

**IDENTIFIKASI KOMPONEN UTAMA EKSTRAK ETIL
ASETAT DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

oleh:

**LAILATUL MUFARRICHAH
0610920032-92**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**IDENTIFIKASI KOMPONEN UTAMA EKSTRAK ETIL
ASETAT DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

LAILATUL MUFARRICHAH
0610920032-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG

2011

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**IDENTIFIKASI KOMPONEN UTAMA EKSTRAK ETIL
ASETAT DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

oleh :

**LAILATUL MUFARRICAH
0610920032-92**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 3 Januari 2011
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Drs. Suratmo, M.Sc
NIP. 19630706 199002 1 002**

**Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes
NIP. 19720326 200212 2 001**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 198701 1 001**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Lailatul Mufarrichah
NIM : 0610920032
Jurusan : Kimia

Penulis tugas akhir berjudul :

Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 3 Januari 2011
Yang menyatakan,

Lailatul Mufarrichah
NIM. 0610920032-92

**IDENTIFIKASI KOMPONEN UTAMA EKSTRAK ETIL
ASETAT DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi komponen utama dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan mengetahui aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Ekstrak diperoleh dengan cara ekstraksi soxhlet serbuk daun sirih merah menggunakan pelarut etil asetat. Golongan senyawa fenolik yang berikatan dengan gula sebagai glikosida merupakan komponen utama dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah. Keberadaan senyawa fenolik dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah diuji menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet-Visibel (UV-Vis). Komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah diidentifikasi menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM). Aktivitas ekstrak etil asetat daun sirih merah sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* diketahui berdasarkan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode dilusi tabung dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode *streaking*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat tiga komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah, yaitu metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida, asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida, dan hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida. Hasil uji antibakteri memberikan nilai KHM 25 % dan nilai KBM 30 %.

**IDENTIFICATION OF MAJOR COMPONENTS FROM
ETHYL ACETATE EXTRACT OF RED BETEL LEAVES
(*Piper crocatum*) AND ITS ACTIVITY AS ANTIBACTERIAL
AGENT TO *Staphylococcus aureus***

ABSTRACT

The purposes of this research were identifying the major components from ethyl acetate extract of red betel leaves (*Piper crocatum*) and examining its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. The extract was obtained by soxhlet extraction of red betel leaves powder with ethyl acetate as solvent. Major component from ethyl acetate extract of red betel leaves were phenolic compound which bonded with sugar to form glycoside. The existence of phenolic compounds on ethyl acetate extract of red betel leaves was analyzed using Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV-Vis). Its major components were analyzed by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS). Antibacterial activity test was conducted by tube dilution method to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and streaking method to determine Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The result showed that three compounds of ethyl acetate extract of red betel leaves were methyl hydroxybenzenacetic- β -acetil maltoside, acetochavicol glucofuranocyl-1-buten- β -glucopiranoside, and hydroacetochavicol glucofuranocyl- β -maltoside. Antibacterial test showed MIC 25 % and MBC 30 %.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul **Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.**

Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Suratmo, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing I, atas segala bimbingan, pengarahan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis.
2. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes., selaku Dosen Pembimbing II, atas bimbingan, pengarahan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis.
3. Drs. Dinar Purwonugroho, M.Si., selaku Dosen Penasehat Akademik, atas nasehat dan semangat yang diberikan kepada penulis.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan MS., selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, atas perhatian kepada penulis selama melaksanakan masa studi.
5. Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Yuniar Ponco Prananto, S.Si., M.Sc., Dr. Diah Mardiana, MS., dan Dr. Atikah, Apt.M.Si., selaku Dosen Penguji, atas segala masukan dan saran yang diberikan kepada penulis untuk perbaikan naskah tugas akhir.
6. Seluruh Dosen Pengajar Jurusan Kimia Universitas Brawijaya yang selama ini memberikan ilmu, nasehat dan semangat kepada penulis.
7. Kedua orang tua, kakak, adik, serta keluarga besar yang selalu mendoakan, memberikan semangat dan kasih sayang serta dukungan hingga terselesainya skripsi ini.
8. Sahabat dan semua pihak yang telah memberikan semangat, doa, dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun dari pembaca dan semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Januari 2011

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i>).....	5
2.2 Metode Isolasi	8
2.2.1 Ekstraksi Soxhlet	8
2.2.2 Hidrolisis.....	9
2.3 Uji Fenolik	9
2.4 Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM).....	10
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.6 Senyawa Antibakteri.....	13
2.7 Uji Aktivitas Antibakteri.....	15
2.8 Hipotesis	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Bahan-Bahan Penelitian.....	17
3.3 Alat-Alat Penelitian	17
3.4 Tahapan Penelitian	18

3.5	Cara Kerja Penelitian.....	18
3.5.1	Preparasi Daun Sirih Merah.....	18
3.5.2	Ekstraksi Daun Sirih Merah.....	18
3.5.3	Hidrolisis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah.....	18
3.5.4	Uji Fenolik	19
3.5.5	Identifikasi Menggunakan KC-SM.....	19
3.5.6	Uji Aktivitas Antibakteri.....	20
	1. Penentuan KHM dengan metode dilusi tabung.....	20
	2. Penentuan KBM dengan metode <i>streaking</i> .20	
3.5.7	Analisis Hasil	21

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Ekstraksi dan Hidrolisis.....	23
4.2	Uji Fenolik	24
4.3	Identifikasi Menggunakan KC-SM.....	26
4.4	Uji Aktivitas Antibakteri.....	45
4.4.1	Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung.....	45
4.4.2	Penentuan KBM dengan Metode <i>Streaking</i>	46

BAB V PENUTUP

5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran.....	49

DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Sirih merah 5
Gambar 2.2	Struktur senyawa penyusun ekstrak air daun sirih hijau 6
Gambar 2.3	Struktur senyawa fenolik yang terkandung dalam daun sirih hijau 7
Gambar 2.4	<i>S. aureus</i> 12
Gambar 4.1	Reaksi pembentukan kompleks $[\text{Fe(III)}-(\text{fenolat})_6]^{3-}$ 24
Gambar 4.2	Delokalisasi elektron pada ion kavikolat..... 26
Gambar 4.3	Kromatogram KC ekstrak etil asetat daun sirih merah..... 27
Gambar 4.4	Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 47,042 menit..... 32
Gambar 4.5	Struktur senyawa metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida 34
Gambar 4.6	Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 55,089 menit..... 37
Gambar 4.7	Struktur senyawa asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida 38
Gambar 4.8	Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 56,993 menit..... 42
Gambar 4.9	Struktur senyawa hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida 43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Nama dan kadar senyawa penyusun ekstrak air daun sirih hijau	7
Tabel 4.1 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah	25
Tabel 4.2 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah setelah penambahan basa NaOH....	25
Tabel 4.3 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 47,042 menit	33
Tabel 4.4 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 55,089 menit	38
Tabel 4.5 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 56,993 menit	43
Tabel 4.6 Dugaan komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah berdasarkan spektra massa	44
Tabel 4.7 Hasil pengamatan tingkat kekeruhan pada tabung reaksi	45
Tabel 4.8 Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP	46
Tabel L.1 Massa daun sirih merah sebelum dan setelah pengeringan	69
Tabel L.2 Perhitungan jumlah koloni bakteri <i>S. aureus</i> untuk penentuan KBM dari ekstrak etil asetat daun sirih merah	75
Tabel L.3 Banyaknya pasangan hasil pengamatan (a, b) yang searah dengan hipotesis berurut dimana X_{ia} lebih besar dari X_{jb}	76
Tabel L.4 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah	78
Tabel L.5 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah setelah penambahan basa	79
Tabel L.6 Data hasil analisis senyawa menggunakan KC	81

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
L.1 Diagram Alir Tahapan Penelitian.....	55
L.2 Surat Keterangan Determinasi Daun Sirih Merah yang Digunakan.....	56
L.3 Preparasi Bahan Penelitian	57
L.3.1 Preparasi Daun Sirih Merah	57
L.3.2 Preparasi <i>Drying Agent</i>	57
L.3.3 Preparasi Larutan HCl 2 M	58
L.3.4 Preparasi Larutan FeCl ₃ 0,062 M.....	58
L.3.5 Preparasi Larutan NaOH 1 M.....	58
L.4 Proses Ekstraksi dan Hidrolisis.....	59
L.5 Uji Fenolik.....	60
L.5.1 Uji dengan Larutan FeCl ₃ 0,062 M.....	60
L.5.2 Uji dengan Spektrofotometer UV-Vis	60
L.6 Identifikasi Menggunakan KC-SM	61
L.7 Uji Aktivitas Antibakteri	61
L.7.1 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah.....	61
1. Pembuatan Larutan Kontrol Konsentrasi 0 % (Larutan <i>Tween</i> 20 0,01%)	61
2. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 %.....	62
3. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 27,5 %.....	62
4. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 25 %.....	63
5. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 22,5 %.....	63
6. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 20 %.....	64
7. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 17,5 %.....	64
8. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 15 %.....	65
L.7.2 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) Miring dan <i>Nutrient Agar Plate</i> (NAP)	66

L.7.3	Pembuatan Media Cair <i>Nutrient Broth</i> (NB).....	67
L.7.4	Peremajaan Biakan Murni <i>S. aureus</i>	67
L.7.5	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>S. aureus</i>	68
L.7.6	Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung....	68
L.7.7	Penentuan KBM dengan Metode <i>Streaking</i>	69
L.8	Perhitungan	69
L.8.1	Perhitungan Kadar Air dalam Daun Sirih Merah ...	69
L.8.2	Perhitungan Rendemen Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah.....	70
L.8.3	Pembuatan <i>Drying Agent</i>	70
L.8.4	Pembuatan Larutan HCl 2 M.....	71
L.8.5	Pembuatan Larutan FeCl ₃ 0,062 M.....	72
L.8.6	Pembuatan Larutan NaOH 1 M.....	72
L.8.7	Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah	72
	1. Pembuatan Larutan Kontrol Konsentrasi 0 % (Larutan <i>Tween</i> 20 0,01%)	72
	2. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 %.....	72
	3. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 27,5 %.....	73
	4. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 25 %.....	73
	5. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 22,5 %.....	73
	6. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 20 %.....	73
	7. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 17,5 %.....	73
	8. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 15 %.....	74
L.8.8	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>S. aureus</i> 10 ⁶ sel/mL	74
L.8.9	Uji Jonckheere-Terpstra	75
L.9	Spektrum UV-Vis Uji Fenolik	78
L.9.1	Spektrum UV-Vis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah	78
L.9.2	Spektrum UV-Vis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Setelah Penambahan Basa	79

L.10	Hasil Analisis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Menggunakan KC-SM.....	80
L.10.1	Kromatogram KC	80
L.10.2	Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC....	81
L.10.3	Hasil Pindaian (<i>Scan</i>) dengan Spektrometer Massa terhadap Komponen Utama dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah	82
	1. Spektrum Massa dengan waktu retensi 47,042 menit.....	82
	2. Spektrum Massa dengan waktu retensi 55,089 menit.....	83
	3. Spektrum Massa dengan waktu retensi 56,993 menit.....	84
L.11	Pustaka Spektrum Massa Komponen dalam Sirih Merah....	85
L.11.1	Senyawa Kavikol (4-alilfenol).....	85
L.11.2	Senyawa Kavikol Asetat	85
L.12	Foto-Foto Penelitian	86
L.12.1	Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah.....	86
L.12.2	Penentuan KHM Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>S. aureus</i>	86
L.12.3	Penentuan KBM Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>S. aureus</i>	87

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia. Selain dikenal sebagai tanaman hias, tanaman yang termasuk dalam famili *Piperaceae* ini ternyata juga bermanfaat untuk mengobati berbagai macam penyakit. Secara tradisional, sirih merah banyak digunakan untuk mengobati beberapa penyakit dalam seperti diabetes, tuberkulosis, asam urat, ambeien, dan hepatitis, serta untuk pengobatan luar seperti obat kumur dan obat yang dibalurkan pada bagian tubuh yang sakit atau luka, misalnya gatal-gatal, luka bernanah, jerawat, dan kadas, karena dipercaya bahwa tanaman ini mengandung senyawa antibakteri yang tinggi (Sudewo, 2005).

Piperaceae telah banyak diteliti secara luas sebagai sumber senyawa bioaktif. Beberapa penelitian terhadap daun sirih hijau (*Piper betle*) telah dapat mengidentifikasi adanya senyawa fenolik yang terkandung sebagai komponen utama. Menurut penelitian Nalina and Rahim (2007), dan didukung penelitian Maisuthisakul (2008), senyawa fenolik yang terdapat pada tanaman ini diantaranya kavikol, hidroksikavikol, kavibetol, kavibetol asetat, dan eugenol.

Pelczar *et al.* (1986) menyebutkan bahwa senyawa fenol dan turunannya sangat efektif sebagai senyawa antibakteri, baik sebagai bakteriostatik maupun bakterisida tergantung pada konsentrasi yang digunakan. Bakteriostatik adalah tindakan yang hanya menghambat pertumbuhan dan multiplikasi bakteri, dinyatakan dengan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum). Sedangkan bakterisida merupakan tindakan yang menyebabkan kematian bakteri, dinyatakan dengan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum).

Aktivitas antibakteri dari suatu senyawa antibakteri ditentukan dengan menggunakan bakteri uji tertentu yang memiliki ketahanan cukup tinggi. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang paling banyak digunakan untuk standar tes evaluasi bahan-bahan antibakteri (Chatin dan Suharto, 1994). Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri yang biasa ditemukan pada kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir manusia. Bakteri yang termasuk

dalam famili *Micrococcaceae* ini merupakan penyebab terjadinya berbagai macam infeksi seperti pada jerawat, bisul, dan luka bernanah pada bagian tubuh mana pun (Pelczar *et al.*, 1986).

Ali *et al.* (2007) telah melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun *Piper longum* (*Piperaceae*) menggunakan beberapa pelarut dengan kepolaran yang berbeda terhadap *S. aureus*. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak dari pelarut semipolar etil asetat menghasilkan diameter zona hambat yang terbesar dibandingkan ekstrak dalam pelarut yang lain. Menurut penelitian Maisuthisakul (2008), ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dapat melarutkan paling banyak komponen senyawa fenolik pada daun *Piper betle* dibandingkan dengan pelarut lain yang lebih polar.

Gan dan Setiabudy (1987), menjelaskan bahwa senyawa fenol dan turunannya efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri karena fenol dapat mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Senyawa fenol dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel. Gilman *et al.* (1991) menambahkan bahwa setelah gugus polar molekul fosfolipid bereaksi dengan anion fenolat dari senyawa fenol, membran sel akan rusak dan bakteri akan mengalami kematian.

Identifikasi komponen dalam ekstrak daun sirih merah dapat dilakukan menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM). Pemisahan komponen dalam campuran menggunakan Kromatografi Cair (KC) memiliki metode yang lebih baik daripada menggunakan Kromatografi Gas (KG) untuk senyawa-senyawa yang tidak volatil, tidak stabil dengan pemanasan, makromolekul, komponen obat-obatan, dan senyawa biokimia. Fasa diam dan fasa gerak dalam KC dapat berinteraksi secara selektif dengan sampel. Interaksi tersebut dapat berupa kompleksasi atau terjadinya ikatan hidrogen, dimana interaksi-interaksi tersebut tidak terjadi pada fasa gerak KG karena fasa geraknya merupakan gas (Lindsay, 1992).

Berdasarkan uraian di atas dapat diduga bahwa daun tanaman sirih merah juga mengandung komponen senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Senyawa fenolik dapat diisolasi dari daun sirih merah dengan ekstraksi soxhlet menggunakan pelarut etil asetat, dan diidentifikasi keberadaannya menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM). Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap *S.aureus* ditunjukkan dengan nilai KHM dan KBM.

1.2 Rumusan Masalah

1. Komponen utama apakah yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*)?
2. Bagaimanakah aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap *S. aureus* berdasarkan nilai KHM dan KBM?

1.3 Batasan Masalah

1. Identifikasi komponen utama ekstrak etil asetat daun sirih merah berdasarkan spektra massa hasil analisis menggunakan KC-SM.
2. Komponen utama ekstrak etil asetat daun sirih merah yang dikarakterisasi berdasarkan % luas puncak pada kromatogram.
3. Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dengan metode dilusi tabung untuk menentukan KHM dan metode *streaking* untuk menentukan KBM.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui komponen utama ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*).
2. Menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap *S. aureus* berdasarkan nilai KHM dan KBM.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai komponen utama yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan pemanfaatannya sebagai tanaman obat yang memberikan efek antibakteri terhadap *S.aureus*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Tanaman yang sering ditanam atau dipelihara sebagai tanaman hias ini ternyata juga memiliki manfaat yang besar, baik terhadap kesehatan maupun kecantikan. Tanaman sirih merah (*Piper crocatum*) diklasifikasikan sebagai berikut (Dasuki, 1994):



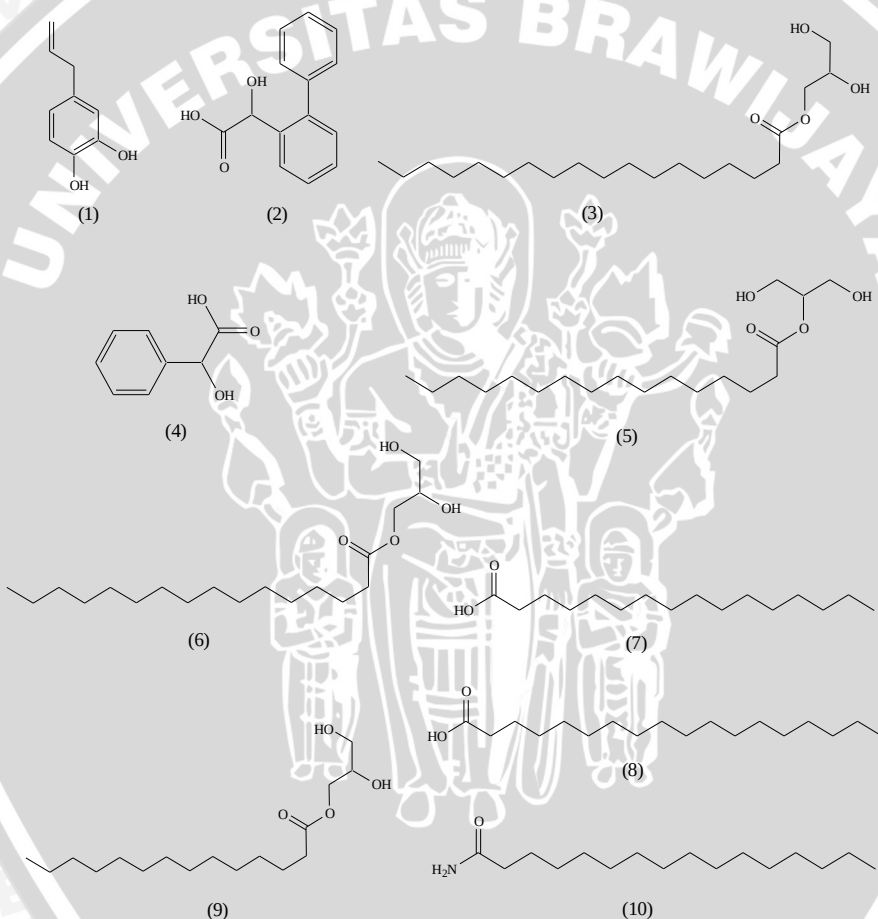
Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub Kelas : Magnoliidae
Ordo : Piperales
Famili : Piperaceae
Genus : Piper
Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Gambar 2.1 Sirih Merah

Menurut Sudewo (2005), tanaman yang tergolong dalam famili *Piperaceae* ini tumbuh menjalar seperti halnya sirih hijau. Tanaman ini tidak berbunga, batangnya bulat berwarna hijau keunguan. Daunnya berbentuk seperti jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata, permukaannya mengkilap dan tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlandir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Disetiap buku tumbuh bakal akar.

Berdasarkan pemeriksaan fitokimia menggunakan uji kualitatif, dapat disimpulkan bahwa sampel daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, senyawa polifenolat, tanin dan minyak atsiri (Sudewo, 2005).

Sirih merah (*Piper crocatum*) dan sirih hijau (*Piper betle*) merupakan tanaman dalam genus yang sama. Nalina and Rahim (2007) telah mengidentifikasi senyawa penyusun dalam ekstrak air daun sirih hijau menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM). Struktur senyawa penyusun ekstrak air daun sirih hijau disajikan pada Gambar 2.2, sedangkan nama senyawa penyusun beserta kadarnya dapat dilihat pada tabel 2.1.



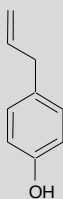
Gambar 2.2 Struktur senyawa penyusun ekstrak air daun sirih hijau

Tabel 2.1 Nama dan kadar senyawa penyusun ekstrak air daun sirih hijau

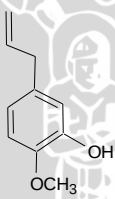
No	Senyawa	% Luas Puncak
1.	Hidroksikavikol	39,31
2.	Asam benzenasetat, alfa-hidroksifenil	0,95
3.	Asam oktadekanoat, 2,3-bis(hidroksi)propil ester	24,49
4.	Asam benzenasetat, alfa-hidroksi	3,96
5.	2-Monopalmitin	1,56
6.	Asam heksadekanoat, 2,3-bis(hidroksi)propil ester	14,71
7.	Asam heksadekanoat	1,60
8.	Asam oktadekanoat	3,77
9.	Asam miristat, 2,3-bis(hidroksi)propil ester	1,58
10.	Heksadekanamida	1,46

(Nalina and Rahim, 2007)

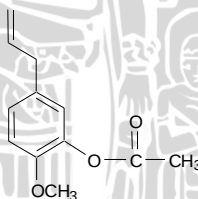
Maisuthisakul (2008), menyebutkan bahwa struktur senyawa fenolik yang terkandung dalam daun sirih hijau berhubungan dengan senyawa kavikol, kavibetol, kavibetol asetat, dan eugenol. Struktur senyawa fenolik dalam daun sirih hijau disajikan pada Gambar 2.3 berikut.



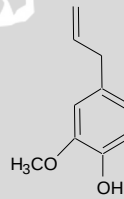
Kavikol



Kavibetol



Kavibetol Asetat



Eugenol

Gambar 2.3 Struktur senyawa fenolik yang terkandung dalam daun sirih hijau (Maisuthisakul, 2008)

2.2 Metode Isolasi

2.2.1 Ekstraksi Soxhlet

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya berdasarkan kelarutan selektifnya. Berdasarkan komponen yang diekstraksi, maka ekstraksi dibedakan menjadi dua macam, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair (Eugene, 1981). Menurut penelitian Maisuthisakul (2008), ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dapat melarutkan paling banyak komponen senyawa fenolik pada daun *Piper betle* dibandingkan dengan pelarut lain yang lebih polar seperti metanol, etanol, dan aseton.

Senyawa fenol dalam tanaman dapat menimbulkan gangguan dalam proses isolasi karena kemampuannya berinteraksi dengan protein melalui ikatan hidrogen. Bila kandungan sel bercampur dan membran menjadi rusak selama proses isolasi, senyawa fenol cepat sekali berinteraksi dengan protein. Fenol juga bersifat sangat peka terhadap oksidasi secara enzimatis dan mungkin hilang pada proses isolasi akibat kerja enzim fenolase yang terdapat dalam tanaman. Ekstraksi senyawa fenol dalam tanaman dengan etanol mendidih biasanya mencegah terjadinya oksidasi (Harborne, 1987). Karena itu metode isolasi yang dilakukan adalah ekstraksi soxhlet namun dengan pelarut etil asetat.

Ekstraksi soxhlet merupakan ekstraksi padat-cair yang banyak digunakan untuk mengisolasi substansi yang terkandung di dalam bahan alam dengan menggunakan alat yang disebut ekstraktor soxhlet. Prinsip yang dilakukan pada ekstraksi soxhlet yaitu pemanasan (penguapan), kondensasi dan proses pengekstraksian. Sebelum proses ekstraksi, sampel dimasukkan ke dalam timbel yang terbuat dari kertas saring. Pelarut diuapkan lalu dikondensasikan. Pelarut yang terkondensasi jatuh ke timbel yang berisi sampel sehingga terjadi proses pengekstraksian. Sistem pipa sifon mengakibatkan ekstrak jatuh ke dalam labu didih dan pelarut diuapkan kembali (Galkar and Dandekar, 2001).

Campuran yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pengurangan tekanan. Prinsip kerjanya adalah mengurangi tekanan suatu sistem sehingga tekanannya semakin kecil (kurang dari 1 atm) dan menyebabkan titik didih larutan menurun. Dengan penurunan titik didih,

penguapan lebih cepat terjadi, sehingga ekstrak dapat dipisahkan dari pelarutnya (Vogel, 1989).

2.2.2 Hidrolisis

Hidrolisis merupakan proses kimia dengan menggunakan air sebagai pemecah suatu persenyawaan, termasuk pemecahan ikatan glikosida, saponifikasi lemak dan ester, serta pemecahan ikatan peptida. Senyawa fenol mudah larut dalam air karena umumnya senyawa ini sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Karena itu, untuk mengisolasi senyawa fenol perlu dilakukan hidrolisis untuk memecah ikatan antara fenol dan gula (Harborne, 1987).

Reaksi dengan air sangat lambat sehingga reaksi ini dikatalisis dengan penambahan asam atau basa untuk meningkatkan laju hidrolisis. Menurut Harborne (1987), untuk menghidrolisis suatu senyawa organik dapat dilakukan dua cara, yaitu hidrolisis asam dan hidrolisis basa. Namun, cara hidrolisis yang sering digunakan adalah hidrolisis asam. Hidrolisis asam dilakukan dengan penambahan HCl 2 M dan dipanaskan selama 30-40 menit pada temperatur 100 °C. Lee (2004) menambahkan bahwa larutan HCl 2 M (atau HCl 6 %) merupakan katalis asam dengan konsentrasi maksimal yang digunakan untuk hidrolisis senyawa fenolik.

2.3 Uji Fenolik

Senyawa fenol sederhana dapat diidentifikasi keberadaannya dengan menambahkan larutan besi(III) klorida 1 % (atau 0,062 M) dalam air atau etanol ke dalam larutan sampel, yang menimbulkan warna hijau, merah-ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harborne, 1987). Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena terbentuknya kompleks antara fenol dengan FeCl_3 (Mohan, 2003). Namun, uji ini tidak dapat digunakan untuk membedakan macam-macam golongan senyawa fenol (Robinson, 1995).

Senyawa fenolik merupakan senyawa aromatik sehingga menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV. Selain itu, secara khas senyawa fenolik menunjukkan pergeseran batokromik pada spektrumnya apabila ditambahkan basa (Harborne, 1987). Hal ini dikarenakan, terjadi ionisasi pada gugus hidroksil sehingga memperpanjang sistem delokalisasi elektron. Akibat delokalisasi elektron,

energi yang digunakan untuk transisi elektron akan lebih rendah, dengan demikian akan menyerap cahaya pada panjang gelombang yang lebih besar (Markham, 1988).

Identifikasi senyawa organik dengan spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada serapan cahaya oleh molekul pada daerah spektrum UV-Vis. Serapan cahaya oleh molekul pada daerah UV-Vis tergantung pada struktur elektronik dari molekul (Sastrohamidjojo, 1991).

Spektra UV senyawa organik berkaitan erat dengan transisi diantara tingkatan-tingkatan energi elektronik. Keadaan dasar suatu molekul organik mengandung elektron-elektron valensi dalam tiga tipe utama orbital molekul, yaitu orbital sigma (σ), orbital phi (π), dan orbital *non bonding* (n) (Sastrohamidjojo, 1991). Transisi-transisi elektron mencakup promosi suatu elektron dari salah satu dari tiga keadaan dasar (σ , π , atau n) ke salah satu dari dua keadaan eksitasi (σ^* atau π^*) (Fessenden dan Fessenden, 1992).

2.4 Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM)

Kromatografi Cair (KC) merupakan istilah pada kromatografi dengan fase gerak berupa cairan. Berbeda dengan Kromatografi gas (KG), penggunaan KC tidak dibatasi pada sifat volatil suatu senyawa atau stabilitasnya terhadap panas (Braithwaite and Smith, 1985).

Pada KC dikenal istilah kromatografi fase normal dan fase terbalik. Pada fase normal, fase diam bersifat polar dan fase geraknya nonpolar. Sedangkan pada fase terbalik, fase diam bersifat nonpolar dan fase geraknya polar sehingga senyawa polar akan keluar terlebih dahulu bersama eluen. Gugus alkil C-18 yang terikat pada permukaan partikel silika, disebut dengan ODS (oktadekilsilan) digunakan sebagai fase diam pada kromatografi fase terbalik. Oktadekil berikatan kuat dengan analit nonpolar (Lindsay, 1992).

Selain kolom, pemisahan juga dipengaruhi fase geraknya. Hal ini dikarenakan derajat kelarutan komponen dalam sampel bervariasi terhadap pelarut yang berbeda. Pemilihan pelarut organik dapat mempengaruhi selektifitas dan resolusinya. Pelarut organik yang digunakan dalam kromatografi fase terbalik adalah metanol, tetrahidrofur dan asetonitril untuk meningkatkan kekuatan

pelarutnya. Kekuatan pelarut merupakan kemampuan pelarut untuk menahan analit dalam fase gerak (Lindsay, 1992).

Lindsay (1992) juga menjelaskan bahwa kolom pada KC umumnya memiliki panjang 10-25 cm dengan diameter eksternal 6,35 mm dan diameter internal 4,6 mm. Fasa gerak diinjeksikan ke dalam kolom dengan laju alir 1-5 mL/menit. Waktu yang diperlukan oleh suatu zat terlarut untuk melewati kolom (waktu retensi) merupakan karakteristik dari zat terlarut tersebut pada kondisi khusus yang digunakan. Namun, data waktu retensi saja tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang belum diketahui. Karena itu, KC dikombinasikan dengan suatu detektor yang dapat menganalisis zat terlarut begitu zat tersebut keluar dari kolom.

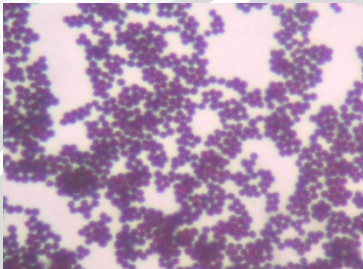
Spektrometer massa merupakan detektor yang baik untuk KC. Spektrometer massa digunakan pada efluen kromatografi sehingga memungkinkan pengukuran spektrum massa setiap komponen dari aliran komponen murni atau campuran (Gritter *dkk.*, 1991).

Spektrometri massa didasarkan pada penguraian senyawa organik dan pola fragmentasi menurut massanya. Pada spektrometri massa, sampel dalam bentuk gas ditembak dengan elektron berenergi tinggi. Tabrakan antara sebuah molekul organik dengan salah satu elektron berenergi tinggi menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari molekul itu dan terbentuknya suatu ion organik. Ion organik yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tinggi ini tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain (Fessenden dan Fessenden, 1992). Spektrum massa merupakan grafik antara limpahan relatif dengan perbandingan massa/muatan (m/z) (Sastrohamidjojo, 1991).

Pecahnya suatu molekul/ion menjadi fragmen-fragmen tergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Pola fragmentasi suatu senyawa adalah spesifik dan tergantung dari struktur kimia senyawa tersebut, oleh karena itu Spektrometri Massa dapat digunakan untuk mengkarakterisasi senyawa tertentu (Khopkar, 1990).

2.5 *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai berikut (Bonang dan Koeswardono, 1982):



Divisi	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Gambar 2.4 *S. aureus*

Bakteri *S. aureus* adalah bakteri kokus gram positif, dan merupakan patogen utama pada manusia. Hampir setiap orang pernah mengalami berbagai infeksi *S. aureus* selama hidupnya, dari keracunan makanan atau infeksi kulit yang ringan, sampai infeksi yang tidak bisa disembuhkan (Brooks *et al.*, 2001).

Jawetz *et al.* (1974) menjelaskan bahwa bakteri ini memiliki bentuk bulat atau kokus dengan diameter 0,4-1,2 μm (rata-rata 0,8 μm). Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat akan memperlihatkan koloni berbentuk bulat, halus, menonjol, berkilau-kilauan, dan berwarna kuning emas. Sedangkan yang berasal dari perbenihan cair bisa terlihat bentukan kuman yang terlepas sendiri-sendiri, berpasangan atau rantai pendek.

Bakteri *S. aureus* tumbuh dengan baik pada berbagai media bakteriologi dibawah suasana aerobik atau mikroaerofilik. Tumbuh dengan cepat pada temperatur 37 °C, namun pembentukan pigmen yang terbaik adalah pada temperatur kamar (20-35 °C) (Brooks *et al.*, 2001).

Diantara bakteri yang tidak membentuk spora, *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang kuat daya tahannya. Pada agar miring dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain, dan dalam nanah dapat tetap hidup selama 6-14 minggu. Karena itu, galur *Staphylococcus* tertentu terkadang digunakan untuk

standar tes evaluasi bahan-bahan antiseptik atau antibiotik (Chatin dan Suharto, 1994).

Dinding sel bakteri gram positif mengandung 30-70 % peptidoglikan. Peptidoglikan merupakan polimer dari perulangan disakarida yang tersusun atas monosakarida N-asetilglukosamin (NAG) dan N-asam asetimuraid (NAM) yang melekat pada suatu peptida yang terdiri atas 4 atau 5 asam amino yaitu L-alanin, D-alanin, asam D-glutamat, dan lisin atau asam diaminopimelat membentuk selubung mengelilingi sel. Dinding sel bakteri gram positif mengandung lebih banyak lapisan peptidoglikan dibandingkan dengan bakteri gram negatif, membentuk struktur yang tebal dan kaku, serta mengandung asam teikoat yang terdiri dari alkohol dan fosfat. Lapisan setelah dinding sel adalah membran plasma, merupakan membran yang menyelubungi sitoplasma, tersusun atas lapisan fosfolipid dan protein (Tortora *et al.*, 2001).

2.6 Senyawa Antibakteri

Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh suatu bakteri (Jawetz *et al.*, 1974). Antibakteri dapat bertindak sebagai bakteriostatik atau bakterisida. Bakteriostatik adalah suatu tindakan yang menghambat pertumbuhan dan multiplikasi bakteri, dan apabila tindakan dihilangkan bakteri akan tumbuh kembali. Sedangkan bakterisida merupakan tindakan yang menyebabkan kematian seluruh bakteri (Pelczar *et al.*, 1986). Brooks *et al.* (2001) menambahkan bahwa aksi bakterisida berbeda dengan bakteriostatik hanya dalam sifat irreversibelnya, yaitu seluruh bakteri yang terbunuh menyebabkan tidak adanya bakteri yang dapat tumbuh dan menggandakan diri, bahkan setelah tidak berkontak dengan senyawa antibakteri.

Antibakteri yang ideal haruslah memenuhi syarat-syarat sebagai berikut (Brooks *et al.*, 2001):

1. Mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*broad spectrum antibiotic*)
2. Tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen

3. Tidak menimbulkan efek samping (*side effect*) yang buruk pada tubuh, seperti reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi lambung, dan sebagainya
4. Tidak mengganggu keseimbangan flora normal tubuh seperti flora usus atau flora kulit

Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa antibakteri yang berasal dari sumber hayati dibagi menjadi dua bagian, yaitu ditinjau berdasarkan komponen bioaktif dalam senyawa antibakteri dan mekanisme kerjanya:

1. Komponen bioaktif dalam senyawa antibakteri

Aktivitas senyawa antibakteri dipengaruhi oleh adanya komponen bioaktif yang terkandung dalam senyawa tersebut, sehingga setiap senyawa mempunyai perbedaan aktivitas. Komponen bioaktif tersebut antara lain:

- a. Cincin aromatik

Komponen bioaktif ini merupakan cincin aromatik dalam bentuk senyawa fenolik yang mampu menginaktivkan enzim yang berperan dalam metabolisme sel bakteri. Selain itu, senyawa fenolik dapat menembus dinding sel bakteri, merusak membran sel, serta mendenaturasi protein sitoplasma (Velmurugan *et al.*, 2009).

- b. Gugus alkil

Penambahan gugus alkil pada struktur molekul cincin benzena dari fenol dapat meningkatkan aktivitas antibakterinya. Aktivitas antibakteri lebih efektif dengan adanya penambahan satu rantai alkil, dan gugus alkil yang tidak bercabang lebih efektif daripada yang bercabang. Gugus alkil merupakan rantai hidrofobik yang berperan membentuk interaksi hidrofobik dengan lipid pada membran sel bakteri (Kubo *et al.*, 1993).

2. Mekanisme kerja senyawa antibakteri

Mekanisme kerja senyawa antibakteri tidak sepenuhnya dimengerti. Namun, mekanisme aksi ini dapat dikelompokkan menjadi 4 kelompok utama (Brooks *et al.*, 2001):

- a. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel
- b. Penghambatan terhadap fungsi membran sel

- c. Penghambatan terhadap sintesis protein (misalnya penghambatan translasi dan transkripsi material genetik)
- d. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat

Senyawa-senyawa antibakteri yang utama dapat dikelompokkan menjadi golongan senyawa fenol dan turunannya, alkohol, halogen, logam berat dan senyawanya, detergen, senyawa amonium kuaterner, dan aldehid. Larutan fenol 5 % dapat membunuh dengan cepat sel bakteri. Aktivitas antibakteri senyawa fenol meningkat dengan adanya penambahan substituen kimia pada struktur cincin fenol (Pelczar *et al.*, 1986).

2.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji kepekaan terhadap senyawa antibakteri dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu metode dilusi dan metode difusi.

1. Metode dilusi tabung

Metode dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum) dari senyawa antibakteri.

KHM merupakan konsentrasi terendah senyawa antibakteri pada tabung reaksi dimana hasil biakan mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri). Metode ini menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi dengan media cair dan sejumlah tertentu bakteri uji. Kemudian masing-masing tabung reaksi diisi dengan senyawa antibakteri yang telah diencerkan secara serial. Satu seri tabung reaksi diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 18-24 jam dan diamati kekeruhannya. Konsentrasi terendah senyawa antibakteri pada tabung reaksi dimana hasil biakan mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri) adalah KHM dari senyawa antibakteri tersebut (Pelczar *et al.*, 1986).

Biakan hasil uji dilusi tabung pada penentuan KHM selanjutnya diinokulasi pada media agar padat yang bebas senyawa antibakteri dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Cara penanaman pada media padat dapat dilakukan dengan metode *streaking*. Pada metode ini, kultur bakteri yang telah dicampur dengan senyawa antibakteri digoreskan pada media

pertumbuhan dengan pola tertentu. Bakteri akan tumbuh dan bereproduksi membentuk koloni. KBM dari senyawa antibakteri terhadap bakteri uji ditunjukkan pada konsentrasi terendah senyawa antibakteri dimana tidak ada pertumbuhan koloni bakteri (Tortora *et al.*, 2001).

Bakteri yang tumbuh memiliki kemungkinan bergabung dengan bakteri lain membentuk suatu kumpulan. Apabila jumlah bakteri dinyatakan dalam satuan bakteri per mililiter, jumlah bakteri akan terhitung lebih sedikit dari jumlah bakteri tunggal yang seharusnya. Oleh karena itu, satu kumpulan bakteri hanya akan menghasilkan satu koloni, sehingga jumlah bakteri dinyatakan dengan *Colony Forming Unit* (CFU) per mililiter (Pelczar *et al.*, 1986).

2. Metode difusi cakram

Metode difusi digunakan untuk mengamati timbulnya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pada metode ini, cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu senyawa antibakteri ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah inkubasi, diameter zona hambatan di sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan senyawa antibakteri terhadap bakteri uji (Brooks *et al.*, 2001).

2.8 Hipotesis

Ekstrak etil asetat daun sirih merah (*Piper crocatum*) mengandung golongan senyawa fenolik sebagai komponen utamanya sehingga memberikan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan Juli 2010. Proses ekstraksi, hidrolisis, dan uji fenolik dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Analisis KC-SM dilakukan di Laboratorium Pengujian Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta Pusat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Bahan-Bahan Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*) hasil penanaman di daerah Malang. Bahan-bahan penelitian yang digunakan meliputi pelarut etil asetat, larutan HCl 2 M, larutan FeCl_3 0,062 M, larutan NaOH 1 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gas N_2 , biakan bakteri *S. aureus*, serbuk *Nutrient Agar* (NA), serbuk *Nutrient Broth* (NB), Tween 20 (Polioksietilena (20) sorbitan monolaurat), dan akuades.

3.3 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya blender, neraca analitik, seperangkat alat ekstraktor soxhlet 500 mL, seperangkat alat refluks 1000 mL, corong pisah 500 mL, seperangkat alat penyaring vakum, *rotary evaporator* pengurangan tekanan, seperangkat alat UV-Vis merek Shimadzu, seperangkat alat KC-SM merek Shimadzu LC 10 AD-QP 8000, autoklaf, inkubator, seperangkat alat *colony counter*, cawan petri, seperangkat peralatan gelas, rak tabung reaksi, jarum ose, kertas saring Whatman no.40, kapas, karet hisap, bunsen, kertas *tissue*, aluminium foil, botol sampel, dan botol semprot.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Preparasi daun sirih merah
2. Ekstraksi daun sirih merah menggunakan pelarut etil asetat
3. Hidrolisis ekstrak etil asetat daun sirih merah
4. Uji fenolik
5. Identifikasi komponen utama dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah menggunakan KC-SM
6. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap *S. aureus*

3.5 Cara Kerja Penelitian

3.5.1 Preparasi Daun Sirih Merah

Daun sirih merah dicuci dengan air bersih, kemudian dikering-anginkan selama 4-5 hari. Setelah kering, daun sirih merah dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk. Skema kerja terlampir pada Lampiran L.3.1.

3.5.2 Ekstraksi Daun Sirih Merah

Serbuk daun sirih merah ditimbang sebanyak 80 gram, diekstraksi dengan ekstraktor soxhlet menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 700 mL. Ekstraksi dilakukan sampai larutan dalam ekstraktor soxhlet menjadi jernih hingga tak berwarna.

3.5.3 Hidrolisis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

Ekstrak etil asetat daun sirih merah ditambahkan larutan HCl 2 M dengan perbandingan volume 2:1, kemudian dipanaskan (refluks) di atas *heating mantle* selama 30-40 menit. Ditambahkan akuades ke dalam ekstrak hasil hidrolisis yang telah dingin dengan perbandingan volume 1:1, kemudian diekstraksi menggunakan corong pisah, dan dipisahkan antara lapisan air dan lapisan etil asetat. Lapisan air diekstraksi kembali dengan pelarut etil asetat.

Lapisan etil asetat ditambah $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kemudian disaring menggunakan penyaringan vakum. Ekstrak etil asetat daun sirih merah hasil hidrolisis diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pengurangan tekanan, kemudian dipekatkan dengan gas N_2 . Skema kerja ekstraksi daun sirih merah dan hidrolisis ekstrak terlampir pada Lampiran L.4.

3.5.4 Uji Fenolik

Uji senyawa fenolik dilakukan dengan memasukkan 1 mL ekstrak etil asetat daun sirih merah ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes FeCl_3 0,062 M. Adanya kandungan senyawa fenolik ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah-ungu, biru, biru-ungu, atau hitam yang kuat. Skema kerja terlampir pada Lampiran L.5.1.

Sebanyak 1 tetes basa NaOH 1 M ditambahkan ke dalam 1 tetes ekstrak etil asetat daun sirih merah, kemudian diencerkan hingga volume 10 mL dengan pelarut etil asetat. Larutan tersebut dianalisis menggunakan seperangkat alat UV-Vis merek Shimadzu, dan dibandingkan spektrum UV-Vis yang dihasilkan dengan spektrum tanpa penambahan basa. Adanya senyawa fenolik menunjukkan pergeseran batokromik pada spektrum setelah ditambahkan basa. Skema kerja terlampir pada Lampiran L.5.2.

3.5.5 Identifikasi Menggunakan KC-SM

Dipipet 20 μL ekstrak etil asetat daun sirih merah kemudian diinjeksikan ke dalam alat KC-SM merek Shimadzu LC 10 AD-QP 8000 dengan kondisi operasional:

Kromatograf Cair

Kolom : Shim-Pak VP ODS 250 x 4,6 mm
Detektor : PDA, UV 320 nm
Temperatur kolom : 30 °C
Kecepatan alir : 0,5 mL/menit
Eluen : A. Air
B. Asetonitril

Gradien

Waktu (menit)	% A	% B
10	90	10
49	60	40
51	90	10
61	90	10

Spektrometer Massa (m/z 100-800)

Jenis pengionan : *electrospray ionization* (ESI)
Polaritas : Positif
Library : Wiley 7

3.5.6 Uji Aktivitas Antibakteri

1. Penentuan KHM dengan metode dilusi tabung

Tabung reaksi steril disiapkan sebanyak 9 buah. Suspensi bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 10^6 sel/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi (nomor 1-8) yang sebelumnya ditambah dengan 1 mL media cair NB. Ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan konsentrasi 0 %; 15 %; 17,5 %; 20 %; 22,5 %; 25 %; 27,5 %; dan 30 % (v/v), masing-masing dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 1 mL. Skema kerja pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah terlampir pada Lampiran L.7.1. Ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan pada tabung reaksi nomor 9 tanpa penambahan suspensi bakteri. Kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan pengamatan terhadap kekeruhan pada tabung dan ditentukan KHM ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap *S. aureus* dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari larutan ekstrak tersebut yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri). Skema kerja terlampir pada Lampiran L.7.6.

2. Penentuan KBM dengan metode *streaking*

Suspensi bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam dari tabung reaksi hasil dilusi tabung digoreskan pada NAP menggunakan *loop* yang telah disterilkan, kemudian cawan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya, jumlah koloni *S. aureus* yang tumbuh pada NAP dihitung dengan menggunakan *colony counter*. KBM ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah ekstrak etil asetat daun sirih merah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada cawan petri. Skema kerja terlampir pada Lampiran L.7.7.

3.5.7 Analisis Hasil

Berdasarkan analisis menggunakan KC-SM akan diperoleh pola fragmentasi senyawa-senyawa dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah, dengan melakukan interpretasi terhadap pola fragmen-

tasi senyawa tersebut, dapat ditentukan hubungan pola fragmentasi dengan struktur senyawanya. Penentuan nilai KHM dilakukan berdasarkan tingkat kekeruhan pada tabung reaksi yang berisi berbagai variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah yang telah ditambahkan ke dalam suspensi bakteri *S. aureus*, sedangkan nilai KBM ditentukan berdasarkan hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP selanjutnya dilakukan uji statistik nonparametrik menggunakan uji Jonckheere-Terpstra untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan yang nyata dari setiap perlakuan konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi dan Hidrolisis

Pada preparasi bahan penelitian, daun sirih merah dikeringkan untuk menghilangkan kandungan airnya, pengeringan dilakukan dengan cara dikering-anginkan selama 4-5 hari pada tempat dengan aliran udara yang baik. Ekstraksi daun sirih merah dengan pelarut etil asetat dilakukan dengan metode ekstraksi soxhlet. Ekstraksi komponen utama dalam daun sirih merah, yang diduga adalah golongan senyawa fenolik, dengan menggunakan pelarut mendidih dapat mencegah terjadinya oksidasi fenol secara enzimatik pada tanaman. Harborne (1987) menjelaskan bahwa adanya enzim fenolase pada tanaman memungkinkan fenol hilang pada proses isolasi, karena sifat senyawa fenol yang sangat peka terhadap oksidasi.

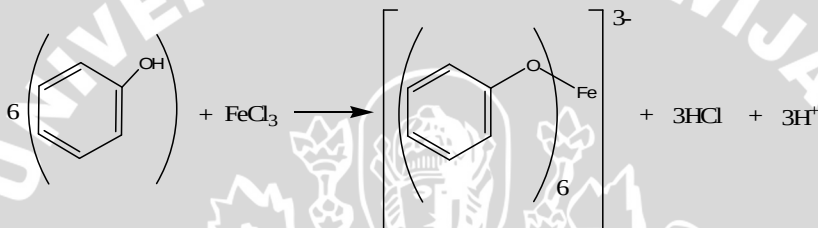
Ekstrak etil asetat daun sirih merah berupa cairan berwarna hijau kehitaman dan terdapat sedikit gumpalan. Adanya gumpalan diduga karena kandungan fenolik yang terlarut dalam pelarut etil asetat berikatan dengan gula sebagai glikosida. Karena itu dilakukan hidrolisis terhadap ekstrak etil asetat daun sirih merah. Reaksi hidrolisis bertujuan untuk memutus ikatan glikosida pada senyawa penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah.

Proses hidrolisis dilakukan dalam suasana asam dengan HCl 2 M dan dipanaskan selama 30-40 menit pada 100 °C. HCl berfungsi sebagai katalis asam karena hidrolisis akan lebih mudah terjadi jika terdapat donor H⁺ yang akan memprotonasi atom oksigen pada ikatan glikosida sehingga ikatan glikosida putus.

Setelah dipekatkan, ekstrak etil asetat daun sirih merah yang didapatkan berwarna hijau kehitaman. Ekstrak diperoleh sebanyak 14 mL dengan massa 15,46 gram, sehingga dari 80 gram serbuk daun sirih merah yang diekstraksi, diperoleh rendemen ekstrak etil asetat daun sirih merah sebesar 19,33 % (b/b). Sisanya merupakan komponen-komponen yang tidak dapat larut dalam pelarut etil asetat yang digunakan, diantaranya golongan senyawa lipid yang bersifat nonpolar, karbohidrat yang kurang larut dalam pelarut etil asetat, serta protein yang telah terdenaturasi karena pemanasan.

4.2 Uji Fenolik

Perubahan warna dari uji fenolik dengan metode penambahan larutan FeCl_3 0,062 M ke dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah cukup sulit untuk diamati karena warna awal dari ekstrak adalah hijau kehitaman. Reaksi positif pada uji ini ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah-ungu, biru, biru-ungu, atau hitam yang kuat karena terbentuk senyawa kompleks antara fenol atau turunannya dengan Fe(III) . Reaksi pembentukan kompleks antara fenol dengan Fe(III) disajikan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi pembentukan kompleks $[\text{Fe(III)}-(\text{fenolat})_6]^{3-}$

Uji fenolik juga dilakukan dengan analisis spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui adanya pergeseran panjang gelombang sebelum dan setelah penambahan basa NaOH pada ekstrak etil asetat daun sirih merah. Spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah sebelum dan setelah penambahan NaOH terdapat pada Lampiran L.9.1 dan L.9.2. Penambahan basa memberikan pergeseran batokromik pada spektrum. Hal ini dikarenakan, terjadi ionisasi pada gugus hidroksil sehingga memperpanjang sistem delokalisasi elektron. Akibat delokalisasi elektron, energi yang digunakan untuk transisi elektron akan lebih rendah, dengan demikian akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih besar (Markham, 1988). Delokalisasi elektron yang terjadi pada ion kavikolat dari senyawa kavikol- β -glukopiranosida ditunjukkan pada Gambar 4.2.

Puncak pada panjang gelombang 275 nm pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah menunjukkan adanya transisi $n \rightarrow \pi^*$, setelah penambahan basa terjadi pergeseran puncak ke panjang gelombang yang lebih pendek (hipsokromik). Hal ini

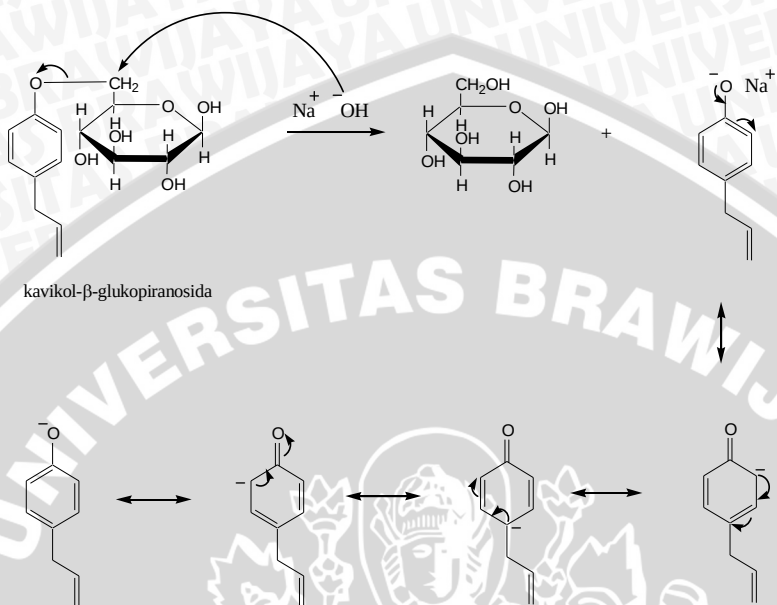
disebabkan bertambahnya solvasi pasangan elektron mengakibatkan turunnya tingkat energi elektron pada orbital molekul *non bonding* (*n*) (Khopkar, 1990). Puncak pada spektrum UV-Vis sebelum dan setelah penambahan basa dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2.

Tabel 4.1 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
667	0,5980
608	0,1282
534	0,1624
505	0,1896
410	1,6619
275	1,9048

Tabel 4.2 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah setelah penambahan basa NaOH

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
669	0,4625
610	0,1500
537	0,1649
507	0,1882
411	1,0619
274	1,4020

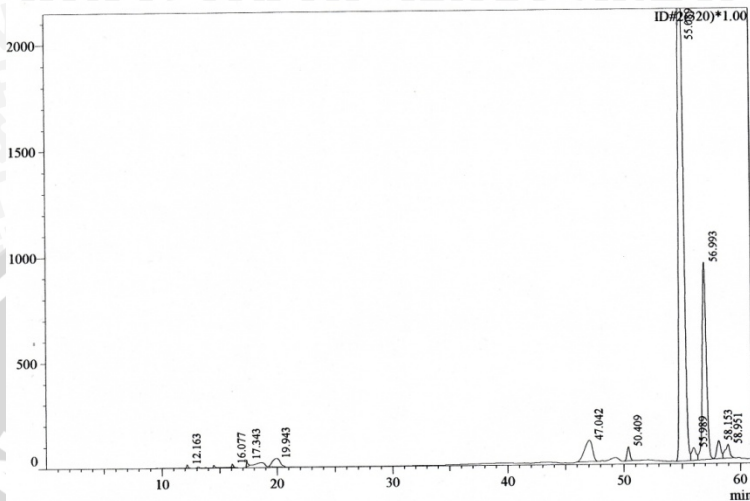


Gambar 4.2 Delokalisasi elektron pada ion kavikolat

Berdasarkan uji tersebut, maka dapat dinyatakan bahwa dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah terdapat golongan senyawa fenol.

4.3 Identifikasi Menggunakan KC-SM

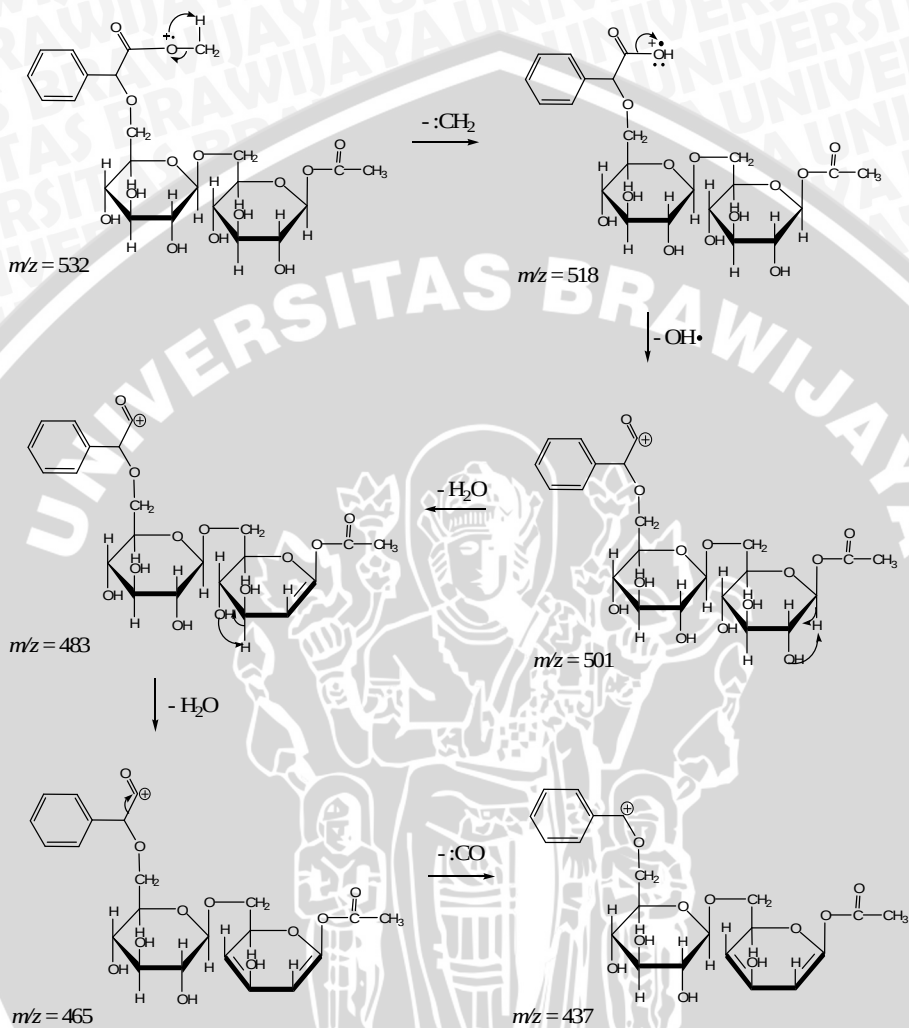
Ekstrak etil asetat daun sirih merah dikarakterisasi senyawa penyusunnya menggunakan KC-SM. Komponen-komponen di dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah dipisahkan menggunakan metode KC fase terbalik. Pada metode ini, fase gerak (asetonitril) bersifat polar sehingga senyawa yang lebih polar akan terelusi lebih dahulu bersama eluen dibandingkan senyawa yang kurang polar. Kromatogram KC ekstrak etil asetat daun sirih merah disajikan pada Gambar 4.3.

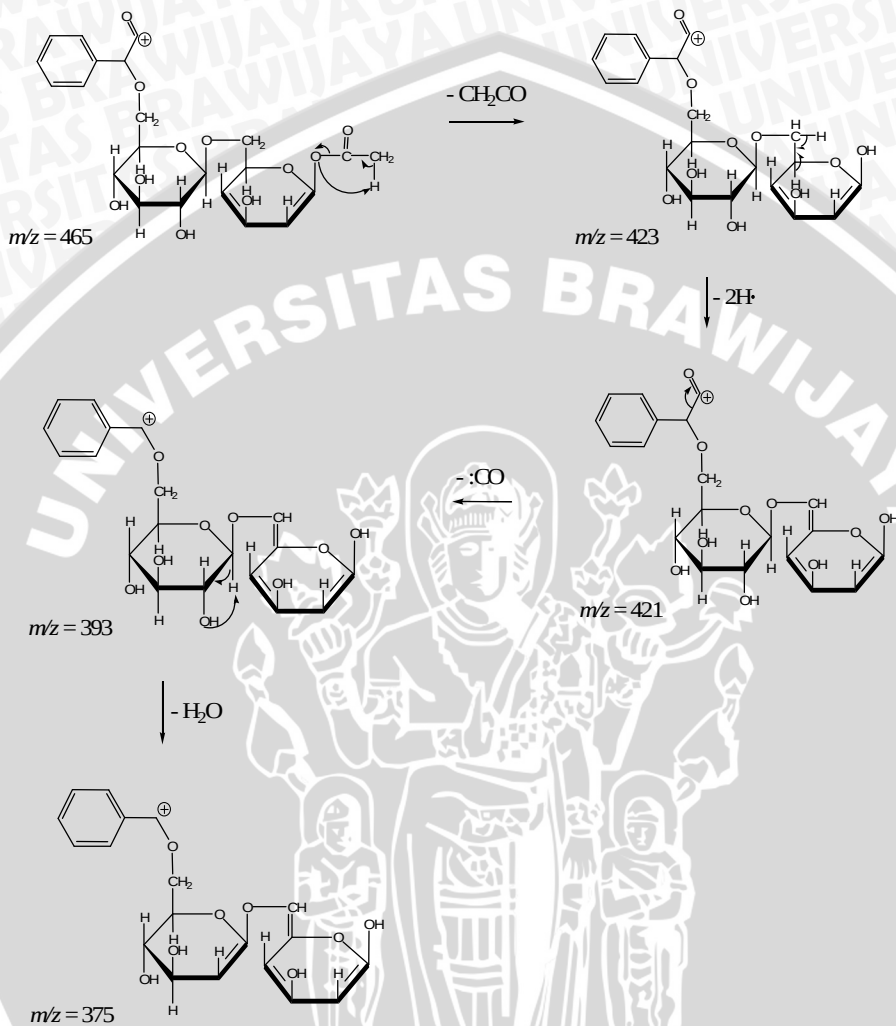


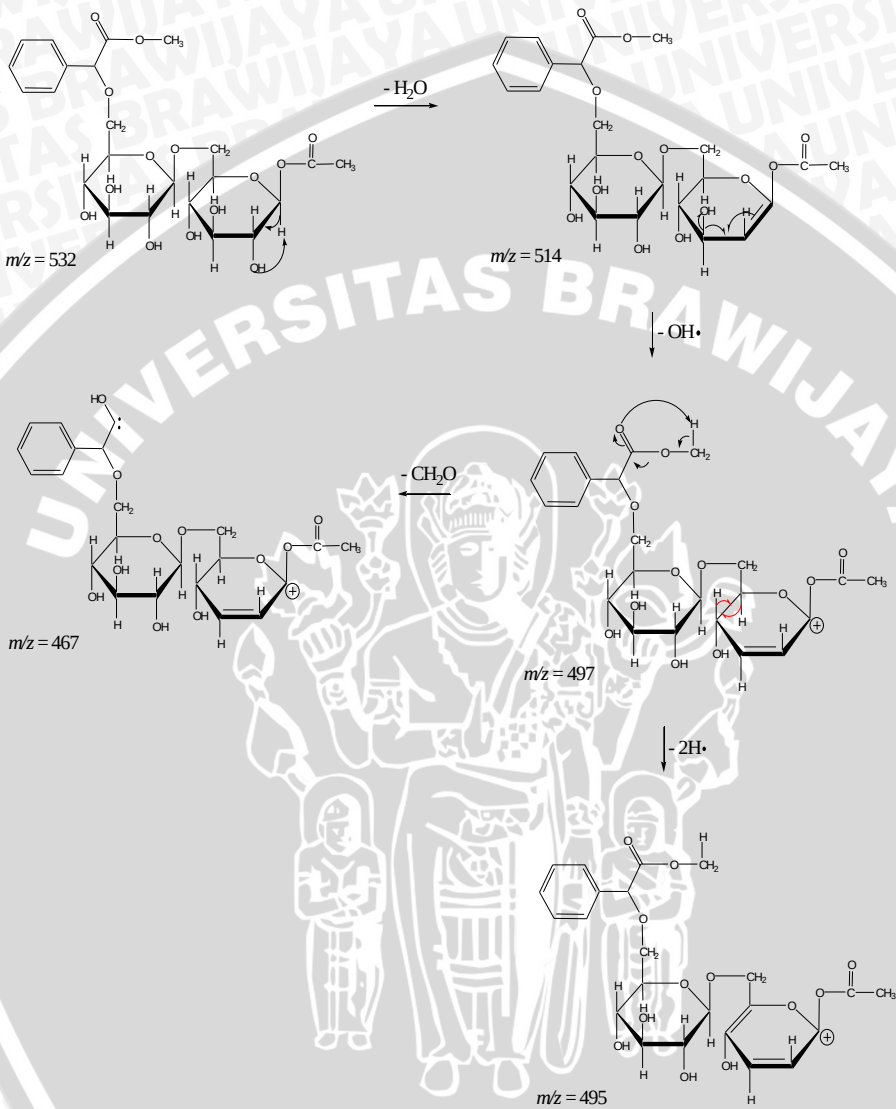
Gambar 4.3 Kromatogram KC ekstrak etil asetat daun sirih merah

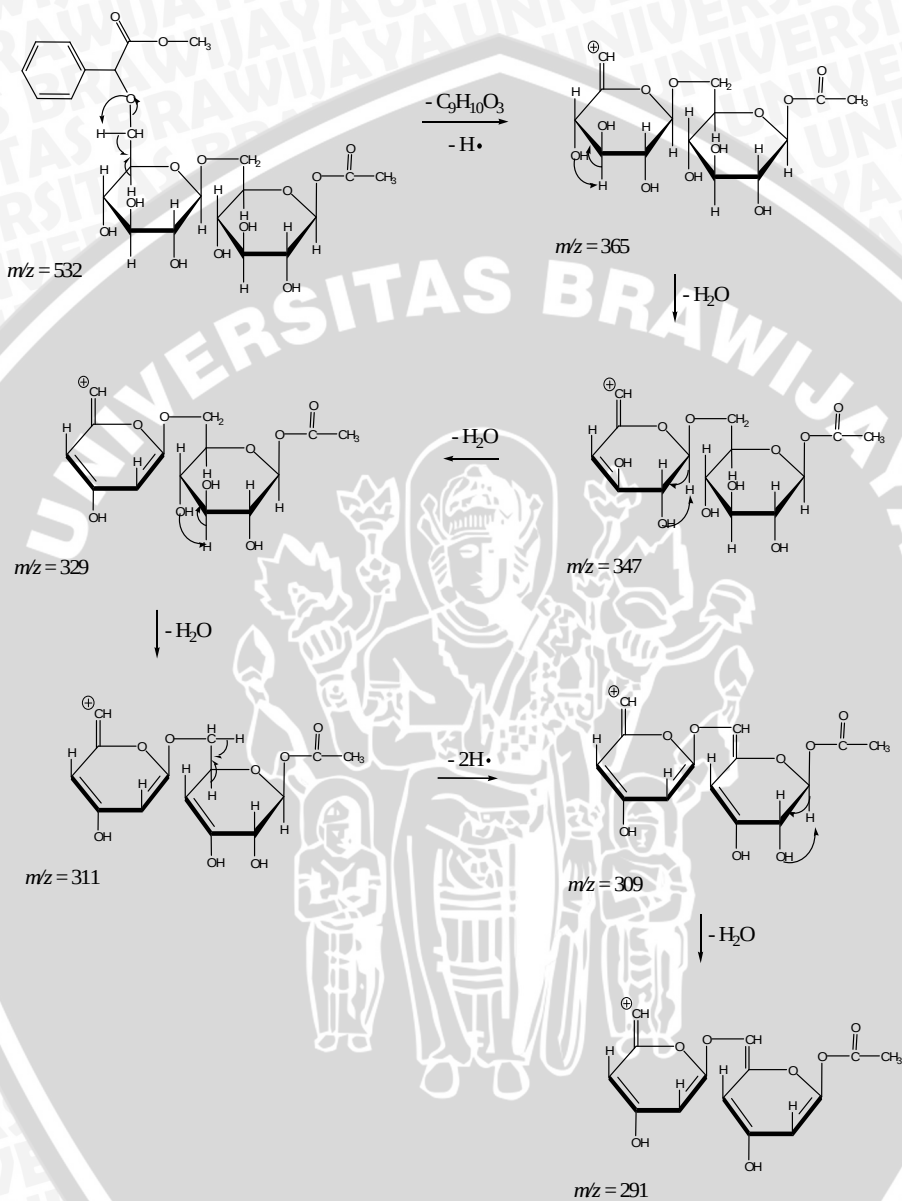
Berdasarkan kromatogram pada Gambar 4.3, dapat diketahui terdapat 11 puncak yang dapat terdeteksi dari ekstrak etil asetat daun sirih merah yang dipisahkan secara kromatografi cair. Diantara puncak-puncak tersebut, 3 puncak memiliki % luas puncak tertinggi, secara berturut-turut puncak-puncak tertinggi mempunyai waktu retensi 47,042; 55,089; dan 56,993 menit, dengan % luas puncak 4,493 %; 66,092 %; dan 21,078 %. Masing-masing puncak tersebut dipindai (*scan*) dalam alat spektrometer massa sehingga diperoleh spektrum massa dan dianalisis pola fragmentasinya.

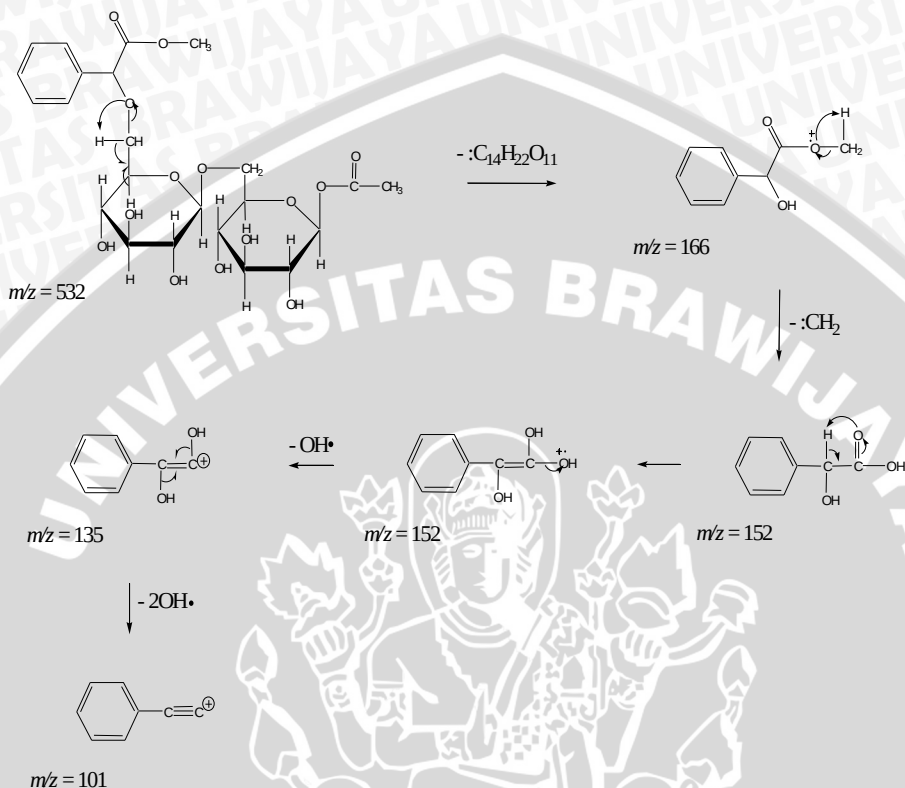
Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 47,042 menit disajikan pada Lampiran L.10.3 bagian 1. Hasil spektra massa menunjukkan puncak seperti pada lampiran. Puncak m/z 532 diperoleh setelah senyawa ditembak dengan elektron berenergi tinggi sehingga satu elektron dari pasangan elektron bebas pada salah satu atom O terlepas membentuk senyawa bermuatan positif. Puncak m/z 518 diperoleh setelah m/z 532 melepaskan CH_2 (M-14), kemudian melepaskan radikal OH (M-17) dan 1 molekul air (M-18) menghasilkan puncak











Gambar 4.4 Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 47,042 menit

m/z 483. Dari m/z 532 juga terjadi pelepasan 1 molekul air (M-18) diikuti 1 radikal OH (M-17) menghasilkan m/z 497. Puncak m/z 495 diperoleh setelah m/z 497 melepaskan 2 buah radikal hidrogen (M-2). Puncak m/z 467 diperoleh setelah m/z 497 melepaskan molekul CH_2O (M-30). Dari m/z 483 terjadi pelepasan 1 molekul air (M-18) diikuti 1 molekul CO (M-28) membentuk puncak m/z 437. Sedangkan puncak m/z 421 dihasilkan dari m/z 483 yang melepaskan 1 molekul air (M-18) kemudian 1 molekul CH_2CO (M-42) serta 2 buah radikal hidrogen (M-2). m/z 421 yang melepaskan 1 molekul

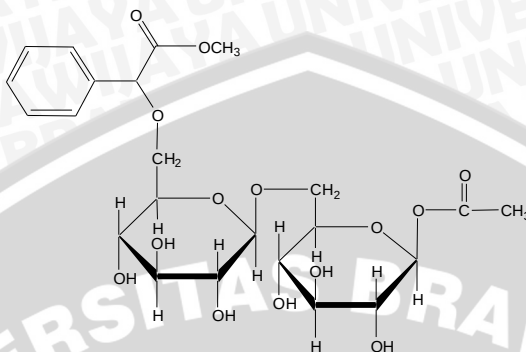
CO (M-28) menghasilkan puncak m/z 393, dilanjutkan dengan pelepasan 1 molekul air (M-18) membentuk puncak m/z 375.

Selain pola fragmentasi tersebut, dari m/z 532 juga terjadi pelepasan molekul $C_9H_{10}O_3$ (M-166) diikuti 1 radikal hidrogen (M-1) serta 1 molekul air (M-18) menghasilkan puncak m/z 347. Kemudian lepasnya 3 molekul air (M-54) dan 2 buah radikal hidrogen dari m/z 347 menghasilkan puncak m/z 291. Dari m/z 532 yang melepaskan $C_{14}H_{22}O_{11}$ (M-366) dan CH_2 (M-14) menghasilkan puncak pada m/z 152, dilanjutkan dengan terlepasnya 3 buah radikal OH (M-51) membentuk puncak m/z 101. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 47,042 menit

m/z	M-x	Fragmen
518	M-14	$C_{22}H_{30}O_{14}^+$
495	M-37	$C_{23}H_{27}O_{12}^+$
483	M-35	$C_{22}H_{27}O_{12}^+$
467	M-65	$C_{22}H_{27}O_{11}^+$
437	M-46	$C_{21}H_{25}O_{10}^+$
421	M-62	$C_{20}H_{21}O_{10}^+$
393	M-28	$C_{19}H_{21}O_9^+$
375	M-18	$C_{19}H_{19}O_8^+$
347	M-185	$C_{14}H_{19}O_{10}^+$
291	M-56	$C_{14}H_{11}O_7^+$
152	M-380	$C_8H_8O_3^+$
101	M-51	$C_8H_5^+$

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.4, maka dapat diusulkan komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 47,042 menit adalah metil hidroksi-benzenasetat- β -asetil maltosida dengan berat molekul 532 g/mol. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.5.

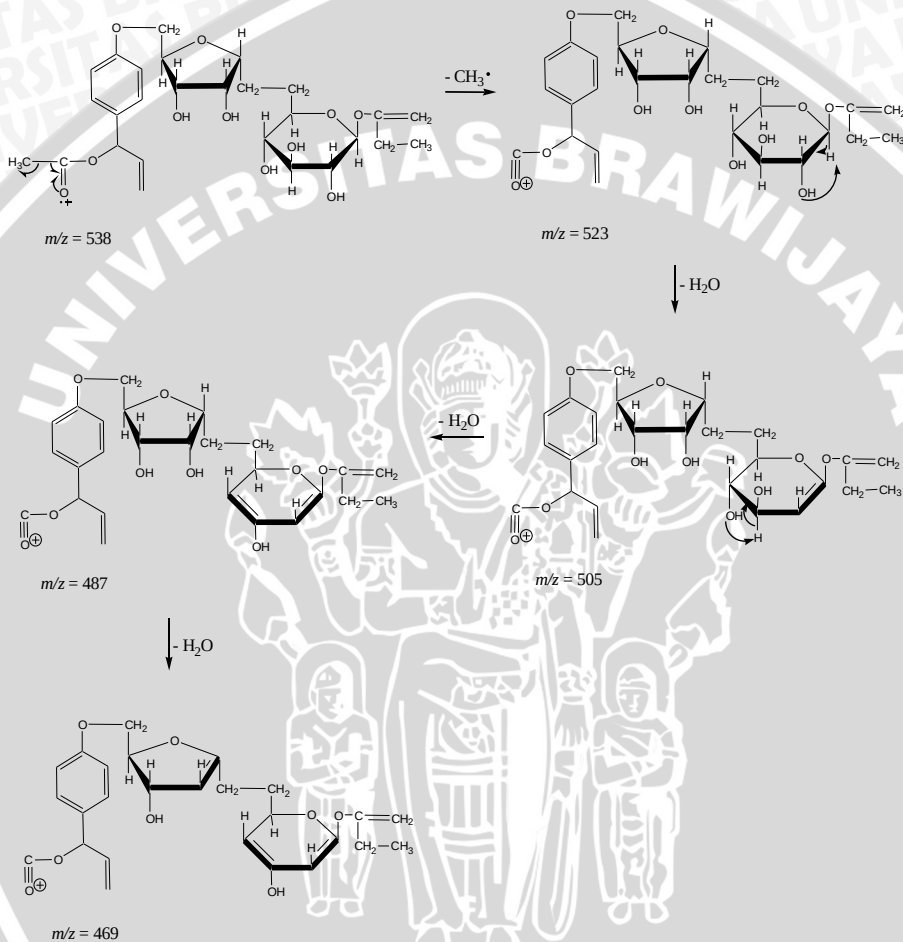


Gambar 4.5 Struktur senyawa metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida

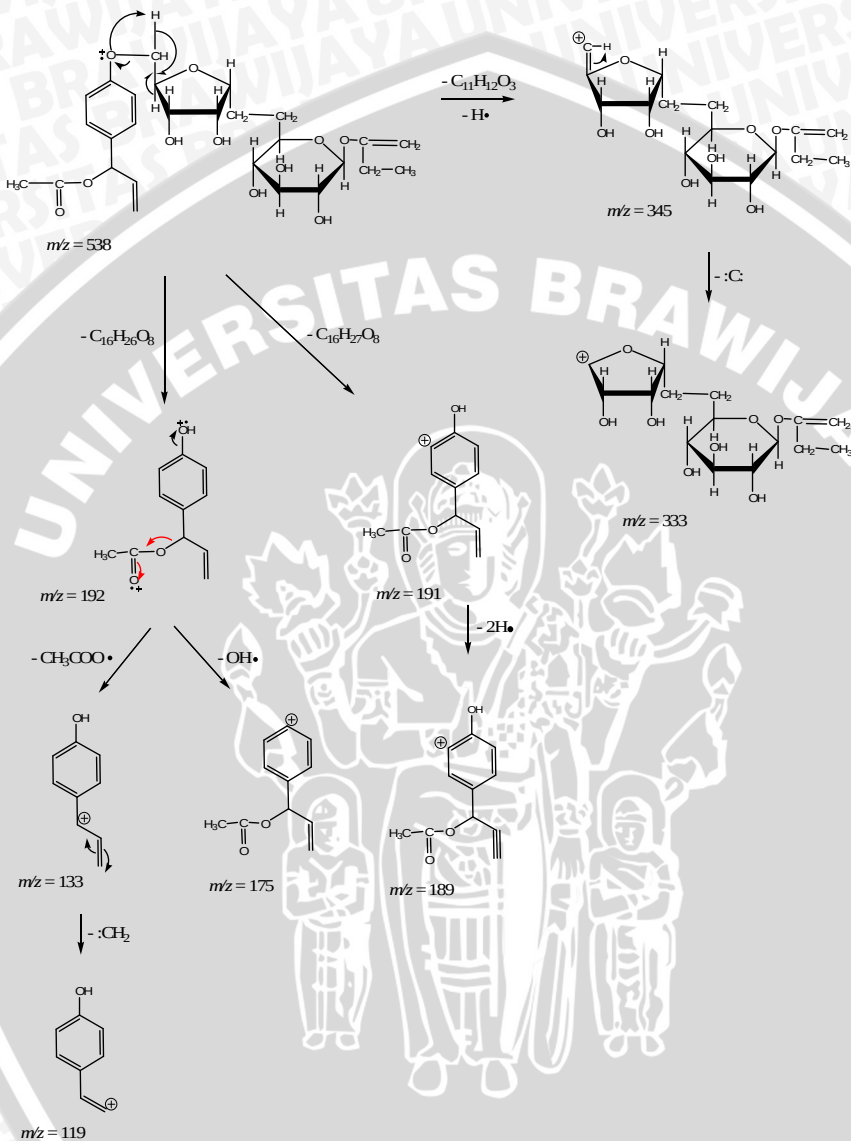
Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 55,089 menit disajikan pada Lampiran L.10.3 bagian 2. Hasil spektra massa menunjukkan puncak-puncak seperti pada lampiran. Puncak m/z 538 diperoleh setelah senyawa ditembak dengan elektron berenergi tinggi sehingga satu elektron dari pasangan elektron bebas pada salah satu atom O terlepas membentuk senyawa bermuatan positif. Pelepasan radikal CH_3 (M-15) menghasilkan puncak m/z 523, dan pelepasan radikal CH_2CH_3 (M-29) menghasilkan puncak m/z 509. Setelah melepaskan 2 molekul air (M-36) dari m/z 523 menghasilkan puncak m/z 487. Dari m/z 509 terjadi pelepasan $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ (M-42) dilanjutkan pelepasan 2 buah hidrogen radikal (M-2) sehingga dihasilkan puncak m/z 465. Puncak m/z 411 diperoleh setelah terjadi 3 kali pelepasan molekul air (M- 54) dari m/z 465.

Selain pola fragmentasi tersebut, dari m/z 538 dapat melepaskan $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_8$ (M-346) menghasilkan m/z 192, dilanjutkan dengan pelepasan radikal OH (M-17) menghasilkan puncak m/z 175. Dari m/z 192 dapat melepaskan radikal $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (M-59) menghasilkan puncak m/z 133, kemudian terjadi pelepasan CH_2 (M-14) sehingga terbentuk puncak m/z 119. Dari m/z 538 juga dapat melepaskan $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_6$ (M-347) dilanjutkan dengan pelepasan 2 buah radikal hidrogen (M-2) menghasilkan puncak m/z 189. Puncak m/z 333 diperoleh setelah m/z 538 mengalami pelepasan $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M-192) dilanjutkan dengan pelepasan 1 radikal hidrogen (M-1) dan 1 atom

karbon (M-12). Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.4.





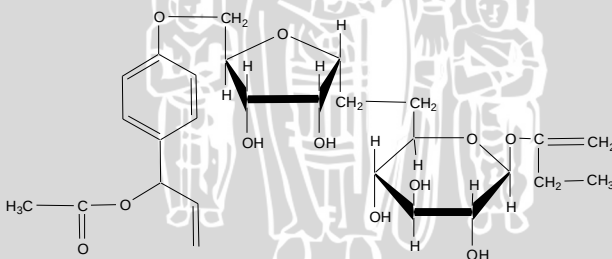


Gambar 4.6 Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 55,089 menit

Tabel 4.4 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 55,089 menit

<i>m/z</i>	M-x	Fragmen
523	M-15	$C_{26}H_{35}O_{11}^{+}$
509	M-29	$C_{25}H_{33}O_{11}^{+}$
487	M-36	$C_{26}H_{31}O_9^{+}$
465	M-44	$C_{23}H_{29}O_{10}^{+}$
411	M-54	$C_{23}H_{23}O_7^{+}$
345	M-193	$C_{16}H_{25}O_8^{+}$
333	M-205	$C_{15}H_{25}O_8^{+}$
192	M-346	$C_{11}H_{12}O_3^{+}$
189	M-349	$C_{11}H_9O_3^{+}$
175	M-17	$C_{11}H_{12}O_2^{+}$
133	M-59	$C_9H_9O^{+}$
119	M-14	$C_8H_7O^{+}$

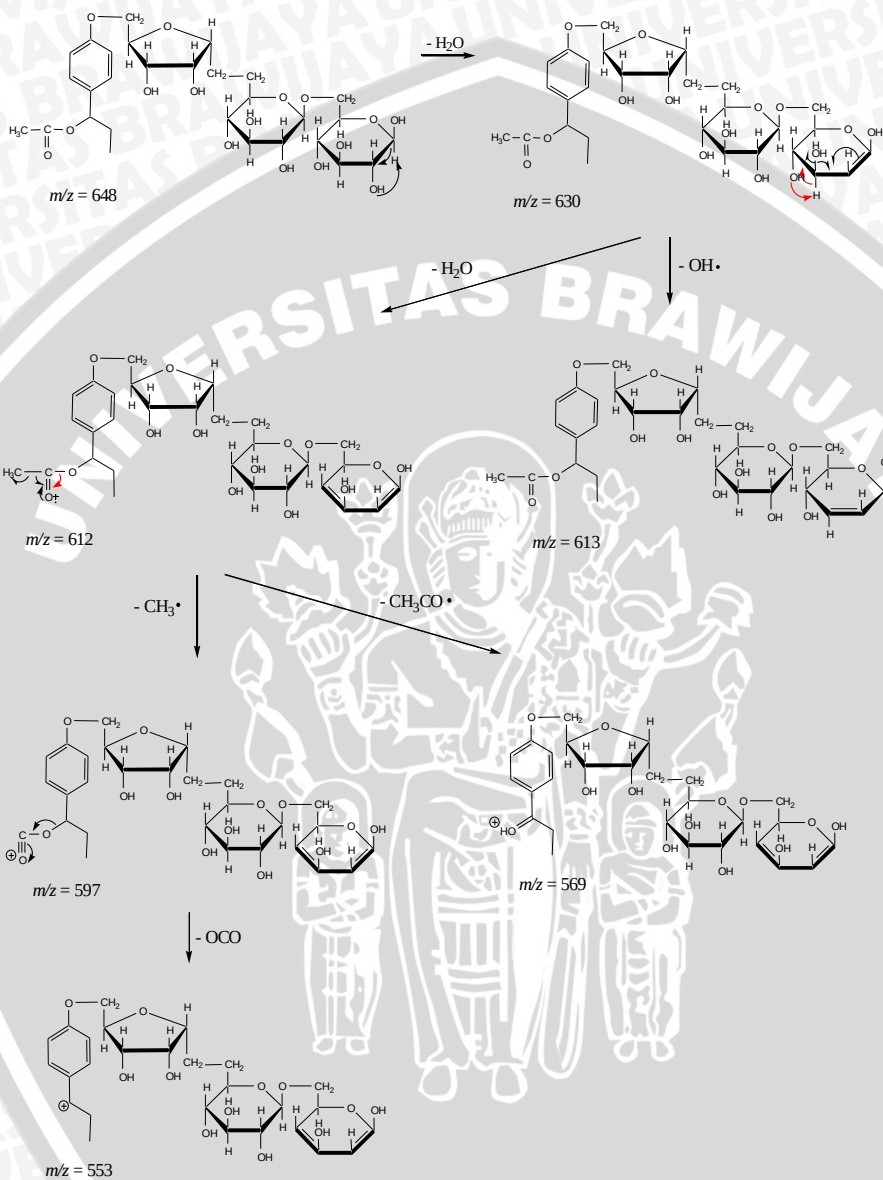
Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.6, maka dapat diusulkan komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 55,089 menit adalah asetokavikol glukofuranosil-1-buten-2- β -glukopiranosida dengan berat molekul 538 g/mol. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.7.

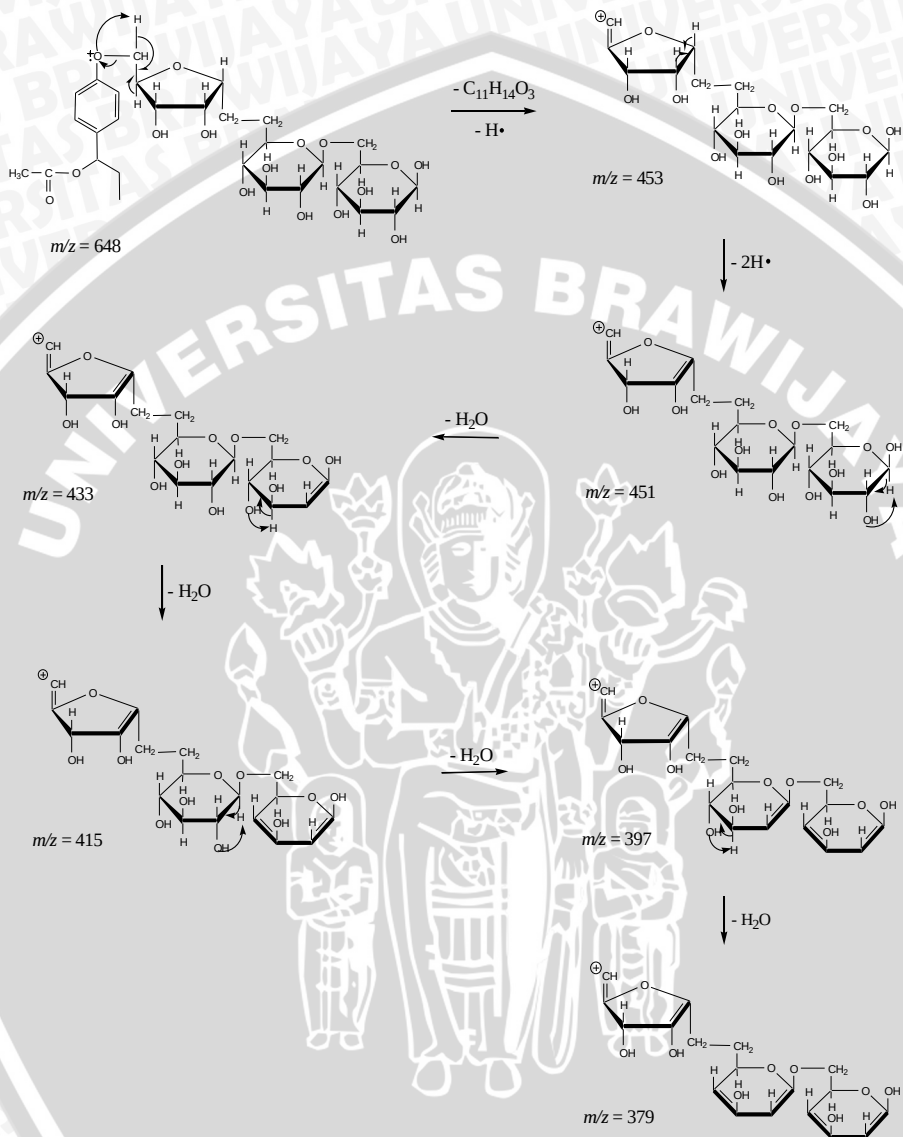


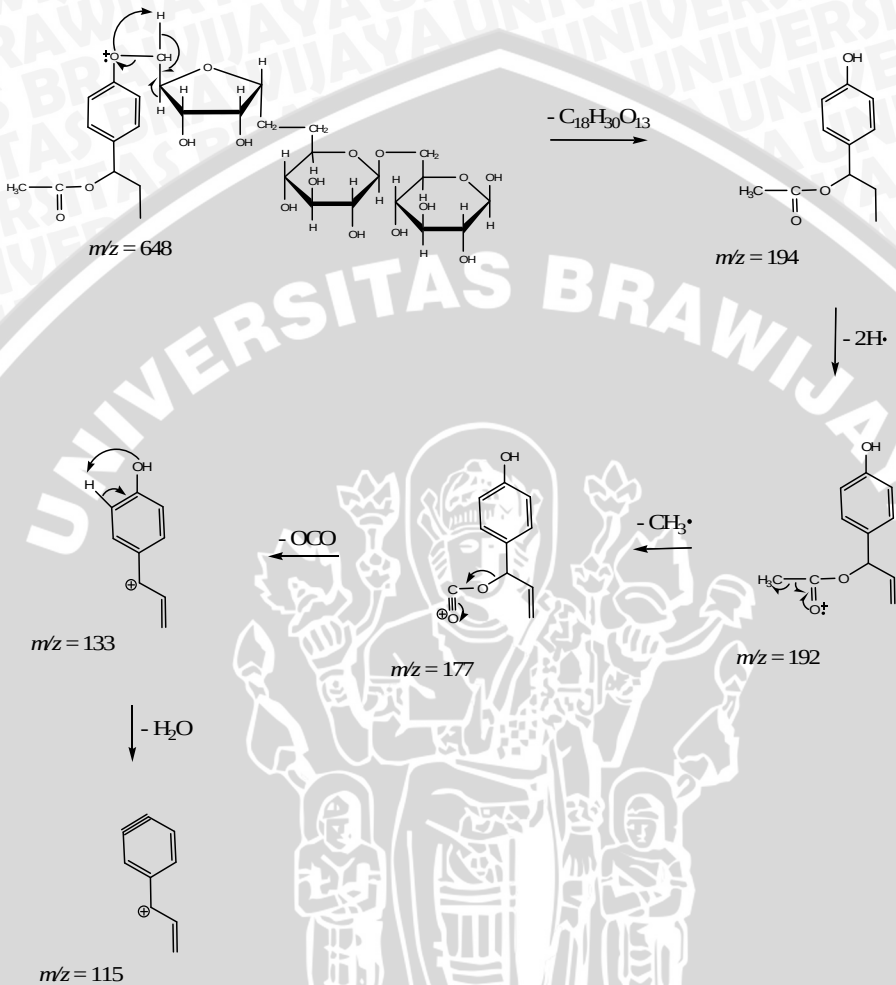
Gambar 4.7 Struktur senyawa asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 56,993 menit disajikan pada Lampiran L.10.3 bagian 3. Hasil spektra massa menunjukkan puncak-puncak seperti pada lampiran. Puncak m/z 648 diperoleh setelah senyawa ditembak dengan elektron berenergi tinggi sehingga satu elektron dari pasangan elektron bebas pada salah satu atom O terlepas membentuk senyawa bermuatan positif. Pelepasan 1 molekul air (M-18) menghasilkan m/z 630, dilanjutkan dengan pelepasan 1 radikal OH (M-17) menghasilkan puncak m/z 613. Dari m/z 630 juga dapat melepaskan 1 molekul air (M-18) lagi menghasilkan m/z 612. Puncak m/z 597 dihasilkan dari pelepasan radikal CH_3 (M-15) dari ion molekul m/z 612. Dilanjutkan dengan pelepasan 1 molekul CO_2 (M-44) sehingga terbentuk puncak m/z 553. Dari m/z 612 juga terjadi pelepasan radikal $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ menghasilkan puncak m/z 569.

Dari m/z 648 dapat pula melepaskan $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (M-194) dilanjutkan dengan terlepasnya 3 buah radikal hidrogen (M-3) menghasilkan m/z 451. Dari m/z 451 terjadi pelepasan 1 molekul air (M-18) menghasilkan puncak m/z 433. Dilanjutkan dengan pelepasan 3 molekul air (M-54) menghasilkan puncak m/z 379. Puncak m/z 192 diperoleh melalui pelepasan $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$ (M-454) diikuti pelepasan 2 buah radikal hidrogen (M-2) dari molekul m/z 648. Pelepasan radikal CH_3 (M-15) dari m/z 192 menghasilkan puncak m/z 177, dilanjutkan pelepasan molekul CO_2 (M-44) sehingga memunculkan puncak m/z 133, kemudian terjadi pelepasan 1 molekul air (M-18) menghasilkan puncak m/z 115. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.8 dan Tabel 4.5.





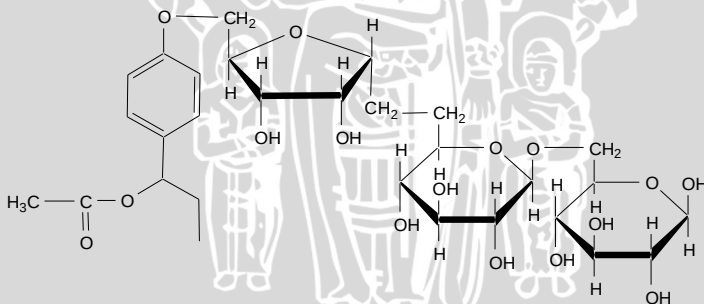


Gambar 4.8 Pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 56,993 menit

Tabel 4.5 Data pola fragmentasi komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 56,993 menit

m/z	M-x	Fragmen
613	M-35	$C_{29}H_{41}O_{14}^+$
597	M-51	$C_{28}H_{37}O_{14}^+$
569	M-79	$C_{27}H_{37}O_{13}^+$
553	M-44	$C_{27}H_{37}O_{12}^+$
433	M-215	$C_{18}H_{25}O_{12}^+$
379	M-54	$C_{18}H_{19}O_9^+$
192	M-456	$C_{11}H_{12}O_3^+$
177	M-15	$C_{10}H_9O_3^+$
133	M-44	$C_9H_9O^+$
115	M-18	$C_9H_7O^+$

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.8, maka dapat diusulkan komponen penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan waktu retensi 56,993 menit adalah hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida dengan berat molekul 648 g/mol. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Struktur senyawa hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida

Hasil analisis terhadap pola fragmentasi 3 komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah dapat diringkaskan seperti yang disajikan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Dugaan komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah berdasarkan spektra massa

Waktu Retensi (menit)	% Luas Puncak	Usulan Senyawa
47,042	4,493	metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida
55,089	66,092	asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida
56,993	21,078	hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida

Berdasarkan hasil analisis pola fragmentasi 3 komponen utama dalam ekstrak etil asetat daun sirih merah tersebut, didapatkan bahwa ketiga komponen merupakan senyawa yang masih terikat pada gula sebagai glikosida. Hal ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis yang telah dilakukan belum maksimal.

Ekstrak etil asetat daun sirih merah merupakan fasa yang bersifat semipolar sedangkan larutan HCl 2 M merupakan fasa polar, sehingga terbentuk dua lapisan yang tidak saling campur selama proses hidrolisis. Karena itu terdapat tegangan antarmuka antara fasa etil asetat dan fasa air yang tidak saling campur tersebut. Senyawa fenolik berada pada fasa etil asetat, sedangkan air dan katalis asam untuk reaksi hidrolisis berada pada fasa air. Reaksi hidrolisis yang memerlukan air untuk memecah ikatan glikosida antara fenol dan gula hanya dapat terjadi pada tegangan antarmuka yang terbentuk oleh kedua fasa yang tidak saling campur tersebut. Hal ini menyebabkan sedikitnya reaksi hidrolisis yang dapat terjadi, sehingga komponen utama yang ditemukan pada kromatogram ekstrak etil asetat daun sirih merah merupakan senyawa fenol yang masih terikat dengan gula.

4.4 Uji Aktivitas Antibakteri

Prinsip dari uji antibakteri ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etil asetat daun sirih merah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Uji ini menggunakan metode dilusi tabung untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan metode *streaking* untuk menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

4.4.1 Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung

Penentuan KHM dilakukan dengan metode dilusi tabung melalui pengamatan visual terhadap kekeruhan media pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang telah ditambahkan ekstrak etil asetat daun sirih merah dengan berbagai konsentrasi. KHM merupakan konsentrasi terendah ekstrak etil asetat daun sirih merah yang menunjukkan hasil biakan mulai tampak jernih. Hasil pengamatan terhadap kekeruhan pada tabung hasil dilusi disajikan pada Tabel 4.7 berikut, serta dapat diamati pada Lampiran L.12.2.

Tabel 4.7 Hasil pengamatan tingkat kekeruhan pada tabung reaksi

Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah (%)	Tingkat Kekeruhan
0	+++++
15	++++
17,5	+++
20	++
22,5	+
25	-
27,5	-
30	-

Keterangan: tanda positif (+) menunjukkan kekeruhan
tanda negatif (-) menunjukkan kejernihan

Berdasarkan data pada Tabel 4.7 dan Lampiran L.12.2, dapat diketahui bahwa biakan dalam tabung reaksi mulai tampak jernih pada konsentrasi 25 %. Tingkat kekeruhan menunjukkan banyaknya pertumbuhan bakteri. Semakin banyak pertumbuhan bakteri, maka larutan akan semakin keruh. Hasil biakan mulai tampak jernih pada

konsentrasi 25 % mengindikasikan bahwa ekstrak etil asetat daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Oleh karena itu, konsentrasi 25 % merupakan nilai KHM dari ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap bakteri *S. aureus*.

4.4.2 Penentuan KBM dengan Metode *Streaking*

Penentuan KBM menggunakan metode *streaking* diperoleh melalui pengamatan pada media NAP. Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada media NAP dapat dilihat pada Lampiran L.12.3, sedangkan hasil perhitungan koloni bakteri menggunakan *colony counter* disajikan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP

Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah (%)	Jumlah Koloni Bakteri (CFU/Plate)
0	$2,9 \times 10^7$
15	$2,8 \times 10^5$
17,5	$2,1 \times 10^4$
20	$1,2 \times 10^3$
22,5	$9,5 \times 10^2$
25	$8,7 \times 10^1$
27,5	$7,6 \times 10^1$
30	0

Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP (Tabel 4.8) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 30 % ekstrak etil asetat daun sirih merah tidak tampak pertumbuhan koloni bakteri. Dengan demikian, nilai KBM dari ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap bakteri *S. aureus* adalah 30 % karena pada konsentrasi tersebut tidak ada bakteri yang dapat bertahan hidup. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada media NAP selanjutnya dilakukan uji statistik nonparametrik menggunakan uji Jonckheere-Terpstra. Tujuan dari uji statistik ini adalah untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan yang nyata dari setiap perlakuan konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus*. Uji Jonckheere-Terpstra dapat dilihat pada Lampiran L.8.9. Berdasarkan uji statistik tersebut, dapat disimpulkan bahwa variasi

konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah yang ditambahkan berpengaruh terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S.aureus*.

Pada konsentrasi 25 % dikatakan sebagai KHM ekstrak etil asetat daun sirih merah yang mempunyai efek bakteriostatik. Hal ini menyatakan konsentrasi terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Konsentrasi 30 % dikatakan sebagai KBM ekstrak etil asetat daun sirih merah yang mempunyai efek bakterisida. Hal ini menyatakan bahwa pada media pertumbuhan tersebut tidak ada bakteri yang tumbuh.

Berdasarkan Tabel 4.7 dan 4.8, semakin besar konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah maka jumlah bakteri *S. aureus* yang tumbuh semakin menurun. Dari hasil analisis KC-SM diketahui bahwa asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida dan hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida merupakan senyawa golongan fenol, dan kedua senyawa tersebut serta metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida memiliki cincin aromatik dan gugus polar. Menurut Velmurugan *et al.* (2009) cincin aromatik pada senyawa fenol dapat berinteraksi dengan protein yang terdapat pada peptidoglikan dinding sel, protein pada membran plasma, serta protein sitoplasma. Gilman *et al.* (1991) menambahkan bahwa gugus hidroksil pada fenol dapat berinteraksi dengan fosfolipid pada membran plasma sel bakteri. Membran plasma bakteri *S. aureus* mengandung fosfolipid yang memiliki gugus polar dan nonpolar. Gugus polar yang terikat pada fosfolipid berada pada permukaan membran sehingga senyawa fenol yang memiliki gugus hidroksil berinteraksi kuat dengan gugus polar pada fosfolipid menyebabkan membran sel lisis dan bakteri mengalami kematian. Oleh karena itu, ekstrak etil asetat daun sirih merah memberikan efek bakteriostatik dan bakterisida terhadap *S. aureus*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat 3 komponen utama penyusun ekstrak etil asetat daun sirih merah, yaitu metil hidroksibenzenasetat- β -asetil maltosida, asetokavikol glukofuranosil-1-buten- β -glukopiranosida, dan hidroasetokavikol glukofuranosil- β -maltosida.
2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap bakteri *S. aureus* memberikan nilai KHM 25% dan nilai KBM 30%.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi hidrolisis ekstrak etil asetat daun sirih merah sehingga dapat diperoleh senyawa fenol yang bebas gula.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M.A., N.M. Alam, M.S. Yeasmin, A.M. Khan, and M.A. Sayeed, 2007, **Antimicrobial Screening of Different Extracts of *Piper longum* Linn.**, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(6):852-857
- Bonang, G. dan E.S. Koeswardono, 1982, **Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik**, PT Gramedia, Jakarta
- Braithwaite, A. and F.J. Smith, 1985, **Chromatographic Methods**, Chapman & Hall, England
- Brooks, G.F., J.S. Butel, dan S.A. Morse, 2001, **Jawetz, Melnick, & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran**, Salemba Medika, Jakarta
- Chatin, A. dan Suharto, 1994, **Sterilisasi dan Disinfeksi dalam Mikrobiologi Kedokteran, Edisi Revisi**, Bina Rupa Aksara, Jakarta
- Dasuki, U., 1994, **Sistematika Tumbuhan Tinggi**, Bagian Ilmu Hayati ITB, Bandung
- Eugene, J.R., 1981, **Chemistry The General Science, Second Edition**, Prentice Hall Inc., New York
- Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden, 1992, **Kimia Organik, Jilid 2**, Alih Bahasa Oleh A.H. Pudjaatmaka, Erlangga, Jakarta
- Galkar, V.G. and D.V. Dandekar, 2001, **Process for Extraction of Curcuminoids from Curcuma Species**, United States Patent, 224-877
- Gan, V.H.S. dan R. Setiabudy, 1987, **Farmakologi dan Terapi, Edisi Ketiga**, Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran UI, Jakarta
- Gilman, A.G., T.R. Nies, and P. Taylor, 1991, **The Pharmacological Basic of Therapeutics**, Pengamongan Press Inc., New York

- Gritter, R.J., J.M. Bobbit, dan A.E. Schwarting, 1991, **Pengantar Kromatografi, Edisi Kedua**, Penerbit ITB, Bandung
- Harborne, J.B., 1987, **Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua**, Alih Bahasa Oleh Kosasih P. dan Iwang S., Penerbit ITB, Bandung
- Jawetz, E., J.L. Melnick, and E.A. Adelberg, 1974, **Review of Medical Microbiology, Eleventh Edition**, LANGE Medical Publication, California
- Khopkar, S.M., 1990, **Konsep Dasar Kima Analitik**, UI Press, Jakarta
- Kubo, I., H. Muroi, and M. Himejima, 1993, **Structure-Antibacterial Activity Relationships of Anacardic Acid**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(6):1016-1019
- Lee, J., 2004, **Hydrolitic and Antioxidant Properties Of Ellagic Acid and Its Precursors Present In Muscadine Grape**, Disertation, University of Florida
- Lindsay, S., 1992, **High Performance Liquid Chromatography, Second Edition**, John Wiley & Sons Inc., London
- Maisuthisakul, P., 2008, **Phenolic Antioxidants from Betel Leaf (*Piper betel* Linn.) Extract Obtained Different Solvents and Extraction Time**, Univ. Thai. Chamber of Commerce, 28(2):52-64
- Markham, K.R., 1988, **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, Alih Bahasa Oleh Kosasih P., Penerbit ITB, Bandung
- Mohan, J., 2003, **Organic Analytical Chemistry Theory and Practice**, Alpha Science International Ltd., Pangbourne, England
- Nalina, T. and Z.H.A. Rahim, 2007, **The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans***, American Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3(1):10-15

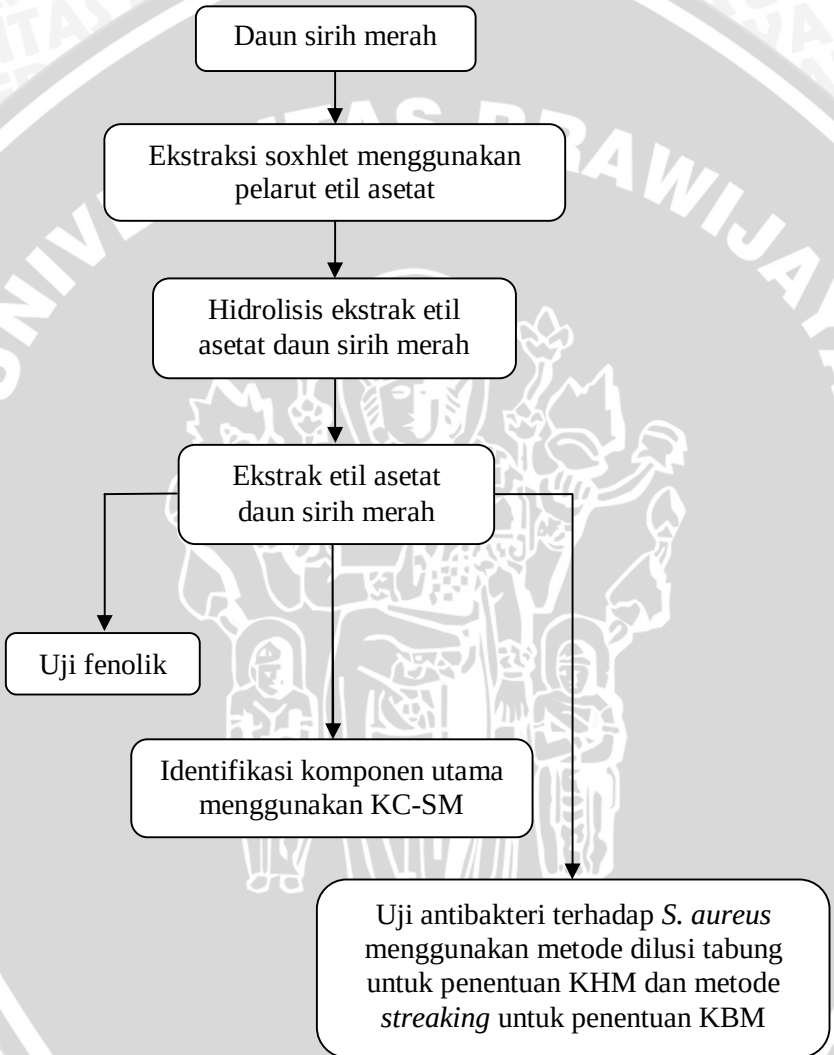
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg, 1986, **Microbiology, Fifth Edition**, McGraw-Hill Books Company, Singapore
- Robinson, T., 1995, **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**, Alih Bahasa Oleh Kosasih P., Penerbit ITB, Bandung
- Sastrohamidjojo, H., 1991, **Spektroskopi, Edisi kedua**, Penerbit Liberty, Yogyakarta
- Sudewo, B., 2005, **Basmi Penyakit dengan Sirih Merah**, PT AgroMedia Pustaka, Yogyakarta
- Tortora, G.J., B.R. Funke, and C.L. Case, 2001. **Microbiology: An Introduction**, Addison Wesley Longman Inc., USA
- Velmurugan, N., S.S. Chun, S.S. Han, and Y.S. Lee, 2009, **Characterization of Chikusaku-Eki and Mokusaku-Eki and Its Inhibitory Effect on Sapstaining Fungal Growth in Laboratory Scale**, Int. Journal of Environment, Science, and Technology, 6(1):13-22
- Vogel, A.I., 1989, **Textbook of Practical Organic Chemistry, Fifth Edition**, Longmann Group Ltd., England

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

L.1 Diagram Alir Tahapan Penelitian



L.2 Surat Keterangan Determinasi Daun Sirih Merah yang Digunakan



UNIVERSITAS GADJAH MADA FAKULTAS BIOLOGI

LABORATORIUM TAKSONOMI TUMBUHAN

Jl. Tekhnika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281, Telp. (0274) 6492272/6492262, Fax: (0274) 580839

SURAT KETERANGAN

Nomer : 0111 / T.Tb. / XI / 2007

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : Suratmo
NIM : 24189/I-4/1962/06
Jurusan : Ilmu-Ilmu MIPA Program Pascasarjana
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut :

Familia : Piperaceae
Genus : *Piper*
Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.
Nama Lokal : Sirih Merah

identifikasi tersebut dibantu oleh Dra. Slamet Sutanti Budi Rahayu, M.Sc.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Yogyakarta, 28 November 2007

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada



Dr. Siti Sumarmi
NIP. 131860991

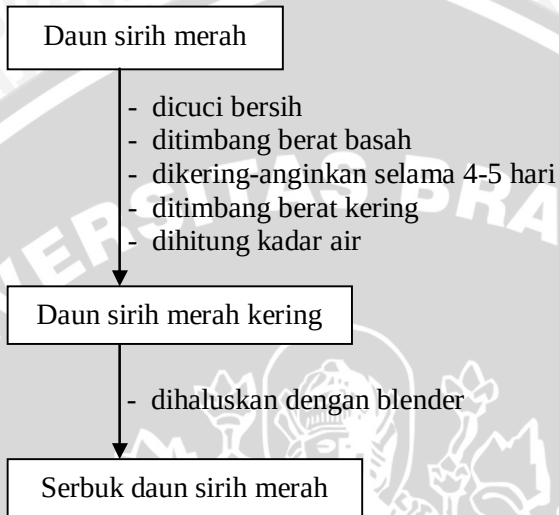
Kepala Laboratorium
Taksonomi tumbuhan
Fakultas Biologi UGM



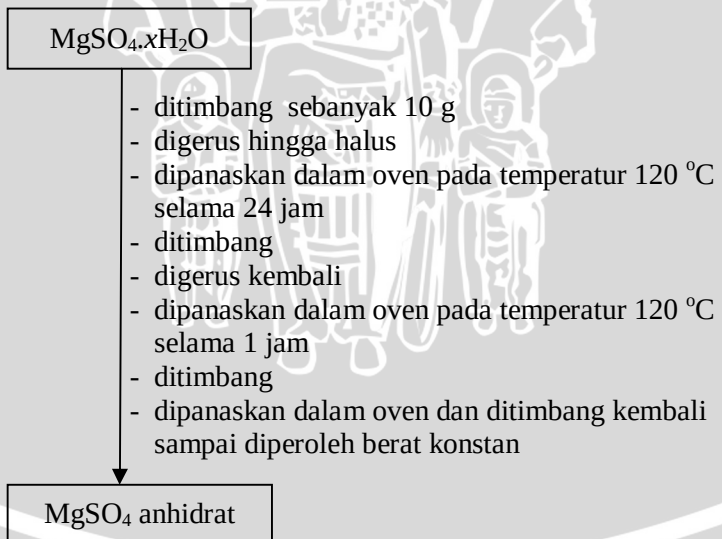
Dr. Rina Sri Kasiandari
NIP. 132086688

L.3 Preparasi Bahan Penelitian

L.3.1 Preparasi Daun Sirih Merah



L.3.2 Preparasi *Drying Agent*



L.3.3 Preparasi Larutan HCl 2 M

Akuades

- dimasukkan ke dalam labu takar 500 mL sebanyak satu per tiga bagian labu
- ditambahkan larutan HCl 37 % sebanyak 82,9 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan HCl 2M

L.3.4 Preparasi Larutan FeCl_3 0,062 M

1,68 gram $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- dilarutkan dalam akuades
- dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan FeCl_3 0,062 M

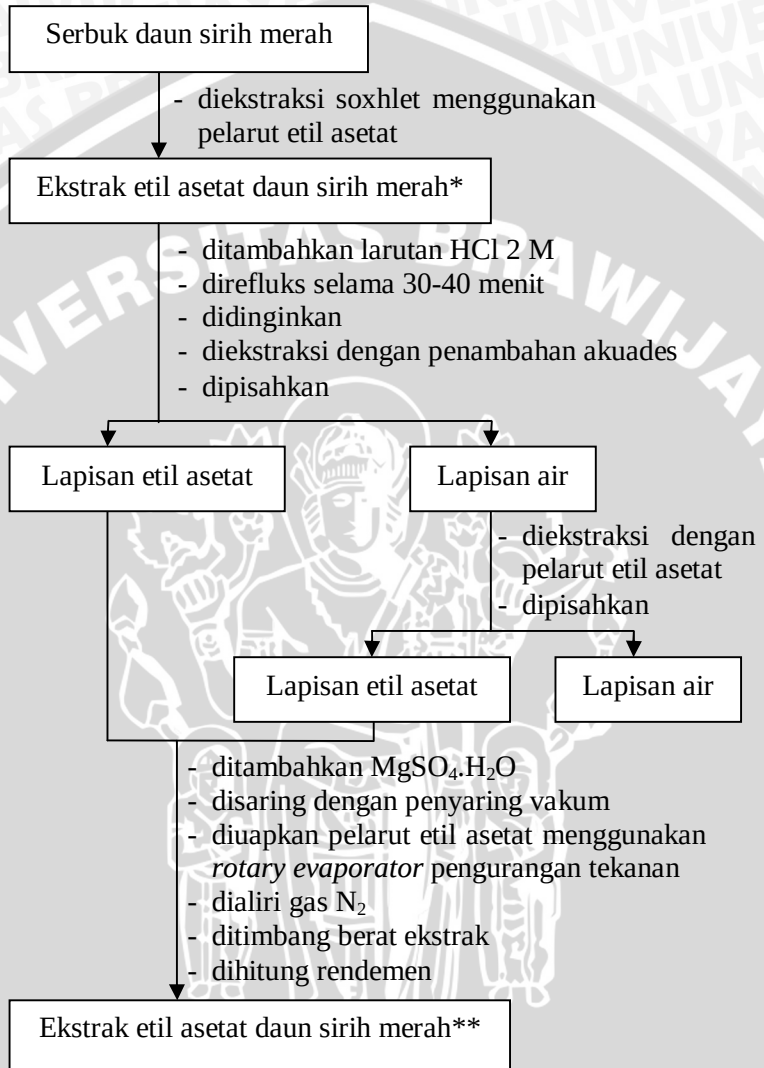
L.3.5 Preparasi Larutan NaOH 1 M

4 gram NaOH

- dilarutkan dalam akuades
- dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan NaOH 1M

L.4 Proses Ekstraksi dan Hidrolisis



Keterangan:

* = ekstrak etil asetat daun sirih merah sebelum hidrolisis

** = ekstrak etil asetat daun sirih merah setelah hidrolisis
(ekstrak yang digunakan pada proses selanjutnya)

L.5 Uji Fenolik

L.5.1 Uji dengan Larutan FeCl_3 0,062 M

Ekstrak etil asetat daun sirih merah

- diambil 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 2 tetes FeCl_3 0,062 M
- diamati perubahan warna

Hasil

L.5.2 Uji dengan Spektrofotometer UV-Vis

1 tetes ekstrak etil asetat
daun sirih merah

- dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan etil asetat hingga tanda batas
- dikocok

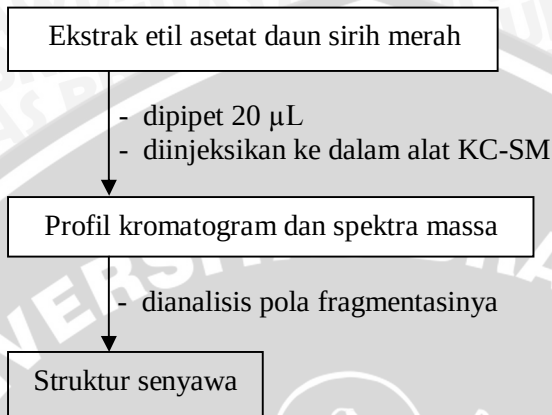
1 tetes ekstrak etil asetat
daun sirih merah

- dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan 1 tetes larutan NaOH 1 M
- ditambahkan etil asetat hingga tanda batas
- dikocok

- dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis
- dibandingkan spektrum yang dihasilkan

Data

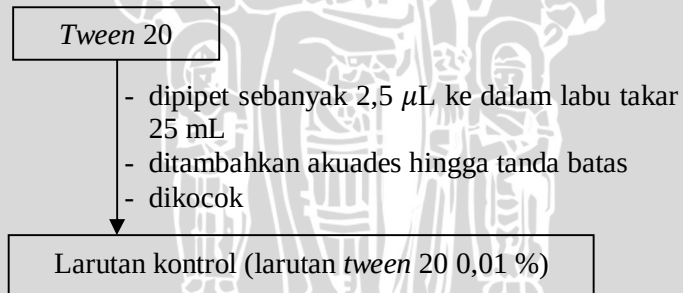
L.6 Identifikasi Menggunakan KC-SM



L.7 Uji Aktivitas Antibakteri

L.7.1 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

1. Pembuatan Larutan Kontrol Konsentrasi 0 % (Larutan Tween 20 0,01 %)



2. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 %

Ekstrak etil asetat daun sirih merah

- dipipet sebanyak 7,5 mL ke dalam labu takar 25 mL
- ditambahkan 2,5 μ L *tween* 20
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 30 %

3. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 27,5 %

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 30 %

- dipipet sebanyak 9,2 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 27,5 %

4. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 25 %

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 30 %

- dipipet sebanyak 8,3 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 25 %

5. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 22,5 %

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 27,5 %

- dipipet sebanyak 8,2 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 22,5 %

6. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 20 %

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 25 %

- dipipet sebanyak 8,0 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 20 %

7. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 17,5 %

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 22,5 %

- dipipet sebanyak 7,8 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 17,5 %

8. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 15 %

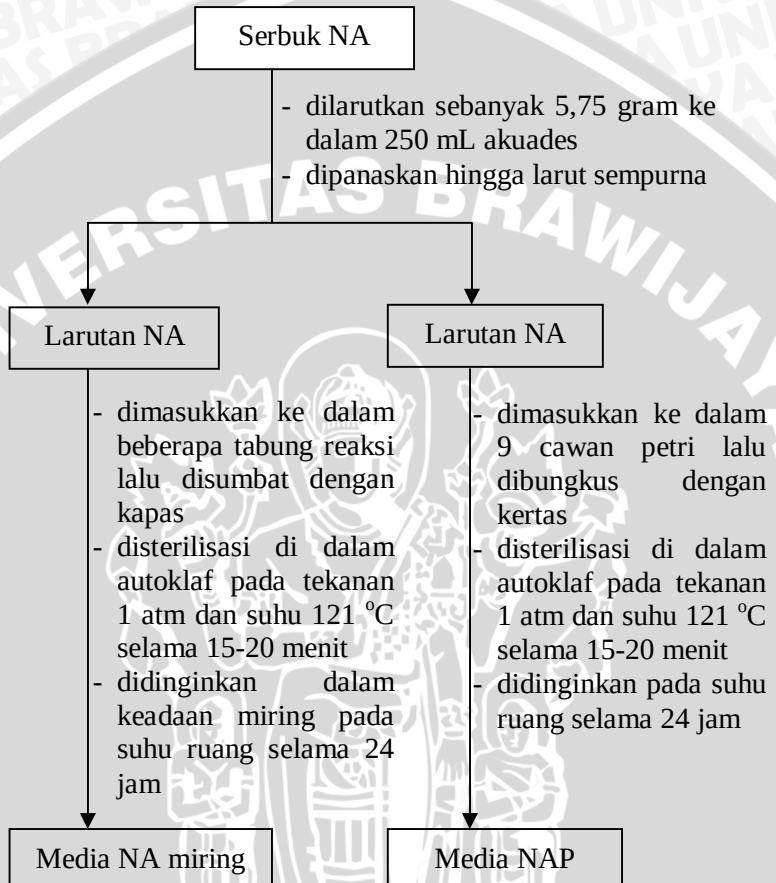
Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 20 %

- dipipet sebanyak 7,5 mL ke dalam labu takar 10 mL
- ditambahkan akuades hingga tanda batas
- dikocok

Larutan ekstrak etil asetat daun sirih merah konsentrasi 15 %



L.7.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) Miring dan *Nutrient Agar Plate* (NAP)



L.7.3 Pembuatan Media Cair *Nutrient Broth* (NB)

Serbuk NB

- dilarutkan sebanyak 2 gram ke dalam 250 mL akuades
- dipanaskan hingga larut sempurna
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu disumbat kapas, dibungkus kertas dan diikat dengan benang kasur
- disterilisasi di dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121 °C selama 15-20 menit

Media cair NB

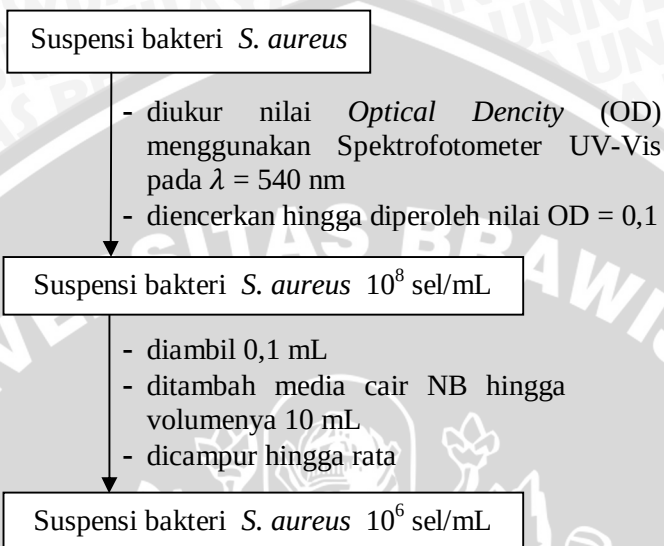
L.7.4 Peremajaan Biakan Murni *S. aureus*

Isolat bakteri

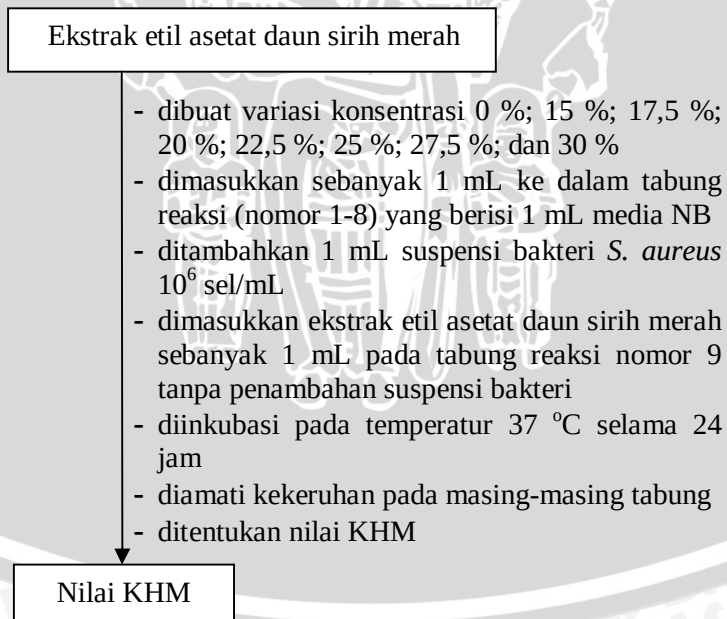
- digoreskan secara aseptis pada media NA miring
- disumbat dengan kapas
- diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam

Biakan murni

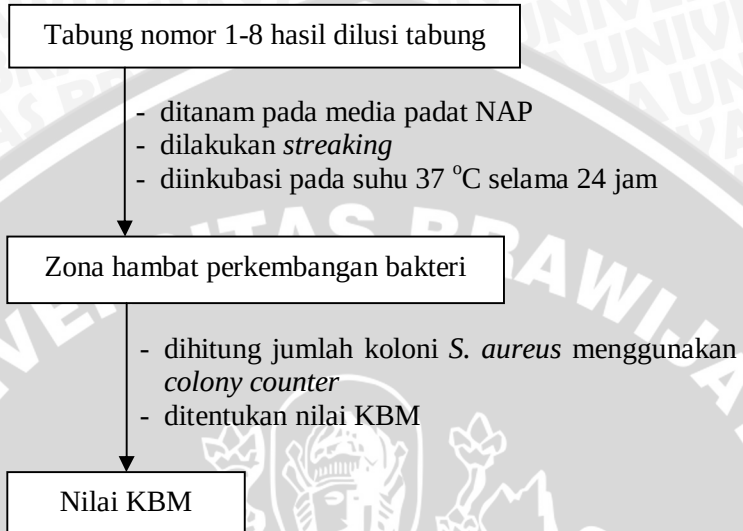
L.7.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *S. aureus*



L.7.6 Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung



L.7.7 Penentuan KBM dengan Metode *Streaking*



L.8 Perhitungan

L.8.1 Perhitungan Kadar Air dalam Daun Sirih Merah

Tabel L.1 Massa daun sirih merah sebelum dan setelah pengeringan

Penimbangan	Massa (g)
Daun sirih merah basah	1378,39
Daun sirih merah yang telah dikeringkan 4-5 hari	374,29

$$\begin{aligned}\text{Kadar Air} &= \frac{\text{Massa DSM basah} - \text{Massa DSM kering}}{\text{Massa DSM basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{1378,39 \text{ g} - 374,29 \text{ g}}{1378,39 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 72,85 \%\end{aligned}$$

L.8.2 Perhitungan Rendemen Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Massa ekstrak etil asetat DSM}}{\text{Massa serbuk DSM yang diekstraksi}} \times 100 \% \\ &= \frac{15,46 \text{ g}}{80 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 19,33 \%\end{aligned}$$

Keterangan: DSM = Daun Sirih Merah

L.8.3 Pembuatan *Drying Agent*



x = Jumlah molekul H_2O yang hilang

$$\text{Massa } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 10 \text{ g}$$

$$\text{Massa } \text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O} = 5,91 \text{ g}$$

$$\text{Massa } x\text{H}_2\text{O} = 10 \text{ g} - 5,91 \text{ g}$$

$$= 4,09 \text{ g}$$

$$\text{BM } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 246 \text{ g/mol}$$

$$\text{BM } \text{MgSO}_4 = 120 \text{ g/mol}$$

$$\text{BM } \text{H}_2\text{O} = 18 \text{ g/mol}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol } \text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O} &= \frac{\text{Massa } \text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}}{\text{BM } \text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}} \\ &= \frac{5,91 \text{ g}}{120 + (7-x)18 \text{ g/mol}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol } x\text{H}_2\text{O} &= \frac{\text{Massa } x\text{H}_2\text{O}}{\text{BM } x\text{H}_2\text{O}} \\ &= \frac{4,09 \text{ g}}{18 \text{ g/mol}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{\text{Mol } x\text{H}_2\text{O}}{\text{Mol MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}} \\
 &= \frac{4,09 \text{ g}}{x18 \text{ g/mol}} \times \frac{120 + 126 - x18 \text{ g/mol}}{5,91 \text{ g}} \\
 &= \frac{4,09 (246 - x18)}{106,38x} \\
 106,38x &= 1006,14 - 73,62x \\
 x &= 5,59 \approx 6
 \end{aligned}$$

L.8.4 Pembuatan Larutan HCl 2 M

Larutan HCl 37 %

Misal dalam 100 mL larutan HCl 37 %, Volume HCl = 37 mL

$$\begin{aligned}
 \text{Massa HCl} &= \rho_{\text{HCl}} \times \text{Volume HCl} \\
 &= 1,19 \text{ g/mL} \times 37 \text{ mL} \\
 &= 44,03 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Mol HCl} &= \frac{\text{Massa HCl}}{\text{BM HCl}} \\
 &= \frac{44,03 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} \\
 &= 1,21 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{HCl}] &= \frac{\text{Mol HCl}}{\text{Volume Larutan}} \\
 &= \frac{1,21 \text{ mol}}{0,1 \text{ L}} \\
 &= 12,1 \text{ M}
 \end{aligned}$$

Larutan HCl 2 M

$$\begin{aligned}V_{\text{HCl } 37\%} \times N_{\text{HCl } 37\%} &= V_{\text{HCl } 2\text{M}} \times N_{\text{HCl } 2\text{M}} \\V_{\text{HCl } 37\%} \times 12,1 \text{ M} &= 500 \text{ mL} \times 2 \text{ M} \\V_{\text{HCl } 37\%} &= 82,64 \text{ mL}\end{aligned}$$

L.8.5 Pembuatan Larutan FeCl₃ 0,062 M

$$\begin{aligned}\text{Massa FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} &= [\text{FeCl}_3] \times \text{Volume Larutan} \times \text{BM FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \\&= 0,062 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 270,33 \text{ g/mol} \\&= 1,68 \text{ g}\end{aligned}$$

L.8.6 Pembuatan Larutan NaOH 1 M

$$\begin{aligned}\text{Massa NaOH} &= [\text{NaOH}] \times \text{Volume Larutan} \times \text{BM NaOH} \\&= 1 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 40 \text{ g/mol} \\&= 4 \text{ g}\end{aligned}$$

L.8.7 Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

1. Pembuatan Larutan Kontrol Konsentrasi 0 % (Larutan *Tween* 20 0,01 %)

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 100\% &= 25 \text{ mL} \times 0,01\% \\V_1 &= 2,5 \times 10^{-3} \text{ mL} \\&= 2,5 \mu\text{L}\end{aligned}$$

2. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 100\% &= 25 \text{ mL} \times 30\% \\V_1 &= 7,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

3. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 27,5 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 30 \% &= 10 \text{ mL} \times 27,5 \% \\V_1 &= 9,2 \text{ mL}\end{aligned}$$

4. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 25 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 30 \% &= 10 \text{ mL} \times 25 \% \\V_1 &= 8,3 \text{ mL}\end{aligned}$$

5. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 22,5 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 27,5 \% &= 10 \text{ mL} \times 22,5 \% \\V_1 &= 8,2 \text{ mL}\end{aligned}$$

6. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 20 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 25 \% &= 10 \text{ mL} \times 20 \% \\V_1 &= 8,0 \text{ mL}\end{aligned}$$

7. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 17,5 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 22,5 \% &= 10 \text{ mL} \times 17,5 \% \\V_1 &= 7,8 \text{ mL}\end{aligned}$$

8. Pembuatan Larutan Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah
Konsentrasi 15 %

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 20 \% &= 10 \text{ mL} \times 15 \% \\V_1 &= 7,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

L.8.8 Pembuatan Suspensi Bakteri *S. aureus* 10^6 sel/mL

Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* 10^8 sel/mL:

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\V_1 \times 0,277 &= 10 \text{ mL} \times 0,1 \\V_1 &= 3,6 \text{ mL}\end{aligned}$$

Keterangan:

N_1 = *Optical Density* (OD) stok bakteri awal (0,277)
 N_2 = OD suspensi bakteri yang ingin didapatkan (0,1)
 V_1 = Volume suspensi bakteri awal
 V_2 = Volume suspensi bakteri dengan OD 0,1
Nilai OD = 0,1 setara dengan konsentrasi suspensi bakteri
 10^8 sel/mL

Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* 10^6 sel/mL:

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\0,1 \text{ mL} \times 10^8 \text{ sel/mL} &= V_2 \times 10^6 \text{ sel/mL} \\V_2 &= 10 \text{ mL}\end{aligned}$$

Keterangan:

V_1 = Volume suspensi bakteri 10^8 sel/mL
 V_2 = Volume suspensi bakteri 10^6 sel/mL
 N_1 = Konsentrasi 10^8 sel/mL
 N_2 = Konsentrasi 10^6 sel/mL

L.8.9 Uji Jonckheere-Terpstra

Dari data penentuan KBM ekstrak etil asetat daun sirih merah terhadap *S.aureus* dilakukan uji statistik nonparametrik pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri.

Tabel L.2 Perhitungan jumlah koloni bakteri *S. aureus* untuk penentuan KBM dari ekstrak etil asetat daun sirih merah

Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah (%)	Replikasi		Rata-Rata	Perlakuan
	I	II		
0	293×10^5	287×10^5	$2,9 \times 10^7$	μ_1
15	285×10^3	276×10^3	$2,8 \times 10^5$	μ_2
17,5	205×10^2	213×10^2	$2,1 \times 10^4$	μ_3
20	114×10^1	132×10^1	$1,2 \times 10^3$	μ_4
22,5	89×10^1	101×10^1	$9,5 \times 10^2$	μ_5
25	91	83	$8,7 \times 10^1$	μ_6
27,5	77	75	$7,6 \times 10^1$	μ_7
30	0	0	0	μ_8

Untuk mengetahui perbedaan nyata dari tiap perlakuan, maka dibuat hipotesis nol statistik (H_0) dan hipotesis alternatif (H_1) sebagai berikut.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_8$$

$$H_1 : \mu_1 > \mu_2 > \mu_3 \dots > \mu_8$$

Ada tidaknya pengaruh dari tiap-tiap perlakuan terhadap jumlah koloni bakteri dapat diketahui dengan melakukan uji statistik nonparametrik menggunakan uji Jonckheere-Terpstra.

Tabel L.3 Banyaknya pasangan hasil pengamatan (a, b) yang searah dengan hipotesis berurut dimana X_{ia} lebih besar dari X_{jb}

Konsentrasi	Jumlah koloni	0 %		15 %		17,5 %			25 %		27,5 %		30 %	
		293×10^5	287×10^5	285×10^3	276×10^3	205×10^2	213×10^2		91	83	77	75	0	0
0 %	293×10^5			>	>	>	>		>	>	>	>	>	>
	287×10^5			>	>	>	>		>	>	>	>	>	>
15 %	285×10^3					>	>		>	>	>	>	>	>
	276×10^3					>	>		>	>	>	>	>	>
.....														
27,5 %	77												>	>
	75												>	>
30 %	0													
	0													

1. Menghitung banyaknya pengamatan yang searah dengan hipotesis berurut (J)

$$\begin{aligned} J &= \sum_{i>j} U_{ij} \\ &= 4 \times 28 \\ &= 112 \end{aligned}$$

2. Menghitung E(T)

$$\begin{aligned} E(T) &= \frac{N^2 - \sum_{i=1}^k n_i^2}{4} \\ &= \frac{16^2 - (8 \times 2^2)}{4} \\ &= 56 \end{aligned}$$

3. Menghitung Varian(J)

$$\begin{aligned} \text{Var}(J) &= \frac{N^2 (2N + 3) - \sum_{i=1}^k n_i^2 (2n_i + 3)}{72} \\ &= \frac{16^2 (32 + 3) - 32 (4 + 3)}{72} \\ &= 121,33 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai z hitung

$$\begin{aligned} z \text{ hitung} &= \frac{J - E(T)}{\sqrt{\text{Var}(J)}} \\ &= \frac{112 - 56}{\sqrt{121,33}} \\ &= 5,084 \end{aligned}$$

Nilai z tabel ($\alpha = 0,01$) = 2,33

Karena z hitung > z tabel, maka H_0 ditolak.

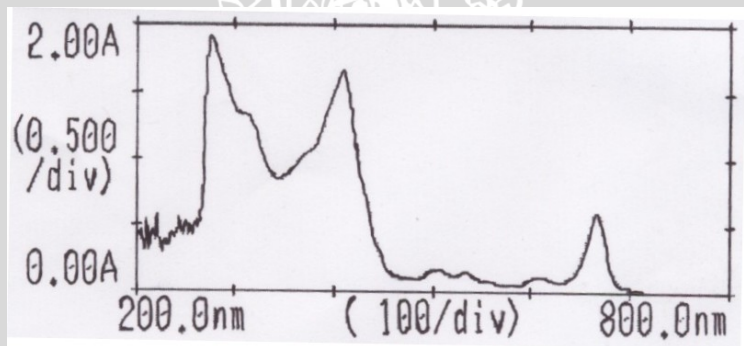
Jadi variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun sirih merah yang ditambahkan berpengaruh terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S.aureus*.

Keterangan: U_{ij} = banyaknya pasangan hasil pengamatan (a, b),
dalam hal ini X_{ia} lebih besar dari X_{jb}

N = banyaknya perlakuan dikalikan pengulangan

L.9 Spektrum UV-Vis Uji Fenolik

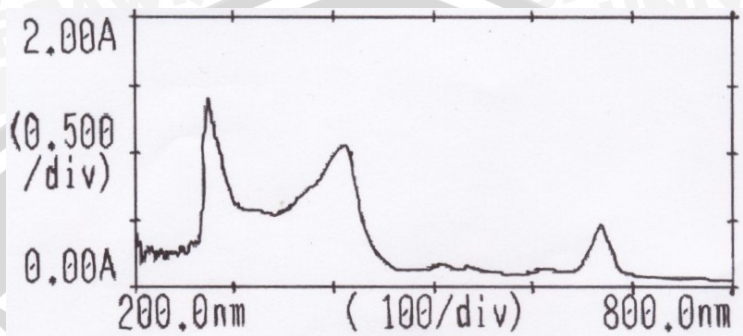
L.9.1 Spektrum UV-Vis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah



Tabel L.4 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
667	0,5980
608	0,1282
534	0,1624
505	0,1896
410	1,6619
275	1,9048

L.9.2 Spektrum UV-Vis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Setelah Penambahan Basa

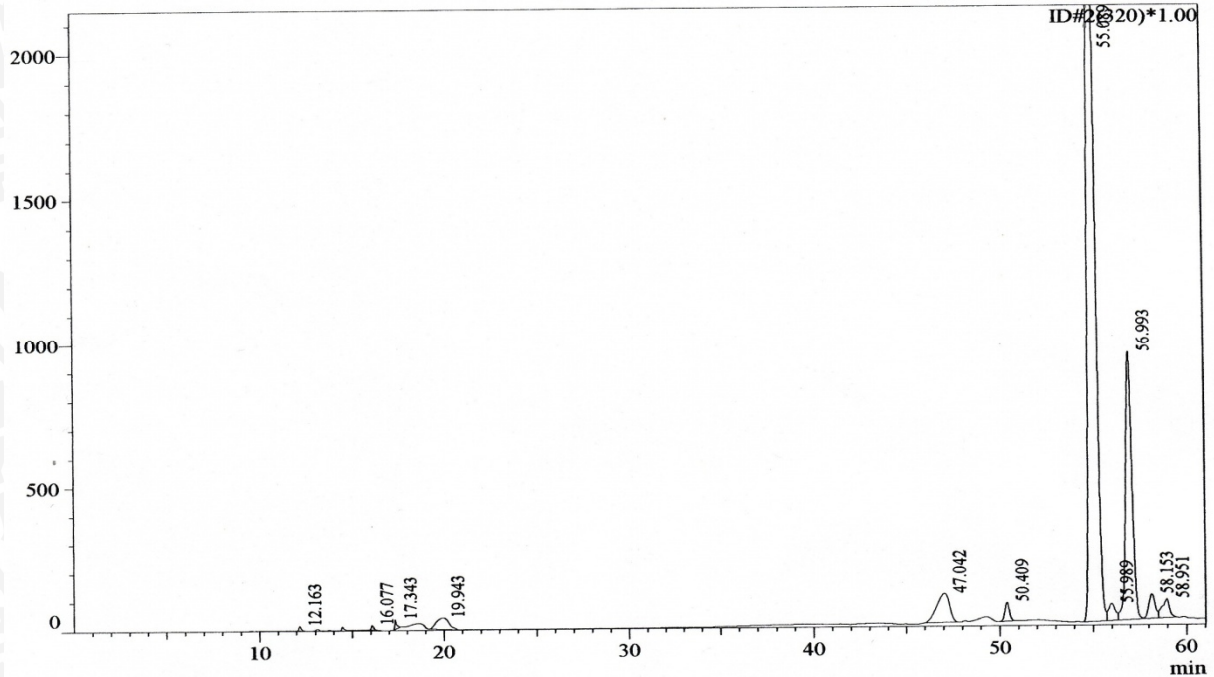


Tabel L.5 Puncak pada spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat daun sirih merah setelah penambahan basa

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
669	0,4625
610	0,1500
537	0,1649
507	0,1882
411	1,0619
274	1,4020

L.10 Hasil Analisis Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah Menggunakan KC-SM

L.10.1 Kromatogram KC



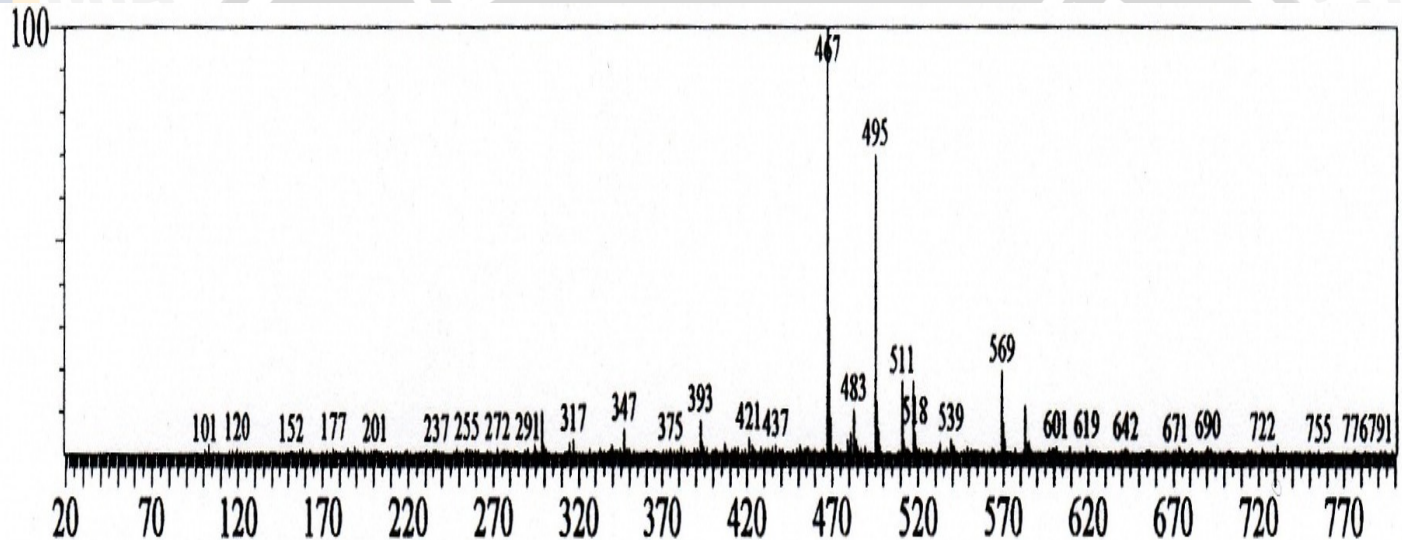
L.10.2 Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC

Tabel L.6 Data hasil analisis senyawa menggunakan KC

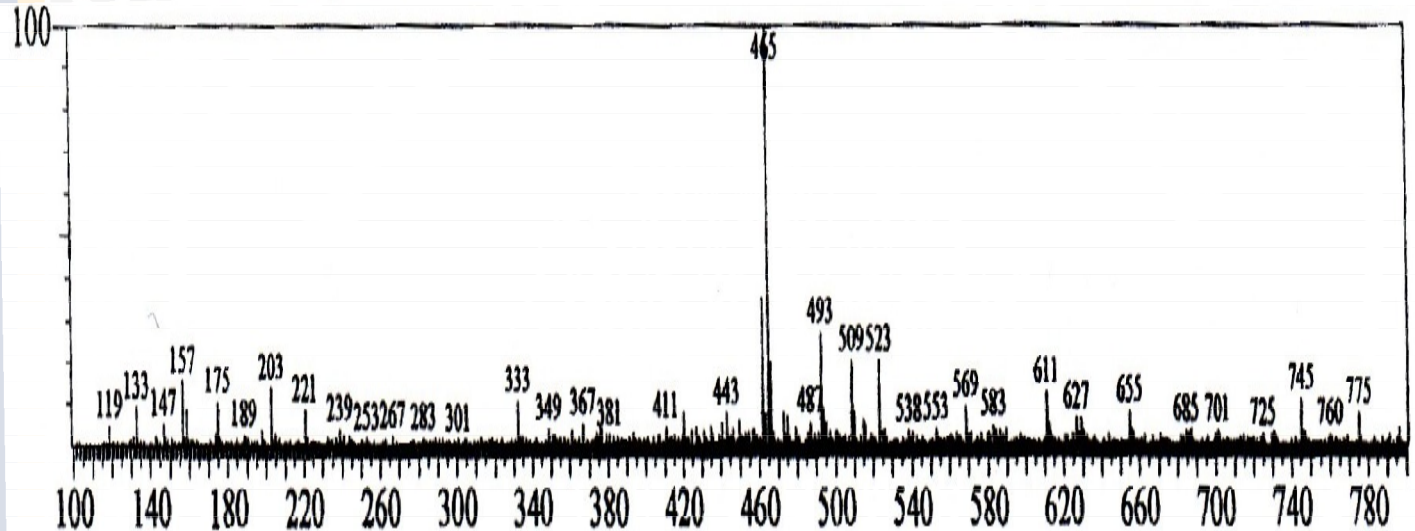
Puncak	Waktu Retensi (menit)	% Luas Puncak
1	12,163	0,143
2	16,077	0,156
3	17,343	0,239
4	19,943	1,740
5	47,042	4,493
6	50,409	1,032
7	55,089	66,092
8	55,989	1,446
9	56,993	21,078
10	58,153	1,850
11	58,951	1,732

L.10.3 Hasil Pindaian (*Scan*) dengan Spektrometer Massa terhadap Komponen Utama dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

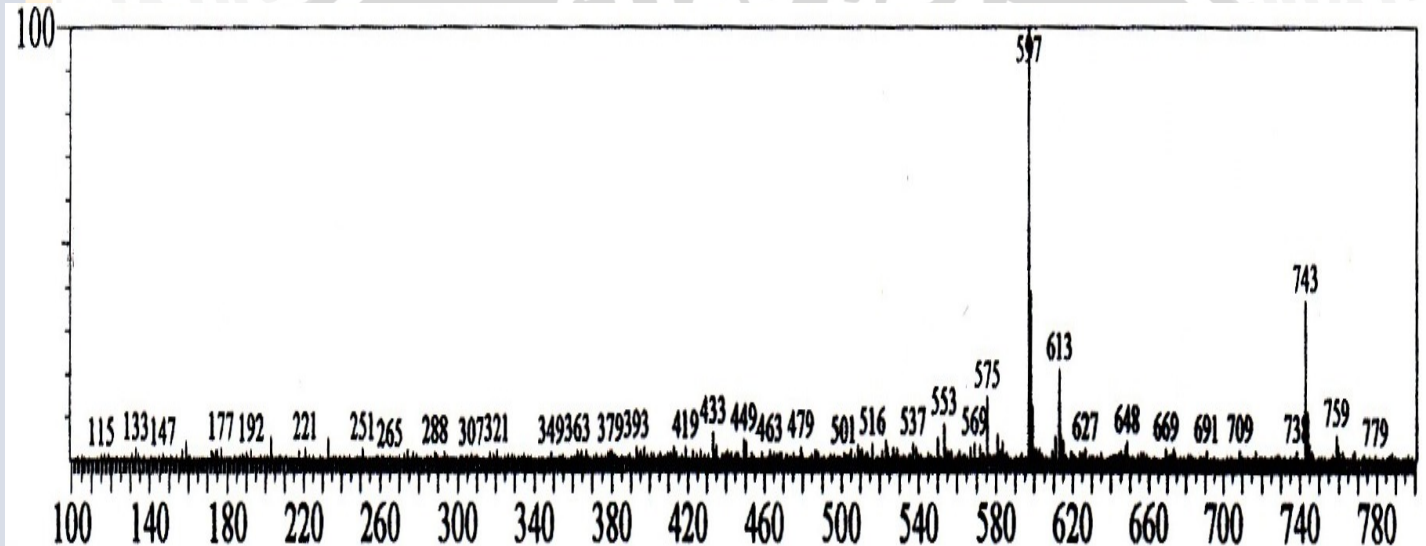
1. Spektrum Massa dengan waktu retensi 47,042 menit



2. Spektrum Massa dengan waktu retensi 55,089 menit

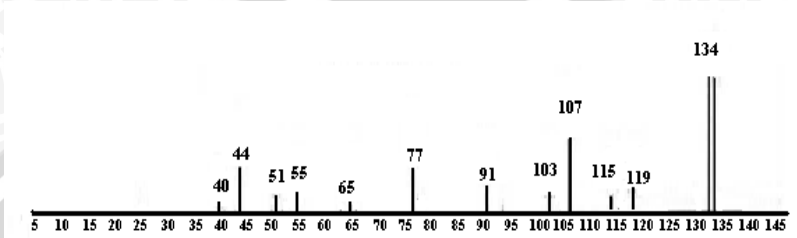


3. Spektrum Massa dengan waktu retensi 56,993 menit



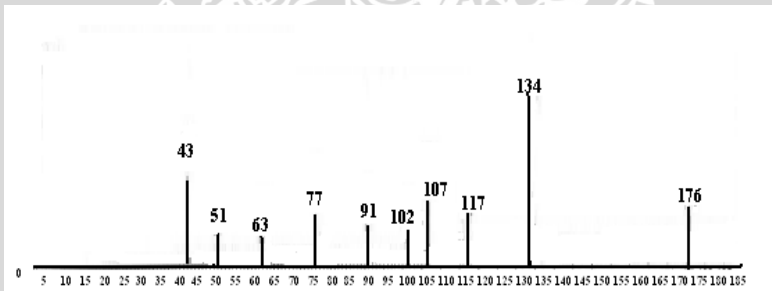
L.11 Pustaka Spektrum Massa Komponen dalam Sirih Merah

L.11.1 Senyawa Kavikol (4-alilfenol)



Berat molekul : 134
Rumus molekul : $C_9H_{10}O$
Nama komponen : 4-Alilfenol
Pustaka : WILEY7.LIB

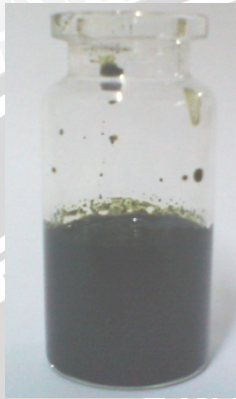
L.11.2 Senyawa Kavikol Asetat



Berat molekul : 178
Rumus molekul : $C_{11}H_{14}O_2$
Nama komponen : kavikol asetat
Pustaka : WILEY7.LIB

L.12 Foto-Foto Penelitian

L.12.1 Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah

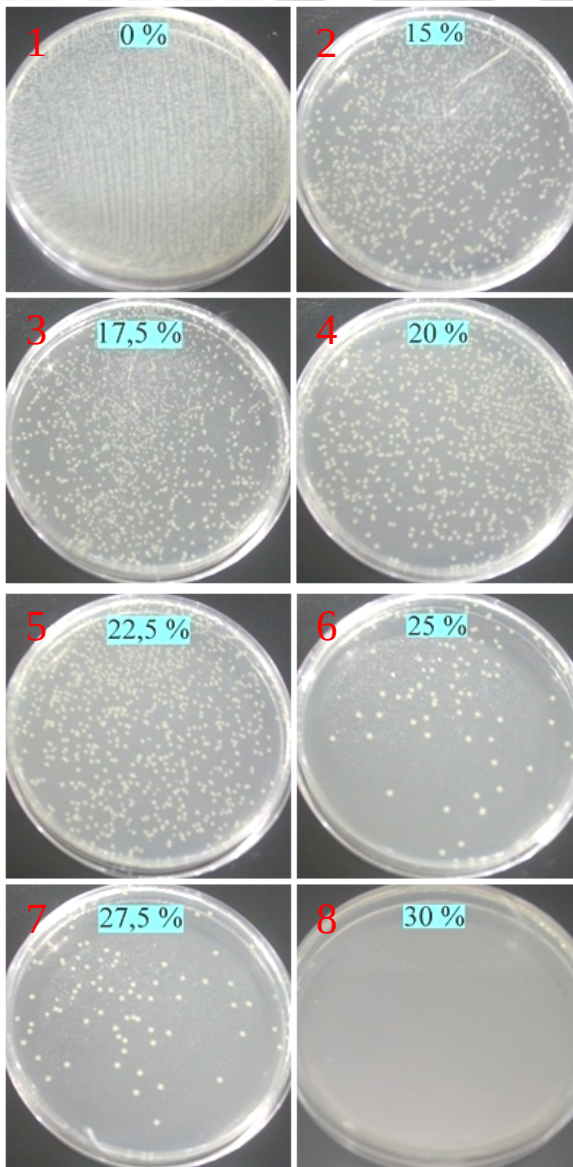


L.12.2 Penentuan KHM Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *S. aureus*



Keterangan: (a) Konsentrasi 0% (e) Konsentrasi 22,5%
(b) Konsentrasi 15% (f) Konsentrasi 25%
(c) Konsentrasi 17,5% (g) Konsentrasi 27,5%
(d) Konsentrasi 20% (h) Konsentrasi 30%

L.12.3 Penentuan KBM Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *S. aureus*



Keterangan:

1. Konsentrasi 0%
2. Konsentrasi 15%
3. Konsentrasi 17,5%
4. Konsentrasi 20%
5. Konsentrasi 22,5%
6. Konsentrasi 25%
7. Konsentrasi 27,5%
8. Konsentrasi 30%