

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kekayaan alam hayati beraneka ragam dengan luas hutan tropika 143 juta ha yang menempati urutan ke-3 terbesar di dunia setelah Brasil dan Zaira. Diperkirakan kurang lebih 30.000 spesies tumbuhan ditemukan didalamnya dan kurang lebih 1.260 spesies diantaranya berkhasiat obat.(1)

Tren kembali ke alam (*back to nature*) menjadi pilihan pengobatan berbagai penyakit, terutama penyakit degeneratif. Herbal merupakan suatu pengobatan alami dengan memanfaatkan tanaman yang berkhasiat obat. Cara ini relatif murah karena bahan untuk membuatnya bisa diperoleh di lingkungan sekitar atau menanam sendiri. Sekarang juga tersedia depot khusus yang menjual tanaman obat sekaligus ramuannya. Dibandingkan dengan pengobatan kimia, pengobatan dengan tanaman obat tidak menimbulkan efek samping dan aman dikonsumsi asalkan mengikuti petunjuk pemakaian atau ahlinya.(2)

Salah satu tanaman yang berkhasiat obat yaitu daun sirih (*Piper betle*, Linn).(3) Daun sirih memiliki banyak kandungan kimia. Salah satunya yaitu tanin yang terdapat dalam daun dan berfungsi sebagai *astringent*, penekan kekebalan tubuh, pelindung lever, antidiare, dan antimutagenik.(4)

Daun sirih salah satu tumbuhan yang daunnya banyak digunakan orang tua di desa maupun dikota sebagai nginang (di Jawa) yaitu mengunyah daun sirih ditambah racikan gambir, kapur putih, dan buah pinang muda. Tradisi nginang

atau menyirih ini dilakukan karena masyarakat zaman dahulu sudah mengetahui khasiat dari daun sirih yang dapat mengobati beberapa penyakit.(5)

Sirih merupakan tanaman yang tumbuh memanjat pada tanaman lain. Tingginya dapat mencapai antara 5 m sampai 15 m. Batangnya berwarna hijau kecokelatan. Daunnya berbentuk bundar telur atau bundar telur lonjong. Warna daun bagian permukaan yaitu hijau. Bunganya berbentuk bulir. Baunya cukup aromatik dan rasanya pedas.(3)

Bagian tanaman sirih yang berkhasiat adalah daunnya. Salah satu khasiat daun sirih yaitu untuk mengobati diare yang disebabkan oleh bakteri, virus, atau parasit. Virus penyebab diare meliputi *Rotavirus*, dan *Norwalk*. Parasit penyebab diare meliputi *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, dan *Giardia lamblia*. Bakteri penyebab diare meliputi *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella*, dan *Salmonella*.(6)

UNICEF dan WHO memperkirakan 2,5 miliar kasus diare terjadi pada anak balita setiap tahun. Penyakit diare di Indonesia merupakan penyebab utama kematian bayi usia 1-12 bulan (42%) dan anak-anak hingga usia 4 tahun (25%), Bayi yang tidak mendapatkan Air Susu Ibu (ASI) dinyatakan lebih beresiko kehilangan nyawa akibat diare di usia 2 bulan pertama.(7)

Menurut Anang Hermawan didalam penelitiannya yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*P. betle* Linn) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *E. coli* dengan Metode Difusi Disk” pada tahun 2007, menyimpulkan bahwa ekstrak daun sirih (*P. betle* Linn) berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *S.*

*aureus* dan *E. coli* yang ditunjukkan dengan adanya daerah jernih (*clear zona*) yang terbentuk pada media uji.”

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin melakukan penelitian tentang Daya Hambat Infusum Daun Sirih (*Piper betle*, Linn) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*”.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas maka peneliti merumuskan masalah apakah infusum daun sirih (*P. betle* Linn) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Untuk mengetahui adanya daya hambat dari infusum daun sirih terhadap bakteri *E. coli*

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

Untuk menentukan kemampuan daya hambat infusum daun sirih terhadap bakteri *E. coli*.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

1. Untuk menambah ilmu pengetahuan dan wawasan bagi penulis maupun pembaca, terutama dalam bidang bakteriologi.
2. Untuk mengetahui sifat bakteristatik air rebusan (infusum) daun sirih terhadap bakteri *E. Coli*

3. Dapat dijadikan sumber informasi bagi masyarakat terhadap besarnya khasiat dan manfaat daun sirih sebagai obat tradisional.
4. Sebagai tingkat acuan bagi peneliti selanjutnya demi pengembangan dan penyempurnaan penelitian ini.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Peneliti Terdahulu

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sulastrianah (2014) dengan judul Uji DayaHambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*)Dan Daun Sirih (*Piper BetleL.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*. Hasil uji daya hambat ekstrak *A.muricata L.*dan *P. betle L.* terhadapbakteri *E.coli* sebagai bakteri ujimenunjukkan adanya respon hambatanterhadap *E.coli*. Respon hambatan yangterjadi pada penelitian ini disebabkan olehadanya kandungan atau senyawa aktifyang dimiliki oleh tanaman uji (*A.muricata L.*dan*P. betle L.*).(5)

Penelitian yang dilakukan oleh Widiana R, *dkk.*, (2012) dengan judul Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirih (*Piper BetleL.*) terhadap pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*, menyimpulkan bahwa sari daun Sirih (*Piper BetleL.*)dapat menghambat *E.coli* dan konsentrasi efektif 10% (100.000 ppm) dengan daerah hambat bakteri 22,19 mm.(5)

Penelitian yang dilakukan oleh Anang Hermawan (2012) dengan judul Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle L.*) TerhadapPertumbuhan *Escherichia Coli*Dengan Metode Difusi Disk. Dari hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*)diperoleh hasil bahwa ekstrakdaun sirih (*Piper betle L.*) berpengaruhterhadap pertumbuhan bakteri*Escherichia coli*yang ditunjukkan dengan adanya daerahjernih (*clear zona*) yang terbentuk padamedia uji.(8)

## 2.2. Telaah Teori

### 2.2.1. Daun Sirih

Sirih (*P. betle* Linn) merupakan tanaman merambat yang dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 2.000 meter dpl. Namun, pertumbuhannya akan lebih baik di daerah dengan ketinggian 300 - 1.000 meter dpl. Tanaman ini merambat di batang pohon dengan ketinggian rambatan bisa mencapai 15 meter. Batangnya berwarna hijau keabu-abuan, beruas, berbentuk bulat, dan berkayu lunak.

Daun sirih memiliki daun tunggal dan berbentuk bundar sampai bulat telur. Ujungnya runcing, pangkalnya berbentuk jantung atau agak bundar asimetris, dan pertulangannya menyirip. Warna daun sirih ada yang kuning, hijau, atau hijau tua yang mengeluarkan bau aromatis. Bunganya bunga majemuk berbentuk bulir dan bulat panjang. Panjang bulir jantan 1,5 - 3 cm dan panjang bulir betina 1,5 - 6 cm. Buahnya merupakan buah buni, berbentuk bulat, dan berwarna hijau keabu-abuan. Akar merupakan akar tunggang berbentuk bulat dan berwarna coklat kekuningan. Bagian tanaman yang digunakan untuk obat adalah daunnya.(8)

### 2.2.2. Taksonomi Daun Sirih (*P. betle*, Linn)

Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari daun sirih adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales

Famili : Piperaceae  
Genus : *Piper* sp.  
Spesies : *P. betle* Linn (9)

### 2.2.3. Jenis-Jenis Daun Sirih

#### 1) Sirih Jawa

Sirih Jawa memiliki daun yang lebih lembut dan berwarna hijau rumput, baunya tidak terlalu tajam atau kuat dan paling banyak digunakan masyarakat untuk menyirih.



Gambar 1. Sirih Jawa

Masyarakat di Indonesia umumnya mempunyai kebiasaan menyirih terutama banyak dijumpai di daerah Jawa, Sumatera barat, Sumatera utara dan Nusa Tenggara Barat (NTB). Sebagian besar orang yang gemar menyirih adalah orang yang sudah berusia lanjut (lansia). Disamping itu, menyirih juga merupakan adat maupun budaya warisan leluhur. Tradisi menyirih biasanya dilakukan untuk mengisi waktu luang, selain itu, merupakan menghilangkan beban pikiran yang sedang dihadapi, bisa mengganjal rasa lapar, mengusir rasa kejenuhan, menimbulkan sensasi panas atau hangat didalam tubuh serta dapat memperkuat

dan menyehatkan gigi. Hal ini dikarenakan daun sirih memiliki sifat alami sebagai antiseptik atau zat pembunuh kuman.

## 2) Sirih Hitam

Sirih hitam (*Piper betle* var *nigra*) tumbuh subur di dataran rendah dan dataran sedang. Sirih ini dapat tumbuh sampai tinggi dengan rata-rata 5 meter dengan cara merambat. Daunnya berbentuk hati dan lebih kaku, warnanya lebih hitam dan seperti ada jelaga pada permukaan daunnya.



Gambar 2. Sirih Hitam (*Piper betle* var *nigra*)

## 3) Sirih Belanda

Sirih Belanda mempunyai nama latin *Epipremnum aureum*. Tanaman ini memiliki daun yang besar dan berwarna kuning atau hijau kekuningan. Sirih ini juga memiliki rasa yang pedas, bau yang lebih tajam dan memiliki kelebihan yaitu merambat dengan cepat.



Gambar 3. Sirih Belanda (*Epipremnum aureum*)



#### 4) Sirih Cengkeh

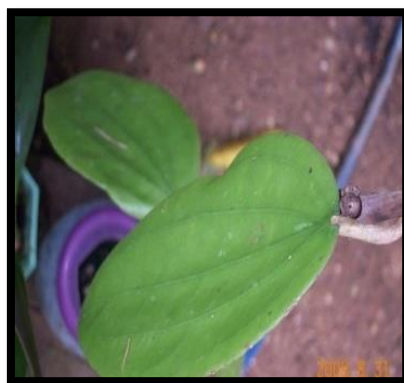
Sirih cengkeh memiliki daun yang lebih kecil dan berwarna kuning. Sirih ini juga memiliki rasa seperti cengkeh.



Gambar 4. Sirih Cengkeh.

#### 5) Sirih Raja

Sirih raja mempunyai akar setebal/serapat, daunnya berbentuk lonjong hampir seperti daun sirih pada umumnya. Sirih raja memiliki daun yang lebih tebal dan memiliki tekstur yang lebih indah. Biasanya tumbuh di Asia tenggara sampai Australia.



Gambar 5. Sirih Raja

## 6) Sirih Merah

Sirih merah (*Crocatum piper*) memiliki daun yang berlendir dan berasa pahit. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan dan bagian bawahnya berwarna merah hati cerah.(5)



Gambar 5. Sirih merah (*Crocatum piper*)

### 2.2.4. Kandungan Zat Kimia Daun Sirih

Adapun kandungan zat kimia yang terkandung dalam daun sirih adalah sebagai berikut.

**Tabel 2.1 Kandungan Zat Kimia Daun Sirih**

No.	Nama Zat	Kadar (%)
1	Minyak Asiri	1 - 4,2%
2	<i>Diastese</i>	0,8 – 1,8 %
3	<i>Kavicol</i>	7,2 - 16,7%
4	<i>Kavibetol</i>	2,7 - 6,2%
5	<i>Allylpykatekol</i>	0 - 9,6%
6	<i>Karvakol</i>	2,2 - 5,6%
7	<i>Eugenol</i>	26,8 - 42,5%

8	<i>Eugenol Methyl Ether</i>	4,2 – 15,8 %
9	<i>P-Cymene</i>	1,2 - 2,5 %
10	<i>Cyneole</i>	2,4 – 4,8 %
11	<i>Cadinene</i>	2,4 – 15,8 %
12	<i>Caryophyllene</i>	3 - 9,8 %
13	<i>Alkohol</i>	
14	<i>Estragol</i>	
15	<i>Terpennena</i>	
16	<i>Eskuiterpene</i>	
17	<i>Fenil Propana</i>	
18	<i>Tanin</i>	
19	<i>Hidroksikavicol</i>	
20	Gula	
21	Pati	

(Sumber(4))

### 2.2.5. Khasiat Daun Sirih

Menurut Rosdiana, dkk (2014), tanaman daun sirih berkhasiat untuk mengobati asma, mengobati gusi berdarah, mengobati batuk, mengobati radang selaput mata, mengobati reumatik, mengatasi bau badan, mengatasi jerawat dan sebagai antidiare.

### 2.2.6. *Escherichia coli*

*E. coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif dan termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini merupakan penghuni normal usus, selain itu dapat juga berkembang biak di lingkungan sekitar manusia.(10)

### 2.2.7. Taksonomi *Escherichia coli*

Klasifikasi ilmiah *E. coli* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i> sp.
Spesies	: <i>E. coli</i> .(11)

### 2.2.8. Morfologi dan Fisiologi

#### 1) Morfologi

*E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang tidak membentuk spora, dan berbentuk batang dengan hidup secara anaerob fakultatif. Secara tipikal bakteri bersifat mesofilik akan tumbuh pada suhu sekitar 7 - 10°C sampai 50°C. Suhu optimal bagi pertumbuhannya bakteri mesofilik berkisar 37°C. Bakteri *E. coli* masih dapat tumbuh pada kisaran pH antara 4,4 - 8,5.(14)

#### 2) Fisiologi

*E. coli* secara khas menunjukkan hasil positif pada tes indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol, serta menghasilkan gas dari glukosa maupun laktosa akibat proses fermentasi.(11)

#### 3) Patogenesis

*E. coli* berdasarkan vero-toksin yang dihasilkan, memiliki empat kelas yang bersifat enterovirulen. Keempat kelas tersebut adalah Entero-patogenik *E. coli* (EPEC), Entero-toksigenik *E. coli* (ETEC), Entero-invasif *E. coli* (EIEC), dan Entero-emoragik *E. coli* (EHEC).(12)

#### **4) Enteropatogenik *E. coli*(EPEC)**

Menurut CDC (*Center for Disease Control*), EPEC merupakan bakteri penyebab diare persisten yang dapat berlangsung 2 minggu atau lebih. Bakteri ini menyebar ke manusia melalui kontak dengan air maupun makanan yang terkontaminasi tinja manusia atau hewan yang terinfeksi, dan umumnya sering terjadi di negara-negara yang sedang berkembang.

#### **5) Enterotoksigenik *E. coli* (ETEC)**

(ETEC adalah nama yang diberikan kepada sekelompok *E. coli* yang menghasilkan racun khusus yang merangsang lapisan usus untuk mengeluarkan cairan yang berlebihan, sehingga menghasilkan diare. ETEC pertama kali diakui sebagai penyebab penyakit diare manusia pada tahun 1960. Strain bakteri ini telah muncul sebagai bakteri penyebab utama diare di Negara berkembang. Setiap tahun, sekitar 200 juta kasus dan 380.000 kematian terjadi, terutama pada anak-anak, menurut *Center for Disease Control* (CDC), ETEC merupakan penyebab paling umum dari *traveller's diarrhea* pada anak-anak di Negara maju, seperti Amerika Serikat. Infeksi ETEC dapat menyebabkan diare berair dan kram perut. Faktor permukaan untuk perlekatan sel bakteri pada mukosa sel usus penting didalam patogenesis diare, karena bakteri harus melekat pada sel epitel mukosa usus sebelum bakteri mengeluarkan toksin. Gejala klinis dapat berupa demam, mual tanpa muntah, mengigil, kehilangan nafsu makan, sakit kepala, nyeri otot, dan kembung juga dapat terjadi tetapi kurang umum. Penyakit berkembang 1-3 hari setelah terkena dan biasanya berlangsung 3 - 4 hari. Beberapa infeksi mungkin memakan waktu 1 minggu atau lebih untuk menyelesaikan siklusnya.

Gejala jarang berlangsung lebih dari 3 minggu. Kebanyakan pasien sembuh dengan langkah dukungan perawatan yang intensif dan tidak memerlukan rawat inap atau antibiotik.

#### **6) Enteroinvasif *E. coli*(EIEC)**

Menurut CDC, golongan ketiga disebut Entero-invasif *E. coli* (EIEC), dimana sel-sel *E. coli* mampu menembus dinding usus dan menimbulkan kolitis (radang usus besar) atau gejala seperti disentri. Bakteri menginvasi sel mukosa, menimbulkan kerusakan sel dan terlepasnya lapisan mukosa. Ciri khas diare yang disebabkan oleh strain EIEC adalah tinja mengandung darah, mukosa dan nanah. Waktu inkubasi 8 - 44 jam (rerata 26 jam) dengan gejala demam, sakit kepala, kejang perut dan diare berdarah.

#### **7) Enterohemoragik *E. coli*(EHEC)**

Menurut *World Health Organization* (WHO), golongan keempat disebut Enterohemoragik *E. coli* (EHEC) merupakan bakteri yang dapat menyebabkan diare berdarah. Sumber utama adalah produk mentah atau daging sapi kurang matang, susu mentah dan kontaminasi tinja dalam sayuran. Dalam kebanyakan kasus, gejala penyakit yang disebabkan oleh EHEC termasuk kram perut dan diare yang mungkin dalam beberapa kasus berkembang menjadi diare berdarah. Demam dan muntah juga dapat terjadi. Masa inkubasi dapat berkisar dari 3 - 8 hari, dengan rata-rata 3 - 4 hari. Kebanyakan pasien sembuh dalam waktu 10 hari, tetapi pada sebagian kecil pasien (terutama remaja dan orang tua), infeksi dapat menyebabkan penyakit yang mengancam jiwa, seperti sindroma uremik hemolitik (SUH), SUH ditandai dengan gagal ginjal, anemia hemolitik akut dan

trombositopenia. EHEC adalah peka terhadap panas. Dalam menyiapkan makanan di rumah, pastikan untuk mengikuti hidup dengan pola kebersihan makanan dasar, seperti memasak secara menyeluruh sampai semua bagian mencapai suhu 70°C atau lebih tinggi.(13)

### **8) Gejala Klinis**

*E. coli* tipe enteropatogenik melekat pada mukosa usus dan mengubah kapasitas absorpsi usus, sehingga menyebabkan muntah, diare, nyeri abdomen, serta demam.

Infeksi ETEC efeknya pada kesehatan diperantarai oleh enterotoksin. Gejalanya meliputi diare (yang berkisar dari diare afebril ringan sampai sindrom mirip kolera dengan diare yang banyak tanpa darah atau mukus), kram abdomen serta muntah, yang kadang-kadang menimbulkan dehidrasi dan syok.

Kelainan inflamasi pada mukosa dan submukosa usus yang disebabkan oleh invasi dari multiplikasi EIEC dalam sel epitel kolon. Gejalanya meliputi demam, nyeri abdomen yang hebat, muntah dan diare cair.(14)

Gejala yang ditimbulkan oleh EHEC berkisar dari diare berair ringan hingga kolitis hemoragik yang parah. Setelah masa inkubasi 1 - 5 hari dilalui, diare berair terjadi dan kerap diikuti oleh kram perut serta muntah. Pada kebanyakan pasien, diare berdarah biasanya muncul 1 - 2 hari setelah gejala pertama timbul, tetapi tidak terkait dengan keberadaan leukosit dalam tinja. Demam sering kali menjangkiti sepertiga kasus diare lainnya, sementara penyakit ini berlangsung selama 4-10 hari.

### 9) Pemeriksaan Laboratoris

Seluruh tinja penderita diare berdarah (bila terjadi keadaan KLB cukup sebagai tanda diare tanpa darah) sebaiknya tinja hendaknya di kultur untuk menemukan kemungkinan keberadaan bakteri patogen *E. coli*. Tanpa kultur, *E. coli* patogen dapat juga ditemukan dengan menggunakan *rapid enzyme immunoassays*, disamping itu pemeriksaan dapat dilakukan lebih cepat dengan *polymerase chain reaction (PCR)* yang dapat mengidentifikasi jasad renik langsung dari spesimen.

### 10) Diagnosis

Diagnosis ditegakkan berdasarkan gejala klinis dan pemeriksaan laboratorium.

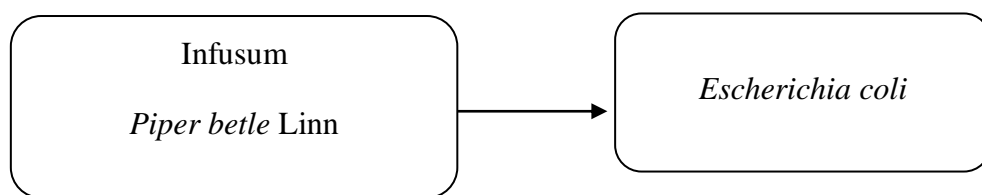
### 11) Penanganan

Penanganan keracunan makanan dilatarbelakangi oleh famili *E. coli*, pada prinsipnya serupa dengan pengobatan gastroenteritis yang disebabkan oleh bakteri lain, terutama yang bersifat suportif yaitu mempertahankan keseimbangan cairan dan elektrolit tubuh. Pada kasus ringan-sedang cukup diberi ORT (*oral rehydration therapy*). Jika ORT tak dapat diberikan atau dehidrasi sudah berada pada tingkat yang parah, berikan cairan intravena. Obat antimotilitas tidak diperkenankan, sementara pemberian antibiotik harus menanti hasil biakan. Pengobatan sementara (*presumptive therapy*) dengan menggunakan antibiotik tidak dianjurkan karena potensi kejadian HUS yang besar, terutama jika berhadapan dengan *E. coli*.



Profilaksis *traveler's diarrhea* dengan bismuth subsalisilat, trimetoprim, dan sulfametoksazol pada anak tidak dianjurkan karena potensi akumulasi asam salisilat serta reaksi energi. Selain itu, belum ada bukti kajian ilmiah terhadap manfaat penggunaan antibiotik untuk pengobatan EHEC dan EIEC.(10)

### 2.2.9. Kerangka Konsep



**Gambar 2.1 Kerangka Konsep**

### 2.2.10. Definisi Operasional

- a. Infusum : adalah filtrat hasil proses perendaman daun sirih yang mengandung zat yang terdapat pada daun sirih.
- b. Daun sirih (*P. betle* Linn) : daun yang digunakan dalam uji anti bakteri terhadap *E. coli* dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.
- c. *E. coli*: bakteri yang digunakan dalam uji aktivitas infusum daun sirih dalam uji daya hambat bakteri

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian ini bersifat pra-eksperimental dengan design the one -shot case study (perlakuan terhadap sekelompok tertentu, Kemudian dilakukan pengukuran) dalam hal ini dengan metoda difusi disk, Dimana pada tahap awal akan dilakukan pembuatan infusum daun sirih Kemudian dilakukan pengujian daya hambat terhadap bakteri *E. coli*.

#### **3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian berdasarkan daun sirih yang dibeli di pasar tradisional, dan pengujian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Medan Jurusan Analis Kesehatan, Jl. Williem Iskandar Pasar V Barat No. 6, Medan yang dilaksanakan pada bulan November 2018.

#### **3.3. Objek Penelitian**

Objek Penelitian dalam penelitian ini adalah tanaman sirih jawa (*P. betle* Linn) yang dibeli dari pasar.

Sampel yang digunakan adalah daun sirih jawa (*P. betle*, Linn) yang cukup segar dan dibeli di pasar sebanyak 200 gr. Kemudian daun sirih ini dibuat menjadi larutan infusum, dimana infusum ini digunakan sebagai bahan uji terhadap bakteri uji.

### **3.4. Alat dan Bahan**

#### **3.4.1. Alat**

Neraca analitik, labu erlenmeyer, kapas, kertas saring, pipet volume, botol steril, klinipet, pipet klinipet, disk kosong (blank disk), petridish, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose cincin, lampu bunsen, corong, gelas ukur, hotplate, aluminium foil, isolasi, pinset, kapas lidi steril, dan inkubator.

#### **3.4.2. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah infusum daun sirih dan strain murni *E. coli*.

### **3.5. Media dan Reagensia**

#### **3.5.1. Media**

Media yang digunakan adalah media *Muller Hinton Agar* (MHA).

#### **3.5.2. Reagensia**

Reagensia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest steril, NaCl 0,9%, Asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 1% dan Barium klorida ( $BaCl_2$ ) 1%.

### **3.6. Prosedur Kerja**

#### **3.6.1. Pembuatan Infusum Daun Sirih**

Timbang daun sirih sebanyak 200 gram, cuci bersih dengan aquadest steril, masukkan kedalam labu erlenmeyer tambahkan aquadest 200 ml. Kemudian direbus dan dibiarkan mendidih selama 15 menit. Dinginkan. Lalu hasil rebusan disaring dan dibuat konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, dan kontrol.

**Tabel 3.1 Pembuatan Konsentrasi Infusum**

No.	Infusum Daun Sirih	Nacl 0,9 %	Konsentrasi
1	10 ml	-	100 %
2	7,5 ml	2,5 ml	75 %
3	5 ml	5 ml	50 %
4	2,5 ml	7,5 ml	25 %

Kemudian teteskan infusum sebanyak 10 µl ke setiap disk kosong lalu dibiarkan kering pada suhu kamar. Setelah kering, kertas disk tersebut siap untuk ditanam ke media *Muller Hinton Agar* (MHA).

### 3.6.2. Pembuatan Standar Mc Farland

Masukkan larutan Asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 1% sebanyak 9,9 ml ke dalam tabung dan tambahkan larutan Barium klorida ( $BaCl_2$ )1% sebanyak 0,1 ml (9:1). Kemudian tutup tabung tersebut dengan kapas steril dan homogenkan. Suspensi  $BaSO_4$  yang terdapat di dalam tabung tersebut dibandingkan kekeruhannya dengan suspensi bakteri yang akan dibuat. Suspensi ini mengandung  $1 \times 10^8$  kuman/ml.(11)

### 3.6.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pada Tabung steril yang telah diisi Nacl 0,9% steril sebanyak 10 ml, kemudian 1 ose strain bakteri murni *E. coli* dengan menggunakan ose cincin dan dimasukkan kedalam tabung tersebut kemudian dihomogenkan. Sesuaikan kekeruhan suspensi bakteri tersebut dengan standar Mc Farland yang mengandung  $1 \times 10^8$  bakteri/ml. Apabila warnanya belum sesuai, tambahkan lagi suspensi bakterinya hingga didapatkan warna yang sama.

#### 3.6.4. Pengujian Daya Hambat

Dalam melakukan pengujian daya hambat infusum terhadap pertumbuhan bakteri, dilakukan sebagai berikut :

- a. Oleskan suspensi bakteri pada permukaan media *Muller Hinton Agar* dengan menggunakan kapas lidi steril hingga rata.
- b. Ambil kertas disk untuk uji sebanyak tiga kali ulangan, dan tetesi dengan infusum satu tetes dengan konsentrasi infusum antara lain : 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol negatif (NaCl 0,9%) dan kontrol positif (*Chloramfenikol*).
- c. Kemudian letakkan pada permukaan media pada petridish yang telah ditanami kuman *E. Coli*, Kemudian Inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37° C.
- d. Setelah dilakukan pengeraman selama 24 jam, ukur diameter daya hambat menggunakan penggaris (mm), hasil pengukuran ini merupakan hasil uji.