

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Daun sirih hijau diidentifikasi dengan menggunakan seluruh bagian tanaman untuk memastikan keakuratan identitas tanaman serta menghindari pencampuran dengan bahan tanaman lain selama proses pengumpulan. Proses determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta pada tanggal 21 Maret 2025. Tanaman yang dimanfaatkan dalam penelitian ini merupakan daun sirih hijau dengan nama ilmiah *Piper betle* Linn. Hasil identifikasi ditunjukkan pada **Lampiran 2**.

2. Pembuatan Infusa

Hasil pembuatan infusa daun sirih hijau menunjukkan bahwa dari 50 gram sampel daun sirih muda yang direbus dalam 100 mL akuades, diperoleh volume akhir infusa sebesar 20 mL, sedangkan pada sampel daun sirih tua diperoleh volume akhir infusa sebesar 30 mL. Hasil infusa dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Hasil Infusa Daun Sirih Tua (A) dan Daun Sirih Muda (B)

3. Uji Organoleptik

Hasil uji organoleptik infusa daun sirih hijau dapat dilihat pada **Tabel 3**. Berdasarkan hasil tersebut, yang membedakan antara hasil infusa daun sirih muda dan daun sirih tua yaitu pada warna infusa yang dihasilkan.

Tabel 3. Uji Organoleptik Infusa Daun Sirih Hijau

Pengamatan	Daun muda	Daun tua	
	Bentuk	Cair	
Organoleptik	Warna	Hijau kekuningan	Cokelat kekuningan
	Bau	Aroma khas sirih	Aroma khas sirih
	Rasa	Pahit	Pahit

4. Skrining Fitokimia

Dilakukan skrining fitokimia sebagai upaya identifikasi senyawa aktif dalam infusa daun sirih muda dan tua. Data hasil skrining fitokimia disajikan pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Uji Skrining Fitokimia

Uji Senyawa	Pereaksi / Reagen	Literatur (Kiko <i>et al.</i> , 2023)	Hasil uji pada sampel	
			Daun muda	Daun tua
Flavonoid	Serbuk magnesium + HCl pekat	Warna merah, kuning, jingga	(+) Terbentuk warna jingga	(+) Terbentuk warna jingga
Saponin	Akuades panas + HCl	Terbentuk busa	(+) Terbentuk busa	(+) Terbentuk busa
Tanin	FeCl ₃ 1 %	Warna hijau kehitaman	(+) Terbentuk warna hijau kehitaman	(+) Terbentuk warna hijau kehitaman
Triterpenoid & steroid	Asam asetat anhidrat + asam sulfat pekat	Warna merah atau ungu dan hijau atau biru	(+) Terbentuk warna ungu	(+) Terbentuk warna ungu
	Mayer	Endapan putih kekuningan	(+) Terbentuk endapan putih	(+) Terbentuk endapan putih
Alkaloid	Dragendrof	Endapan merah jingga	(+) Terbentuk endapan jingga	(+) Terbentuk endapan jingga
	Wagner	Endapan coklat	(-) Tidak terbentuk endapan coklat	(-) Tidak terbentuk endapan coklat

Keterangan :

(+) : Mengandung senyawa uji

(-) : Tidak mengandung senyawa uji

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih muda dan tua terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair dan padat, dengan variasi konsentrasi 1,56%, 3,25%, 6,12%, 12,5%, 25%, dan 50%. Pengamatan terhadap Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan

melihat tingkat kejernihan dan kekeruhan larutan uji. Larutan yang tampak jernih menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri berhasil terhambat, sedangkan larutan yang keruh menunjukkan masih terdapat adanya pertumbuhan bakteri.

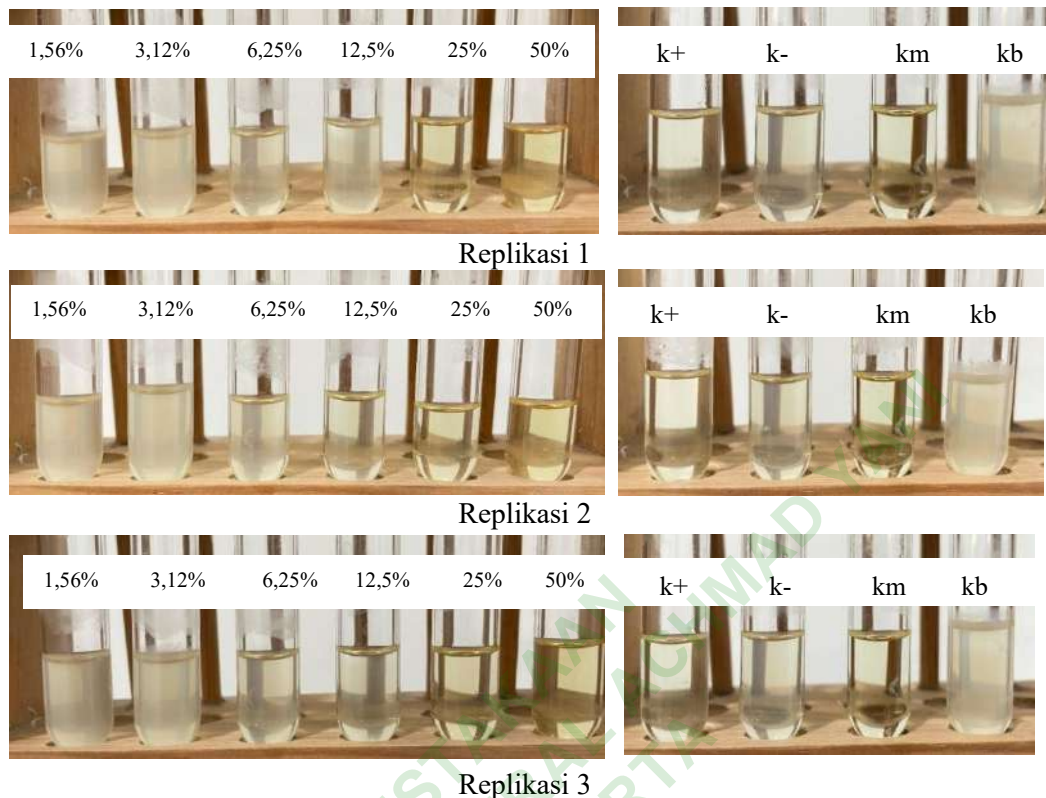
Data pengamatan memperlihatkan bahwa infusa daun sirih muda mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan melalui kejernihan larutan pada konsentrasi tertentu. Data KHM yang disajikan pada **Tabel 5** menggambarkan bahwa pada konsentrasi 25% dan 50% larutan tetap jernih pada seluruh replikasi. Sementara itu, pada konsentrasi 1,56% hingga 12,5% larutan tampak keruh yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Visualisasi data tersebut dapat dilihat pada **Gambar 6**. Hasil pengujian KHM terhadap infusa daun sirih muda menunjukkan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji adalah 25% yang ditunjukkan oleh kejernihan larutan uji pada seluruh replikasi.

Tabel 5. Hasil KHM Infusa Daun Sirih Muda

No	Perlakuan	Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni Bakteri		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
1	50%	Jernih	Jernih	Jernih
2	25%	Jernih	Jernih	Jernih
3	12,5%	Keruh	Keruh	Keruh
4	6,25%	Keruh	Keruh	Keruh
5	3,12%	Keruh	Keruh	Keruh
6	1,56%	Keruh	Keruh	Keruh
7	K+	Jernih	Jernih	Jernih
8	K-	Jernih	Jernih	Jernih
9	Km	Jernih	Jernih	Jernih
10	Kb	Keruh	Keruh	Keruh

Keterangan:

- 1,56% = Konsentrasi infusa 1,56%
- 3,12% = Konsentrasi infusa 3,12%
- 6,25% = Konsentrasi infusa 6,25%
- 12,5% = Konsentrasi infusa 12,5%
- 25% = Konsentrasi infusa 25%
- 50% = Konsentrasi infusa 50%
- K+ = Kontrol positif (antibiotik kloramfenikol 0,0083%)
- K- = Kontrol negatif (pelarut akuades)
- Km = Kontrol media (*Nutrient Broth*)
- Kb = Kontrol bakteri (*Staphylococcus aureus*)



Gambar 6. Hasil KHM Infusa Daun Sirih Muda Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

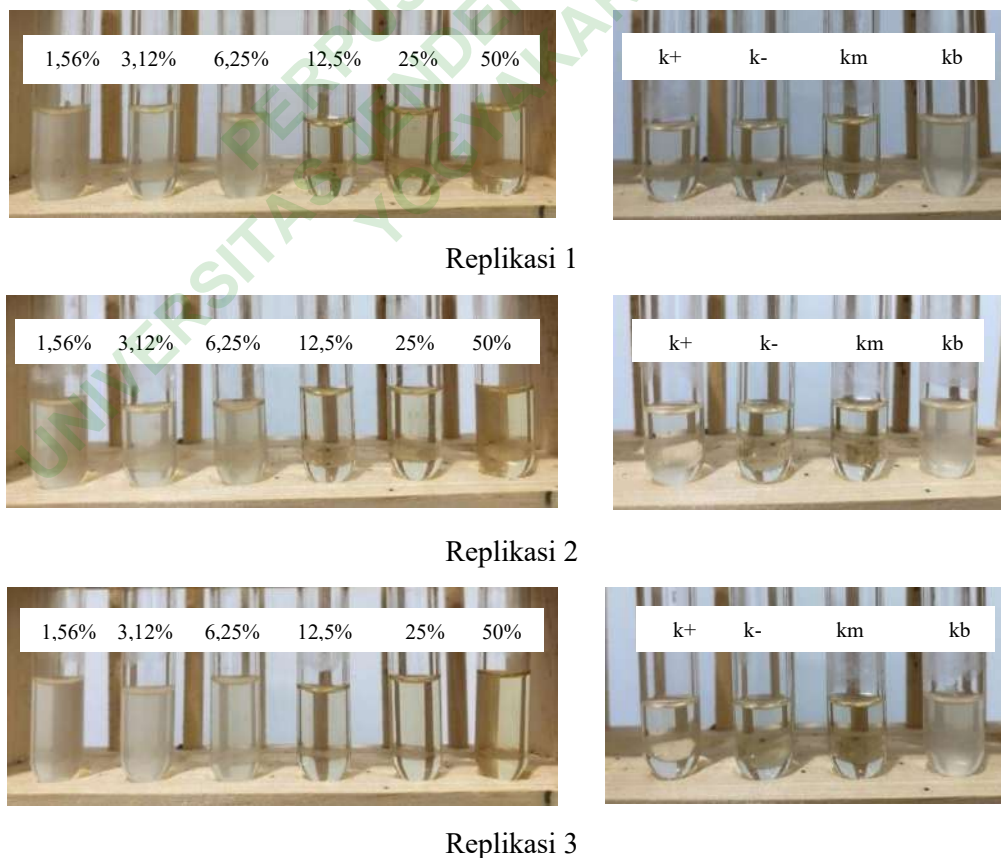
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa infusa daun sirih tua mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan melalui kejernihan larutan pada konsentrasi tertentu. Data KHM yang disajikan pada **Tabel 6** menggambarkan bahwa pada konsentrasi 12,5% hingga 50% larutan tetap jernih pada seluruh replikasi. Sementara itu, pada konsentrasi 1,56% hingga 6,25% larutan tampak keruh yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Visualisasi data tersebut terlihat pada **Gambar 7**. Hasil pengujian KHM terhadap infusa daun sirih tua menunjukkan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji adalah 12,5% yang ditunjukkan dengan kejernihan larutan uji pada seluruh replikasi.

Tabel 6. Hasil KHM Infusa Daun Sirih Tua

No	Perlakuan	Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni Bakteri		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
1	50%	Jernih	Jernih	Jernih
2	25%	Jernih	Jernih	Jernih
3	12,5%	Jernih	Jernih	Jernih
4	6,25%	Keruh	Keruh	Keruh
5	3,12%	Keruh	Keruh	Keruh
6	1,56%	Keruh	Keruh	Keruh
7	K+	Jernih	Jernih	Jernih
8	K-	Jernih	Jernih	Jernih
9	Km	Jernih	Jernih	Jernih
10	Kb	Keruh	Keruh	Keruh

Keterangan:

- 1,56% = Konsentrasi infusa 1,56%
 3,12% = Konsentrasi infusa 3,12%
 6,25% = Konsentrasi infusa 6,25%
 12,5% = Konsentrasi infusa 12,5%
 25% = Konsentrasi infusa 25%
 50% = Konsentrasi infusa 50%
 K+ = Kontrol positif (antibiotik kloramfenikol 0,0083%)
 K- = Kontrol negatif (pelarut akuades)
 Km = Kontrol media (*Nutrient Broth*)
 Kb = Kontrol bakteri (*Staphylococcus aureus*)

Gambar 7. Hasil KHM Infusa Daun Sirih Tua Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Setelah mengetahui nilai KHM, selanjutnya dilakukan pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan mengamati media agar setelah inkubasi untuk memastikan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Konsentrasi paling rendah yang menandakan tidak adanya pertumbuhan dianggap sebagai KBM.

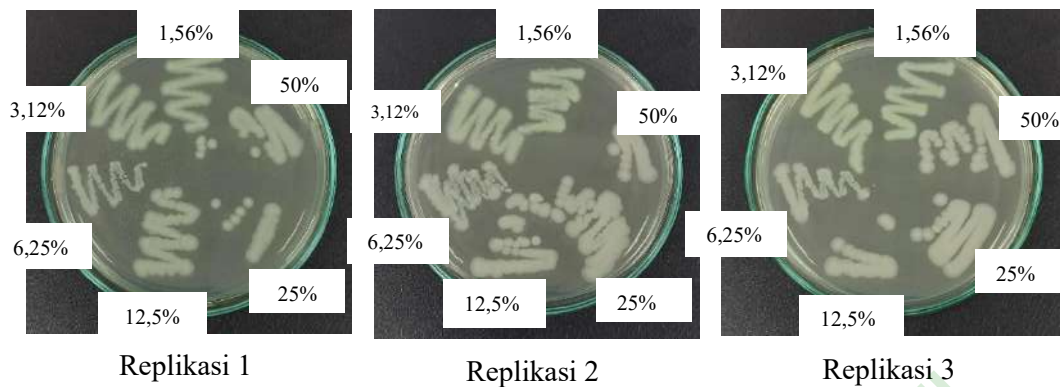
Data pengujian KBM infusa daun sirih muda terhadap *Staphylococcus aureus* disajikan pada **Tabel 7**. Berdasarkan data pengamatan, koloni bakteri masih terlihat tumbuh pada seluruh konsentrasi yang diuji. Hal tersebut menandakan bahwa infusa daun sirih muda belum bisa membunuh bakteri. Visualisasi hasil pengamatan ditampilkan pada **Gambar 8** yang memperlihatkan adanya pertumbuhan koloni pada semua perlakuan. Dengan demikian, KBM dari infusa daun sirih muda terhadap *Staphylococcus aureus* tidak dapat ditentukan dalam pengujian ini.

Tabel 7. Hasil KBM Infusa Daun Sirih Muda

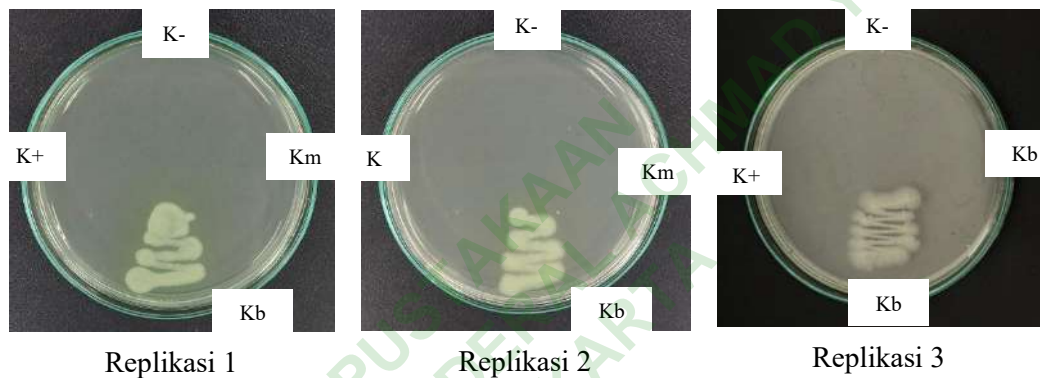
No	Perlakuan	Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni Bakteri		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
1	50%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
2	25%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
3	12,5%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
4	6,25%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
5	3,12%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
6	1,56%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
7	K+	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
8	K-	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
9	Km	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
10	Kb	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh

Keterangan:

- 1,56% = Konsentrasi infusa 1,56%
- 3,12% = Konsentrasi infusa 3,12%
- 6,25% = Konsentrasi infusa 6,25%
- 12,5% = Konsentrasi infusa 12,5%
- 25% = Konsentrasi infusa 25%
- 50% = Konsentrasi infusa 50%
- K+ = Kontrol positif (antibiotik kloramfenikol 0,0083%)
- K- = Kontrol negatif (pelarut akuades)
- Km = Kontrol media (*Nutrient Broth*)
- Kb = Kontrol bakteri (*Staphylococcus aureus*)



Gambar 8. Hasil KBM Infusa Daun Sirih Muda Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 9. Hasil KBM Kontrol Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

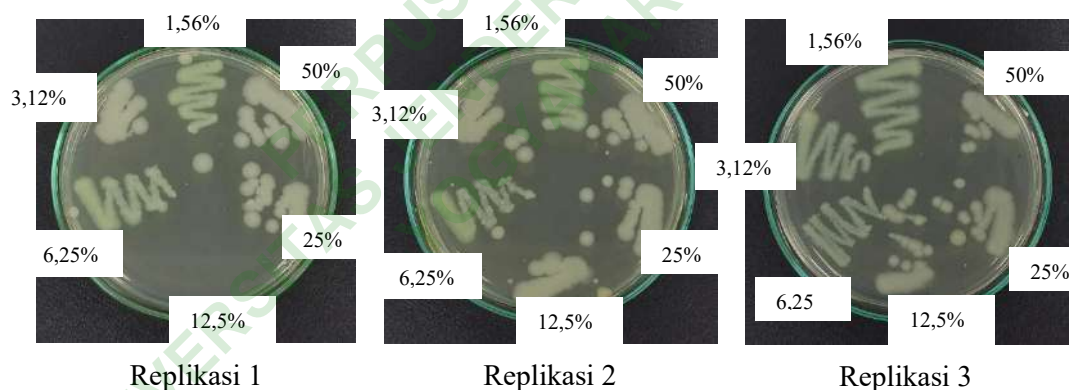
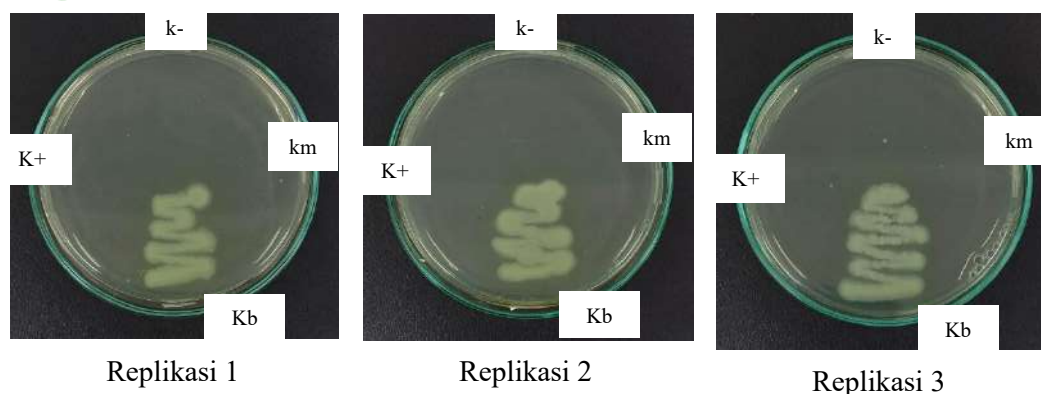
Data pengujian KBM infusa daun sirih tua terhadap *Staphylococcus aureus* disajikan pada **Tabel 8**. Berdasarkan data pengamatan, diketahui bahwa pada replikasi pertama konsentrasi 12,5% menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri. Namun, pada replikasi kedua dan ketiga koloni bakteri masih ditemukan pada seluruh konsentrasi uji. Dengan demikian, KBM infusa daun sirih tua tidak dapat ditentukan karena hasil antar replikasi tidak konsisten. Hal tersebut menandakan bahwa infusa daun sirih tua belum bisa membunuh bakteri. Visualisasi hasil pengamatan disajikan pada **Gambar 10** yang memperlihatkan adanya pertumbuhan koloni pada semua perlakuan. Dengan demikian, KBM dari infusa daun sirih tua terhadap *Staphylococcus aureus* tidak dapat ditentukan dalam pengujian ini.

Tabel 8. Hasil KBM Infusa Daun Sirih Tua

No	Perlakuan	Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni Bakteri		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
1	50%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
2	25%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
3	12,5%	Tidak tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
4	6,25%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
5	3,12%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
6	1,56%	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
7	K+	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
8	K-	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
9	Km	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
10	Kb	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh

Keterangan:

- 1,56% = Konsentrasi infusa 1,56%
 3,12% = Konsentrasi infusa 3,12%
 6,25% = Konsentrasi infusa 6,25%
 12,5% = Konsentrasi infusa 12,5%
 25% = Konsentrasi infusa 25%
 50% = Konsentrasi infusa 50%
 K+ = Kontrol positif (antibiotik kloramfenikol 0,0083%)
 K- = Kontrol negatif (pelarut akuades)
 Km = Kontrol media (*Nutrient Broth*)
 Kb = Kontrol bakteri (*Staphylococcus aureus*)

Gambar 10. Hasil KBM Infusa Daun Sirih Tua Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*Gambar 11. Hasil KBM Kontrol Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

B. Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan daun sirih hijau muda dan tua yang diperoleh dari Dusun Ngireng-ireng, Desa Sidomulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Daun sirih yang digunakan adalah daun segar yang telah melalui proses determinasi di Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar merupakan daun sirih hijau dengan nama latin *Piper betle* Linn. Dipilih daun sirih muda dan daun sirih tua sebagai sampel karena keduanya memiliki perbedaan umur dan sifat yang cukup jelas. Perbedaan umur daun ini menyebabkan kandungan zat di dalamnya juga berbeda. Daun tua umumnya mengandung minyak atsiri dan senyawa aktif lain yang lebih banyak dibandingkan daun muda. Senyawa-senyawa ini penting karena berpengaruh pada manfaat daun sirih, seperti kemampuan melawan bakteri (Mulangsri, 2018).

Proses ekstraksi senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih menggunakan metode infusa, karena metode ini sederhana, cepat, serta efektif dalam mengekstraksi senyawa aktif yang bersifat polar. Selain itu, metode ini juga lebih praktis dibandingkan metode maserasi yang membutuhkan waktu lebih lama, bahkan hingga beberapa hari (Hasanah *et al.*, 2023). Infusa yang dihasilkan selanjutnya dilakukan uji organoleptik. Uji organoleptik dilakukan guna mengamati karakteristik fisik larutan sampel, meliputi bentuk, warna, aroma, dan rasa. Pengamatan menunjukkan bahwa infusa daun sirih muda berwarna hijau kekuningan dengan aroma khas yang lebih ringan, sedangkan infusa daun sirih tua berwarna coklat kekuningan dengan aroma yang lebih kuat. Perbedaan karakteristik ini menunjukkan adanya variasi komposisi senyawa aktif antara daun muda dan daun tua (Nori *et al.*, 2021). Hasil infusa daun sirih menunjukkan volume yang berbeda, yaitu 20 mL pada daun muda dan 30 mL pada daun tua. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan struktur jaringan daun. Daun tua yang memiliki jaringan lebih keras cenderung melepaskan lebih banyak cairan saat proses penyaringan. Sementara itu, daun muda yang lebih lunak mudah menyerap kembali pelarut atau hancur saat perebusan, sehingga menghasilkan volume infusa yang lebih sedikit (Kiko *et al.*, 2023).

Infusa daun sirih muda dan tua yang telah dihasilkan selanjutnya diuji skrining fitokimia untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam infusa. Pengujian dilakukan secara kualitatif terhadap lima jenis senyawa, yaitu tanin, triterpenoid/steroid, flavonoid, saponin serta alkaloid. Hasil pengujian yang tersaji dalam **Tabel 4** menunjukkan bahwa infusa daun sirih muda dan tua mengandung senyawa saponin, triterpenoid, flavonoid, tanin serta alkaloid. Sampel menunjukkan hasil positif terhadap senyawa flavonoid, yang ditandai oleh munculnya warna jingga. Hal tersebut disebabkan oleh reaksi antara flavonoid menggunakan magnesium (Mg) serta asam klorida pekat (HCl) yang membentuk garam flavylum (Kurniawan *et al.*, 2021). Kandungan flavonoid pada sampel infusa daun sirih muda dan tua menunjukkan hasil positif. Hasil tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Hamzah *et al.*, (2021) dan Wahyuni *et al.*, (2024) yang menunjukkan bahwa daun sirih hijau memiliki kandungan flavonoid.

Uji terhadap senyawa saponin, hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil. Hal ini terjadi karena keberadaan glikosida yang dapat menghasilkan busa di dalam air dan selanjutnya terhidrolisis menjadi glukosa serta senyawa aglikon (Adiningsih *et al.*, 2021). Kandungan saponin pada sampel infusa daun sirih muda dan tua menunjukkan hasil positif. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Marfu'ah *et al.*, (2021) dan Putri *et al.*, (2023) yang menunjukkan bahwa daun sirih mengandung senyawa saponin. Selanjutnya, pengujian terhadap senyawa tanin menunjukkan hasil yang positif, ditandai dengan munculnya warna hijau kehitaman. Reaksi ini terjadi akibat interaksi antara senyawa tanin dengan ion Fe^{3+} (Rukmini *et al.*, 2020). Kandungan tanin pada sampel infusa daun sirih muda dan tua menunjukkan hasil positif. Data ini didukung oleh kajian yang dilakukan oleh Wahyuni *et al.*, (2024) dan Putri *et al.*, (2023) yang menunjukkan hasil positif mengandung senyawa tanin pada daun sirih. Selain itu, pengujian terhadap senyawa terpenoid menandakan hasil positif yang ditandai oleh terjadinya perubahan warna ungu. Warna ini muncul karena kemampuan senyawa triterpenoid bereaksi menggunakan campuran asam sulfat pekat (H_2SO_4) dan asam asetat anhidrat (Rasydy *et al.*, 2019). Kandungan triterpenoid pada sampel daun sirih hijau muda dan tua menunjukkan hasil positif. Temuan ini didukung oleh

penelitian Tjitraesmi *et al.*, (2020) dan Zaneta & Ferdinal (2023) yang menyatakan adanya kandungan triterpenoid positif di daun sirih hijau.

Pengujian terakhir dalam skrining fitokimia adalah uji terhadap senyawa alkaloid yang dilakukan menggunakan tiga macam reagen, yakni reagen Mayer, Dragendorff, serta Wagner. Hasil menunjukkan positif alkaloid dengan penambahan reagen Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Hal ini disebabkan oleh reaksi yang melibatkan atom nitrogen dalam struktur alkaloid bereaksi dengan ion kalium tetraiodomercurat (II) sehingga menghasilkan endapan kompleks kalium-alkaloid. Pengujian dengan penambahan reagen Dragendorff menunjukkan hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga, akibat terbentuknya kompleks antara alkaloid dan ion logam dalam senyawa kalium tetraiodobismutat (III) melalui ikatan kovalen koordinasi, menghasilkan ion kompleks $[BiI_4]^-$. Namun, pada penambahan reagen Wagner tidak ditemukan hasil positif alkaloid. Hal tersebut disebabkan oleh sejumlah faktor, termasuk kadar alkaloid pada sampel sirih yang diuji terlalu rendah atau bahkan tidak ada, sehingga tidak cukup untuk bereaksi dengan reagen Wagner (Khafid *et al.*, 2023). Suatu sampel dianggap mengandung alkaloid apabila menunjukkan reaksi positif minimal dua dari tiga reagen tersebut (Wahyuni & Marpaung, 2020). Sehingga pada hasil uji alkaloid infusa daun sirih muda dan tua dapat dikatakan positif mengandung alkaloid. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Khafid *et al.*, (2023) yang menyatakan bahwa infusa daun sirih positif mengandung senyawa alkaloid. Hasil skrining fitokimia didukung oleh temuan dari penelitian oleh Marfu'ah *et al.*, (2021) dan Kiko *et al.*, (2023) menunjukkan bahwa daun sirih hijau memiliki kandungan senyawa tanin, alkaloid, flavonoid, saponin dan triterpenoid.

Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Oleh karena itu, dilakukan pengujian antibakteri untuk mengidentifikasi kemampuan infusa daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sebelum melakukan pengujian antibakteri, seluruh peralatan dan bahan terlebih dahulu disterilkan guna mencegah terjadinya kontaminasi. Proses sterilisasi bertujuan untuk membunuh dan menghilangkan seluruh mikroorganisme yang ada pada alat maupun bahan yang digunakan (Wulandari *et al.*, 2022). Metode dilusi digunakan

untuk pengujian antibakteri karena dianggap lebih sensitif dan akurat dibandingkan metode difusi. Pada metode ini, bahan uji dicampurkan secara merata dengan suspensi bakteri sehingga interaksi antara keduanya dapat berlangsung secara optimal (Munira & Nasir, 2023). Untuk mengamati kemampuan infusa daun sirih muda dan tua dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, sampel diuji pada berbagai konsentrasi, yaitu 1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%. Penggunaan variasi konsentrasi ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi minimum yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara efektif. Selain itu, beberapa kontrol digunakan sebagai pembanding, meliputi kontrol positif (antibiotik kloramfenikol), kontrol negatif (akuades steril), kontrol media (media tanpa bahan uji maupun bakteri), serta kontrol bakteri (media dengan suspensi bakteri). Pengujian dilakukan dengan tiga pengulangan agar hasil yang didapat lebih akurat.

Berdasarkan hasil penelitian, pengujian terhadap infusa daun sirih muda diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi 1,56% hingga 12,5%, larutan menunjukkan kekeruhan yang menandakan masih adanya pertumbuhan bakteri. Sementara itu, pada konsentrasi 25% hingga 50% larutan terlihat jernih yang menandakan tidak terjadi pertumbuhan bakteri. Dengan demikian, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada infusa daun sirih muda adalah pada konsentrasi 25%. Sementara itu, infusa daun sirih tua menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1,56% hingga 6,25% larutan masih keruh, sedangkan pada konsentrasi 12,5% hingga 50% larutan jernih. Hal tersebut memperlihatkan bahwa konsentrasi 12,5% merupakan konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Tahap selanjutnya yaitu menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). KBM merujuk pada tingkat konsentrasi minimal dari agen antibakteri yang dapat mematikan 99,9% populasi bakteri awal, yang ditandai dengan tidak adanya perkembangan koloni bakteri dalam media agar setelah proses inkubasi (Sari *et al.*, 2013). Data hasil uji KBM infusa daun sirih muda yang ditampilkan pada **Tabel 7 dan Gambar 8** menunjukkan bahwa seluruh media yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi infusa masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, tidak dapat ditentukan nilai KBM untuk sampel daun sirih muda.

Sementara itu, hasil pengujian KBM untuk sampel daun sirih tua yang disajikan dalam **Tabel 8 dan Gambar 10** terlihat bahwa pada replikasi pertama, bakteri tidak tumbuh pada konsentrasi 12,5%, sedangkan pada konsentrasi lain masih terlihat pertumbuhan bakteri. Berbeda dengan replikasi kedua dan ketiga, di mana bakteri tetap tumbuh di semua konsentrasi. Perbedaan hasil antar replikasi kemungkinan disebabkan oleh faktor teknis selama proses pengujian dan kondisi lingkungan. Beberapa faktor yang dapat memengaruhi hasil replikasi antara lain teknik penggoresan yang tidak konsisten, potensi kontaminasi pada media atau alat yang digunakan. Selain itu, kesalahan manusia (*human error*) dalam pengambilan sampel, pengenceran, atau inokulasi juga dapat menyebabkan ketidaksesuaian hasil antar replikasi (Pelealu *et al.*, 2021). Karena hasil pada replikasi pertama tidak sesuai atau tidak konsisten dengan dua replikasi lainnya, maka konsentrasi 12,5% belum bisa ditetapkan sebagai KBM. Penentuan KBM harus berdasarkan hasil yang menandakan ketiadaan pertumbuhan bakteri pada tingkat konsentrasi tertentu di semua replikasi secara konsisten.

Dalam uji aktivitas antibakteri, digunakan kontrol media dan kontrol bakteri guna untuk memastikan hasil yang diperoleh benar-benar akurat. Kontrol media adalah media pertumbuhan yang tidak ditambahkan bakteri maupun sampel uji. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa media dalam keadaan steril dan tidak terkontaminasi. Jika terdapat pertumbuhan bakteri pada kontrol media, maka hal tersebut menandakan media terkontaminasi dan hasil uji tidak akurat. Sementara itu, kontrol bakteri berisi media dan suspensi bakteri tanpa penambahan sampel uji. Kontrol ini digunakan untuk melihat pertumbuhan alami bakteri tanpa efek senyawa antibakteri. Pengamatan terhadap pertumbuhan pada kontrol bakteri, dapat dibandingkan apakah senyawa uji benar-benar mampu menghambat pertumbuhan bakteri atau tidak (Sulistiyani, 2011).

Dalam penelitian ini, antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif. Antibiotik kloramfenikol digunakan karena mempunyai aktivitas antibakteri spektrum luas sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Kloramfenikol bekerja melalui mekanisme menghalangi sintesis protein mikroba (Dwicahyani *et al.*, 2018). Sedangkan

pemilihan akuades sebagai kontrol negatif karena akuades berfungsi sebagai pelarut dalam penelitian ini. Penggunaan akuades digunakan sebagai kontrol negatif bertujuan untuk memastikan bahwa efek antibakteri yang diamati tidak disebabkan oleh pelarut melainkan oleh senyawa aktif dalam sampel uji.

Mikroorganisme uji yang digunakan berupa *Staphylococcus aureus* s, yang merupakan jenis bakteri Gram positif. Perbedaan karakteristik sensitivitas bakteri terhadap antibakteri sangat dipengaruhi oleh struktur dinding sel. Bakteri Gram positif ditandai dengan dinding sel yang relatif lebih sederhana, tersusun sekitar 90% dari lapisan peptidoglikan, sehingga senyawa antibakteri lebih mudah menembus masuk. Sementara itu, Bakteri Gram negatif ditandai oleh struktur dinding sel yang berlapis-lapis serta mengandung lipid lebih tinggi (11–12%), sehingga cenderung lebih resisten terhadap agen kimia maupun antibakteri (Lingga et al., 2016).

Hasil penelitian menandakan bahwa infusa daun sirih tua memiliki efektivitas lebih tinggi dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan infusa daun sirih muda. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kandungan senyawa aktif antara daun sirih tua dan muda. ktivitas antibakteri daun sirih hijau berasal dari senyawa aktif yang mampu menekan dan mematikan pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa senyawa aktif dalam infusa daun sirih hijau yang berperan sebagai antibakteri meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Senyawa-senyawa ini bekerja melalui berbagai mekanisme, seperti enghambat pembentukan dinding sel, merusak permeabilitas membran, mengganggu metabolisme dan sintesis protein, serta merusak asam nukleat bakteri (Sadiah et al., 2022).

Senyawa aktif tersebut bekerja melalui mekanisme yang berbeda dalam aktivitas menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri. Flavonoid bekerja dengan cara mengganggu dinding sel bakteri melalui pembentukan kompleks bersama protein ekstraseluler serta menurunkan motilitas bakteri. Gugus alkohol dalam flavonoid dapat bereaksi dengan lemak dan asam amino penyusun dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan senyawa ini masuk ke dalam inti sel dan bereaksi dengan DNA, yang akhirnya menyebabkan lisis (Sadiah et al., 2022).

Selanjutnya, Saponin bekerja melalui proses denaturasi protein dan merusak membran sel bakteri karena sifatnya yang mirip deterjen, sehingga menurunkan tegangan permukaan dan mengakibatkan kebocoran sitoplasma yang menyebabkan kerusakan internal pada sel berujung pada kematian sel (Putri *et al.*, 2023). Sementara itu, alkaloid menghambat sintesis peptidoglikan yang penting bagi kekuatan dinding sel bakteri, menyebabkan dinding sel menjadi kaku dan tidak dapat bertahan di lingkungan hipotonis (Sadiah *et al.*, 2022). Kemudian, terpenoid merusak membran melalui interaksi dengan protein porin pada dinding sel bakteri, sehingga mengurangi permeabilitas dan menghambat nutrisi masuk ke dalam sel (Wulansari *et al.*, 2020). Adapun tanin bekerja dengan menghambat enzim ekstraseluler dan Menyerang polipeptida dinding sel, yang berakibat pada rusaknya struktur bakteri (Sadiah *et al.*, 2022).

Hasil studi menunjukkan bahwa infusa daun sirih tua lebih efektif dalam mencegah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan daun sirih muda. Hal ini ditunjukkan dengan hasil uji KHM, dimana infusa daun sirih tua Pada konsentrasi 12,5%, bakteri sudah mengalami penghambatan pertumbuhan, sedangkan infusa daun sirih muda memerlukan konsentrasi yang lebih besar yaitu 25% untuk menghasilkan efek yang sama. Temuan tersebut mendukung hasil studi Mulangri (2018) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau tua menghasilkan zona hambat lebih besar dibandingkan dengan daun sirih muda. Hasil tersebut mendukung bahwa daun sirih tua mengandung konsentrasi senyawa aktif yang lebih tinggi, sehingga memiliki daya antibakteri yang lebih kuat terhadap *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini juga didukung oleh Kapondo *et al.*, (2020) yang melaporkan bahwa Ekstrak etanol daun sirih efektif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dengan konsentrasi KHM sebesar 10%. menggunakan metode dilusi cair. Meskipun nilai KHM yang diperoleh sedikit lebih rendah, perbedaan jenis bakteri dan metode ekstraksi dapat memengaruhi hasil tersebut. *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* sama-sama merupakan bakteri Gram positif, tetapi bisa saja memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap senyawa antibakteri. Selain itu, penggunaan pelarut etanol cenderung menghasilkan ekstrak dengan konsentrasi senyawa aktif yang lebih tinggi

dibandingkan dengan metode ekstraksi infusa dengan menggunakan pelarut air, sehingga efektivitas antibakteri yang dihasilkan dapat lebih kuat. Dengan demikian, meskipun terdapat variasi dalam hasil yang diperoleh, secara umum data hasil penelitian ini, dapat disimpulkan sesuai dengan studi sebelumnya, bahwa daun sirih hijau tua memiliki potensi antibakteri alami yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun muda.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA