ada atau tidak terbentuk zona hambat, hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) memiliki daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas*, namun zona hambat yang terbentuk sangat kecil atau resisten dibandingkan dengan antibiotik *clindamycin*.

Hasil dari penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Haeria *et al.* (2018), tentang aktivitas antioksidan dan antibakteri dari ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Pseudomonas*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* dengan zona hambat sebesar 6,25 mm, yaitu kategori zona hambat resisten.

Pada konsentrasi 20% diperoleh rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 2,35 mm. Pada konsentrasi 40% diperoleh rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 3,35 mm. Pada konsentrasi 60% diperoleh

rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 5,88 mm. Pada konsentrasi 80% diperoleh rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 5,98 mm. Pada konsentrasi 100% diperoleh rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 6,35 mm disekitar *paper disk* setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 × 24 jam. Berdasarkan ketentuan CLSI (2021), bahwa zona hambat  $\geq 15$  mm dikategorikan respon daya hambat sensitif, zona hambat 13 – 14 mm dikategorikan respon daya hambat intermediate dan zona hambat  $\leq 12$  mm dikategorikan respon daya hambat resisten. Berdasarkan hasil penelitian, pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) memiliki daya hambat resisten dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*.

Adanya zona hambat pada ekstrak daun bidara, karena daun bidara mengandung zat-zat kimia seperti saponin, steroid dan flavonoid. Uji kandungan saponin ekstrak daun bidara yaitu senyawa glikosida kompleks yang terdiri dari senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan suatu senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non gula (aglikon). Saponin diidentifikasi dengan uji busa dan uji warna. Mengandung saponin jika adanya pembentukan busa stabil selama 30 detik, setelah simplisia tanaman dikocok dalam air yang menghasilkan ketinggian busa 1 – 3 cm dan penambahan asam klorida pekat pada tabung reaksi (Safrudin dan Nurfitasari, 2018). Uji kandungan steroid ekstrak daun bidara bersifat fisiologis dan bioaktivitas, yaitu berperan dalam pembentukan struktur membran, pembentukan hormon pertumbuhan serta pembentukan vitamin D sebagai antimikroba. Adanya perubahan warna menjadi hijau-biru menandakan adanya kandungan steroid (Alydrus *et al.*, 2023). Uji kandungan flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi dengan cara mentransfer senyawa elektron pada senyawa radikal bebas, sehingga senyawa radikal bebas menjadi stabil dan tidak terjadi reaksi oksidasi. Uji kandungan

flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna filtrat menjadi jingga hingga merah dan muncul sedikit busa (Mauludiyah *et al.*, 2020).

Menurut Hastiana *et al.* (2022), senyawa tertinggi yang terkandung pada daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) adalah senyawa saponin dengan presentase kadar 5,3507%, steroid dengan presentase kadar 3,494% dan flavonoid memiliki presentase kadar 1,5312%. Setiawati (2023), ekstrak daun bidara mengandung senyawa flavonoid sebesar 136,62 *mgQE/g* ekstrak dan mengandung senyawa saponin sebesar 1128,6 *mgQE/g* ekstrak yang berarti berkaitan dengan antifertilitas. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa saponin merupakan senyawa tertinggi yang terkandung dalam ekstrak daun bidara.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi diameter zona hambat bakteri yaitu temperatur inkubasi, ketebalan media agar, terjadinya kontaminasi pada saat pembuatan media dan pemberian *paper disk* dan juga ruangan laboratorium yang tidak steril. Suhu inkubasi yang ideal untuk memperoleh pertumbuhan bakteri yang optimal adalah 37°C. Inkubasi pada suhu yang tidak tepat dapat menyebabkan difusi kurang baik. Pada penelitian ini suhu ruangan tidak stabil.

Ketebalan media agar juga menjadi salah satu faktor yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Ketebalan media agar yang paling efektif adalah sekitar 4 *mm*. Jika ketebalan media agar lebih dari 4 *mm* maka difusi ekstrak menjadi lebih lambat, sedangkan jika ketebalan kurang dari 4 *mm* maka difusi ekstrak menjadi lebih cepat.