

**UJI UJIAKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL
DAUN SIRIH HIJAU (*Piper Betle L.*) TERHADAP
PERTUMBUHAN BAKTERI *Citrobacter freundii***

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si) dalam Ilmu Kimia**

**IKA SURYANI
NIM 1908036047**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO**

SEMARANG

2024

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ika Suryani

NIM : 1908036047

Jurusan: Kimia

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap Bakteri *Citrobacter freundii*

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian atau karya saya sendiri, kecuali bagian lain yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 14 Desember 2023

Pembuat pernyataan



Ika Suryani

NIM 1908036047

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini :

Judul : Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap Bakteri *Citrobacter freundii*

Nama : Ika Suryani

NIM : 1908036047

Jurusan : Kimia

Telah diujikan dalam sidang munaqosah oleh Dewan Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang ilmu kimia

Semarang, 22 Januari 2024

DEWAN PENGUJI

Ketua Sidang

Rais Nur Latifah, M. Si.
NIP. 199203042019032019

Sekretaris Sidang

Mutista Hafsha, M. Si.
19940102209032015

Penguji I

Dr. R. Arizal Firmansyah S.Pd., M. Si.
NIP. 197908192009121001

Penguji II

Ana Mardiyah, M. Si.
NIP. 198905252019032019



Pembimbing

Rais Nur Latifah, M. Si.
NIP. 199203042019032019

...

NOTA DINAS

Semarang, 14 Desember 2023

Yth. Ketua Program Studi Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan

Bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap Bakteri *Citrobacter freundii*

Nama : Ika Suryani

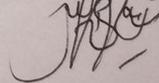
NIM : 1908036047

Jurusan: Kimia

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diajukan dalam Sidang Munaqosah.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Dosen Pembimbing



Rais Nur Latifah, M.Si

NIP 199203042019032019

ABSTRAK

Citrobacter freundii adalah salah satu bakteri gram-negatif pada saluran usus manusia dan hewan yang menyebabkan penyakit diare. Daun sirih hijau mengandung kelompok metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan tanin. Ketiga metabolit sekunder tersebut dimungkinkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Citrobacter freundii*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode cakram (*disc diffusion*) dengan kertas cakram (*paper disc*). Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair dengan instrumen spektrofotometer *UV-Vis*. Pada konsentrasi 2%, 4% dan 8% didapatkan diameter zona hambatnya sebesar 7,76 mm; 6,63 mm; dan 6,72 mm dengan hasil data yang fluktuatif. Uji KHM didapatkan pada konsentrasi 6,25% yang menunjukkan konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii*. Namun hasil tersebut dikatakan kurang valid karena kurang akuratnya total larutan yang digunakan untuk uji KHM.

Kata kunci : Daun Sirih Hijau, *Citrobacter freundii*, Antibakteri

TRANSLITERASI

Pedoman Transliterasi Arab-Latin yang digunakan dalam menulis disertasi ini adalah pedoman transliterasi yang merupakan hasil keputusan Bersama (SKB) Menteri Agama dan Materi Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia, Nomor: 158 Tahun dan Nomor: 0543b/U/1987. Di bawah ini daftar huruf-huruf Arab dan transliterasinya dengan huruf latin.

1. Konsonan

Huruf Arab	Nama	Huruf Latin	Nama
ا	Alif	Tidak dilambangkan	Tidak dilambangkan
ب	Ba	B	be
ت	Ta	T	Te
ث	Śa	Ś	Es (dengan titik diatas)
ج	Ja	J	Je
ح	Ha	H	Ha (dengan titik di bawah)
خ	Kha	Kh	Ka dan Ha
د	Dal	D	De
ذ	Zal	Z	Zet (dengan

			titik di atas)
ر	Ra	R	Er
ز	Za	Z	Zet
س	Sa	S	Es
ص	Şa	Ş	Es (dengan titik di bawah)
ض	Ḍat	Ḍ	De (dengan titik di bawah)
ط	Ta	T	Te (dengan titik di bawah)
ظ	Ẓa	Ẓ	Zet (dengan titik di bawah)
ع	'Ain	'	Apostrof
غ	Ga	G	Ge
ف	Fa	F	Ef
ق	Qa	Q	Qi
ك	Ka	K	Ka
ل	La	L	Ka
م	Ma	M	Em
ن	Na	N	En

و	Wa	W	We
هـ	Ha	H	Ha
ء	Hamzah	'	Apostrof
ي	Ya	Y	Ye

Hamzah (ء) yang terletak di awal kata mengikuti vokalnya tanp diberi tanda apa pun. Jika hamzah (ء) terletak di tengah atau di akhir, maka ditulis dengan tanda (').

2. Vokal

Vokal bahasa Arab, seperti vokal bahasa Indonesia, terdiri atas vokal tunggal atau monoftong dan vokal rangkap atau diftong. Vokal tunggal bahasa Arab yang lambangnya berupa tanda atau harakat, transliterasinya sebagai berikut:

Huruf Arab	Nama	Huruf Latin	Nama
أ	Fathah	A	A
إ	Kasrah	I	I
أ	Dammah	U	U

Vokal rangkap bahasa Arab yang lambangnya berupa gabungan antara harakat dan huruf, transliterasinya berupa gabungan huruf, yaitu:

Huruf Arab	Nama	Huruf Latin	Nama
أى	Fathah dan Ali ya	Ai	A dan I

أُ Fathah dan Iu A dan U
 lu wau

Contoh:

كَيْفَ : *kaifa*

هَوَّلَ : *hauला*

3. Maddah

Maddah atau vokal panjang yang lambangnya berupa harkat dan huruf, transliterasinya berupa huruf dan tanda, yaitu:

Huruf dan Nama Harokat	Huruf dan Nama Tanda
سَا سَى	Fathah dan Ā a dan garis di atas
سِي	Kasrah dan Ī I dan garis di atas
سُو	Dammah Ū U dan garis di atas
	dan wau

Contoh:

مَتَّ : *māta*

رَمَى : *ramā*

قِيلَ : *qīla*

يَمُوتُ : *yamūtu*

4. Ta Marbūtah

Transliterasi untuk ta marbūṭah ada dua, yaitu: ta marbūṭah yang hidup atau mendapat harkat fathah, kasrah, dan ḍammah, transliterasinya adalah [t], sedangkan ta marbūṭah yang mati atau mendapat harkat sukun, transliterasinya adalah [h]. Jika pada kata yang berakhir dengan ta marbūṭah diikuti oleh kata yang menggunakan kata sandang al-serta bacaan kedua kata itu terpisah, maka ta marbūṭah itu ditransliterasikan dengan ha (h). Contoh:

رَوْضَةَ الْأَطْفَالِ : *raudah al-atfal*

الْمَدِينَةُ الْفَضِيلَةُ : *al-madinah al-fadilah*

الْحِكْمَةُ : *al hikmah*

5. Syaddah (*Tasydīd*)

Syaddah atau *tasydīd* yang dalam sistem tulisan Arab dilambangkan dengan sebuah tanda *tasydīd*, dalam transliterasi ini dilambangkan dengan perulangan huruf (konsonan ganda) yang diberi tanda *syaddah*. Contoh:

رَبَّنَا : *rabbanā*

نَجَّيْنَا : *Najjaā*

الْحَقُّ : *al-haqq*

الْحَجُّ : *al-hajj*

نُعَمُّ : *nu''ima*

عَدُوٌّ : *'aduwwun*

Jika huruf ع ber- tasydīd di akhir sebuah kata dan didahului oleh huruf berharakat kasrah, maka ditransliterasi seperti huruf maddah (ī). Contoh:

عَلِيّ : 'Ali (bukan 'Aliyy atau 'Aly)

عَرَبِيّ : arabī (bukan 'Arabiyy atau 'Araby)

6. Kata Sandang

Kata sandang dalam sistem tulisan Arab dilambangkan dengan huruf ل (alif lam ma'arifah). Dalam pedoman transliterasi ini, kata sandang ditransliterasi seperti biasa, al-, baik ketika ia diikuti oleh huruf syamsiah maupun huruf qamariah. Kata sandang tidak mengikuti bunyi huruf langsung yang mengikutinya. Kata sandang xv ditulis terpisah dari kata yang mengikutinya dan dihubungkan dengan garis mendatar (-). Contohnya:

الشَّمْسُ : *al-syamsu* (bukan *asy-syamsu*)

الرَّزْزَلَةُ : *al-zalزالah* (bukan *az-zalزالah*)

الفَلْسَفَةُ : *al-falsafah*

البِلَادُ : *al-biladu*

7. Hamzah

Aturan transliterasi huruf hamzah menjadi apostrof (') hanya berlaku bagi hamzah yang terletak di tengah dan akhir kata. Namun, bila hamzah terletak di awal kata, tidak dilambangkan, karena dalam tulisan Arab berupa alif. Contohnya:

تَمْرُنُ : *ta'muruna*

النَّوْءُ : *al-nau'*

سَيِّئٌ : *sayai'un*

أَمْرٌ : *umirtu*

8. Penulisan Kata Arab yang Lazim digunakan dalam Bahasa Indonesia

Kata, istilah, atau kalimat Arab yang ditransliterasi adalah kata, istilah atau kalimat yang belum dibakukan dalam bahasa Indonesia. Kata, istilah atau kalimat yang sudah lazim dan menjadi bagian dari perbendaharaan xvi bahasa Indonesia, atau sudah sering ditulis dalam tulisan bahasa Indonesia, tidak lagi ditulis menurut cara transliterasi di atas. Misalnya kata Alquran (dari alQur'ān), sunnah, hadis, khusus dan umum. Namun, bila kata-kata tersebut menjadi bagian dari satu rangkaian teks Arab, maka mereka harus ditransliterasi secara utuh

Contoh:

Fī zilāl al-Qur'ān

Al-Sunnah qabl al-tadwīn

Al-'Ibārāt Fī 'Umūm al-Lafz lā bi khuṣūṣ al-sabab

9. Lafz al-Jalālah

Kata “Allah” yang didahului partikel seperti huruf jarr dan huruf lainnya atau berkedudukan sebagai muḍāf ilaih (frasa nominal), ditransliterasi tanpa huruf hamzah.

دِينُ اللَّهِ : *dīnullāh*

Adapun ta marbūṭah di akhir kata yang disandarkan kepada lafẓ al-jalālah, ditransliterasi dengan huruf [t]

هُمْفِي رَحْمَةِ اللَّهِ : *hum fī rahmatillāh*

10. Huruf Kapital

Walau sistem tulisan Arab tidak mengenal huruf kapital (All Caps), dalam transliterasinya huruf-huruf tersebut dikenai ketentuan tentang penggunaan huruf xvii kapital berdasarkan Pedoman Umum Ejaan Bahasa Indonesia (PUEBI). Huruf kapital, misalnya, digunakan untuk menuliskan huruf awal nama diri (orang, tempat, bulan) dan huruf pertama pada permulaan kalimat. Bila nama diri didahului oleh kata sandang (al-), maka yang ditulis dengan huruf kapital tetap huruf awal nama diri tersebut, bukan huruf awal kata sandangnya. Jika terletak pada awal kalimat, maka huruf A dari kata sandang tersebut menggunakan huruf kapital (Al-). Ketentuan yang sama juga berlaku untuk huruf awal dari judul referensi yang didahului oleh kata sandang al-, baik ketika ia ditulis dalam teks maupun dalam catatan rujukan (CK, DP, CDK, dan DR). Contoh:

Wa mā Muḥammadun illā rasūl

Inna awwala baitin wuḍi'a linnāsi lallaẓī bi Bakkata
mubārakan

Syahru Ramaḍān al-laẓī unzila fih al-Qur'ān

Naṣīr al-Dīn al-Ṭūs

Abū Naşr al-Farābī
Al-Gazālī
Al-Munqiz min al-Ḍalāl

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur selalu terpanjatkan atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat serta kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa kita haturkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW, yang ditunggu syafaatnya di yaumul akhir.

Skripsi dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap Bakteri *Citrobacter freundii*” ini disusun guna memenuhi tugas akhir untuk mendapatkan gelar sarjana sains dalam ilmu kimia Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Walisongo Semarang.

Selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis menyadari begitu banyak bantuan dari berbagai pihak yang sudah meluangkan waktunya, mendidik dan membimbing, memberikan motivasi dan mendoakan yang terbaik kepada penulis. Kesempatan ini, penulis menyampaikan penghargaan dan rasa terimakasih sebesar besarnya kepada:

1. Yang terhormat Bapak Prof. Dr. Nizar, M.Ag selaku rektor UIN Walisongo Semarang

2. Bapak Dr. H. Ismail, M.Ag, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang
3. Ibu Dr. Hj. Malikhatul Hidayah, S.T., M.Pd selaku ketua Program Studi Kimia UIN Walisongo Semarang
4. Ibu Rais Nur Latifah, M.Si, selaku pembimbing yang telah sabar dan meluangkan banyak waktu untuk melakukan bimbingan, petunjuk, dorongan, serta motivasi bagi penulis dari awal hingga skripsi ini dapat terselesaikan
5. Ibu Mutista Hafshah, M.Si, selaku wali dosen yang sudah mendampingi dari awal masuk kuliah hingga selesai
6. Bapak dan Ibu Dosen program Studi Kimia UIN Walisongo Semarang yang telah memberikan ilmu dan pengalamannya kepada penulis, semoga ilmu yang diberikan dapat bermanfaat, berkah, dan menjadi ladang pahala. *Aamiin*
7. Ibu tercinta Suwarti dan bapak Asnawi yang memberikan cinta dan kasih sayang, semangat, dukungan, doa yang tak pernah putus, dan memberikan dukungan berupa materi agar skripsi dapat terselesaikan dengan penuh tanggung jawab
8. Keluarga besar tercinta yang selalu mendukung dan mendoakan penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan

9. Alto, Shoba dan Abdur sebagai teman yang selalu mendukung, membantu penulis dalam proses penyelesaian skripsi, kebersamaan dalam suka duka selama kuliah di UIN Walisongo Semarang dan semoga pertemanan akan terus berlanjut
10. Teman-teman seperjuangan Kimia Murni Angkatan 2019 yang telah memberikan warna baru semasa duduk dibangku perkuliahan, dan kebersamaan yang sangat indah untuk dikenang di masa tua
11. Teman-teman seperjuangan selama penelitian di laboratorium kimia dan mikrobiologi yang sudah saling tolong menolong dalam proses penelitian
12. Serta semua pihak yang telah membantu selama proses penyusunan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat ganda atas segala bantuan dan dukungan kepada penulis. Penulis menyadari jika penulisan skripsi ini masih banyak kelemahan serta kekurangan. Maka dari itu dengan segala kerendahan hati sangat mengharapkan kritik, saran dan masukan agar skripsi dapat tersusun lebih baik

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN.....	ii
PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
NOTA DINAS	iv
ABSTRAK	v
TRANSLITERASI.....	vi
KATA PENGANTAR.....	xv
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL.....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BAB I PENDAHULUAN.....	23
A. Latar Belakang.....	23
B. Rumusan Masalah.....	28
C. Tujuan Penelitian	28
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	29
A. Kajian Teori.....	29
B. Kajian Pustaka	50
BAB III METODE PENELITIAN	55
A. Waktu Penelitian.....	56
B. Alat dan Bahan	56

C. Prosedur Penelitian	57
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	66
A. Ekstraksi Daun Sirih Hijau	66
B. Uji Fitokimia	68
C. Uji Daya Hambat Metode Cakram	78
D. Uji KHM	85
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	93
A. Kesimpulan	93
B. Saran	94
DAFTAR PUSTAKA	95
LAMPIRAN	119

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Sirih Hijau	29
Gambar 4.1 Ekstrak Kental Daun Sirih Hijau	67
Gambar 4.2 Perubahan Warna Uji Flavonoid sebelum reaksi dan sesudah reaksi	70
Gambar 4.3 Reaksi Uji Flavonoid	71
Gambar 4.4 Perubahan Warna Uji Tannin sebelum reaksi dan sesudah reaksi.....	72
Gambar 4.5 Reaksi Uji Tannin.....	73
Gambar 4.6 Hasil Uji Saponin sebelum reaksi dan sesudah reaksi	74
Gambar 4.7 Reaksi Uji Saponin	75
Gambar 4.8 Perubahan Warna Uji Alkaloid sebelum reaksi dan sesudah reaksi	76
Gambar 4.9 Reaksi Uji Alkaloid.....	77
Gambar 4.10 Variasi Konsentrasi Larutan Sebelum Inkubasi	87
Gambar 4.11 Variasi Konsentrasi Larutan Setelah Inkubasi	87

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kategori Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri	46
Tabel 2.2 Jenis Standar <i>Mc Farland</i>	49
Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia.....	68
Tabel 4.2 Hasil Daya Hambat Uji Antibakteri.....	80
Tabel 4.3 Hasil KHM Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau Terhadap Bakteri <i>Citrobacter freundii</i>	88

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pembuatan Ekstrak	119
Lampiran 2 Uji Fitokimia.....	121
Lampiran 3 Uji Cakram.....	122
Lampiran 4 Uji KHM.....	124
Lampiran 5 Perhitungan.....	125
Lampiran 6 Daftar Riwayat Hidup.....	131

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit menular ialah kondisi penyakit yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu dan disebarkan oleh individu yang terinfeksi, baik secara langsung maupun tidak langsung melalui tumbuhan, hewan, atau lingkungan (Dinkes Prov. Sulawesi Selatan, 2015). Penyakit menular atau penyakit infeksi biasanya disebabkan oleh mikroorganisme patogen, salah satu mikroorganisme tersebut adalah bakteri (Pratiwi, 2017). Diare merupakan salah satu penyakit yang tergolong penyakit menular (Dinkes Prov. Sulawesi Selatan, 2015). Mikroorganisme penyebab diare masuk ke saluran pencernaan melalui makanan, minuman dan jari yang terkontaminasi. *Citrobacter freundii* adalah salah satu jenis mikroorganisme yang dapat ditemukan dalam saluran pencernaan (Pratiwi, 2008; Carolia, 2016).

Citrobacter freundii adalah bakteri basil gram-negatif yang termasuk dalam spesies *Enterobacteriaceae* yang hidup di berbagai tempat seperti air, tanah, makanan, *feses* dan saluran pencernaan manusia dan hewan. Bakteri ini dapat menjadi bakteri patogen ketika berada di luar saluran pencernaan atau di lingkungan yang jarang

terdapat flora normal (Brooks *et al.*, 2012). Menurut Liu *et al* (2018) meskipun *Citrobacter freundii* adalah bagian dari flora normal dalam saluran usus manusia dan hewan, bakteri ini juga dapat menyebabkan diare pada manusia. Bai *et al* (2012) dan Liu *et al* (2018) menyatakan bahwa *Citrobacter freundii* merupakan bakteri penyebab diare yang jarang terjadi, namun dapat menyebabkan penyakit diare pada manusia. Temuan ini menunjukkan bahwa bakteri *Citrobacter freundii* berada dalam saluran pencernaan dan memiliki potensi untuk menyebabkan diare serupa dengan *Escherichia coli*. Sejalan dengan penelitian Hang *et al* (2023), Das *et al* (2022) & Zamakshshari *et al* (2021) menyatakan bahwa daun sirih hijau memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (gram negatif). Aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* tersebut digunakan dasar sebagai bakteri model gram negatif. Bakteri gram negatif lainnya yang dapat dipertimbangkan adalah *Citrobacter freundii*. Jenis bakteri ini yang menjadi keterbaruan pada penelitian ini.

Diare dapat diobati menggunakan obat-obatan kimia contohnya imodium. Produk imodium mengandung bahan aktif *loperamide hydrochloride* yang berfungsi memperlambat pergerakan usus. *Loperamide* akan

mengikat molekul (reseptor) di dinding usus, hal ini menyebabkan usus berkontraksi lebih sedikit dan memperlambat waktu yang dibutuhkan cairan dan makanan untuk bergerak melalui usus. Bahan aktif tersebut juga memiliki efek samping ke sistem kardiovaskular, seperti halnya pemanjangan interval QT dan QRS yang bisa menyebabkan *torsade de pointes* dan disritmia ventrikel (Banas *et al.*, 2013; Mukarram *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

Berdasarkan efek samping penggunaan bahan aktif dalam obat-obatan kimia tersebut, tanaman dapat dipertimbangkan sebagai solusi alternatif. Pemanfaatan tanaman sebagai obat dan terbukti memiliki efikasi (Boy *et al.*, 2018 ; Prasathkumar *et al.*, 2021).

Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri penyebab diare adalah daun sirih hijau. Pemilihan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dalam penelitian ini terbukti bahwa daun tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif *Escherichia coli* (Prabhu *et al.*, 2022 ; Tran *et al.*, 2023). Bakteri gram negatif lainnya seperti *Citrobacter freundii* memungkinkan dapat dihambat oleh beberapa kelompok metabolit sekunder dalam daun sirih.

Daun sirih hijau mengandung berbagai senyawa

metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, saponin, dan tanin, selain minyak atsiri, terpinen, seskuiiterpen, fenilpropan, dan terpen (Gupta *et al.*, 2023 ; Tran *et al.*, 2023 ; Prabhu *et al.*, 2022). Berdasarkan penelitian oleh Lincah *et al* (2022) daun sirih mengandung senyawa tannin yang bermanfaat dalam mengobati diare. Temuan oleh Nisyak *et al* (2022) dalam skrining fitokimia ekstrak etanol daun sirih hijau menunjukkan keberadaan alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Selaras dengan penelitian Dwicahyani *et al* (2018) kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, saponin, dan alkaloid terkandung dalam ekstrak etanol.

Penelitian terdahulu tersebut telah membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki kandungan kelompok metabolit sekunder yang bertanggung jawab sebagai penghambat bakteri penyebab diare. Hal ini tidak menutup kemungkinan ekstrak etanol daun sirih juga mampu menghambat bakteri *Citrobacter freundii* yang juga memberikan kontribusi terhadap penyakit diare oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menguji apakah ekstrak daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Citrobacter freundii*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat

membuktikan potensi penggunaan ekstrak etanol daun sirih hijau sebagai obat alternatif dari sumber alam dan menjadi referensi untuk peneliti selanjutnya.

Fakta empiris yang telah dilakukan oleh para peneliti terdahulu memberikan bukti bahwa tanaman atau tumbuh-tumbuhan memiliki berbagai macam manfaat. Hal ini sebagaimana disebutkan dalam firman Allah SWT pada Q.S Thaha (20): 53 dan Asy-Syu'araa' (26): 7 yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ
مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى (٥٣)

Artinya: *“Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.”*

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)

Artinya: *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

B. Rumusan Masalah

1. Apa saja kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) ?
2. Bagaimana daya hambat ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii* ?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*).
2. Untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii*.

D. Manfaat Penulisan

1. Penulisan ini dapat dijadikan informasi bagi masyarakat mengenai kandungan senyawa antibakteri pada ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*).
2. Penulisan ini dapat digunakan untuk memberikan informasi pada masyarakat mengenai manfaat daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap bakteri *Citrobacter freundii*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)

Daun sirih hijau sering dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Daun sirih ini umumnya tumbuh menyerupai sulur pada batang pohon atau di dinding rumah, dengan tinggi berkisar antara 5 hingga 15 meter. Daun sirih hijau memiliki ciri khas berupa permukaan daun yang licin dan sedikit mengkilap, dengan tulang daun yang agak tenggelam, serta memiliki aroma khas seperti yang terlihat pada gambar 2.1 (Bauer *et al*, 1966). Klasifikasi tanaman sirih dapat dijelaskan sebagai berikut:

a. Klasifikasi Tanaman Sirih



Gambar 2.1 Daun Sirih Hijau (Sari *et al.*, 2014)

Menurut (Pangesti *et al.*, 2017) tanaman sirih memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Divisio : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Ordo : Piperales

Famili : Piperaceae

Genus : Piper

Spesies : Piper betle

b. Morfologi Tanaman Sirih

Tanaman sirih merupakan jenis tanaman perdu yang memiliki sulur, tumbuh merambat, batang berkayu, dan bercabang-cabang (Kharisma dan Lisa, 2010). Morfologi daun sirih memiliki bentuk hati, ujungnya tajam, tumbuh secara berselang-seling dengan tangkai, memiliki tekstur yang kasar saat disentuh, serta menampilkan aroma khas. Panjang daun berkisar antara 6 hingga 17,5 cm dan lebar 3,5 hingga 10 cm. Daun sirih memiliki ciri khas aroma yang khas dan rasa pedas (Kharisma dan Lisa, 2010). Tanaman sirih memiliki bunga majemuk berbentuk bulir. Bunga sirih dilindungi oleh daun pelindung berbentuk bulat panjang dengan diameter 1 mm. Buah sirih berada tersembunyi, berbentuk bulat, berdaging, dan memiliki warna kuning kehijauan hingga hijau keabu-abuan. Batang berbentuk bulat dan lunak, berwarna hijau kecokelatan dengan kulit

yang kasar dan berkerut (Inayatullah, 2012). Akar tanaman sirih berbentuk tunggang, berwarna coklat kekuningan (Koensoemardiyah, 2010).

c. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

Kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun sirih hijau terdiri dari flavonoid, alkaloid, dan tannin yang masing-masing memiliki sifat antibakteri (Carolia *et al.*, 2016; Bustanussalam, 2015; Inayatullah, 2012).

Klasifikasi metabolit sekunder tanaman dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan gugus fungsi dan struktur kimianya. Kelompok-kelompok ini termasuk terpen (termasuk senyawa volatil, sterol, dan karotenoid), polisakarida, senyawa fenolik, fitoaleksin, alkaloid (senyawa yang mengandung nitrogen), flavonoid, dan hidrokarbon (Teoh, 2015).

Tumbuhan umumnya menghasilkan senyawa fenol dan senyawa ini cenderung memiliki ciri berupa cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Golongan senyawa fenolik terbesar dalam tumbuhan adalah flavonoid dan tanin (Harborne, 1987).

Daun sirih hijau sering dimanfaatkan sebagai pengobatan untuk berbagai macam penyakit, seperti sariawan, masalah mata, diare, dan kondisi lainnya. Daun sirih hijau juga mengandung minyak atsiri sekitar 1- 4,25%, yang memberikan aroma khas pada daun sirih hijau. Beberapa zat yang terdapat dalam daun sirih hijau termasuk vitamin A, vitamin B, vitamin C, gula, fosfor, kalsium, dan pati. Minyak atsiri mengandung senyawa fenol dan turunannya, yang memiliki kemampuan untuk mengubah struktur protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri (Sripradha, 2014). Daun sirih hijau juga mengandung senyawa kavikol yang memberikan aroma khas dan menunjukkan efektivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa fenol (Sujono *et al.*, 2019).

2. Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan langkah awal dalam suatu penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa kimia atau metabolit sekunder yang ada dalam sampel uji (Kristianti *et al.*, 2008 dalam Fatmawati, 2019). Uji fitokimia dapat dilakukan dengan mendeteksi perubahan warna yang terjadi pada sampel uji menggunakan berbagai reagen warna (Fatmawati,

2019). Kelompok senyawa yang diuji dalam penelitian ini mencakup alkaloid, flavonoid, saponin, tanin.

a. Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang mengandung gugus nitrogen (N) yang terdapat pada cincin heterosiklik dan bersifat basa (Simaremare, 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Mitra *et al* (2022) telah menyebutkan bahwa spesies tanaman yang masih satu keluarga dengan daun sirih hijau yaitu *Piperaceae* sebagai sumber yang kaya akan alkaloid piperidin. Salah satu tanaman ini adalah *Piper nigrum* atau lada hitam, yang telah dideskripsikan sebagai sumber alkaloid piperidin esensial, termasuk piperidin dan turunannya yang tersubstitusi. *Piperlongumine* adalah alkaloid piperidin lain yang diisolasi dari *Piper longum* atau lada panjang India, yang termasuk dalam keluarga tanaman *Piperaceae* (Awasthee *et al.*, 2022). *Piper methysticum* adalah *Piperaceae* lain yang dilaporkan memiliki alkaloid piperidin. Aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh senyawa alkaloid diatas menunjukkan bahwa kandungan alkaloid dalam daun sirih hijau juga memiliki aktivitas antibakteri.

Berdasarkan struktur kerangkanya, alkaloid diklasifikasikan sebagai isokuinolin, kuinolin, indol, alkaloid piperidin yang masing-masing senyawa memiliki aktivitas antibakteri. Alkaloid merupakan salah satu produk alami yang tersebar luas di alam (Qiu *et al.*, 2014).

Hang *et al* (2023) telah melaporkan bahwa empat senyawa turunan alkaloid *N-fenetilbenzamida* baru yang diberi nama *piperbetamida* dan enam turunan *alilbenzena* yang diisolasi dari batang *Piper betle L.* terbukti menunjukkan aktivitas antimikroba yang potensial terhadap *S. flexneri*, *L. monocytognes*, *S. aureus*. Alkaloid lainnya sebagai antibakteri adalah *strychnine*, *16,17,19,20-tetrahydro-2,16-dehydro-18 deoxyisostrychnine* yang aktif terhadap *E. coli*, *S. aureus*, dan *Enterococcus faecalis* yang diisolasi dari daun *Psychotria pilifera*. Alkaloid tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri selektif terhadap *E. coli*, yang setara dengan sefotaksim dengan MIC 0,781 µg / mL (Liu *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian Liu *et al* (2016) bakteri *E.coli* termasuk bakteri gram negatif dan dapat dijadikan bakteri model dalam pengujian aktivitas antibakteri. Oleh karena itu bakteri gram negatif lainnya seperti

Citrobacter freundii memungkinkan dapat dihambat oleh kelompok metabolit sekunder alkaloid yang berasal dari daun sirih hijau.

b. Flavonoid

Flavonoid adalah salah satu kelas senyawa fenolik yang paling penting, flavonoid merupakan metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman dan ditemukan dalam bentuk non-glikosilasi (aglikon) atau bentuk glikosidik (melekat pada molekul gula, juga dikenal sebagai glikon) (Cosme *et al.*, 2020).

Senyawa fenolik yang diisolasi dari daun sirih hijau yaitu *hydroxychavicol* atau *4-allylpyrocatechols*, diuji terhadap *Streptococcus sanguinis*. Senyawa tersebut merupakan agen antibakteri moderat yang berfungsi dengan cara memblokir MurA yang menyebabkan gangguan pada dinding sel bakteri. Pada penelitian lainnya juga efektif melawan *C. albicans* secara keseluruhan pada konsentrasi minimum (400 µg/mL) (Kurnia *et al.*, 2020 ; Phumat *et al.*, 2020).

Berdasarkan penelitian oleh Ticona *et al* (2022) yang mengisolasi 6 senyawa flavonoid kalkon baru yang diambil dari spesies tanaman yang masih satu keluarga dengan daun sirih hijau yakni *Piper* atau

family Pipereaceae yaitu *Piper delineatum*, *Piper divaricatum* dan *Piper glabratum* didapatkan salah satu senyawa flavonoid yaitu *3,2'-dihydroxy-5,4',6'-trimethoxychalcone* memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap infeksi giardiasis.

c. Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif yang mampu menghasilkan busa yang stabil ketika dikocok selama ekstraksi tumbuhan dan uji skrining fitokimia. Glikosida yang terkandung dalam saponin memiliki kemampuan membentuk busa dalam air (Sangi *et al.*, 2008 dalam Illing *et al.*, 2017).

Saponin tipe *oleanane* dari *Paullinia pinnata* menunjukkan efek antibakteri pada *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. smartii* (Sun *et al.*, 2019). Kedua bakteri ini (*E. coli* dan *S. aureus*) termasuk bakteri gram negatif dan dapat dijadikan bakteri model dalam pengujian aktivitas antibakteri. Oleh karena itu bakteri gram negatif lainnya seperti *Citrobacter freundii* memungkinkan dapat dihambat oleh kelompok metabolit sekunder saponin yang berasal dari daun sirih hijau.

d. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang dapat larut dalam air dan memberikan rasa pahit pada tumbuhan (Bhalodia & Shukla, 2011).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Sharifah *et al* (2016) menyatakan bahwa senyawa *tannic acid*, *gallic acid*, *quercetin*, dan *naringin* yang diisolasi dari *Piper sarmentosum* ditemukan berfungsi sebagai agen antibakteri bakteri patogen beras dengan kisaran penghambatan 10,67-17,33 mm pada 100 mg / mL. *Piper sarmentosum* ini termasuk satu keluarga dengan *Piper betle*. Aktivitas antibakterinya menunjukkan bahwa tanin dalam daun sirih juga memiliki aktivitas antibakteri.

3. Bakteri *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii adalah bakteri gram-negatif yang termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini umumnya ditemukan di lingkungan seperti tanah, air, serta saluran pencernaan hewan dan manusia. *Citrobacter freundii* juga bersifat anaerob fakultatif, yang berarti dapat tumbuh baik dalam keberadaan atau ketiadaan oksigen (Lwin *et al.*, 2019).

Bakteri *Citrobacter freundii* menunjukkan positivitas terhadap sitrat dan memiliki perbedaan dengan

Salmonella karena tidak menginduksi dekarboksilasi lisin. Bakteri dari genus *Citrobacter* cenderung dapat melakukan fermentasi gula, menghasilkan enzim urease, enzim katalase, mengeluarkan gas H₂S, serta menunjukkan hasil positif pada uji sitrat, indol, dan *metil merah-voges proskauer* (Sayuti, 2016).

Citrobacter freundii adalah bakteri yang memiliki bentuk batang dengan panjangnya sekitar 1- 2 mm dan lebar 0,5 - 1,0 mm. Bakteri ini dilengkapi dengan satu flagel yang berfungsi untuk pergerakan. Pada pengamatan di bawah mikroskop, *Citrobacter freundii* akan tampak sebagai batang gram-negatif yang dapat diwarnai menggunakan metode pewarnaan gram (Fernández-Canigia *et al.*, 2019).

Citrobacter freundii telah tercatat memiliki tingkat resistensi antibiotik yang tinggi, termasuk resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik. Faktor ini menjadi signifikan karena dapat berperan dalam penyebaran gen resistensi antibiotik, baik dalam lingkungan umum maupun lingkungan klinis (Shin *et al.*, 2020).

4. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen kimia yang dapat larut dari suatu materi untuk memisahkannya dari zat yang tidak larut. Simplisia yang menjadi objek ekstraksi mengandung senyawa

yang tidak larut, seperti serat, karbohidrat, protein, dan komponen lainnya, sementara senyawa aktif yang dapat larut dapat dikelompokkan ke dalam kategori minyak atsiri, senyawa fenolik, alkaloid, dan sebagainya. Mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia memudahkan penentuan pilihan pelarut dan metode ekstraksi yang optimal. Selama proses ekstraksi, pelarut akan meresap ke dalam bahan tumbuhan padat dan melarutkan senyawa dengan tingkat polaritas yang sesuai (Tiwari *et al.*, 2011). Salah satu teknik ekstraksi yang umum digunakan adalah metode maserasi (Pratiwi, 2009).

Maserasi adalah teknik ekstraksi di mana bahan aktif direndam dalam pelarut dengan bahan aktif yang hendak diekstraksi. Proses maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dalam cairan penyari pada suhu ruangan. Kelebihan dari metode maserasi mencakup kemudahan pelaksanaan, penggunaan peralatan yang relatif sederhana, dan risiko kerusakan pada senyawa kimia yang sangat rendah (Tiwari *et al.*, 2011).

5. Pelarut

Pelarut merupakan substansi yang berperan sebagai medium untuk melarutkan zat lain. Keberhasilan dalam menentukan senyawa aktif dari bahan tumbuhan sangat

tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Karakteristik yang membuat suatu pelarut dianggap baik untuk ekstraksi meliputi tingkat toksisitas yang rendah, kemudahan menguap pada suhu ruangan, kecepatan dalam mengekstraksi senyawa kimia, kemampuan untuk mengawetkan, dan tidak menyebabkan disosiasi ekstrak (Tiwari *et al.*, 2011). Beberapa jenis pelarut yang umum digunakan dalam proses ekstraksi salah satunya yaitu alkohol. Etanol merupakan salah satu jenis alkohol yang biasanya digunakan untuk proses ekstraksi. Aktivitas antibakteri dari ekstrak tumbuhan menggunakan pelarut etanol cenderung lebih tinggi daripada ekstrak yang menggunakan pelarut air, hal ini disebabkan oleh keberadaan polifenol. Jumlah polifenol cenderung lebih tinggi ketika diekstraksi dengan etanol sebagai pelarut dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan air sebagai pelarut, karena etanol memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menembus membran sel tumbuhan. Meskipun metanol memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol, namun karena sifatnya toksik penggunaannya kurang cocok dalam proses ekstraksi (Tiwari *et al.*, 2011).

6. Antibakteri

Senyawa kimia baik yang berasal dari alam maupun sintetik yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri disebut sebagai antibakteri (Nurhayati *et al.*, 2020). Sebagai senyawa antibakteri yang efektif, senyawa tersebut harus memiliki sifat selektif yang berarti dapat merugikan parasit tanpa menimbulkan bahaya pada inangnya. Menurut Waluyo (2010), mekanisme kerja antibakteri dapat diklasifikasikan ke dalam empat cara, yaitu:

a. Penghambat sintesis dinding

Agen penghambat sintesis dinding sel bakteri merupakan jenis antibiotik yang berfungsi untuk menghambat proses pembentukan peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Hal ini menyebabkan kerusakan pada sel bakteri karena kurangnya lapisan pelindung yang diperlukan.

b. Pengubah fungsi membran plasma

Senyawa antibakteri yang berperan sebagai pengubah fungsi membran plasma memengaruhi peranan penting membran sel sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif. Membran sel juga terlibat dalam proses transport aktif dan mengendalikan susunan dalam sel. Sejumlah aktivitas biosintetik juga terjadi di dalam membran

sel. Zat antibakteri tertentu dapat menyebabkan kerusakan atau melemahkan satu atau lebih fungsi tersebut, yang pada gilirannya dapat menghambat pertumbuhan sel atau bahkan menyebabkan kematian sel.

c. Penghambat sintesis protein

Senyawa antibakteri yang berperan sebagai penghambat sintesis protein mengganggu dua proses utama dalam sintesis protein: transkripsi (proses transfer instruksi genetik dari DNA ke mRNA) dan translasi (proses penerjemahan kode-kode yang terdapat pada mRNA di dalam ribosom). Antibakteri dapat menghambat salah satu dari proses ini dengan menghalangi pelekatan tRNA dan mRNA ke ribosom.

d. Penghambat sintesis asam nukleat

Senyawa antibakteri yang bertindak sebagai penghambat sintesis asam nukleat dapat memengaruhi DNA, RNA, dan protein yang semuanya berperan sangat penting dalam proses kehidupan sel. Gangguan terhadap pembentukan atau fungsi zat-zat ini dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Bahan antibakteri tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan

cara mengikat enzim DNA dan RNA bakteri, sehingga menyebabkan penghambatan sintesis RNA bakteri (Pelczar dan Chan, 1988 dalam Ngaisah, 2010).

7. Media Pertumbuhan Bakteri

Media merupakan suatu substansi yang berfungsi sebagai tempat untuk menumbuhkan dan memperbanyak mikroorganisme, digunakan dalam proses isolasi dan pengujian sifat fisiologisnya. Beberapa syarat media yang dapat digunakan untuk mendukung pertumbuhan bakteri secara optimal meliputi:

a. Susunan makanan

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri atau jamur perlu memiliki susunan makanan yang mencakup vitamin, air, sumber karbon, mineral, sumber nitrogen, dan gas (Ngaisah, 2010).

b. Tekanan osmosa

Tekanan osmosis berperan signifikan dalam pertumbuhan sel mikroba karena sel mikroba dan media tempatnya tumbuh harus memiliki tekanan osmosis yang seimbang. Bakteri atau jamur biasanya tumbuh lebih baik dalam media yang isotonik, di mana tekanan osmosisnya serupa.

Media yang bersifat hipertonik dengan tekanan osmosis yang lebih tinggi, tidak ideal untuk mendukung pertumbuhan sel bakteri. Dalam kondisi hipertonik, sel bakteri akan mengalami hidrasi yang berlebihan mengakibatkan peristiwa plasmolisis di mana sel kehilangan air dan sitoplasma cenderung menyusut (Ngaisah, 2010).

c. Derajat keasaman (pH)

Mikroorganisme memerlukan media dengan pH yang netral agar dapat bertahan hidup, dengan pH sekitar 7 menjadi kondisi yang optimal untuk pertumbuhan bakteri (Ngaisah, 2010).

d. Temperatur

Mikroorganisme membutuhkan suhu optimal untuk pertumbuhannya, dan umumnya suhu sekitar 37°C dianggap optimal karena sesuai dengan suhu tubuh inangnya. Pada suhu ini, mikroorganisme dapat tumbuh dengan baik (Ngaisah, 2010).

e. Sterilitas

Sterilisasi media memegang peran krusial dalam mendukung pertumbuhan mikroorganisme karena keberadaan sterilitas membantu mengurangi risiko kontaminasi. Setiap langkah tindakan harus dilaksanakan secara aseptik dan penting untuk

memastikan bahwa alat-alat yang digunakan telah menjalani proses sterilisasi sebelumnya agar media yang dihasilkan benar-benar steril. Media yang digunakan pada penelitian ini meliputi media cair dan media padat.

Media cair digunakan untuk pembenihan mikroorganisme. Beberapa contoh media cair meliputi *Nutrient Broth* (NB), *Mac Conkey Broth* (MCB), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Pepton Dilution Fluid* (PDF), *Lactose Broth* (LB), dan lain-lain (Yusmaniar *et al.*, 2017).

Media padat umumnya mengandung agar dalam jumlah sekitar 15%. Media ini digunakan untuk isolasi dan mendapatkan biakan murni dari mikroba. Contoh media padat meliputi *Saboraud Dextrose Agar* (SDA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Plate Count Agar* (PCA), *Mueller Hinton Agar* (MHA). Berdasarkan berbagai jenis media pertumbuhan bakteri, peneliti memilih menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media MHA dikenal sebagai media uji sensitivitas antibiotik yang direkomendasikan oleh CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Pincus, 2011, yang disebutkan dalam Saputera *et al.*, 2019).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri adalah metode penentuan tingkat kerentanan bakteri terhadap senyawa antibakteri. Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan 2 metode yaitu:

a. Metode difusi

Metode difusi digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri dengan memanfaatkan kemampuan zat antibakteri untuk berdifusi dalam lempeng agar yang sebelumnya telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Hasil pengamatan mencakup pembentukan zona hambat atau zona bening, dan untuk mengukur aktivitasnya, diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong. Klasifikasi respon terhadap hambatan pertumbuhan dapat dilihat dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kategori Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri (Handayani *et al.*, 2017)

Diameter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan
0-3	Lemah
3-6	Sedang
>6	Kuat

Pada metode difusi ada 3 cara yang sering dilakukan (Sylvia, 2010) yaitu:

1) Cakram (*disc*)

Metode ini merupakan pendekatan yang umum digunakan dalam pengujian antibakteri. Cakram kertas saring (*paper disc*) difungsikan sebagai tempat zat antibakteri, dan selanjutnya ditempatkan pada medium agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil dari metode ini terlihat dalam bentuk zona bening di sekitar *paper disc*, menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Keunggulan metode difusi cakram meliputi lebih praktis, tidak memerlukan peralatan khusus, dan relatif ekonomis itulah sebabnya peneliti memilih metode ini.

2) Silinder

Metode difusi silinder melibatkan penempatan beberapa silinder pada medium agar yang sebelumnya telah diinokulasikan dengan bakteri, kemudian diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah proses inkubasi,

diamati apakah terdapat daerah hambatan di sekitar silinder yang menunjukkan pertumbuhan bakteri atau tidak.

3) Sumuran (*hole / cup*)

Difusi sumuran dilakukan dengan menciptakan lubang pada medium yang telah diinokulasikan dengan bakteri, dan selanjutnya lubang tersebut diisi dengan zat uji. Medium yang telah dilubangi dan diisi dengan zat uji diinkubasi menghasilkan zona hambat di sekitar lubang.

b. Metode dilusi

Metode dilusi melibatkan pencampuran zat uji antibakteri dengan media agar, yang kemudian diinokulasi dengan bakteri uji. Evaluasi hasil uji metode ini dapat dilakukan melalui penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Metode dilusi memiliki dua pendekatan, yaitu melalui pengenceran serial dalam tabung dan penipisan lempeng agar (Pratiwi, 2008).

9. Standar Kekeruhan *McFarland*

Standar *McFarland* merupakan larutan kimia yang terdiri dari barium klorida dan asam sulfat. Campuran kedua bahan tersebut menghasilkan endapan berupa

barium sulfat. Standar kekeruhan *McFarland* digunakan untuk mengestimasi jumlah bakteri dengan cara membandingkan kekeruhan suspensi uji dalam pengujian antimikroba. Salah satu standar *McFarland* yang umum digunakan adalah standar *McFarland* 0,5, yang menunjukkan perkiraan jumlah suspensi bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Asrisetya, 2019). Berikut jenis konsentrasi suspensi bakteri yang setara dengan kekeruhan standar *Mc Farland* dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Jenis Standar *Mc Farland* (Stahl *et al.*, 2016.

Cat No.	Mc Farland Standard	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Approximate Baterial Suspension /mL
TM50	0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
TM51	1,0	0,10	9,90	$3,0 \times 10^8$
TM52	2,0	0,20	9,80	$6,0 \times 10^8$
TM53	3,0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
TM54	4,0	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
TM55	5,0	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$
TM56	6,0	0,6	9,4	$1,8 \times 10^9$
TM57	7,0	0,7	9,3	$2,1 \times 10^9$
TM58	8,0	0,8	9,2	$2,4 \times 10^9$
TM59	9,0	0,9	9,1	$2,7 \times 10^9$
TM60	10,0	1,0	9,0	$3,0 \times 10^9$

10. Spektrofotometer *UV-Vis*

Spektrofotometer *UV-Vis* digunakan untuk mengukur nilai absorbansi suatu larutan. Pada pengujian antibakteri, uji KHM menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* untuk menghitung absorbansi larutan uji sebelum dan setelah inkubasi. Jika nilai absorbansi setelah inkubasi lebih tinggi daripada sebelum inkubasi, hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri masih dapat tumbuh. Sebaliknya, jika nilai absorbansi sebelum inkubasi lebih tinggi daripada nilai absorbansi setelah inkubasi, hal itu menandakan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat (Lolongan *et al.*, 2016).

Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Makolit *et al* (2017) menyatakan uji khm dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer *Uv-Vis* karena jika hanya melihat secara visual kekeruhan pada tabung reaksi sebelum dan sesudah di inkubasi maka hasilnya cenderung bersifat subjektif sehingga perlu di hitung nilai absorbansinya menggunakan instrumen spektrofotometer *Uv-Vis*.

B. Kajian Pustaka

Hasil penelitian Isnawati (2018) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau dengan metode maserasi memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* sehingga dapat digunakan sebagai pilihan pengobatan diare. Penelitian lainnya Hang *et al* (2023) menyatakan bahwa empat turunan *N-fenetilbenzamida* baru, yang diberi nama *piperbetamida* dan enam turunan *alilbenzena* diisolasi dari batang *Piper betle L.* Beberapa senyawa dari *N-fenetilbenzamida* terbukti memiliki efek penghambatan sembilan mikroorganisme termasuk lima gram-negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap beta-laktam spektrum luas). Das *et al* (2022) menguatkan bahwa aktivitas antibakteri daun sirih hijau juga berasal dari komponen minyak atsiri yaitu *Chavibetol*. *Chavibetoll* dalam daun sirih hijau tersebut terbukti menghambat beberapa strain bakteri yang resisten terhadap beberapa obat seperti *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter cloacae*. Aktivitas antibakteri daun sirih hijau dapat juga diketahui dari penelitian Prabhu *et al* (2022). Pada penelitian tersebut menyatakan bahwa ekstrak air dan etanolik *P. betle L.*

menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* dan *Klebsiella*.

Berdasarkan temuan Tran *et al* (2023) menyatakan bahwa ekstrak daun sirih dan minyak atsiri menunjukkan sifat antibakteri, antijamur, anti inflamasi, dan antioksidan yang kuat untuk berbagai aplikasi. Senyawa daun sirih juga terbukti menghambat pertumbuhan mikroorganisme termasuk bakteri gram positif, bakteri gram negatif, bakteri yang kebal obat, dan jamur, yang menyebabkan penyakit menular yang parah. Metode ekstraksi dan fitokimia daun sirih dirangkum untuk menjelaskannya karakterisasi. Aktivitas antimikroba dari konstituen utama daun ini, seperti hidroksi kavikol, eugenol, *chavibetol*, dan *chavicol* juga disebutkan untuk strain mikroba.

Penelitian yang dilakukan oleh Ermawati *et al* (2020) menyatakan bahwa aktivitas antibakteri *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* oleh ekstrak daun sirih dapat menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri tersebut. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Gloria *et al* (2021) tentang menyatakan bahwa ekstrak daun sirih hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri dihasilkan pada konsentrasi 25%

ekstrak daun sirih dan ekstrak jeruk nipis 50% efektif melawan *E. coli*.

Penelitian yang dilakukan oleh Nayaka *et al* (2021) menyatakan bahwa ekstrak daun sirih, minyak atsiri, sediaan, dan isolat dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan membunuh berbagai bakteri gram-negatif dan gram-positif serta spesies jamur, termasuk yang resisten terhadap berbagai macam obat dan menyebabkan penyakit infeksi yang serius. Daun sirih hijau menunjukkan efisiensi yang tinggi pada bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*.

P. betle menunjukkan aktivitas antibakteri yang luar biasa dibandingkan dengan tanaman lainnya. Penelitian sebelumnya membandingkan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 12 tanaman dari Filipina. Ekstrak etanol *Piper betle* adalah satu-satunya tanaman yang menunjukkan aktivitas bakterisidal yang kuat terhadap semua bakteri yang diuji (Valle *et al.*, 2015; Phumat *et al.*, 2017).

Penelitian yang dilakukan oleh Ihuma *et al* (2022) tentang aktivitas antimikroba dari ekstrak daun *Ficus sycomorus Linn.* pada *Helicobacter pylori* dan *Citrobacter*

freundii menyatakan bahwa terbukti menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat pada kedua bakteri tersebut. Sejalan dengan penemuan mengenai aktivitas antibakteri tanaman obat terhadap bakteri *Citrobacter freundii* yang dilakukan oleh Tkachenko *et al* (2016) temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol yang diperoleh dari daun *Ficus drupacea*, *F. septica*, *F. deltoidea* serta *F. hispida*, *F. mucoso*, *F. pumila*, *F. craterostoma* menunjukkan aktivitas antibakteri yang menguntungkan terhadap *C. freundii*.

Penelitian yang dilakukan oleh Kaveti *et al* (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih lebih efektif daripada ekstrak air dengan zona hambat yang lebih besar. Ekstrak etanol pada 50-100 µg / mL memiliki zona hambat maksimum (8,9-11,0 mm) pada *E. coli* dan penghambatan pada *P. aeruginosa* (<7,2 mm). Sementara itu, ekstrak air pada 50 µg / mL tidak aktif menghambat pertumbuhan bakteri.

Kelompok metabolit skunder dalam daun sirih hijau terdiri dari senyawa flavonoid, tannin, alkaloid, saponin dan terpenoid (Nisyak *et al.*, 2022). Keempat kelompok metabolit skunder tersebut bersifat polar sehingga dalam penelitian ini digunakan pelarut etanol. Harapannya banyak senyawa dari keempat kelompok metabolit

sekunder tersebut terekstrak dan memungkinkan memiliki aktivitas antibakteri (Lezoul *et al.*, 2020).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia organik dan laboratorium mikrobiologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang yang dilakukan pada bulan Agustus – November 2023.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *rotary evaporator* (DLAB), *hotplate* (Benchmark), autoklaf (Hirayama), *spektrofotometer UV-Vis* (Thermoscientific), oven (Memmert), inkubator (Memmert), *Laminar Air Flow* (LAF) (ESCO), *vortex* (BIO-RAD BR-2000), neraca analitik (Mettler Toledo), alat destilasi, blender, gelas beaker, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung reaksi, ose, korek api, pulpen, cawan petri, pipet ukur, gelas ukur, pinset, penggaris, bunsen, batang pengaduk, mikropipet, *glass drill*, jangka sorong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun sirih hijau yang diambil dari Dukuh Pranak Desa Lau Kec. Dawe Kab. Kudus Prov. Jawa tengah,

bakteri *Citrobacter freundii* yang diperoleh dari Klinik Permata Utama Semarang, akuades, etanol 96%, NaCl 0,9% fisiologis, bubuk *Nutrient Agar* (NA), bubuk MHA (*Mueller Hinton Agar*), bubuk NB (*Nutrient Broth*), kertas saring, aluminium foil, HCl pekat, reagen *Dragendroff*, besi (III) klorida 1%, serbuk magnesium, asam sulfat 1%, barium klorida 1%.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Simplisia

Daun sirih hijau yang telah dicuci bersih dikeringkan pengeringan dibawah sinar matahari langsung dan diangin anginkan. Daun sirih hijau kering dilakukan penghalusan menjadi bubuk menggunakan blender.

2. Ekstraksi Daun Sirih Hijau

Sebanyak 144 g bubuk daun sirih hijau ditimbang. Bubu daun sirih di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang telah didestilasi selama 24 jam per harinya selama 5 hari di tempat yang terlindungi sinar matahari. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C dan menghasilkan ekstrak kental daun sirih hijau (Nanda *et al.*, 2020).

$$\% \text{ kadar ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{bobot sampel yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

..... (3.1) (Azizah *et al.*, 2020)

3. Uji Fitokimia

a. Alkaloid

Ekstrak etanol daun sirih hijau sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 5 mL dimasukkan ke tabung reaksi kemudian ditambah reagen *Dragendroff* 1-2 tetes. Larutan tersebut ditambahkan 0,5 mL HCl 1%. Larutan positif senyawa alkaloid akan ditandai perubahan warna larutan menjadi merah atau jingga (Kirana Jati *et al.*, 2019).

b. Tanin

Sejumlah 0,1 g ekstrak daun sirih hijau dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 5 mL dan diberi tambahan 2 tetes FeCl_3 1% . Keberadaan senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan atau hijau kehitaman (Angelina *et al.*, 2015).

c. Saponin

Sejumlah 0,1 g ekstrak daun sirih hijau dilarutkan dengan 5 ml akuades dan dikocok selama 10 detik. Didiamkan selama 10 menit dan ditambahkan 1

tetes HCl 2N. Keberadaan senyawa saponin dapat ditandai melalui pembentukan busa yang stabil setelah didiamkan selama 10 menit dengan tinggi busa lebih dari 1 cm. (Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Flavonoid

Ekstrak daun sirih hijau sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 5 mL etanol 96%. Dicampurkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat. Keberadaan flavonoid dapat diidentifikasi melalui perubahan warna menjadi kemerahan pada larutan (Alfonsius Wijaya *et al.*, 2014).

4. Uji Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian dicuci dan dikeringkan, setelah kering dibalut dengan kertas koran. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf, suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Ose dan pinset disterilkan melalui pemijaran menggunakan bunsen (Ratnah *et al.*, 2022).

b. Pembuatan Media NA

Bubuk NA seberat 2 g ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga benar-benar larut.

Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Ratnah *et al*, 2022).

c. Pembuatan Media MHA

Dalam erlenmeyer dimasukkan sebanyak 20 g bubuk dan dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hot plate*. Media tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Ratnah *et al*, 2022).

d. Pembuatan Media NB

Bubuk NB dipersiapkan dengan menimbang 3,25 g NB, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 500 mL, dan dicampurkan dengan 250 mL aquadest. Campuran larutan dipanaskan menggunakan *hot plate*, diaduk secara teratur hingga homogen dan mencapai titik didih. Sterilisasi media dilakukan sterilisasi dengan memasukkan ke dalam autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Media NB dibiarkan selama 24 jam (Mahmudah & Atun, 2017).

e. Pembuatan NaCl Fisiologis

Larutan fisiologis NaCl pada konsentrasi 0,9% disiapkan dengan melarutkan 0,9 g NaCl dalam 100 ml akuades lalu disterilisasi dengan menggunakan

autoklaf selama 20 menit di suhu 120°C (Lestari *et al.*, 2016).

f. Pembuatan Larutan *Mc Farland*

Larutan *Mc. Farland* 0,5 dibuat dengan mencampurkan sejumlah 0,05 mL BaCl₂ 1% dalam akuades dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1%. Campuran larutan yang sudah dibuat disimpan di tempat tanpa paparan sinar matahari langsung (Aviany & Pujiyanto, 2020).

g. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Citrobacter freundii* diambil 1 ose dari stok murni lalu diinokulasi ke permukaan media miring nutrisi agar menggunakan metode *streak langsung (zig-zag)* dari bagian atas secara rapat ke bagian bawah, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nuria *et al.*, 2021)

h. Penyiapan Suspensi Bakteri

Bakteri *Citrobacter freundii* diambil sebanyak 1-2 ose dari media miring stok kultur kemudian disuspensikan dalam pelarut NaCl 0,9% 10 mL dan dikocok hingga homogen hingga larutan terlihat keruh (Rahman Wahid *et al.*, 2020). Tingkat kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan secara visual dengan standar *Mc Farland* 0,5 (kepadatan sel

bakteri 1×10^8 sel/mL) (Lopez, 2003 dalam Widiastomo, 2013). Uji kekeruhan suspensi bakteri diukur dengan instrumen spektrofotometer *UV-Vis* dengan panjang gelombang 625 nm (setara dengan standar 0,5 *Mc Farland*), sehingga menghasilkan absorbansi antara 0,08 hingga 0,13 ($1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL) (Lisdiana *et al.*, 2022).

i. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Uji Daya Hambat Menggunakan Metode Cakram

Ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 2%, 4% dan 8% menggunakan rumus b/v (Ratnah *et al.*, 2022). Cawan petri yang sudah steril diisi dengan *Mueller Hinton Agar* (MHA) sekitar ± 10 mL dibiarkan mengeras. Kertas saring direndam dalam ekstrak etanol daun sirih hijau 2%, 4%, 8% dan etanol 96% sebagai kontrol negatif. Diambil bakteri uji sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet 100-1000 μ L. Bakteri diusapkan secara merata pada permukaan media MHA menggunakan *glass drill* dan dibiarkan selama ± 15 menit. Kertas saring yang telah direndam dan ditiriskan, ditempatkan menjadi empat bagian . Diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat diamati

dan diukur. Pengujian ini direplikasi sebanyak 3 kali. Hasilnya berupa zona bening disekitar cakram/kertas saring yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Pengukuran zona bening yang dilakukan menggunakan jangka sorong dengan menghitung rata-rata dari empat sisi zona bening (Aviany & Pujiyanto, 2020).

2) Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Makolit *et al*, (2017), cara untuk uji KHM adalah sebagai berikut :

- Tabung 1 yaitu larutan konsentrasi 100%. Larutan berisi 0,5 g ekstrak kental daun sirih hijau dan 0,5 mL media cair NB.
- Tabung 2 yaitu larutan konsentrasi 50%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 1.
- Tabung 3 yaitu larutan konsentrasi 25%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 2.
- Tabung 4 yaitu larutan konsentrasi 12,5%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 3.

- Tabung 5 yaitu larutan konsentrasi 6,25%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 4.
- Tabung 6 yaitu larutan konsentrasi 3,125%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 5.
- Tabung 7 yaitu larutan konsentrasi 1,563%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 6.
- Tabung 8 yaitu larutan konsentrasi 0,781%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL tabung 7.
- Tabung 9 yaitu larutan konsentrasi 0,391%. Larutan berisi 0,5 mL media cair NB dan 0,5 mL larutan tabung 8.
- Tabung 1 – 9 diisi suspensi bakteri sebanyak 0,5 mL.
- Tabung K(+) (bakteri uji kekeruhannya setara *Mc Farland*).
- Tabung K(-) (100% ekstrak etanol daun sirih hijau).

Tabung perlakuan sebelum inkubasi dan sesudah inkubasi di ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Dicatat

nilai pada spektrofotometer *UV-Vis* untuk tabung sebelum inkubasi dan tabung sesudah inkubasi (Makolit *et al.*, 2017).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Daun Sirih Hijau

Sampel daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang digunakan pada penelitian didapatkan dari Dukuh Meranak Desa Lau Kec. Dawe Kab. Kudus Prov. Jawa Tengah yang diambil pada bulan Agustus 2023. Pembuatan simplisia diawali dengan daun sirih hijau yang dicuci bersih untuk membersihkan kontaminasi fisik. Simplisia yang sudah bersih dikeringkan dengan pengeringan penyinaran matahari secara langsung dan pengeringan udara. Daun sirih hijau yang sudah kering kemudian di haluskan dengan blender, di mana semakin kecil ukuran simplisia atau luas permukaan serbuknya akan semakin memperluas kontak dengan larutan penyari sehingga terjadi peningkatan interaksi bersama pelarut (Sineke *et al.*, 2016).

Metode yang digunakan untuk ekstraksi daun sirih hijau yaitu maserasi. Sebanyak 144 g serbuk daun sirih hijau dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang telah di destilasi tujuannya agar lebih murni dan ini juga membantu mengurangi kandungan air dalam etanol. Proses maserasi dilakukan dengan lima kali pengulangan. Prinsip ekstraksi atau proses penyarian dalam maserasi

melibatkan pemecahan dinding sel dan membran sel yang disebabkan oleh perbedaan tekanan antara bagian dalam dan luar sel, hasilnya metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma sel larut dalam larutan penyari atau pelarut organik. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi disesuaikan dengan kelarutan atau polaritas bahan aktif pada bahan alami untuk mencapai efektivitas yang tinggi (Handoyo, 2020).

Maserat yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan *rotatory evaporator* dan dipanaskan dengan *hot plate* hingga terbentuk ekstrak kental, sebagaimana terlihat pada gambar 4.1. Ekstrak ini memiliki warna hijau pekat dan tekstur yang agak lengket, yang bercampur dengan minyak berwarna kuning yang diyakini mengandung minyak atsiri, suatu senyawa yang terdapat dalam daun sirih hijau. Jumlah total ekstrak kental etanol dari daun sirih hijau mencapai 17,24 g, dengan rendemen sebesar 12,00%.



Gambar 4.1 Ekstrak Kental Daun Sirih Hijau

Maserasi merupakan teknik ekstraksi di mana sampel atau bahan tumbuhan direndam dalam pelarut organik pada suhu ruang. Maserasi berguna dalam mengisolasi komponen alami yang tidak dapat bertahan terhadap suhu tinggi. Etanol dipilih sebagai pelarut pada proses maserasi ini karena memiliki kelebihan yakni tidak merusak komponen daun yang dilihat dengan tidak adanya perubahan warna, ekonomis yang dapat digunakan pada ekstraksi dari sampel makanan, nilai titik didih yang cukup rendah dan cenderung lebih aman untuk digunakan (Azis *et al.*, 2014).

B. Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia pada ekstrak etanol 96% dari daun sirih hijau menunjukkan adanya flavonoid, tannin, dan alkaloid. Berikut tabel 4.1 yang berisi hasil uji fitokimia daun sirih hijau.

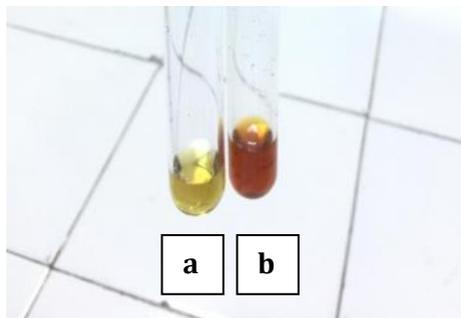
Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Flavonoid	+	Kemerahan/merah bata
Tannin	+	Hijau tua
Saponin	-	Muncul busa tetapi tinggi busa kurang dari 1 cm

Temuan fitokimia dalam penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya. Marfu'ah *et al* (2021) bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, tannin, dan alkaloid. Penelitian ini menekankan bahwa metode ekstraksi, seperti maserasi dapat memengaruhi hasil uji fitokimia. Maserasi sebagai metode yang digunakan terbukti efektif untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder dari daun sirih hijau.

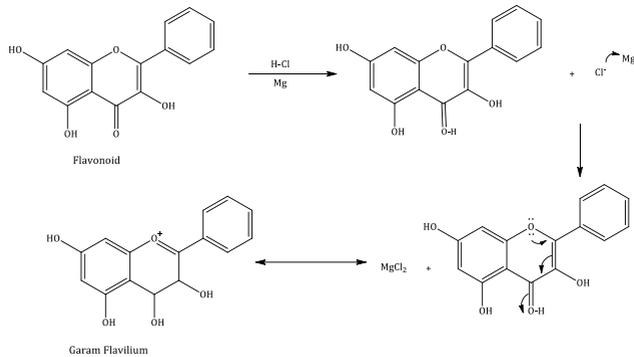
Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak etanol dari daun sirih hijau menunjukkan hasil positif untuk kandungan flavonoid karena perubahan warna larutan menjadi kemerahan. Terlihat pada gambar 4.2 menunjukkan perubahan warna larutan uji flavonoid. Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Widyaningtyas *et al* (2014) yang menyimpulkan bahwa daun sirih hijau mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid umumnya lebih mudah larut dalam air atau pelarut polar karena terikat pada gugus gula (Sangi *et al.*, 2008). Arifin dan Ibrahim (2018) menyatakan bahwa flavonoid dalam tumbuhan dapat menghasilkan berbagai warna seperti kuning, merah, oranye, biru, dan ungu pada

buah, bunga, dan daun. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih hijau dimungkinkan memiliki sifat antibakteri karena mengandung senyawa fenolik *hydroxychavicol* atau *4-allylpyrocatechols* yang terbukti merupakan salah satu senyawa agen antibakteri moderat yang berfungsi dengan cara memblokir MurA yang menyebabkan gangguan pada dinding sel bakteri (Kurnia *et al.*, 2020).



Gambar 4.2 Hasil Uji Flavonoid (a) sebelum reaksi (b) sesudah reaksi

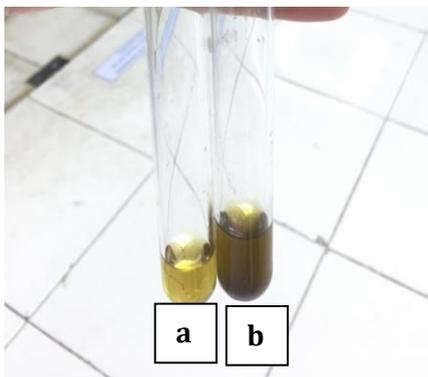
Penambahan HCl pekat pada larutan menyebabkan terjadinya hidrolisis glikosida flavonoid yang biasanya ada pada tanaman menjadi aglikon flavonoid. Ketika suasana dalam keadaan asam Mg bereaksi dengan HCl membentuk ion Mg^{2+} dan gas H_2 , ion Mg^{2+} berikatan dengan flavonoid menghasilkan senyawa kompleks dan menyebabkan perubahan warna menjadi kemerahan (Nugrahani *et al.*, 2016). Reaksi uji flavonoid terdapat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Reaksi Uji Flavonoid (Kurang *et al*, 2020)

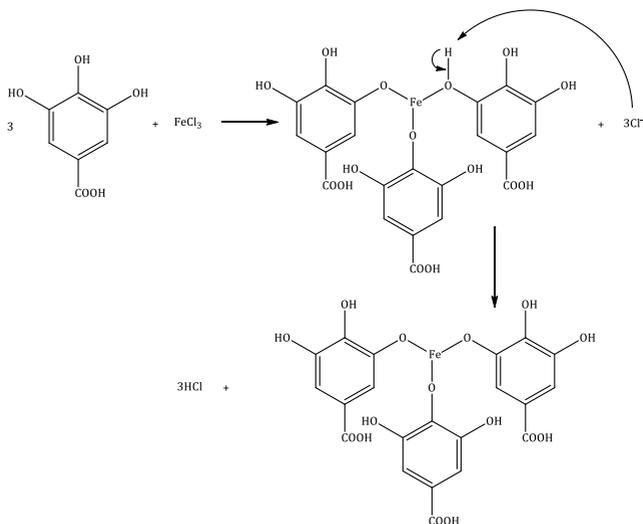
Ekstrak etanol dari daun sirih hijau juga menunjukkan hasil positif untuk kandungan senyawa tannin karena larutan sampel berubah warna menjadi hijau kehitaman. Perubahan warna uji tannin terdapat dalam gambar 4.4. Definisi tannin sebagai senyawa fenolik dengan rasa sepat hingga pahit dinyatakan oleh Julianto (2019). Temuan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Widyaningtias et al (2014), yang mengonfirmasi bahwa daun sirih hijau mengandung senyawa tannin. Tannin sebagai golongan senyawa fenolik, cenderung larut dalam air dan memiliki sifat yang bersifat polar (Harborne, 1987). Tannin dalam ekstrak etanol daun sirih hijau dimungkinkan juga memiliki sifat antibakteri karena adanya

senyawa *tannic acid*, *gallic acid*, *quercetin*, dan *naringin* yang terbukti berfungsi sebagai agen antibakteri (Sharifah *et al.*, 2016).



Gambar 4.4 Hasil Uji Tanin (a) sebelum reaksi (b) setelah reaksi

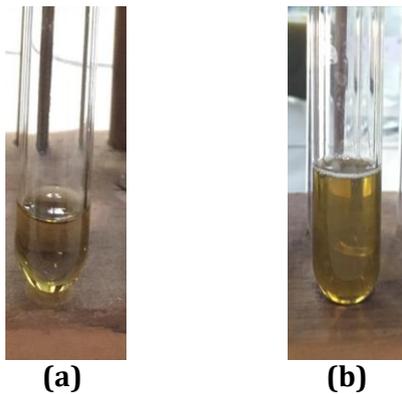
Uji tanin dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 yang berinteraksi dengan salah satu gugus hidroksil pada tanin. Reaksi ini mengakibatkan hidrolisis gugus tanin, menghasilkan perubahan warna biru kehitaman, sedangkan tanin yang terkondensasi dapat menunjukkan warna hijau kehitaman (Sangi *et al.*, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun sirih hijau mengandung gugus fenol. Adanya fenol menandakan keberadaan senyawa tannin, karena tannin merupakan senyawa polifenol (Ergina *et al.*, 2014). Reaksi uji tannin terdapat dalam gambar 4.5.



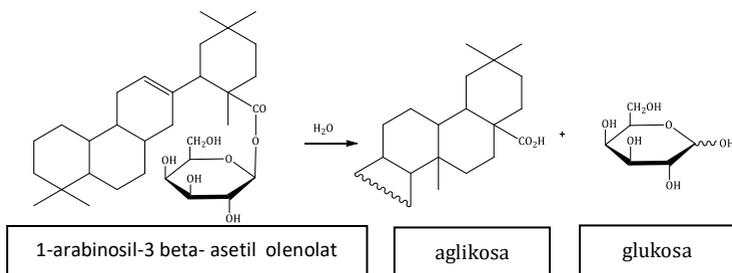
Gambar 4.5 Reaksi Uji Tannin (Simaremare, 2014)

Ekstrak etanol dari daun sirih hijau menunjukkan hasil negatif dalam uji saponin. Indikasi ini dikarenakan tinggi busa yang kurang dari 1 cm setelah 10 menit. Terlihat larutan sampel pada gambar 4.6. Pada gambar menunjukkan setelah 10 menit busa yang dihasilkan tetap ada walaupun sedikit dengan tinggi kurang dari 1 cm. Saponin mengandung glikosil yang berperan sebagai gugus polar, serta triterpenoid dan steroid sebagai gugus nonpolar, keduanya memiliki sifat aktif di permukaan sehingga dapat menyebabkan terbentuknya busa. Pada

saat dikocok, busa terbentuk sebagai hasil dari struktur gugus polar yang menghadap ke luar dan gugus nonpolar yang menghadap ke dalam, menciptakan tampilan busa. Prinsip terbentuknya busa pada pengujian saponin mengindikasikan keberadaan glikosida yang dapat menghasilkan busa dalam air, kemudian melalui hidrolisis, glukosa dan senyawa lainnya dapat terbentuk (Ikhwan Habibi *et al.*, 2018). Reaksi uji saponin terlihat dalam gambar 4.7.

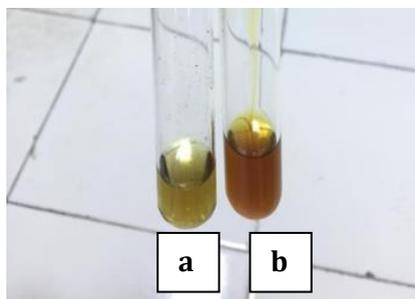


Gambar 4.6 Hasil Uji Saponin (a) sebelum reaksi (b) sesudah reaksi



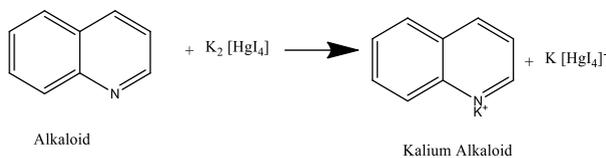
Gambar 4.7 Reaksi Uji Saponin (Marliana *et al*, 2005)

Uji fitokimia dalam penelitian ini juga menunjukkan hasil positif untuk kandungan senyawa alkaloid karena larutan berubah warna menjadi jingga kemerahan. Perubahan warna larutan uji alkaloid terdapat pada gambar 4.8. Alkaloid memiliki afinitas terhadap pelarut etanol karena sifat polar dari senyawa alkaloid (Sangi *et al*, 2008). Pada salah satu senyawa alkaloid ekstrak etanol daun sirih dimungkinkan mengandung senyawa turunan *N-fenetilbenzamida* dan turunan *alilbenzena* yang memiliki aktivitas antimikroba (Hang *et al*, 2023).



Gambar 4.8 Hasil Uji Alkaloid (a) sebelum reaksi (b) sesudah reaksi

Penambahan HCl dalam uji alkaloid dilakukan karena alkaloid bersifat basa, sehingga pelarut asam ditambahkan untuk mengubah warna larutan menjadi merah atau jingga (Marliana *et al.*, 2005). Senyawa alkaloid dalam ekstrak menunjukkan warna merah kecoklatan ketika bereaksi dengan *reagen Dreagendroff*. Perubahan warna ini disebabkan oleh pergantian ligan, di mana nitrogen dengan pasangan elektron bebas pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ . Hasil reaksi ini menghasilkan kompleks kalium-alkaloid, yang mengubah larutan menjadi warna merah kecoklatan dan membentuk endapan (Ikhwan Habibi *et al.*, 2018). Reaksi uji alkaloid terdapat dalam gambar 4.9.



Gambar 4.9 Reaksi Uji Alkaloid (Illing *et al.*, 2020)

Beberapa senyawa metabolit sekunder yang diekstraksi dari tumbuhan mungkin berperan sebagai agen antibakteri alami. Setiap senyawa memiliki mekanisme antibakteri yang khas untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, mengubah fungsi membran sitoplasma, menghambat metabolisme energi, mengurangi perlekatan sel dan pembentukan biofilm, menghambat porin pada membran sel, serta mengganggu permeabilitas dinding dan membran sel sehingga menyebabkan lisis sel bakteri (Gong *et al.*, 2021).

Tanin bekerja dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri, mengendapkan protein, dan mengikat protein untuk menghambat pembentukan dinding sel bakteri (Othman *et al.*, 2018). Tanin juga memiliki efek antibakteri

melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi fungsi materi genetik (Puspodewi, 2015).

Saponin memiliki efek antibakteri dengan cara mengganggu stabilitas membran sel bakteri dan menyebabkan lisis sel bakteri (Tenda *et al.*, 2017). Saponin juga meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri serta mengubah struktur dan fungsi membran, mengakibatkan denaturasi protein membran dan kerusakan serta lisis membran sel (Imrawati, 2016).

Alkaloid mencegah pertumbuhan dan merusak bakteri dengan cara mengganggu permeabilitas dinding dan membran sel, menghambat sintesis asam nukleat dan protein, serta menghambat metabolisme sel bakteri sehingga menyebabkan lisis. Alkaloid dapat bertindak sebagai inhibitor dalam proses biosintesis protein pada sel bakteri (Casciaro *et al.*, 2020).

C. Uji Daya Hambat Metode Cakram

Pada penelitian ini metode cakram digunakan sebagai uji daya hambat bakteri dengan tujuan untuk mengetahui Diameter Daerah Hambat (DDH) pertumbuhan bakteri di sekitar kertas cakram atau *paper disc*. Pengujian ini bertujuan untuk menilai sensitivitas bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai uji yang dinyatakan dalam bentuk diameter zona hambat atau

bunuh (Lalamentik *et al.*, 2017). Zona hambat ini biasanya tampak sebagai daerah bening di sekitar *paper disc*. Sebelum menentukan DDH, bakteri uji perlu disiapkan melalui peremajaan, di mana bakteri diinokulasi dari stok murni ke media miring NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Proses inkubasi dilakukan untuk memastikan bakteri tumbuh optimal dan berada dalam keadaan segar atau muda, serta untuk mengurangi risiko kontaminasi dari luar.

Bakteri yang telah mengalami peremajaan dibuat menjadi suspensi dengan mencampurkan beberapa ose bakteri dari media miring dengan NaCl 0,9% steril. Suspensi bakteri kemudian dihomogenkan melalui pengadukan *vortex* dan kekeruhannya diatur sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5 (Prihatiningtyas *et al.*, 2018). Media MHA dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan sejenak untuk mengeras. Proses penuangan media agar dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk meminimalkan risiko kontaminasi, setelah media mengeras cawan petri dibagi menjadi empat bagian yang diberi label untuk menandai variasi konsentrasi masing-masing. Sebanyak 100 µL suspensi bakteri dituangkan ke dalam media agar MHA yang telah mengeras diaplikasikan secara merata menggunakan *glass drill*. Cawan petri yang

telah diisi suspensi bakteri kemudian ditempatkan dengan kertas cakram, masing-masing berisi kontrol (etanol 96%) dan larutan ekstrak etanol daun sirih hijau dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 8%. Pengujian dengan cakram dalam penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk memastikan hasil yang lebih akurat. Hasil uji cakram dapat dilihat pada lembar lampiran 3 uji cakram.

Cawan petri diinkubasi selama 24 jam dan zona bening terbentuk. Zona bening yang terlihat diukur menggunakan jangka sorong. Hasil uji cakram antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri *Citrobacter freundii* dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Daya Hambat Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau terhadap Bakteri *Citrobacter freundii* Metode Cakram

Replikasi	Diameter Zona Hambat Pertumbuhan (mm)			
	2%	4%	8%	K(-)
1	9,04	8,04	5,64	2,6
2	10,14	5,45	8,09	0,00
3	4,11	6,41	6,44	0,00
Rerata	7,7±3,21	6,63 ±1,30	6,72±1,25	0,87±1,50

Daya hambat ini terbukti melalui daerah zona bening pada *Muller Hinton Agar* (MHA) yang sebelumnya diisi oleh bakteri *Citrobacter freundii* dan kemudian diberikan ekstrak etanol daun sirih hijau pada konsentrasi berbeda, yaitu 2%, 4%, dan 8%. Kekuatan daya hambat bakteri dilakukan berdasarkan rentang daya hambat antibakteri, yang ada dalam tabel 2.1. Hasil variasi konsentrasi 2% menunjukkan rata-rata diameter zona hambat yang paling besar yakni 7,7 mm. Konsentrasi 4% dan 8% menunjukkan rata-rata diameter zona hambat masing-masing sebesar 6,63 mm dan 6,72 mm. Ketiga konsentrasi ini berdasarkan respons dalam menghambat pertumbuhan bakteri, diklasifikasikan sebagai kategori kuat. Sebagai kontrol, etanol 96% digunakan dalam penelitian ini, menunjukkan respons yang lemah terhadap hambatan pertumbuhan bakteri dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 0,87 mm. Kesimpulan dari penelitian ini menegaskan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii*. Pada penelitian ini semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun sirih hijau tidak menunjukkan hasil diameter zona hambat yang semakin besar pula nilainya.

Dalam penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak etanol daun sirih pada konsentrasi 2% (konsentrasi terkecil)

menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 8%. Sumarno (2000) menyebutkan bahwa beberapa faktor dapat mempengaruhi diameter zona hambat pertumbuhan bakteri, salah satunya adalah kekeruhan suspensi bakteri. Jika suspensi kurang keruh maka diameter zona hambat cenderung lebih besar, sebaliknya jika suspensi lebih keruh diameter zona hambat akan semakin kecil. Dalam mengukur kekeruhan suspensi disarankan menggunakan *nephelometer* agar kekeruhan suspensi bakteri dapat diukur secara lebih akurat. Pada penelitian ini pengukuran kekeruhan suspensi dilakukan secara visual.

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Zeniusa *et al* (2019), suhu merupakan variabel lain yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat. Pada penelitian Zeniusa *et al* (2019) menyimpulkan bahwa suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri selama proses inkubasi adalah sekitar 35°C. Penumpukan lebih dari dua cawan petri selama proses inkubasi dapat menyebabkan ketidakmerataan diameter zona hambat karena *plate* yang berada di tengah tidak mendapatkan suhu optimal oleh karena itu inkubasi pada suhu di atas 35°C juga dapat mengakibatkan penurunan efisiensi difusi ekstrak. Dalam penelitian ini, suhu inkubasi yang digunakan adalah 37°C.

Media juga memiliki peran dalam mempengaruhi diameter zona hambat pertumbuhan bakteri. Ketebalan agar yang dianggap efektif adalah sekitar ± 4 mm. Jika ketebalan kurang dari 4 mm difusi ekstrak akan lebih cepat sementara jika lebih dari 4 mm, difusi ekstrak akan menjadi lambat (Zeniusa *et al.*, 2019). Dalam penelitian ini, tidak dilakukan pengukuran langsung pada media agar, sehingga tidak dapat dipastikan ketebalan MHA yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat konsentrasi ekstrak etanol daun sirih hijau tidak selalu sejalan dengan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii* yang dihasilkan. Ekstrak etanol daun sirih hijau pada konsentrasi 2% menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih efektif daripada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 4% dan 8%. Temuan ini sesuai dengan penelitian Dewi (2010) yang menyatakan bahwa konsentrasi yang lebih tinggi tidak selalu memberikan efek penghambatan yang lebih kuat, melainkan dapat menghasilkan efek penghambatan yang lebih lemah dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

Salah satu penyebab hal tersebut dapat dijelaskan oleh Handajani dan Purwoko (2008) yakni kurangnya kemampuan difusi ekstrak ke dalam media. Proses difusi

ekstrak dapat dipengaruhi oleh tingkat pengenceran. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, kelarutannya cenderung menurun (menjadi lebih kental seperti *gel*) sehingga dapat menghambat laju difusi bahan aktif ekstrak ke dalam media akibatnya kemampuan ekstrak dengan konsentrasi tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii* dapat berkurang. Bakteri *Citrobacter freundii* merupakan bagian dari golongan bakteri gram negatif dengan struktur dinding sel yang memiliki porin dan lipopolisakarida. Sifat dari porin itu sendiri yakni hidrofilik menyebabkan molekul molekul ekstrak etanol daun sirih sulit masuk ke dalam sel bakteri Gram negatif (Darwish & Aburjai, 2010).

Menurut Yanti & Mitika (2017), korelasi antara diameter zona hambat dengan kenaikan konsentrasi tidak selalu berbanding lurus dikarenakan pada media agar kecepatan difusi senyawa antibakteri berbeda. Selain itu, konsentrasi dan jenis dari senyawa juga berpengaruh besar terhadap pembentukan diameter zona hambat yang berbeda dan berpengaruh terhadap aktivitasnya.

Dengan adanya penjelasan penyebab berbanding lurusnya hasil daya hambat dan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih dapat dikatakan hasil pada diameter daya hambat uji antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau

terhadap bakteri *Citrobacter freundii* menggunakan metode cakram kurang valid. Pada data tabel 4.2 menunjukkan hasil yang fluktuatif yang artinya hasil berubah-ubah dan tidak stabil. Dari ketiga replikasi tidak menunjukkan hasil yang menunjukkan data stabil, sehingga masih harus dilakukan penelitian lebih lanjut. Walaupun demikian ekstrak etanol daun sirih hijau menunjukkan aktif terhadap bakteri *Citrobacter freundii*. Aktivitas antibakteri ini kemungkinan disebabkan oleh adanya kelompok metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid dan tanin.

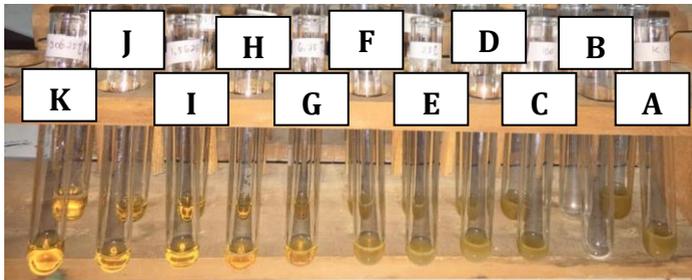
D. Uji KHM

Uji KHM dilakukan menggunakan metode dilusi cair dengan menggunakan *Nutrient Broth* (NB) sebagai media. Metode ini melibatkan pembuatan seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang kemudian dicampur dengan bakteri uji (Fitriana *et al.*, 2019). Keunggulan dari metode dilusi ini terletak pada kemampuannya menggunakan satu konsentrasi agen antimikroba untuk menguji beberapa mikroba uji, sesuai dengan penjelasan yang diberikan oleh Pratiwi (2008). Proses uji KHM dapat diamati melalui perbedaan kekeruhan media yang telah dicampur dengan ekstrak daun sirih hijau dan suspensi bakteri. Kekeruhan ini muncul karena adanya masa

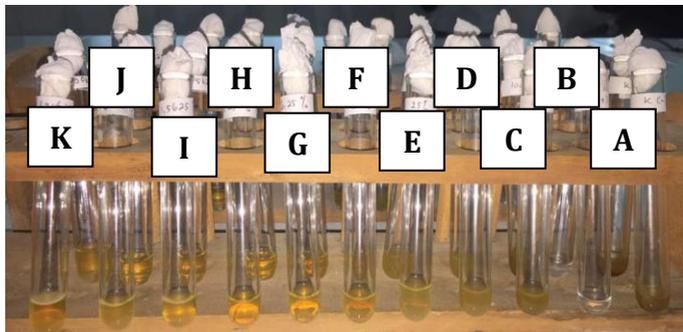
inkubasi yang memungkinkan pertumbuhan bakteri pada media. Penelitian dilanjutkan dengan pengujian melalui pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* untuk mendapatkan hasil pengukuran kekeruhan secara kuantitatif. Nilai absorbansi merupakan nilai yang menunjukkan besarnya jumlah cahaya yang diserap oleh larutan yang terdapat di dalam masing-masing tabung. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan pada tabung 1 hingga 9, kontrol negatif dan positif sebelum dan sesudah inkubasi 1 x 24 jam untuk melihat selisih nilai absorbansi. Panjang gelombang yang digunakan adalah 600 nm sesuai dengan panjang gelombang sinar tampak (Wuon *et al.*, 2018).

Pengukuran KHM menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dilakukan dua kali, yaitu sebelum dan setelah inkubasi selama 24 jam. Nilai KHM ditentukan berdasarkan perubahan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi. Jika nilai absorbansi sebelum inkubasi lebih tinggi, dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat; sebaliknya, jika nilai absorbansi setelah inkubasi lebih tinggi, pertumbuhan bakteri tidak terhambat. Proses penentuan nilai KHM dimulai dengan membuat variasi konsentrasi larutan, dan pengukuran KHM pada penelitian ini dilakukan tiga kali pengulangan untuk memastikan

akurasi hasil. Variasi konsentrasi larutan sebelum inkubasi terdapat pada gambar 4.10 dan variasi konsentrasi larutan setelah inkubasi terdapat pada gambar 4.11.



Gambar 4.10 Variasi Konsentrasi Larutan Sebelum Inkubasi



Gambar 4.11 Variasi Konsentrasi Larutan Setelah Inkubasi

Keterangan:

A : Larutan Kontrol (-)

B : Larutan Kontrol (+)

C : Larutan uji konsentrasi 100%

- D : Larutan uji konsentrasi 50%
 E : Larutan uji konsentrasi 25%
 F : Larutan uji konsentrasi 12,5%
 G : Larutan uji konsentrasi 6,25%
 H : Larutan uji konsentrasi 3,125%
 I : Larutan uji konsentrasi 1,563%
 J : Larutan uji konsentrasi 0,781%
 K : Larutan uji konsentrasi 0,391%

Sebelum inkubasi, larutan uji KHM tampak lebih bening, tetapi setelah mengalami inkubasi, larutan tersebut menjadi lebih keruh. Perubahan ini terjadi karena adanya pertumbuhan bakteri yang lebih signifikan setelah proses inkubasi. Pengidentifikasian perubahan absorbansi, dilakukan dengan pengujian menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Berikut adalah hasil uji KHM ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri *Citrobacter freundii* yang dicantumkan dalam tabel 4.5.

Tabel 4.3 Hasil KHM Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau terhadap Bakteri *Citrobacter freundii*

Konsentrasi Ekstrak	Sebelum Inkubasi	Sesudah Inkubasi	Ket
K(-)	1,544 ± 0,479	1,317 ± 0,187	Turun
K(+)	0,173 ± 0,124	0,074 ± 0,114	Turun
100%	1,501 ± 0,125	1,374 ± 0,267	Turun

50%	0,957 ± 0,189	0,854 ± 0,026	Turun
25%	0,389 ± 0,147	0,273 ± 0,082	Turun
12,5%	0,176 ± 0,086	0,127 ± 0,037	Turun
6,25%	0,067 ± 0,108	0,007 ± 0,004	Turun
3,125%	0,101 ± 0,109	0,112 ± 0,121	Naik
1,563%	0,069 ± 0,063	0,095 ± 0,003	Naik
0,781%	0,087 ± 0,073	0,207 ± 0,171	Naik
0,391%	0,074 ± 0,028	0,201 ± 0,110	Naik

Konsentrasi 6,25% menunjukkan penurunan absorbansi, menandakan bahwa pada konsentrasi tersebut terjadi hambatan minimal terhadap pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii* oleh ekstrak etanol daun sirih hijau. Temuan uji KHM dalam penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fitriana et al (2019) terkait aktivitas antibakteri daun sirih. Dalam penelitian tersebut uji KHM dan KBM terhadap bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* menghasilkan nilai KHM sebesar 6,25%, yang merupakan nilai optimal untuk membunuh bakteri *E. coli* ditandai dari hasil perlakuan yang menghasilkan medium yang jernih.

Konsentrasi di bawahnya menunjukkan peningkatan absorbansi yang mengindikasikan bahwa bakteri masih dapat tumbuh pada konsentrasi-konsentrasi tersebut. Pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% menunjukkan penurunan nilai absorbansi yang menandakan bakteri

terhambat pada konsentrasi tersebut, sedangkan pada konsentrasi 3,125% ; 1,563%; 0,781%; 0,391% mengalami kenaikan nilai absorbansi yang artinya pertumbuhan bakteri masih berlangsung pada konsentrasi tersebut. Hasil ini karena kepekatan konsentrasi yang terjadi pada konsentrasi yang lebih tinggi menyebabkan daya hambat terhadap suatu bakteri semakin besar.

Pada penelitian ini terjadi penurunan nilai absorbansi kontrol positif yang seharusnya naik karena tidak diberikan perlakuan. Penurunan ini diduga disebabkan oleh suspensi bakteri yang diduga sudah mati yang ada pada tabung kontrol positif sehingga ketika dihitung absorbansinya dihasilkan penurunan.

Kondisi kenaikan atau penurunan yang tidak sesuai dengan teori pada kontrol maupun larutan uji pada uji KHM ini sering terjadi di beberapa penelitian salah satunya oleh Wuon *et al* (2018) menyatakan hasil pada konsentrasi 50% mengalami kenaikan yang seharusnya mengalami penurunan. Konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang lebih tinggi dari konsentrasi 25% yang seharusnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Kenaikan nilai absorbansi pada konsentrasi 50% tidak sepenuhnya karena pertumbuhan bakteri, tetapi diduga dipengaruhi oleh kepekatan konsentrasi yang terjadi pada konsentrasi

yang lebih tinggi, sehingga dapat memengaruhi penyerapan cahaya oleh sel-sel bakteri yang mati di dalam larutan (Kusuma, 2010). Pada penelitian yang dilakukan Wuon *et al* (2018) juga terjadi kenaikan nilai absorbansi kontrol negatif yang seharusnya turun atau tetap karena tidak diberikan perlakuan.

Pada penelitian ini ketika proses pembuatan larutan uji metode KHM menggunakan alat pipet ukur untuk membantu mengambil larutan. Pembuatan larutan pada tabung 1 yang berisi 0,5 g ekstrak etanol daun sirih hijau dan 0,5 mL media NB dimasukkan ke tabung reaksi kemudian dikocok hingga homogen. Pada tabung reaksi 1 tidak dilakukan perhitungan total larutan yang ada. Dari kedua campuran tersebut tidak diketahui betul berapa total larutan yang ada pada tabung 1 sehingga nilai keakuratannya kurang atau dapat dikatakan tidak akurat. Hal ini menyebabkan tidak tetapnya sisa jumlah larutan di pengulangan pada tabung 1 yang membuat ketika larutan pada semua tabung 1 duji secara bersamaan nilai absorbansinya tidak valid karena dilakukan tidak dengan kondisi yang sama. Kelalaian pada peneliti dengan tidak menghitung ulang jumlah larutan di tabung 1 membuat keraguan pada tabung 2-8 yang juga tidak dihitung pula

jumlah total akhir larutannya mengakibatkan perhitungan nilai absorbansi di tiap tabung terhitung kurang valid.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak etanol daun sirih hijau positif mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, tannin, dan alkaloid.
2. Pengujian antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri *Citrobacter freundii* dengan metode cakram pada konsentrasi 2%, 4% dan 8% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 7,76mm; 6,63mm; 6,72mm. Didapatkan hasil data fluktuatif dengan beberapa kemungkinan yang mempengaruhi nilai konsentrasi terkecil memiliki daya hambat yang lebih besar daripada konsentrasi lainnya adalah kekeruhan suspensi bakteri, suhu, ketebalan media agar, dan kekentalan ekstrak. Pengujian KHM dengan spektrofotometer *UV-Vis* menunjukkan penurunan absorbansi pada konsentrasi 6,25% menandakan bahwa konsentrasi 6,25% adalah konsentrasi hambat minimum dimana ekstrak etanol daun sirih hijau secara efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Citrobacter freundii* namun dapat dikatakan hasil KHM tersebut kurang valid karena kurang akuratnya total volume larutan yang digunakan untuk uji KHM.

B. Saran

1. Bagi peneliti selanjutnya dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji cakram daya hambat antibakteri daun sirih hijau terhadap bakteri *Citrobacter freundii*.
2. Bagi peneliti selanjutnya dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji KHM ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap bakteri *Citrobacter freundii* dengan pembuatan larutannya dilakukan lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfonsius Wijaya B., C. .. (2014). Potensi Ekstrak Etanol Tangkai Daun Talas (*Colocasia esculenta* [L]) sebagai Alternatif Obat Luka Pada Kulit Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, Vol.3 Issue 3.
- Alseekh, S., de Souza, L., Benina, M., & Fernie, A. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347.
- Anderson, R. C. (2012). Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* in vitro. *Folia Microbiologica*, 57, 253-258.
- Angelina, M. T. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Protobiont*, 4(1), 184-189.
- Arifin, B. &. (2018). Struktur Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, No (1), 21-29.
- Aviany, H. B. (2020). Analisis Efektivitas Probiotik di Dalam Produk Kecantikan sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *In Berkala Bioteknologi*, Vol. 3 Issue 2.

- Awasthee N., S. A. (2022). Piperlongumine a piper alkaloid, enhances the efficacy of doxorubicin in breast cancer: Involvement of glucose import. ROS, NF-KB and lncRNAs. *Apoptosis*, 27, 261-282.
- Ayu A. Ragil Mukaromah, A. F. (2020). DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle* L.) PADA PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli*. *Jurnal Kesehatan*.
- Azizah M., S. L. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dan Madu Hutan Terhadap Beberapa Bakteri Penyebab Penyakit Kulit . *Jurnal Penelitian Sains*, 22(1), 37-44.
- Bai, L. e. (2012). Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE*, (7.3). doi:10.1371/journal.pone.0033054.
- Banas, E. R.-z. (2013). Ventricular Tachycardia Storm Due To Loperamide Abuse. *Critical Care Medicine*, 41, A300.
- Bauer. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Comparative Tolerability Of The Newer Fluoroquinolone Antibacterials. *Drug Saf*, 21(5), 4007-421.
- Bhalodia, N. R. (2011). Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2, 104-109.
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Fitoterapia Antimicrobial flavonoids as a potential

substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720.

- Boakye, Y. D. (2016). Anti-infective properties and time-kill kinetics of *Phyllanthus muellerianus* and its major constituent, geraniin. *Medicinal Chemistry : Current Research*, 6, 95-104.
- Botahala, L. (2021). Pembuatan Herbal Siap Saji di Masa Pandemi COVID 19. *Abdimas Unwahas*, 6(1).
- Botahala, L. S. (2020). *Deteksi Dini Metabolit Sekunder Pada Tanaman*. Solok: Mitra Cendika Media.
- Boy, H. I. (2018). Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Product: A Review. *Digital Chinese Medicin*, 1, 131-142.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2012). *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg Ed 25*. Jakarta: EGC.
- Bustanussalam, A. D. (2015). Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* Linn) terhadap *Staphylococcus aureus*. *ATCC 25923* 5(2), 58-64.
- Carolia, N. &. (2016). Potensi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebagai alternatif terapi *Acne vulgaris*. *Jurnal Majority* 5(1), 140-145.
- Carolina, N. &. (2016). Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Sebagai Alternatif Terapi *Acne Vulgaris*. *Jurnal Majority*, Vol. 6 No. 1.

- Casciaro B., M. I. (2020). Alkaloid Asal Tumbuhan yang Terjadi Secara Alami sebagai Antimikroba Potensial Melawan Infeksi Tahan Antibiotik. *Molekul.* . 25 : 3619.
- Cheenpracha, S., Jitnonom, J., Komek, M., Ritthiwigrom, T., & Laphookhieo. (2016). S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of steroidal alkaloids from *Holarrhena pubescens* barks. *Steroids*, 108, 92-98.
- Chung, K. T. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 29-32.
- Cosme, P., Rodríguez, A., Espino, J., & Garrido, M. (2020). Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. *Antioxidants*, 9, 1263.
- Darwish, R. &. (2010). A Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *BMC Complementary and Alternativ Medicine*, 10, 9.
- Das, S. S. (2022). A comparative study of essential oil profile, antibacterial and antioxidant activities o thirty Piper betle landaraces towards selection of industrially important chemotypes. *Industrial Crops & Products*, 187.
- Donadio, G., Mensitieri, F., Santoro, V., Parisi, V., Bellone, M., De Tommasi, N., . . . Piaz, F. (2021). Interactions with Microbial Proteins Driving the Antibacterial Activity of Flavonoids. *Pharmaceutics*, 13, 660.

- Dong, G. L. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 32, 2225-2228.
- Dragull K., Y. W. (2003). Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. *Phytochemistry*, 63, 193-198.
- Dwicahyani, T. (2018). Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Keling (*Holothuria atra*) Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
- Ebrahimnejad, H. B. (2014). Flavanols and proanthocyanidins. In C. Jacob, G. Kirsch, A. Slusarenko, P. Winyard, & T. Burkholz (Eds.), *Recent advances*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Ekambaram, S. P. (2016). Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. *Phytotherapy Research*, 30, 1035-1045.
- Elizondo, A. M.-M. (2010). Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*, 145, 308-314.
- Engels, C. G. (2011). Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 775-780.
- Ergina, S. N. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Di ekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *J. Akad Kim*, 3(3), 165-172.

- Ermawati, F., Sari, R., Putri, N., Rohmawati, L., Kusumawati, D., Munasir, & Supardi, Z. (2021). Antimicrobial activity analysis of Piper betle Linn leaves extract from Nganjuk, Sidoarjo and Batu against *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal of Physics: Conferences Series*.
- F.K, D. (2010). *Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mengkudu (Morinda citifolia L.) terhadap bakteri pembusuk daging segar*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Sebelas Maret.
- Farha, A., Qiong-qiong, Y., Gowoon, K., Hua-Bin, L., Fan, Z., Hong-Yan, L., . . . Harold, C. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751.
- Fatmawati, I. R. (2019). Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dan Kulit Pisang (*Musa paradisiaca* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakter *Escherichia coli*. *Skripsi*.
- Fernandez-Canigia, L. D. (2019). Antibiotic susceptibility of *Citrobacter freundii* isolated from clinical specimens in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2013-2015). . *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 679-686.
- Fitriana, Y. A. (2019). Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *SAINTEKS*, 16, 101-108.

- Funatogawa, K. H. (2004). Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*, *48*, 251-261.
- Gabriel Juliani Lalamentik, D. .. (2017). AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KARANG LUNAK *Klyxum* sp. YANG DIPEROLEH DARI TELUK MANADO. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 6 No. 3 :46-53.
- Gloria, R. Y., Rahma, Y., & Mia, M. S. (2021). Effectiveness of green betel leaf and lime extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *BIODIVERSITAS*, *22*, 3452-3457.
- Gong, T., He, X., Chen, J., Tang, B., Zheng, T., Jing, M., . . . Li, Y. (2021). Transcriptional Profiling Reveals the Importance of Rerr in the Regulation of Multiple Sugar Transportation and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Mysystems*, *6*.
- Gupta, R. K. (2023). Phytochemical and biological studies of betel leaf (*Piper betle* L.): Review on paradigm and its potential benefits in human health. *Acta Ecologica Sinica*, *43*, 721-732.
- Hagel, J., & Facchini, P. (2013). Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant Cell Physiol.*, *54*, 647-672.
- Halimah, N. W. (2015). Efek Antidiare Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap Mencit Jantan Yang Diinduksi Bakteri *Salmonella Thypimurium*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* *3* (3), 1083-1094.

- Handajani, N. S., P. T. (2008). Aktivitas ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus* sp. penghasil aflatoksin dan *Fusarium moniliforme*. . *Biodiversitas*, 9(3): 161-4.
- Handoyo, D. L. (2020). Pengaruh Lama Waktu Maserasi (Perendaman) Terhadap Kekentalan Ekstrak Daun Sirih (Piper betle) . *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1), 34-41.
- Hang, L. T. (2023). Four new N-phenethylbenzamide derivatives from the stems of piper betle and their antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 37(12), 1969-1977.
- Harbone, J. B. (1998). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J. (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua*. Bandung: Penerbit ITB.
- Heinrich, M. B. (2009). *Farmakologi dan Fisioterapi*. Jakarta: EGC.
- Henis, Y. T. (1964). Effect of water extracts of carob pods, tannic acid, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 12, 204-209.
- Ihuma, J. O., Koggie, A. Z., Famojuro, T. I., Ugboji, L. O., & Malgwi, T. D. (2022). Antimicrobial Activities of the Leaf Extracts of *Ficus sycomorus* Linn. on *Helicobacter*

- pylori and *Citrobacter freundii*. *Asian Journal of Biology*, 15(3), 24-31.
- Ikhwan Habibi, A. A. (2018). Indonesian Journal of Chemical Science Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksan Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). *J. Chem. Sci*, 7(1).
- Illing, I. S. (2017). Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan 8(1). *Dinamika*, 66-84.
- Inayatullah, S. (2012). Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*.
- Isnawati, A. P. (2018). Perbandingan Teknik Ekstraksi Maserasi Dengan Infusa Pada Pengujian Aktivitas Dan Hambat Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Farmasi Malahayati*, 1(1), 19-24.
- Jones, G. M. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1374-1378.
- Julianto, T. (2019). *Buku Ajar Fitokimia: Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Kabera, J. N. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal Of Pharmacy and Pharmacology*, Vol 2.

- Kaveti, B., Tan, L., Sarnnia, Kuan, T., & Baig, M. (2011). Antibacterial Activity Of Piper Betel Leaves. *Int. J. Pharm Teach Pract*, 2, 129-132.
- Khairnar, M. R. (2015). Comparative assessment of cranberry and chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: A randomized parallel clinical trial. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6, 35-39.
- Khanbabaee, K. &. (2001). Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*, 18, 641-649.
- Kharisma dan Lisa, E. (2010). Khasiat Perasan Daun Sirih (Piper betle L) Terhadap Bakteri Aeromonas Hydrophylla yang Menyerang Ikan Lele(Clarias batrachus).
- Kirana Jati, N. T. (2019). Isolasi Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Alkaloid pada Daun Pepaya. *Jurnal MIPA*, 42(1), 1-6.
- Koensoemardiyah. (2010). *A to Z Minyak Atsiri- untuk Industri, Makanan, Kosmetik, dan Aromaterapi* . Yogyakarta, DIY Indonesia: Penerbit ANDI.
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10, 165.
- Kuljanabhagavad, T., & Wink, M. (2009). Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem. Rev*, 8, 473-490.

- Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.*, 162750.
- Kurang, R. Y. (2020). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Daun Kelor (*Moringa Oleifera L.*). *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika (J-PhAM)* 3(1), 13-21.
- Kurnia, D. H. (2020). Potential Allylpyrocatechol Derivatives as Antibacterial Agent Against Oral Pathogen of *S. Sanguinis* ATCC 10,556 and as Inhibitor of MurA Enzymes: In Vitro and in Silico Study. . *Drug Des*, 2977-2985.
- Kursia, S. d. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Indonesian Pharm Sci Technol*, 3(2): 72-77.
- Kusuma, D. F. (2010). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linnaeus) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. *Pusat Informasi Ilmiah*, 33.
- Lestari, Y. A. (2016). Aktivitas Antibakteri Gram Positif dan Negatif Dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. 5(4) 1-8.
- Lezoul, N. E. (2020). Extraction Processes with Several Solvents on Total Bioactive Compounds in Different Organs of Three Medicinal Plants. *Molecules*, 25, 4672.

- Lincih Cerdik Hulu, A. F. (2022). PEMANFAATAN DAUN SIRIH HIJAU (*Piper Betle L*) SEBAGAI OBAT TRADISIONAL DI KECAMATAN LAHUSA. *Jurnal Pendidikan Biologi*, Vol. 3 No. 1 . Retrieved from P-ISSN: 2715-1999 E-ISSN: 2829-0909
- Lisdiana. (2022). Efektivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kersen dan Kunyit sebagai Antibakteri *Propionibacterim acnes* Effectiveness of Combination Ethanol Extract of Cherry Leaves and Turmeric as Antibacterial *Propionibacterium acnes* . 11, 586-593.
- Liu, L. e. (2018). Genetic diversity, multidrug resistance, and virulence of *citrobacter freundii* from diarrheal patiens and healthy individuals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, pp. 1-10. doi:10.3389/fcimb.2018.00233
- Liu, L., Song, C., Khan, A., Li, X., Yang, X., Cheng, G., . . . Luo, X. (2016). A potent antibacterial indole alkaloid from *Psychotria pilifera*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 18, 798-803.
- Ločárek, M., Nováková, J., Klouček, P., Hošťálková, A., Kokoška, L., Gábrlová, L., . . . Cahlíková, L. (2015). Antifungal and Antibacterial Activity of Extract and Alkaloids of Selected *Amaryllidaceae* Species. *Nat. Prod. Commun*, 10, 1537-1540.
- Lolongan, R. A. (2016). Uji Konsentrasi Hambat Minimum(KHM) Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina L.*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Vol 4.

- Luo, Y. (2011). *Natural Medicinal Chemistry*. Wuhan, China: Huazhong University of Science and Technology.
- Lwin, Y. K. (2019). Plant growth-promoting activity of *Citrobacter freundii* and its plant growth-promoting gene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (3), 44.
- Mahmudah, F. A. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol Temukunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (Antibacterial Activity Test Of Ethanol Extract Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Against *Streptococcus mutans* BACTERIA).
- Makolit, J. W. (2017). Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Vol. 5.
- Marliana, S. V. (2005). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3(1) : 26-31.
- Mitra S., A. U. (2022). Anticancer applications and pharmacological properties of piperidine and piperine: A comprehensive review on molecular mechanism and therapeutic perspectives. *Front Pharmacol*, 12, 772418.
- Mukarram, O. H. (2016). Loperamide Induced Torsades de Pointes: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*, 1-3.

- Nanda, D. M. (2020). Karakter Spesifik Ekstrak Daun Yodium(Jatropha Multifida L.) Dari Tiga Lokasi Tempat Tumbuh Di Jawa Timur.
- Nantachit, K., & Roongjang, S. (2016). Anti-mycobacterium and Anti-cancer Activities of Combretin, an Isolated Steroidal Alkaloid from the Seeds of Combretum quadrangulare Kurz. *J. Pharm. Pharmacol*, 4, 261-267.
- Nayaka, N., Maria, M., Dwi, A. S., Putu, E., Ni Luh, K. A., Erna, C., & Rika, H. (2021). Piper betle (L): Recent Review of Antibacterial and Antifungal Properties, Safety Profiles, and Commercial Applications. *Molecules*, 26, 2321.
- Ngaisah, S. (2010). Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav). *Skripsi*.
- Ningsih, K. (2020). Studi Pemanfaatan Tumbuhan Obat Berpotensi Mengobati Pada Penyakit Pada Penyakit Sistem Pencernaan Di Kelurahan Bunut Kecamatan Kapuas Kabupaten Sanggau. *Jurnal Hutan Lestari* 8(2), pp. 217-228. doi:10.26418/jhl.v8i2.39782.
- Nisyak, K. H. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Minyak Atsiri Sirih Hijau Terhadap Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 5.
- Nord, C., Levenfors, J., Bjerketorp, J., Sahlberg, C., Guss, B., Orberg, B., & Broberg, A. (2019). Antibacterial Isoquinoline Alkaloids from the Fungus Penicillium Spathulatum Em19. *Molecules*, 24, 4616.

- Nugrahani, R., Andayani, Y., & Hakim, A. (2016). Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Bumcis (*Phaseolus vulgaris*) dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA (JPPIPA)*, 2.
- Nurhayati, s. L. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Difusi Cakram. *Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), 41-46.
- Nurul Marfu'ah, S. L. (2021). Uji Potensi Antibakteri *Staphylococcus aureus* Dari Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.). *Pharmaceutical Journal of Islamic Pharmacy*.
- Othman, T., Hanafiah, R., Nam, N., Mohd-Said, S., & Adnam, S. (2018). Chemical Composition In Vitro Antimicrobial Properties of *Phyllanthus columnaris* Stem Bark Tannins Against Oral Pathogens. *J. Int. Dent. Med. res*, 12, 848-853.
- Pangesti R. D., C. E. (2017). Perbandingan daya antibakteri ekstrak dan minyak piper betle linn terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Indo J Chem* 6(3), 270-278.
- Permata, D. A. (2014). Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Daun Bombay (*Allium cepa* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon*, 5(1), 5-10.
- Phumat, P. K. (2020). Comparative Inhibitory Effects of 4-Allylpyrocatechol Isolated from Piper Betle on *Streptococcus Intermedius*, *Streptococcus Mutans*, and *Candida Albicans*. *Arch. Oral Biol*, 104690.

- Phumat, P., Khongkhunthian, S., Wanachantararak, P., & Okonogi, S. (2017). Potential of Piper Betle Extracts on Inhibition of Oral Pathogens. *Drug Discov.*, 11, 307-315.
- Popi Zeniusa., M. R. (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau Terhadap *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Majority*, Vol. 6 No 2 : 136-142.
- Prabhu, K. S. (2022). Impact of Piper betle L. bioactive compounds in larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Natural Pesticide Research*, 2.
- Prasathkumar, M. A. (2021). Therapeutic and pharmacological efficacy of selective Indian medicinal plants- A review. *Phytomedicine Plus*, 1.
- Pratiwi. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga Medial Series.
- Pratiwi, A. (2009). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun *Acaylpha indica* Terhadap Bakteri *Salmonella choleraesisis* dan *Salmonella typhimurium*. *Skripsi*.
- Pratiwi, R. H. (2017). Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life*, 4(3), 418-429.
- Prihatiningtyas, W. M. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Mangga Kweni (*Mangifera odorata* Griff) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922 DAN *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 . Vol. 8 issue 2.

- Putri, Z. F. (2010). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau Terhadap Propionobacteriumacne dan Staphylococcus Aureus Multiresisten (Skripsi)*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Qin, X.-J., Sun, D.-J., Ni, W., Chen, C.-X., Hua, Y., He, L., & Liu, H.-Y. (2012). Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Steroids*, 77, 1242-1248.
- Qiu, S., Sun, H., Zhang, A., Xu, H., Yan, G., Han, Y., & Wang, X. (2014). Natural alkaloids: Basic aspects, biological roles, and future perspectives. *J. Nat. Med*, 12, 401-406.
- Rahman Wahid, A. .. (2020). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Terhadap Ekstrak Tanaman Ranting Patah Tulang(*Euphorbia tirucalli* L.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 1(1).
- RI, D. (1980). *Materia Medika Indonesia Jilid IV* . Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- RI, D. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Cetakan Pertama*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Ridho, E. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) Dengan Metode DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)*. . Pontianak: Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- S., S. E. (2014). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *PHARMACY* :

Jurnal Farmasi Indonesia(Pharmaceutical Journal of Indonesia), 11(1).

- Saifudin, A. (2011). *Standarisasi Bahan Obat Alam (Edisi Pertama)*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sandeep, & Ghosh, S. (2020). 12—Triterpenoids: Structural diversity, biosynthetic pathway, and bioactivity. In *Studies in Natural Products Chemistry*. (R. E. Atta ur, & T. N. Elsevier: Amsterdam, Eds.) 67, 411-461.
- Sangi, M. M. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di kabupaten Minahasa Utara. *Chem Prog*, 1(1): 47-53.
- Saraswati, D. (2011). Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih Terhadap Daya Hambat Bakteri Escherichia coli. *Jurnal Health And Sport*, 3(3), 331-338.
- Sari I. P., A. D. (2014). Hubungan antara pengetahuan tentang infeksi silang dengan pentalaksanaan pencegahan infeksi. *Jurnal B-Dent 1(1)*, 30-37.
- Savitri, E. (2008). Rahasia Tumbuhan Berkasiat Obat Perspektif Islam. *Uin Malang Perss*.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Selatan, D. K. (2015). *Profil Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan*. Jakarta: Dinas Kesehatan.
- Selatan, D. P. (2015). Profil Kesehatan Prov. Sulsel Tahun 2015. 28-29.

- Serrano, J. P.-P.-C. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S310-S329.
- Shamsudin, N., Ahmed, Q., Mahmood, S., Ali Shah, S., Khatib, A., Mukhtar, S., . . . Zakaria, Z. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. *Molecules*, 27, 1149.
- Sharifah, F. S. (206). Identification of phenolic compounds and evaluation of antibacterial properties of *Piper sarmentosum* Roxb. against rice pathogenic bacteria. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 12, 475-484.
- Shin, J. K. (2020). Epidemiology and microbiology of bloodstream infections in patients with hematological malignancies. *Multicenter study in Korea Infection and Chemotherapy*, 52(3), 435-443.
- Sineke. (2016). Penentuan Kandungan Fenolik Dan Sun Protection Factor(Spf) Dari Ekstrak Etanol Dari Beberapa Tongkol Jagung (*Zea Mays L.*). *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi Vol. 5*, 275-283.
- Siriyong, T., Voravuthikunchai, S., & Coote, P. (2018). Steroidal alkaloids and conessine from the medicinal plant *Holarrhena antidysenterica* restore antibiotic efficacy in a *Galleria mellonella* model of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Complement. Altern. Med*, 18, 285.

- Šmejkal, K., Chudík, S., Klouček, P., Marek, R., Cvačka, J., Urbanová, M., . . . al., e. (2008). Antibacterial C-Geranylflavonoids from *Paulownia tomentosa* Fruits. *J. Nat. Prod*, 71, 706-709.
- Song, Y., Yang, J., Yu, J., Li, J., Yuan, J., Wong, N.-K., & Ju, J. (2020). . Chlorinated bis-indole alkaloids from deep-sea derived *Streptomyces* sp.SCSIO 11791 with antibacterial and cytotoxic activities. *J. Antibiot.*, 73, 542-547.
- Sripradha, S. (2014). Betel Leaf- the green gold. *J. Pharm Sci & res*, 6(1).
- St. Ratnah, A. M. (2022). Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* L) Urban Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Citrobacter freundii*. *Media Farmasi*, Vol. 18 No 1.
- Stahl, L. f., & & F. (2016). Ceating a micrososome to examie salinity tolerance o *Eschericia coli* in beach sand. *In The Winthrop McNair Research Bulletin*, Vol. 2.
- Suhartati, T. (2017). *Dasar-Dasar Spektrofotometer Uv-Vis Dan Spektrometri Masa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Bojonegoro: CV. Anugrah Utama Raharja.
- Sujono H, R. S. (2019). Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau(*Piper betle* L) terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus aureus* . *J. Kartika Kimia*, 2(1): 30-3.
- Sumarno. (2000). *Teknik Dasar Pemeliharaan Mikroba* . Jakarta: Intan Prawira.

- Sun, R., Dama, J., Tan, J., Rose, J., & Voth, G. (2016). Transition-Tempered Metadynamics Is a Promising Tool for Studying the Permeation of Drug-like Molecules through Membranes. *J. Chem. Theory Comput*, 12, 5157-5169.
- Sylva, L. (2010). Hubungan Antara Mikroorganismen yang Ditemukan Pada Akne Lesi dengan Bentuk Lesi Akne. *Tesis*.
- Snyder, O. (1997). *Antimicrobial Effects of Spices and Herbs*. Minnesota: Hospitality Institute of Technology and Management.
- Taiz, L. a. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publisher.
- Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., & Puripattanavong, J. (2017). Screening for Antibacterial and Antibiofilm Activity in Thai Medicinal Plant Extracts against Oral Microorganisms. *J. J. Tradit. Complementary Med*, 7, 172-177.
- Tenda, P. E., Lenggu, M. Y., Ngale, M. S., farmasi, J., & Kupang, P. (2017). Activity, A. Antibacterial Activity Test of Ethanol Extract of Faloak Tree Skin (*Sterculia* sp.) on *Staphylococcus aureus* Bacteria. *J. Info Kesehatan*, 15, 227-239.
- Teoh, E. S. (2015). Secondary Metabolites of Plants. *Med. Orchid Asia*, 5, 59-73.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Suresh, R. S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: Secondary

- metabolites. In: Vijayakumar R, Raja SSS, editors. Secondary Metabolites: Sources and Applications. . *Crotia: In Tech-Open Science*, 138.
- Tian, F. L. (2009). Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from. *Galla chinensis*. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1289-1295.
- Ticona, J. C.-A. (2022). Flavonoids from Piepr Species as Promising Antiprotozoal Agents against *Giardia intestinalis*: Structure Activity Relationship and Drug-Likeness Studies. *pharmaceuticals*, 15, 1386.
- Tiwari, P. K. (2011). Phytochemical Screening And Extraction . *International Pharmacheutica Scientia*, 1(1).
- Tkachenko, H., Buyun, L., Terech-Majewska, E., & Osadowski, Z. (2016). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC LEAF EXTRACTS OBTAINED FROM VARIOUS FICUS SPECIES (MORACEAE) AGAINST THE FISH PATHOGEN, CITROBACTER FREUNDII. *Journal of Ecology and Protection of the Coastline*, 20, 117-136.
- Tran, V. T. (2023). Recent applicantions of natural bioactive compounds from Piper betle (L.). *Food Control*, 154.
- Trentin, D. S. (2013). Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS One*, 8, e66257.
- Valle, D., Cabrera, E., Puzon, J., & Rivera, W. (2011). Antimicrobial Activities of Methanol, Ethanol and Supercritical CO2 Extracts of Philippine Piper Betle L.

on Clinical Isolates of Gram Positive and Gram Negative Bacteria with Transferable Multiple Drug Resistance. *PLOs ONE*, 11, 0146349.

- Vasileiou, I. K. (2013). Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutrition Research*, 33, 595-607.
- Widyaningtias, N. Y. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Terpurifikasi Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Farmasi Udayana*, Vol. 3 No.1 : 50-53.
- Wojciechowski, K., Orczyk, M., Gutberlet, T., Trapp, M., Marcinkowski, K., Kobiela, T., & Geue, T. (2014). Unusual penetration of phospholipid mono- and bilayers by Quillaja bark saponin biosurfactant. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr*, 1838, 1931-1940.
- Wu, P. E. (2017). Clinical Review: Loperamide Toxicity. *Annals of Emergency Medicine*, 70(2), 245-252.
- Wuon, K. D. (2018). Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Getah Kulit Buah Pisang Goroho (*Musa acuminata* L.) terhadap Pertumbuhan. *Jurnal e-GiGi(eG)*, 6, 2.
- Yan, Y., Xing, L., Chunhong, Z., Lijuan, L., Bing, G., & Minhui, L. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10, 318.

- Yang, C.-R., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zhang, Y.-J., & Li, X.-C. (2006). Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrob. Agents Chemother*, *50*, 1710-1714.
- Yanti, Y. N. (2017). UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina: Ilmu Farmasi dan Kesehatan*, *2*.
- Yolla Arinda Nur Fitriana, V. A. (2019). Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *SAINTEKS*, 101-108.
- Yoshida, T. H. (2005). High molecular weight plant polyphenols (tannins): Prospective functions. *Recent Advances in Phytochemistry*, *39*, 163-190.
- Zamakshshari, N. A. (2021). Effect of extraction procedure on the yield and biological activities of hydroxychavicol from Piper betle L. leaves. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1-10.
- Zhang, Y., Hu, W., Chen, X., Peng, Y., Song, L., & Shi, Y. (2016). Bioactive quinolizidine alkaloids from the root of *Sophora tonkinensis*. *J. Tradit. Chin. Med.*, *41*, 2261-2266.
- Zhou, L., Ge, X., Dong, T., Gao, H., & Sun, B. (2017). Antibacterial steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica*. *Chin. J. Nat. Med.*, *23*, 735-752.

LAMPIRAN**Lampiran 1 Pembuatan Ekstrak**

Gambar	Keterangan
	Proses Pengeringan Daun Sirih Hijau
	Bubuk Daun Sirih Hijau
	Proses maserasi menggunakan etanol

	 A laboratory setup for evaporation. A blue container is mounted on a stand, with a tube leading to a beaker. A white container is also visible on the counter.	<p>Proses evaporasi hasil maserasi</p>
	 A water bath setup. A metal pot is placed on a stove, and water is being poured from a blue container into it. A metal stand is visible in the background.	<p>Proses pemanasan ekstrak menggunakan waterbath agar mendapatkan ekstrak kental</p>
	 A close-up view of a metal pot containing a thick, dark, viscous liquid. A hand is visible holding the edge of the pot.	<p>Hasil ekstrak kental daun sirih hijau</p>

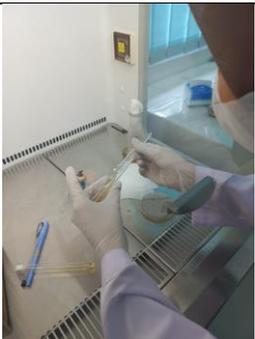
Lampiran 2 Uji Fitokimia

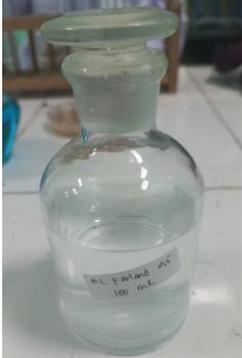
Metabolit Sekunder	Hasil Uji	Hasil
Flavonoid	(+) ditandai larutan berubah menjadi kemerahan	
Tannin	(+) ditandai dengan larutan berubah menjadi hijau pekat atau hijau kehitaman	
Saponin	(-) ditandai tinggi busa pada larutan yang tidak stabil dan kurang dari 1 cm	

Alkaloid	(+) ditandai dengan larutan berubah menjadi merah atau jingga	
----------	--	---

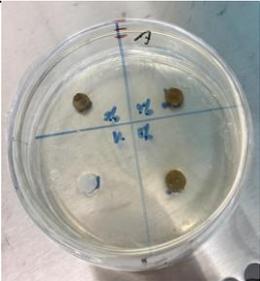
Lampiran 3 Uji Cakram

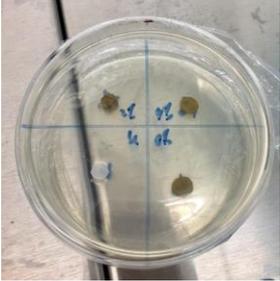
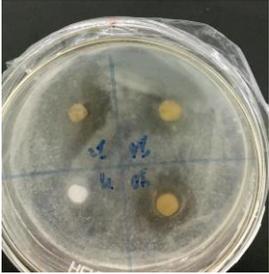
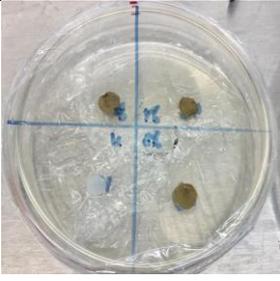
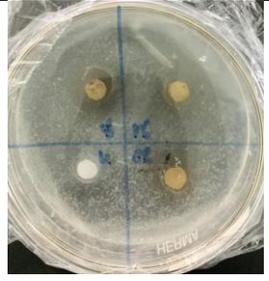
a. Preparasi sebelum uji cakram

Gambar	Keterangan
	Proses peremajaan bakteri uji dengan agar miring NA sebelum diinkubasi
	Kultur bakteri setelah di inkubasi

	Larutan Mc Farland
	Suspensi bakteri

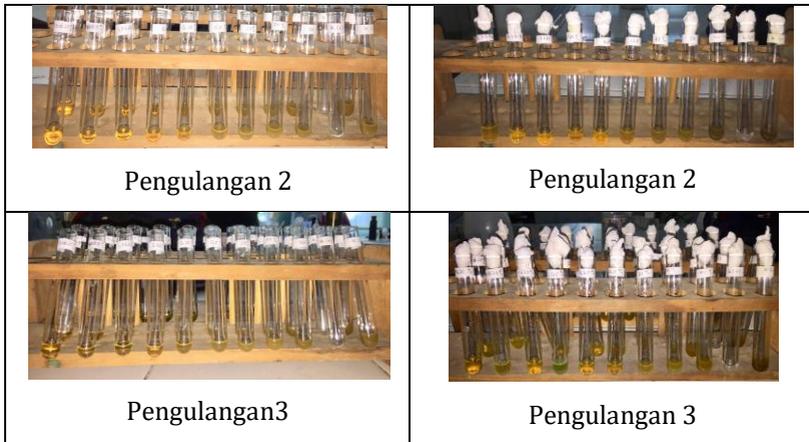
b. Hasil uji cakram

Sebelum inkubasi	Sesudah inkubasi
	

Pengulangan 1	Pengulangan 1
	
Pengulangan 2	Pengulangan 2
	

Lampiran 4 Uji KHM

Sebelum inkubasi	Sesudah inkubasi
	
Pengulangan 1	Pengulangan 1



Lampiran 5 Perhitungan

a. Pembuatan NaCl Fisiologis

$$\begin{aligned} \% (b/v) &= \frac{\text{massa zat terlarut (g)}}{\text{volume larutan (mL)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,9 \text{ g}}{100 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,9\% \end{aligned}$$

Jadi, larutan NaCl fisiologis 0,9% dapat dibuat dengan mencampurkan 0,9 gr NaCl ke dalam 100 mL akuades.

b. Pembuatan larutan uji metode cakram

a. Konsentrasi 8%

$$b / v = 8\%$$

$$b / 100 \text{ mL} = 8\%$$

$$b = 8 \text{ gram}$$

b. Konsentrasi 4%

$$b / v = 4\%$$

$$b / 100 \text{ mL} = 4\%$$

$$b = 4 \text{ gram}$$

c. Konsentrasi 2%

$$b / v = 2\%$$

$$b / 100 \text{ mL} = 2\%$$

$$b = 2 \text{ gram}$$

c. Pembuatan larutan uji metode KHM

a. Tabung K (-) berisi 100% ekstrak etanol daun siirh hijau

b. Tabung 1 berisi larutan uji dengan konsentrasi 100%

$$\begin{aligned} \% (b/v) &= \frac{\text{massa zat terlarut (g)}}{\text{volume larutan (mL)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,5 \text{ g}}{0,5 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 100\% \end{aligned}$$

c. Tabung 2 berisi larutan uji dengan konsentrasi 50%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$100 \cdot V_1 = 50 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

d. Tabung 3 berisi larutan uji dengan konsentrasi 25%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$50 \cdot V_1 = 25 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

e. Tabung 4 berisi larutan uji dengan konsentrasi 12,5%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$25 \cdot V_1 = 12,5 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

- f. Tabung 5 berisi larutan uji dengan konsentrasi 6,25%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$12,5 \cdot V_1 = 6,25 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

- g. Tabung 6 berisi larutan uji dengan konsentrasi 3,125%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$6,25 \cdot V_1 = 3,125 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

- h. Tabung 7 berisi larutan uji dengan konsentrasi 1,563%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$3,125 \cdot V_1 = 1,563 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

- i. Tabung 8 berisi larutan uji dengan konsentrasi 0,781%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$1,563 \cdot V_1 = 0,781 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

j. Tabung 9 berisi larutan uji dengan konsentrasi 0,391%

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,781 \cdot V_1 = 0,391 \cdot 1$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

d. Hasil Uji KHM

Konsentrasi	Replika	Sebelum inkubasi	Setelah inkubasi	Keterangan
K (-)	1	2,019	1,469	Turun
	2	1,061	1,374	
	3	1,554	1,108	
	Rata-rata	1,544	1,317	
K (+)	1	0,271	0,014	Turun
	2	0,214	0,206	
	3	0,033	0,002	
	Rata-rata	0,173	0,074	
100%	1	1,384	1,071	Turun
	2	1,633	1,473	
	3	1,485	1,579	
	Rata-rata	1,501	1,374	
50%	1	1,083	0,861	Turun
	2	1,048	0,876	
	3	0,739	0,825	
	Rata-rata	0,957	0,854	
25%	1	0,367	0,178	Turun

	2	0,546	0,330	
	3	0,254	0,309	
	Rata-rata	0,389	0,273	
	1	0,121	0,127	
12,5%	2	0,133	0,165	Turun
	3	0,276	0,090	
	Rata-rata	0,176	0,127	
	1	0,001	0,012	
6,25%	2	0,008	0,007	Turun
	3	0,192	0,004	
	Rata-rata	0,067	0,007	
	1	0,038	0,049	
3,125%	2	0,038	0,036	Naik
	3	0,226	0,252	
	Rata-rata	0,101	0,112	
	1	0,007	0,099	
1,563%	2	0,067	0,095	Naik
	3	0,134	0,093	
	Rata-rata	0,069	0,095	
	1	0,022	0,361	
0,781%	2	0,071	0,022	
	3	0,167	0,238	Naik
	Rata-rata	0,087	0,207	
	1	0,043	0,264	
0,391%	2	0,081	0,266	Naik

3	0,098	0,073
Rata-rata	0,074	0,201

Lampiran 6 Daftar Riwayat Hidup

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : Ika Suryani
TTL : Kudus, 07 April 2001
Alamat Rumah : Ds. Kaliputu Gg 2 Rt 01 Rw
02 Kec. Kota Kab. Kudus
Nomor HP : 085701595597
E-mail : ikasuryani501@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

Pendidikan Formal:

1. TK Pertiwi Barongan
2. SD N 2 Barongan
3. SMP N 2 KUDUS
4. SMA N BAE 1 KUDUS

Semarang, 14 Desember 2023

Ika Suryani

