

**PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP DAYA ANTIBAKTERI
HASIL EKSTRAKSI DAUN SIRIH HIJAU PADA AKTIVITAS
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**SKRIPSI
TEKNIK KIMIA**

Diajukan untuk memenuhi persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Teknik



**KANIA SALSABILA PUTRI
NIM. 165061100111002**

**NUR HAYATI
NIM. 165061100111014**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS TEKNIK
MALANG
2020**



LEMBAR PENGESAHAN
PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP DAYA ANTIBAKTERI HASIL
EKSTRAKSI DAUN SIRIH HIJAU PADA AKTIVITAS *STAPHYLOCOCCUS*
***AUREUS*.**

SKRIPSI
TEKNIK KIMIA

Ditujukan untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh gelar Sarjana Teknik



KANIA SALSABILA PUTRI
NIM. 165061100111002

NUR HAYATI
NIM. 165061100111014

Skripsi ini telah direvisi dan disetujui oleh dosen pembimbing
Pada tanggal 2 Juli 2020

Dosen Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Chandrawati Cahvani, MS.
NIP. 195205041980022001

Dosen Pembimbing II

Luthfi Kurnia Dewi, ST., MT
NIK. 2016079207142001

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Ir. Bambang Poerwadi, MS
NIP. 196001261986031001



*Teriring Ucapan Terima Kasih Kepada :
Ayahanda dan Ibunda Tercinta*

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya dan berdasarkan hasil penelusuran berbagai karya ilmiah, gagasan, dan masalah ilmiah yang diteliti dan diulas di dalam naskah skripsi ini adalah asli dari pemikiran saya. Tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia skripsi dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 20 April 2020
Mahasiswa,



Kania Salsabila Putri
NIM. 165061100111002



PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya dan berdasarkan hasil penelusuran berbagai karya ilmiah, gagasan, dan masalah ilmiah yang diteliti dan diulas di dalam naskah skripsi ini adalah asli dari pemikiran saya. Tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia skripsi dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 20 April 2020
Mahasiswa,



Nur Hayati
NIM. 165061100111014







Halaman ini sengaja dikosongkan

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
RINGKASAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	2
1.3 Pembatasan masalah.....	2
1.4 Tujuan.....	2
1.5 Manfaat/kegunaan	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Daun Sirih.....	5
2.2. Komposisi senyawa aktif dalam daun sirih.....	6
2.2.1. Chavibetol	8
2.2.2. Eugenol.....	9
2.2.3. Hydroxychavicol (HC).....	9
2.2.4. Allylpyrocatechol	10
2.2.5. Saponin.....	10
2.2.6. Tanin.....	12
2.3. Metode Ekstraksi.....	12
2.3.1. Maserasi	13
2.3.2. Perkolasi.....	13
2.3.3. Refluks	13
2.3.4. Sokletasi	13
2.4. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi.....	14
2.4.1. Sifat Fisika dan Kimia Pelarut	14
2.4.2. Ukuran partikel bahan baku	15
2.4.3. Rasio pelarut dengan bahan baku.....	15
2.4.4. Suhu ekstraksi	15
2.4.5. Lama ekstraksi.....	15
2.4.6. Pengadukan	15
2.5. <i>Rotary Evaporator</i>	15
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.7. Uji Antibakteri.....	16



2.7.1. Media Kultur	16
2.7.2. Sterilisasi Media Kultur	17
2.7.3. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri	18
2.8. Metode Instrumentasi Untuk Analisa Kimia	21
2.8.1. Spektroskopi	21
2.8.2. Kromatografi	21
2.9. Penelitian Terdahulu	22
BAB III METODE	23
3.1 Rancangan Penelitian	23
3.2 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	23
3.3 Sampel Yang Diuji	23
3.4 Sampel Bakteri	23
3.5 Variabel Penelitian	23
3.5.1 Variabel Bebas	23
3.5.2 Variabel Terikat	23
3.5.3 Variabel Terkontrol	24
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	24
3.6.1 Alat Penelitian	24
3.6.2 Bahan Penelitian	24
3.7 Rangkaian Alat	24
3.8 Diagram alir tahapan Penelitian	25
3.8.1 Persiapan Daun Sirih Hijau Segar	25
3.8.2 Proses Ekstraksi Daun Sirih	26
3.8.3 Pembuatan <i>Nutrient Agar</i> (NA)	27
3.8.4 Proses Regenerasi Bakteri	28
3.8.5 Pembuatan Media <i>Nutrient Broth</i>	29
3.8.6 Pembuatan Larutan BaCl ₂ 1%	30
3.8.7 Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc Farland	31
3.8.8 Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	32
3.8.9 Pengukuran Larutan Suspensi Bakteri Sesuai Larutan Baku 0,5 Mcfarland	33
3.8.10 Uji Anti Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	34
3.8.11 Uji Fitokimia Saponin Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau	35
3.8.12 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau : Tanin	36
3.9 Analisis data	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Rendemen Ekstrak Daun Sirih	39
4.2 Kadar Senyawa Fenolik Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau	40

4.3. Senyawa Aktif Saponin dan Tanin pada Ekstrak Daun Sirih Hijau..... 41

4.4. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*)..... 43

4.5. Hubungan Antara Daya Antibakteri, Senyawa Tanin dan Saponin, Serta Kadar Fenol Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau..... 44

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 47

DAFTAR PUSTAKA 49

LAMPIRAN..... 53



DAFTAR TABEL

No.	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Komposisi kimia pada daun sirih hijau segar.....	6
Tabel 2.2	Senyawa Aktif Pada Daun Sirih Hijau.....	6
Tabel 2.3	Komponen Utama Senyawa Turunan Fenol Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau (<i>Piper Betle L.</i>).....	7
Tabel 2.4	Perbandingan Kondisi Operasi Tiap Metode Ekstraksi.....	14
Tabel 2.5	Sifat Fisika Dan Kimia Beberapa Jenis Pelarut Pada Produksi Ekstraksi Alam.....	14
Tabel 2.6	Standar Mcfarland.....	19
Tabel 2.7	Klasifikasi Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri.....	20
Tabel 2.8	Penelitian-Penelitian Terdahulu Mengenai Ekstrak Daun Sirih Hijau (<i>Piper Betle L.</i>) Dan Daya Anti Bakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau (<i>Piper Betle L.</i>).....	22
Tabel 4.1	Hasil Uji Fitokimia Senyawa Aktif Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau.....	41
Tabel 4.2	Zona Terang, Senyawa Tanin Dan Saponin, Serta Kadar Fenol Pada Ekstrak Daun Sirih Tiap Jenis Pelarut.....	44



DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
Gambar 2.1	Daun Sirih Hijau	5
Gambar 2.2	Struktur Kimia Chavibetol.....	8
Gambar 2.3	Struktur kimia Eugenol.....	9
Gambar 2.4	Struktur kimia hydroxychavicol (HC).....	9
Gambar 2.5	Struktur kimia allypyrocatechol.....	10
Gambar 2.6	Struktur Kimia Saponin.....	11
Gambar 2.7	Struktur Kimia Tanin.....	12
Gambar 2.8	Media Uji Antibakteri.....	20
Gambar 2.9	Pengukuran Diameter Zona Hambat.....	20
Gambar 3.1	Rangkaian Alat Ekstraksi Refluks.....	24
Gambar 3.2	Persiapan Daun Sirih Segar.....	25
Gambar 3.3	Proses Ekstraksi Daun Sirih.....	26
Gambar 3.4	Pembuatan Nutrient Agar (NA)	27
Gambar 3.5	Proses Regenerasi Bakteri.....	28
Gambar 3.6	Pembuatan Media Nutrient Broth.....	29
Gambar 3.7	Pembuatan Larutan BaCl ₂ 1%.....	30
Gambar 3.8	Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc Farland.....	31
Gambar 3.9	Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	32
Gambar 3.10	Pengukuran Larutan Suspensi Bakteri Sesuai Larutan Baku 0,5 Mcfarland.....	33
Gambar 3.11	Uji Anti Bakteri Staphylococcus Aureus.....	34
Gambar 3.12	Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau : Saponin.....	35
Gambar 3.13	Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau : Tanin.....	36
Gambar 4.1	Rendemen Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut.....	39
Gambar 4.2	Kadar Fenol Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut.....	40
Gambar 4.3	Reaksi Hidrolisis Saponin Dalam Air.....	42
Gambar 4.4	Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul	Halaman
Lampiran 1	Perhitungan Dan Data Penelitian.....	53
Lampiran 2	Hasil Uji Kadar Fenol.....	55
Lampiran 3	Dokumentasi Penelitian.....	56
Lampiran 4	Riwayat Hidup.....	61



RINGKASAN

Kania Salsabila Putri dan Nur Hayati, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Brawijaya, April 2020, *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Daya Antibakteri Hasil Ekstraksi Daun Sirih Hijau Pada Aktivitas Staphylococcus Aureus*, Dosen Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Chandrawati Cahyani, MS dan Luthfi Kurnia Dewi, ST., MT.

Daun sirih hijau diduga memiliki senyawa aktif yang bersifat antibakteri berupa senyawa fenol dan terpene beserta turunannya. Senyawa aktif dari daun sirih hijau ini dapat diperoleh dengan proses ekstraksi. Daun sirih hijau diekstraksi menggunakan metode ekstraksi refluks pada suhu operasi 65°C selama 4 jam dengan tiga jenis pelarut dengan kepolaran yang berbeda yaitu etanol yang bersifat polar, etil asetat bersifat semi polar, dan heksana yang bersifat non polar. Ekstrak daun sirih hijau menggunakan berbagai pelarut tersebut kemudian dilakukan pengujian daya antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rendemen terbesar dimiliki oleh ekstrak daun sirih dengan pelarut etanol (EDS-E) sebesar (5,77%) diikuti oleh etil asetat (EDS-EA) sebesar (4,26%), dan heksana (EDS-H) sebesar (1,55%). Kadar fenol sampel EDS-E, EDS-EA, dan EDS-H secara berturut-turut sebesar (5,17%), (2,22%) dan (8,45%). Hasil uji daya antibakteri diamati pada media uji antibakteri EDS-E, EDS-EA, dan EDS-H secara berturut-turut terbentuk diameter zona terang sebesar (19 mm), (22 mm) dan (17 mm) dan hasil pengujian kualitatif saponin menunjukkan untuk EDS-E dan EDS-EA positif dan hasil negatif pada EDS-H. Uji kualitatif saponin dinyatakan positif dengan terbentuknya busa pada permukaan ekstrak. Kemudian untuk hasil pengujian kualitatif tanin menunjukkan untuk EDS-E, EDS-EA dan EDS-H seluruhnya positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa daya antibakteri EDS-EA merupakan yang paling kuat di bandingkan EDS-E dan EDS-H serta diketahui senyawa antibakteri dalam ekstrak daun sirih hijau yang berperan penting dalam penghambatan pertumbuhan bakteri *s.aureus* yaitu senyawa aktif saponin serta didukung oleh senyawa antibakteri lainnya yaitu fenol dan tanin.

Kata kunci: antibakteri, daun sirih, ekstraksi, pelarut, *s.aureus*.



SUMMARY

Kania Salsabila Putri dan Nur Hayati, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Brawijaya University, *The Effect Of Solvent Type On Antibacterial Power Of Green Betel Leaves Extraction Results In Staphylococcus Aureus Activities*, Academic Supervisor: Prof. Dr. Ir. Chandrawati Cahyani and Luthfi Kurnia Dewi, ST., MT.

Green betel leaf is thought to have an active compound that is antibacterial in the form of phenol and terpene compounds and their derivatives. The active compound of green betel leaf can be obtained by extraction process. Green betel leaf was extracted using the reflux extraction method at an operating temperature of 65°C for 4 hours with three types of solvents with different polarity, namely ethanol which is polar, ethyl acetate is semi-polar, and non-polar hexane. Green betel leaf extract using various solvents was then tested for antibacterial power against the growth of *staphylococcus aureus* bacteria using the diffusion method.

The results of this study indicate that the largest yield is owned by betel leaf extract with ethanol solvent (5.77%) followed by ethyl acetate (4.26%), and hexane (1.55%). Phenol levels were obtained from betel leaf extract with each ethanol, ethyl acetate and hexane (5.17%), (2.22%) and (8.45%) solvents. Antibacterial test results were observed on the antibacterial test media that were given betel leaf extract with ethanol, ethyl acetate and hexane solvents which formed the diameter of clear zones (19 mm), (22 mm) and (17 mm) as well as qualitative results of saponin testing showed for betel leaf extract with positive ethanol and ethyl acetate solvents and negative results on betel leaf extract with hexane solvent. The saponin qualitative test was stated positive by forming foam on the surface of the extract. Then for the results of qualitative tannin testing showed that betel leaf extract with ethanol, ethyl acetate and hexane solvents were all positive as indicated by the change in color to blue or blackish green. Based on these results it can be concluded that the antibacterial power of betel leaf extract with ethyl acetate solvent is the most powerful compared to using ethanol and peer hexane and it is known that the antibacterial compound in green betel leaf extract which plays an important role in inhibiting the growth of *staphylococcus aureus* is the active compound saponin and is supported by other antibacterial compounds namely phenols and tannins.

Keywords: antibacterial, extraction, green betel leaf, solvent, *staphylococcus aureus*.



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Daun sirih hijau sebagai tanaman obat herbal, telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia untuk pengobatan tradisional dalam mengatasi berbagai macam penyakit. Tanaman daun sirih tumbuh merambat, daun berbentuk menyerupai hati yang berselang-seling di batang. Daun sirih hijau ini termasuk pada famili *piperaceae* dan banyak tumbuh di pekarangan penduduk dan dipercaya memiliki daya antibakteri sehingga banyak digunakan pada pengobatan tradisional khususnya untuk mengobati penyakit kulit.

Di negara dengan iklim tropis seperti Indonesia, infeksi pada kulit merupakan infeksi yang sering terjadi yang disebabkan oleh aktivitas bakteri, contohnya seperti *Staphylococcus aureus* (S.aureus). Bakteri ini termasuk bakteri gram positif yang normal terdapat pada tubuh manusia, khususnya di daerah kulit dan selaput lendir. S.aureus merupakan salah satu bakteri terbanyak yang menyebabkan infeksi kulit (As, 2016: 228).

Sehingga, banyak dari masyarakat Indonesia yang menggunakan daun sirih hijau sebagai salah satu cara atau alternatif tradisional untuk mengobati infeksi pada kulit yang disebabkan oleh bakteri S.aureus. Hal ini, dilakukan masyarakat disebabkan beberapa keuntungan antara lain relatif lebih mudah didapatkan, murah, aman dan tidak menimbulkan resistensi.

Daun sirih hijau mengandung senyawa aktif seperti monoterpena, sesquiterpenes, alkohol, aldehyd, ester, dan fenol. Senyawa aktif tersebut berkhasiat sebagai antibakteri, antibiotik, dan antikuman (Trubus, 2009: 125). Senyawa aktif utama pada daun sirih yang digunakan sebagai antibakteri adalah senyawa terpena dan fenol beserta turunannya. Senyawa aktif yang terkandung pada daun sirih hijau tersebut dapat diperoleh dengan proses ekstraksi.

Proses ekstraksi yang dilakukan oleh pelarut tertentu untuk menarik komponen atau senyawa aktif pada suatu bahan. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa hal salah satunya yaitu sifat pelarut (Zhang, 2018: 1-2). Sehingga, pemilihan pelarut yang tepat dan sesuai sangatlah penting dalam proses ekstraksi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan agar dapat mengetahui pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap hasil ekstraksi daun sirih hijau dan daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau terhadap aktivitas S.aureus.

1.2 Rumusan masalah

1. Bagaimana pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap rendemen, kadar fenol, dan kandungan senyawa aktif pada hasil ekstraksi daun sirih hijau?
2. Bagaimana pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau pada aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ?

1.3 Pembatasan masalah

1. Pelarut yang digunakan yaitu etanol (polar), etil asetat (semipolar) dan heksana (nonpolar).
2. Daun sirih hijau yang digunakan yaitu daun sirih segar berwarna hijau.
3. Metode ekstraksi pada penelitian ini adalah metode refluks dengan suhu operasi pada setiap variabel diberikan perlakuan yang sama yaitu sebesar 65°C dan dilakukan selama 4 jam.
4. Bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) diperoleh dari biakan kultur yang dibeli dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.
5. Uji pada hasil ekstraksi direpresentasikan dalam rendemen, kadar fenol, dan senyawa aktif saponin serta tanin.
6. Daya antibakteri dilihat melalui pengukuran diameter zona terang (zona hambat) yang terbentuk pada media pertumbuhan uji antibakteri.

1.4 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap rendemen, kadar fenol, dan kandungan senyawa aktif pada hasil ekstraksi daun sirih hijau.
2. Mengetahui pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau pada aktivitas *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*).

1.5 Manfaat/kegunaan

- a. Bagi Peneliti
 - Menambah wawasan peneliti dalam penerapan ilmu bidang rekayasa hayati.
 - Menambah wawasan peneliti mengenai pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap hasil ekstraksi daun sirih hijau dan daya antibakterinya pada aktivitas *S.aureus*.

b. Bagi Keilmuan

- Memberi informasi mengenai pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap hasil ekstraksi daun sirih hijau dan daya antibakterinya pada aktivitas *S.aureus*.
- Sebagai bahan referensi untuk penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau pada aktivitas bakteri *S.aureus*.

c. Bagi Sosial Masyarakat

- Memberikan informasi bahwa daun sirih hijau memiliki potensi sebagai alternatif alami zat antibakteri.





Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Daun Sirih

Tanaman ini memiliki karakteristik dengan daun hijau tua berbentuk hati yang merupakan tanaman obat bernilai estetika dan komersial. Sebagai tanaman obat herbal, daun sirih hijau banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia untuk pengobatan



tradisional dalam mengatasi berbagai macam penyakit.

Gambar 2.1 Daun Sirih Hijau (*Piper Betle L.*)

Tanaman sirih termasuk tanaman dikotil yang menjalar dan banyak dibudidayakan di negara-negara tropis terutama di Asia Selatan dan Tenggara. Pada gambar 2.1 diatas dapat diketahui bahwa daun sirih hijau memiliki bentuk menyerupai hati, permukaan daunnya halus dan berkilau serta memiliki tangkai yang panjang. Daunnya rata-rata memiliki panjang sebesar 6–17 cm dan tebal 1,2-1,8 mm (Mabberley, 1997).

Klasifikasi ilmiah tanaman daun sirih hijau adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Piperales
Suku	: Piperaceae
Marga	: Piper
Jenis	: betle
Nama Binomial	: Piper betle L.

(Pradhan, dkk, 2013 : 148 - 149)

2.2. Komposisi senyawa aktif dalam daun sirih

Pada daun sirih hijau segar terdapat komposisi kimia yang dianalisis melalui uji profil nutrisi dan fitokimia. Komposisi kimia yang terkandung dalam daun sirih hijau segar dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia pada daun sirih hijau segar

Komposisi	Kandungan
Kadar Air (%)	80-85
Kadar Abu (%)	3-5
Karbohidrat (%)	4-6
Protein (%)	2-4
Lemak (%)	0,6-0,8
Total fenolik (mg/100 gram)	12-16
Vitamin C (mg/100 gram)	4-6
Sodium (mg/100 gram)	9-12
Fosfor (mg/100 gram)	30-45

(Sumber : Sarma,2018 : 3873)

Menurut Satyal dan Setzer (2012 : 1) ditemukan beberapa senyawa aktif yang terdapat pada daun sirih segar dan hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Senyawa aktif pada daun sirih hijau

Senyawa kimia	Komponen
Monoterpene	Tran-sabinene hydrate (<0,005%)
Sesquiterpenes	ε-caryophyllene (0,4%), δ-cadinene (<0,005%), α-humulene (<0,005%), γ-murolene (<0,005%)
Alcohols	α-cadinol (<0,005%), T-muurolol (<0,005%)
Ester	Methyl salicylate (<0,005%), chavibetol acetat (11,7%), allylpyrocatechol diacetat (6,2%)
Aldehydes	n-decanal (<0,005%)
Phenol	Chavicol (0,4%), eugenol (0,4%), chavibetol (80,5%), methyl eugenol (0,4%)

(Sumber : Satyal dan Setzer, 2012 :1)



Sifat fisika dan kimia dari komponen utama pada daun sirih hijau dapat dilihat pada tabel 2.3. Senyawa target yang diharapkan dalam penelitian ini adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik memiliki gugus -OH yang dapat menembus membran bakteri dan mengakibatkan pemecahan pada dinding selnya sehingga dapat menghambat atau membunuh bakteri (Sabbineni, 2016).

Tabel 2.3 Sifat fisika dan kimia dari komponen utama pada daun sirih hijau

Komponen	Sifat Fisika	Sifat Kimia
Monoterpen	<ul style="list-style-type: none"> Memiliki titik didih yang rendah Tidak ada aroma dan tidak berwarna. 	<ul style="list-style-type: none"> Mudah menguap Rentan terhadap oksidasi
Sesquiterpen	<ul style="list-style-type: none"> Memiliki titik didih lebih tinggi daripada monoterpen 	<ul style="list-style-type: none"> Mudah menguap
Ester	<ul style="list-style-type: none"> cukup larut dalam air Memiliki titik didih yang mirip dengan alkohol atau keton 	<ul style="list-style-type: none"> Stabil
Aldehid	<ul style="list-style-type: none"> Dapat larut dalam air Sebagian besar tidak berwarna. 	<ul style="list-style-type: none"> Mudah menguap Rentan terhadap oksidasi
Chavibetol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> Berat molekul : 164,2 g/mol Titik didih (1 atm) : 253.5°C Cukup larut dalam air dan larut dalam etanol dan eter 	<ul style="list-style-type: none"> Tidak mudah terbakar
Chavicol (C ₉ H ₁₀ O)	<ul style="list-style-type: none"> Berat molekul : 134,17 g/mol Titik didih (1 atm) : 238°C Cukup larut dalam air 	<ul style="list-style-type: none"> Stabil
Eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> Berat molekul : 164,2 g/mol Sedikit larut dalam air dan sangat mudah larut dalam pelarut organik 	<ul style="list-style-type: none"> Tidak mudah terbakar
Methyl Eugenol (C ₁₁ H ₁₄ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> Berat molekul : 178,23 g/mol Titik didih (1 atm) : 255°C Larut dalam etanol, etil eter, kloroform 	<ul style="list-style-type: none"> Tidak Korosif

dan hampir seluruh pelarut organik

lainnya. Namun, Tidak larut dalam air,

glycol dan *propylene glycol*

Chavibetol asetat (C₁₁H₁₂O₂)

- Berat molekul : 176,21 g/mol
- Titik didih (1 atm) : 280°C
- Stabil
- Larut dalam etanol dan ether. Namun, tidak larut dalam air.

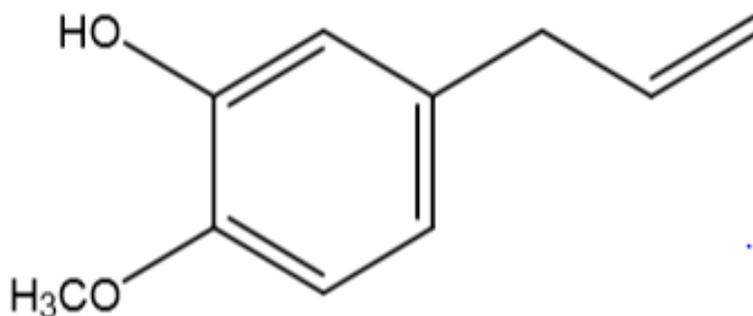
allylpyrocatechol diacetat (C₁₃H₁₄O₄)

- Berat molekul : 234,25 g/mol
- Titik didih (1 atm) : 310°C
- Larut dalam kloroform, diklorometana dan etil asetat
- Stabil

Berikut beberapa deskripsi target senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau :

2.2.1. Chavibetol

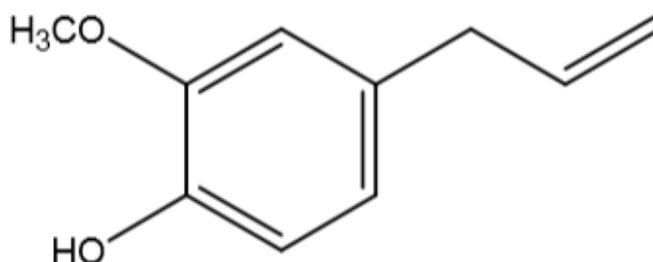
Chavibetol adalah senyawa kimia alami dari kelas fenilpropanoid. Senyawa ini adalah komponen terpenting dari ekstrak daun sirih . Chavibetol merupakan senyawa aromatik dengan bau pedas dan merupakan isomer eugenol yang berfungsi sebagai antibakteri dan antioksidan (Dwivedi & Tripathi, 2014 : 94). Struktur kimia chavibetol dapat dilihat pada gambar 2.2 dimana terdapat gugus –OH didalamnya.



Gambar 2.2 Struktur Kimia Chavibetol

2.2.2. Eugenol

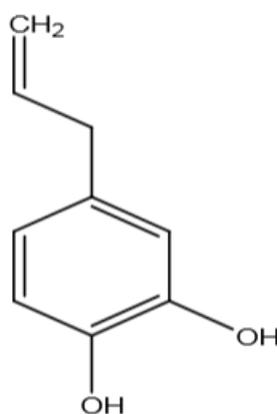
Eugenol adalah salah satu unsur utama daun sirih dan telah terbukti memiliki sifat anti-inflamasi dalam berbagai penelitian pada hewan dengan berbagai jenis peradangan. Aktivitas eugenol dapat digunakan sebagai antimikroba, analgesik, antioksidan, antivirus dan antikanker (Dwivedi & Tripathi, 2014 : 94).). Struktur kimia eugenol dapat dilihat pada gambar 2.3 dimana terdapat gugus -OH didalamnya.



Gambar 2.3 Struktur kimia Eugenol

2.2.3. Hydroxychavicol (HC)

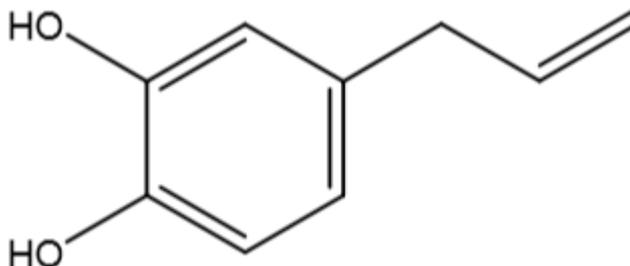
Daun segar yang belum matang mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bermanfaat, di antaranya adalah hydroxychavicol. Hydroxychavicol adalah senyawa fenolik paling penting yang memiliki efek anti kanker, anti-nitrosasi dan memiliki efek anti-mutagenik. Selain itu, senyawa tersebut memiliki potensi yang besar untuk bertindak sebagai anti-inflamasi, antioksidan, antibakteri dan anti-trombotik tanpa mengganggu fungsi hemostatik (Dwivedi & Tripathi, 2014 : 94). Struktur kimia hydroxychavicol (HC) dapat dilihat pada gambar 2.4 dimana terdapat gugus -OH didalamnya.



Gambar 2.4 Struktur kimia hydroxychavicol (HC)

2.2.4. Allylpyrocatechol

Unsur fenolik allylpyrocatechol yang diperoleh dari daun sirih, menunjukkan aksi terhadap bakteri anaerob yang bertanggung jawab atas penyakit halitosis (bau mulut) (Dwivedi & Tripathi, 2014 : 94). Struktur kimia Allylpyrocatechol dapat dilihat pada gambar 2.5 dimana terdapat gugus -OH didalamnya.



Gambar 2.5 Struktur kimia allylpyrocatechol

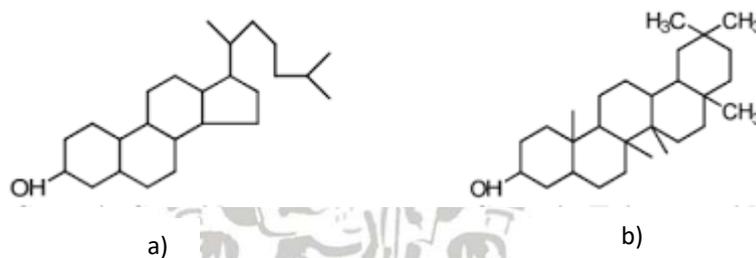
Penelitian Pin, dkk (2010 : 452) mengungkapkan bahwa hasil ekstraksi daun sirih menggunakan pelarut H₂O mempunyai hasil yang signifikan dibandingkan dengan pelarut lain. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa utama dalam daun sirih sebagian besar memiliki polaritas tinggi dan larut dalam air. Namun, di dalam daun sirih terdapat pula senyawa fenolik yang termasuk senyawa dengan polaritas rendah seperti chavicol, chavibetol, chavibetol asetat dan eugenol. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang polaritasnya rendah lebih menunjukkan hasil ekstraksi yang lebih tinggi karena ekstrak daun sirih memiliki senyawa fenolik dengan polaritas yang rendah (Rao, 2012 : 206). Daun sirih memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan melawan berbagai jenis mikroorganisme. Terdapat aktivitas daun sirih yang menunjukkan sifat antibakteri melawan bakteri *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan lainnya. Senyawa fenolik dapat berinteraksi dengan permukaan dinding sel bakteri dan menyebabkan perubahan pada struktur utama dinding sel, yang pada akhirnya mengarah pada pembentukan pori dan degradasi komponen bakteri. Bakteri gram positif lebih rentan menghambat ekstrak tanaman karena hanya memiliki lapisan tunggal dan tidak memiliki penghalang alami terhadap molekul besar, sedangkan bakteri gram negatif memiliki dinding sel multi-lapis dan struktur dinding sel yang kompleks (Pradhan, dkk, 2013 : 159).

2.2.5. Saponin

Secara umum, saponin terdiri dari aglikon yang terikat pada satu atau lebih gugus gula.

Saponin dapat diklasifikasikan sebagai triterpen saponin dan steroid saponin berdasarkan

aglikonnya yang masing-masing dapat berupa triterpen (C_{30}) atau steroid (C_{27}). Sifat paling penting dari saponin adalah kemampuannya untuk membentuk busa yang sangat stabil. Hal ini disebabkan oleh kemampuan surfaktan saponin yang memiliki gugus polar dalam gugus gula dan memiliki gugus non polar dari gugus aglikon sehingga memungkinkan saponin untuk menurunkan tegangan permukaan dalam sistem *aqueous* (Patra, 2012 : 312-313). Pembentukan busa yang persisten selama ekstraksi tanaman dapat menjadi tanda bahwa ekstrak tanaman tersebut mengandung senyawa saponin. Namun, dapat dilakukan tes sederhana untuk mengetahui adanya kandungan saponin pada ekstrak tanaman yaitu dengan memanaskan dan kemudian mengguncang ekstrak tanaman pada larutan aquades dalam tabung reaksi, jika terdapat senyawa saponin maka akan terbentuk busa persisten di atas permukaan cair (Harborne, 1984 : 126). Struktur kimia dasar dari saponin ditunjukkan pada gambar 2.6 dimana terdapat gugus $-OH$ didalamnya.



Gambar 2.6 Struktur Kimia Saponin a) Steroid, b) Triterpenoid

Secara tradisional, tanaman yang mengandung saponin telah banyak digunakan sebagai agen pencuci alami. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin dapat menjadi senyawa antibakteri karena memiliki zat aktif permukaan yang mirip dengan sabun (sifat surfaktan), akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri (Harborne, 1984 : 121). Sifat biologis lain dari saponin adalah kemampuannya untuk menghemolisis sel darah merah, menekan populasi protozoa dalam rumen, dan untuk menghambat pertumbuhan mikroba, terutama jamur (Patra, 2012 : 313).

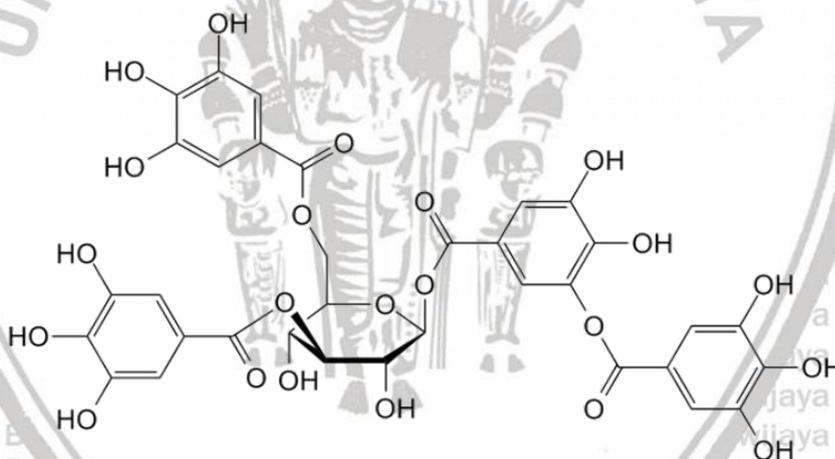
Saponin dari bahan tanaman dapat diekstraksi menggunakan berbagai macam teknik ekstraksi dan pelarut. Teknik konvensional untuk mengekstraksi saponin dapat menggunakan metode soxhlet. Saponin termasuk dalam senyawa semi polar, banyak metode ekstraksi saponin menggunakan pelarut semi polar seperti etil asetat dan aseton.

Jenis aglikon, jenis gula dan kelompok fungsional yang terikat pada aglikon atau gula serta

konsentrasi saponin mempengaruhi kemampuan saponin untuk larut dalam pelarut yang berbeda, oleh karena itu ekstrak yang berbeda dapat memberikan aktivitas yang berbeda (Patra, 2012 :317).

2.2.6. Tanin

Tanin termasuk dalam kelompok senyawa polifenol dan banyak ditemukan pada tanaman. Senyawa ini dapat berinteraksi dan mengendapkan makromolekul seperti protein. Secara kimia, ada dua jenis tanin utama yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi banyak terkandung dalam tanaman gymnospermae dan angiospermae, terutama pada spesies kayu. Sebaliknya, tanin terhidrolisis hanya terdapat dalam tanaman dikotil. Namun, kedua jenis tanin ini dapat terkandung bersamaan pada tanaman yang sama (Harborne, 1984 : 84). Menurut Akiyama,dkk.,(2001) senyawa tanin memiliki sifat antibakteri dapat disebabkan oleh sifat astringen yang dimilikinya sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada membran bakteri. Struktur kimia tannin ditunjukkan pada gambar 2.7 dimana terdapat gugus -OH didalamnya.



Gambar 2.7 Struktur Kimia Tanin

2.3. Metode Ekstraksi

Ekstraksi didefinisikan sebagai proses penarikan komponen potensial dari sumbernya menggunakan pelarut selektif. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit bahan alam yang terlarut, dan meninggalkan residu yang tidak larut. Ekstraksi menghasilkan ekstrak kasar yang mengandung senyawa aktif atau senyawa potensial baik yang diinginkan dan tidak diinginkan (Bulugahapitiya, 2013 : 6). Berikut beberapa metode-metode ekstraksi yang umum dilakukan :

2.3.1. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi senyawa aktif dalam bahan tanaman dengan cara merendam bahan tanaman dalam pelarut tertentu. Maserasi dapat dilakukan pada suhu kamar maupun dengan panas. Pelarut untuk maserasi dipilih dengan mempertimbangkan senyawa aktif yang akan diekstraksi (Bulugahapitiya, 2013 : 15). Maserasi memiliki kelebihan yaitu prosesnya sederhana dan tidak merusak senyawa yang termolabil jika dilakukan hanya pada suhu ruang (Sutrisna, 2016 : 17). Kekurangan utama dari maserasi adalah prosesnya dapat mengonsumsi pelarut dalam volume besar dan untuk beberapa senyawa mungkin tidak diekstraksi secara efisien jika dilarutkan hanya dalam suhu ruang (Sarker, 2006 : 34).

2.3.2. Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi dengan bahan berbentuk bubuk (simplisia) yang direndam dengan pelarut di dalam alat perkolator (wadah silinder atau kerucut yang dilengkapi keran pada bagian bawah). Pelarut tambahan kemudian dituangkan di atas bahan tanaman dan dibiarkan menetes keluar menuju cerek penapis (Sarker, 2006 : 35). Kelebihan dari metode perkolasi adalah simplisia selalu dialiri pelarut baru. Sedangkan kelemahan dari metode perkolasi yaitu diperlukan banyak pelarut (Sutrisna, 2016 : 17).

2.3.3. Refluks

Ekstraksi refluks dilakukan dengan merendam bahan baku ke dalam pelarut pada *round bottom flask* yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan pada suhu hingga menuju titik didihnya kemudian uap yang terbentuk akan terkondensasi dan pelarut akan kembali ke flask. Kondisi optimum ekstraksi menggunakan metode refluks disesuaikan berdasarkan bahan alam yang akan diekstraksi (Sarker, 2006 : 34). Prinsip kerja dari metode refluks yaitu disolusi fisik dengan pemanasan dan pendinginan kontinu selama jangka waktu tertentu. Ekstraksi refluks meliputi pencampuran sampel bahan dengan pelarut selektif, pemanasan campuran sampel dengan pelarut kontinu, dan pendinginan kondensasi uap ke dalam campuran kontinu. Pemanasan dikendalikan pada suhu tertentu yang disesuaikan dengan kebutuhan. Ekstraksi refluks umumnya digunakan untuk ekstraksi komponen termostabil (Jaya, 2017 : 38).

2.3.4. Sokletasi

Sokletasi merupakan proses penyarian secara berkesinambungan dimana pelarut dipanaskan hingga menghasilkan uap yang naik melalui kondensor untuk mengkondensasi uap menjadi pelarut yang dipakai secara terus-menerus (Leba, 2017 : 5). Sampel berupa

serbuk ditempatkan pada klonsong di atas labu dan dibawah kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mendidih sehingga menjadi uap yang naik melalui pipa samping. Kemudian uap akan di embungkan lagi dan turun untuk menyari serbuk sampel. (Sutrisna, 2016 : 16). Namun, kerugian utama dari ekstraksi ini adalah ekstraknya terus-menerus dipanaskan pada titik didih pelarut yang digunakan, dan hal ini dapat merusak senyawa termolabil (Sarker, 2006 : 35). Berikut merupakan perbandingan kondisi operasi tiap metode ekstraksi yang dapat dilihat pada tabel 2.4.

Tabel 2.4 Perbandingan Kondisi Operasi Tiap Metode Ekstraksi

Metode	Pelarut yang dapat dipakai	Suhu	Tekanan	Polaritas pelarut
Maserasi	Air, Pelarut aqueous dan non-aqueous	Suhu ruang, pemanasan	Atmosferik	Tergantung pada polaritas senyawa aktif
Perkolasi	Air, Pelarut aqueous dan non-aqueous	Suhu ruang, pemanasan	Atmosferik	Tergantung pada polaritas senyawa aktif
Refluks	Pelarut aqueous dan non-aqueous	Pemanasan menuju titik didih pelarut	Atmosferik	Tergantung pada polaritas senyawa aktif
Sokletasi	Pelarut organik	Pemanasan pada titik didih pelarut	Atmosferik	Tergantung pada polaritas senyawa aktif

(Sumber : Zhang, dkk, 2018 : 3)

2.4. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi

Berikut merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi :

2.4.1. Sifat Fisika dan Kimia Pelarut

Pemilihan pelarut sangat penting untuk proses ekstraksi. Hal ini didasarkan oleh hukum kesamaan dan intermiscibilitas, pelarut yang memiliki nilai polaritas mendekati dengan nilai polaritas zat terlarut akan bekerja lebih baik dan begitu juga sebaliknya (Zhang, dkk, 2018 : 1- 2). Indeks polaritas, titik didih, viskositas, dan kelarutan dalam air masing-masing pelarut yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2.5.

Tabel 2.5 Sifat fisika dan kimia beberapa jenis pelarut pada produksi ekstraksi alam

Jenis Pelarut	Indeks Polaritas	Titik didih (°C)	Viskositas (cp)	Kelarutan didalam air (% w/w)
heksana	0	69	0,33	0,001
Etil asetat	4,4	77	0,45	8,7
Etanol	5,2	78	1,20	100
Air	9	100	1,00	100

Pada tabel 2.5 menunjukkan bahwa pelarut heksana bersifat non-polar dengan titik didih dan viskositas yang cukup rendah, pelarut etil asetat bersifat semi polar dengan titik didih dan viskositas yang rendah, serta pelarut etanol yang bersifat polar namun lebih non-polar dibandingkan pelarut air dengan titik didih yang rendah dan viskositas yang lebih tinggi dari air.

2.4.2. Ukuran partikel bahan baku

Ukuran partikel bahan baku yang semakin kecil pada umumnya akan memiliki hasil ekstraksi yang lebih baik. Hal ini dapat terjadi disebabkan adanya peningkatan difusi zat terlarut dan penetrasi pelarut (Zhang, dkk, 2018 : 2).

2.4.3. Rasio pelarut dengan bahan baku

Rasio pelarut terhadap bahan baku yang semakin besar, secara umum hasilnya akan semakin baik. Hal ini disebabkan terjadinya peningkatan penetrasi pelarut dengan bahan baku (Zhang, dkk, 2018 : 2).

2.4.4. Suhu ekstraksi

Pemanasan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruang pada proses ekstraksi akan meningkatkan kelarutan dan difusi, sehingga waktu ekstraksi yang digunakan lebih cepat dibandingkan jika tanpa pemanasan. Namun, penggunaan suhu tinggi dapat menyebabkan hilangnya pelarut yang mengarah pada ekstraksi senyawa yang tidak diinginkan dan penguraian komponen termolabil atau tidak tahan panas (Zhang, dkk, 2018 : 2).

2.4.5. Lama ekstraksi

Efisiensi ekstraksi akan meningkat dengan meningkatnya durasi ekstraksi dalam rentang waktu tertentu (Zhang, dkk, 2018 : 2).

2.4.6. Pengadukan

Dengan penambahan pengadukan maka dapat meningkatkan laju difusi zat terlarut dan mempercepat proses pelarutannya. Akibat pengadukan maka akan terjadi pergerakan pelarut di sekitar bahan dan mempercepat kontak antara bahan dengan pelarut (Zhang, dkk, 2018 : 2).

2.5. Rotary Evaporator

Rotary evaporator merupakan alat yang digunakan untuk menghilangkan pelarut pada tekanan yang tereduksi dengan memutar labu secara mekanis dalam penangas air dengan suhu yang terkontrol. Pelarut yang telah terkondensasi dikumpulkan dalam labu terpisah. Sebagian besar *rotary evaporator* memiliki empat komponen utama yaitu *heat bath*, rotor,

kondensor, dan *solvent trap*. Selain itu, pompa vakum perlu dipasang, serta *bump trap* dan *round bottom flask* yang berisi sampel yang akan dipekatkan (O'Sullivan & Sandau, 2014).

2.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan suatu bakteri yang normal dijumpai sebagai flora di kulit dan hidung. Pada manusia, kolonisasi bakteri ini paling banyak dihidung walaupun juga ada dibagian tubuh yang lain. Bakteri ini merupakan salah satu penyebab terbanyak infeksi di kulit. Karakteristik dari *Staphylococcus aureus* adalah berbentuk bulat (kokus), dengan pewarnaan gram bersifat gram positif, tersusun seperti buah anggur. Bakteri ini bersifat aerob atau fakultatif anaerob, bersifat halofilik artinya dapat hidup dalam lingkungan yang mengandung garam tinggi (As, 2016 : 228). Pada suhu antara 7 – 48°C (optimum 37 °C) dan pH 4,0 – 9,3 (pH optimum 7,0 – 7,5) bakteri ini dapat tumbuh (Arisman, 2008 : 90 - 93).

Berikut merupakan klasifikasi ilmiah dari bakteri *Staphylococcus aureus* :

<i>Kingdom</i>	: <i>Bacteria</i>
<i>Subkingdom</i>	: <i>Posibacteria</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Firmicutes</i>
<i>Class</i>	: <i>Bacilli</i>
<i>Family</i>	: <i>Staphylococcaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Staphylococcus</i>
<i>Species</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.7. Uji Antibakteri

Berikut merupakan penjelasan mengenai pengujian antibakteri yaitu dari media kultur, sterilisasinya dan metode uji antibakteri.

2.7.1. Media Kultur

Media kultur untuk perkembangan bakteri merupakan bahan yang berisi campuran nutrisi-nutrisi yang dibutuhkan untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme, isolasi perkembangbiakan dan perhitungan jumlah mikroorganisme. Saat membiakkan bakteri, sangat penting untuk menyediakan kondisi lingkungan dan nutrisi yang serupa pada habitat asli bakteri. Oleh karena itu, media kultur buatan harus menyediakan semua komponen nutrisi yang didapat bakteri di habitat aslinya. Paling sering, media kultur mengandung air, sumber karbon & energi, sumber nitrogen, *trace element* dan beberapa zat pertumbuhan

lainnya. Selain itu, pH media harus diatur sesuai dengan pH tumbuh bakteri (P.N., 2006).

Berdasarkan sifat fisiknya media dapat dibagi menjadi tiga yaitu media padat, semi padat dan cair.

a. Media Padat

Media padat biasanya menggunakan zat pembentuk gel seperti agar dan gelatin. Agar digunakan untuk memadatkan media kultur karena memiliki kekuatan pembentukan gel yang tinggi. Penggunaan media padat biasanya dilakukan pada cawan petri atau tabung reaksi. Tujuannya dilakukan pembiakan bakteri pada media padat adalah untuk mengisolasi koloni dari masing-masing organisme yang ada dalam spesimen.

b. Media Semi-Padat

Media semi-padat merupakan media kultur yang dibuat dengan penambahan sejumlah kecil agar ke media. Media semi-padat digunakan sebagai uji motilitas dan uji biokimia.

c. Media Cair

Media ini banyak digunakan untuk pengayaan organisme yang cenderung berjumlah sedikit. Pada media cair yang harus diperhatikan adalah teknik inokulasi yang baik. Hal ini disebabkan karena dengan sedikit saja kontaminasi maka dapat menghasilkan hasil yang tidak sempurna (Cheesbrough, 2009 : 47).

2.7.2. Sterilisasi Media Kultur

Sterilisasi merupakan proses untuk mematikan semua bentuk organisme. Sebuah benda dikatakan steril jika benda tersebut bebas dari mikroorganisme hidup yang tidak diinginkan. Sterilisasi berfungsi untuk mempertahankan keadaan aseptis dan pencegahan terjadinya pencemaran dari organisme luar. Metode yang banyak digunakan dalam proses sterilisasi antara lain adalah autoklaf, *steaming* dan filtrasi.

a. Autoklaf

Pinsip dasar dari autoklaf adalah untuk mengarahkan kontak uap pada seluruh permukaan media pada suhu dan tekanan yang diperlukan untuk waktu yang ditentukan.

Parameter sterilisasi uap adalah tekanan uap, suhu dan waktu. Tekanan berfungsi sebagai sarana untuk mendapatkan suhu tinggi yang diperlukan untuk membunuh mikroorganisme dengan cepat (Sirois, 2017). Umumnya media kultur disterilisasi menggunakan autoklaf yang bertujuan untuk memastikan penghancuran endospora bakteri dan sel vegetatif. Perlakuan *underautoclaving* dapat menyebabkan media tidak steril sedangkan *overautoclaving* menyebabkan terjadinya pengendapan, perubahan pH, dan penghancuran komponen penting dalam media. Untuk sterilisasi pada suhu diatas 100°C tidak dapat

dilakukan pada suhu 1 atmosfer dengan pemanasan biasa disebabkan pada suhu 100°C adalah suhu tertinggi yang dapat dihasilkan pada tekanan atmosfer normal dipermukaan laut. Untuk menaikkan suhu uap di atas titik ini, harus diberi tekanan dalam ditutup ruang. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave dengan kondisi sterilisasi yang paling efisien dan banyak digunakan adalah kombinasi tekanan-suhu pada autoclave sebesar 15 psi (sehingga atmosfer total 2 atm), yang menghasilkan 121 ° C.

b. *Steaming*

Steaming digunakan untuk mensterilkan media yang mengandung bahan yang dapat rusak atau inaktif pada suhu diatas 100°C. *Steaming* dapat digunakan untuk melelehkan kembali media agar yang telah steril. Waktu pemanasan bervariasi tergantung dari jenis media yang digunakan.

c. Filtasi

Filtasi digunakan untuk menghilangkan bakteri dari fluida yang utamanya digunakan untuk mensterilkan aditif yang sensitif terhadap panas dan perlu segera ditambahkan ke media steril sebelum digunakan Jenis penyaringan yang biasanya digunakan adalah membran karena lebih cepat dan tidak mempengaruhi filtrat serta meyerap sedikit jumlah zat yang disaring (Cheesbrough, 2009 : 49).

2.7.3. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode umum yang sering digunakan yaitu metode difusi dan dilusi.

2.7.3.1. Metode Difusi

Metode ini juga biasa disebut sebagai uji *Kirby-Bauer* dan memberikan ukuran kuantitatif efek antibakteri terhadap bakteri yang tumbuh dalam media kultur. Dalam tes ini, cakram disk 6 mm yang telah diresapi dengan sejumlah zat antibakteri kemudian ditempatkan ke media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Media tersebut diinkubasi semalaman, dan zona penghambatan pertumbuhan bakteri yang terbentuk akan digunakan sebagai pengukuran kerentanan bakteri terhadap zat antibakterinya. Dengan demikian, zona hambatan yang besar menunjukkan bahwa bakteri tersebut rentan, sementara zona hambatan yang kecil atau tidak ada menunjukkan resistensi bakteri terhadap zat antibakterinya. Metode ini sederhana, ekonomis dan ada beberapa cakram disk yang tersedia secara komersial (Munoz-Bonilla, 2017).

Bakteri yang akan diinokulasikan memiliki syarat kepadatan bakteri yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL sehingga diperlukan standarisasi kepadatan bakteri dalam suspensi menggunakan

standar McFarland. Standar McFarland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba menggunakan larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1%. Standar McFarland digunakan untuk menstandarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair dengan membandingkan kekeruhan suspensi pengujian dengan standar McFarland. Ketika terguncang dengan baik, kekeruhan Standar McFarland secara visual sebanding dengan suspensi bakteri dengan konsentrasi yang diketahui seperti pada tabel 2.6. Sesuai dengan syarat kepadatan bakteri yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL maka untuk pengujian antibakteri menggunakan standar 0,5 McFarland.

Tabel 2.6 standar McFarland

Standar McFarland	BaCl_2 1% (mL)	H_2SO_4 1% (mL)	Perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair/ml
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1,0	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2,0	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3,0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4,0	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
5,0	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$

(Sumber : Dallyn, 2014)

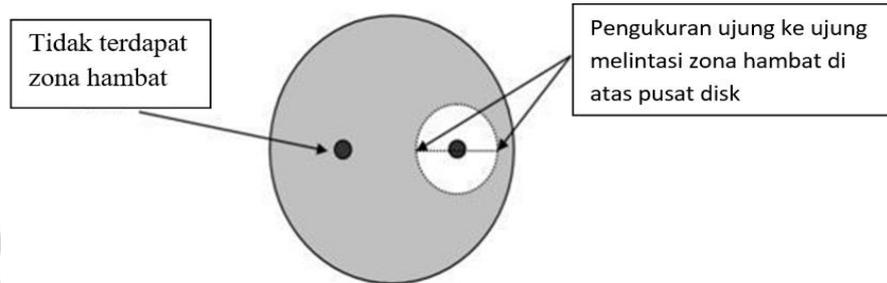
Keakuratan kepadatan Standar McFarland dapat diperiksa menggunakan spektrofotometer dengan lintasan cahaya 1 cm; standar 0,5 McFarland memiliki pembacaan absorbansi 0,08 hingga 0,1 pada 625-nm (Sumber : Dallyn, 2014).

Respon penghambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan munculnya zona bening atau zona terang disekitar cakram disk pada media uji antibakteri yang disebut dengan zona hambat. Gambar 2.8 menunjukkan hasil dari media uji antibakteri yang telah menunjukkan zona hambat setelah diinkubasi. Zona hambat harus dibaca setelah periode konstan, paling konstan adalah setelah inkubasi semalam (18 hingga 24 jam). Inkubasi yang berkepanjangan dapat mengubah ukuran zona hambatan dengan antimikroba yang tidak stabil pada 37°C atau membuat zona sulit dibaca. Jika hasil yang cepat sangat penting, diameter zona hambat dapat dibaca setelah 6 sampai 8 jam inkubasi. Hasil ini harus dikonfirmasi dengan membacanya lagi setelah inkubasi semalam (Sirois, 2020 : 247).



Gambar 2.8 Media Uji Antibakteri

Diameter dari masing-masing zona hambatan (termasuk diameter piringan) diukur dari bagian bawah pelat menggunakan kaliper, penggaris transparan, atau templat. Zona diukur dan dicatat hingga milimeter terdekat (Sirois, 2020 : 247). Gambar 2.9 menunjukkan cara pengukuran zona hambatan yang terbentuk pada media uji antibakteri.



Gambar 2.9 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Efektifitas aktifitas antibakteri didasarkan pada klasifikasi respon penghambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada tabel 2.7.

Tabel 2.7 Klasifikasi Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona terang	Daya Hambat Pertumbuhan
> 20 mm	Kuat
16-20 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
< 10 mm	Tidak ada

2.7.3.2. Metode Pengenceran (Dilusi)

Metode ini adalah pengujian yang melibatkan persiapan sejumlah agen antibakteri yang diinokulasi dengan sejumlah mikroorganisme dalam tabung dan diinkubasi semalaman. Tabung diperiksa untuk pertumbuhan bakteri yang terlihat oleh kekeruhan.

Konsentrasi agen antimikroba terendah yang mencegah penampakan kekeruhan dianggap sebagai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) atau konsentrasi penghambatan minimal (Munoz-Bonilla, 2017).

2.8. Metode Instrumentasi Untuk Analisa Kimia

Metode instrumentasi untuk analisa kimia diperlukan untuk menganalisis senyawa pada suatu bahan. Terdapat beberapa metode identifikasi untuk mengetahui senyawa dalam suatu bahan yaitu metode spektroskopi dan kromatografi.

2.8.1. Spektroskopi

Spektroskopi digunakan untuk mengidentifikasi suatu substansi senyawa dalam suatu bahan melalui spektrum yang dipancarkan atau yang diserap. Terdapat beberapa macam metode identifikasi spektroskopi namun yang banyak digunakan adalah spektroskopi UV dan spektroskopi IR. Kisaran panjang gelombang UV-Vis yaitu 200-800 nm untuk spektrometer dalam keadaan non-vakum (di udara). Spektroskopi UV-Vis termasuk ke dalam kelompok spektroskopi molekular karena melibatkan eksitasi elektron valensi suatu molekul. Untuk radiasi sinar tampak memiliki kisaran panjang gelombang sebesar 400-800 nm dan radiasi UV, memiliki kisaran panjang gelombangnya yaitu 200-400 nm (Gandjar dan Rohman, 2018 : 11). Sedangkan, spektroskopi IR merupakan metode untuk mengidentifikasi senyawa organik disebabkan memiliki spektrum yang kompleks dan terdiri dari banyak puncak-puncak. (Anam, 2007 : 79 - 85).

2.8.2. Kromatografi

Berdasarkan fase geraknya, kromatografi dibagi menjadi dua yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair. Kromatografi gas dilakukan untuk mendeteksi dan memisahkan senyawa *volatile* dalam suatu campuran. Prinsip pemisahan berdasarkan solut yang mudah menguap yang bermigrasi melalui fase diam pada suatu kolom dengan kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya (Rollando, 2019 : 31). Sedangkan, kromatografi cair merupakan suatu metode yang dimana fase diamnya berupa cairan atau padatan dan fase geraknya berupa cairan. Metode ini digunakan untuk analisis senyawa termolabil dan tidak mudah menguap (Rollando, 2019 : 31).

2.9. Penelitian Terdahulu

Tabel 2.8 Penelitian-penelitian terdahulu mengenai ekstrak daun sirih hijau (*Piper Betle L.*) dan daya anti bakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper Betle L.*)

Peneliti (tahun)	Judul Penelitian	Metode	Hasil
Bustanussalam, dkk. (2015)	Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (<i>Piper Betle Linn</i>) Terhadap <i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923	Metode refluks dan metode maserasi.	Hasil optimal zona hambat ekstrak metanol daun sirih hasil maserasi pada konsentrasi 25% yaitu dengan zona hambat 1,66 mm, sedangkan hasil optimal zona hambat ekstrak metanol daun sirih hasil refluks pada konsentrasi 20% yaitu dengan zona hambat 1,64 mm.
Nikmatul Hidayah dkk. (2016)	Uji Efektivitas Ekstrak <i>Sargassum muticum</i> Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas <i>Staphylococcus aureus</i> .	Metode ekstraksi maserasi dan uji bakteri menggunakan metode difusi.	<ul style="list-style-type: none"> • Ekstrak dan rendemen <i>S. Muticum</i> pada pelarut : Etanol 96%: berwarna hijau kehitaman dengan rendemen sebesar 2,5%; Etil asetat: hijau pekat dengan rendemen 1,0 %.; Heksana: hijau dengan rendemen sebesar 0,05%. • Sifat antibakteri tertinggi terdapat pada ekstrak yang menggunakan pelarut etanol 96% diikuti oleh pelarut etil asetat dan heksana sesuai dengan penurunan polaritas
Vifta R.L., Wansyah M., dan Hati A., (2017)	Perbandingan Total Rendemen dan Skrining Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (<i>Piper Betle L.</i>) Secara Mikrodilusi	Metode refluks dan metode maserasi.	Proses ekstraksi pada daun sirih hijau (<i>Piper betle L.</i>) menggunakan metode refluks memberikan hasil total rendemen yang lebih besar dibandingkan dengan metode maserasi.

BAB III METODE

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap hasil ekstraksi senyawa aktif antibakteri pada ekstrak daun sirih hijau dan daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau terhadap aktivitas *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Penelitian ini meliputi ekstraksi daun sirih hijau dan uji antibakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Metode yang digunakan yaitu metode refluks untuk proses ekstraksi dan metode difusi cakram disk untuk uji antibakteri.

3.2 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2020 sampai bulan Maret 2020 di Laboratorium Teknik Bioproses, jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Sampel Yang Diuji

Bahan yang diuji pada penelitian ini yaitu daun sirih hijau segar. Kemudian diekstraksi menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda.

3.4 Sampel Bakteri

Sampel Bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) dilakukan isolasi pada media NA (Nutrient Agar).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- Pelarut etanol (polar), etil asetat (semipolar), dan heksana (nonpolar).

3.5.2 Variabel Terikat

- Rendemen hasil ekstraksi daun sirih hijau, kadar fenol hasil ekstraksi daun sirih hijau, dan kandungan senyawa aktif saponin serta tanin pada hasil ekstraksi daun sirih hijau.

- Aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) pada media NA (*Nutrient Agar*), dengan melakukan pengukuran diameter zona terang (zona hambat) pertumbuhan bakteri *S.aureus* yang terbentuk pada media NA (*Nutrient Agar*).

3.5.3 Variabel Terkontrol

- Suhu dan waktu ekstraksi.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

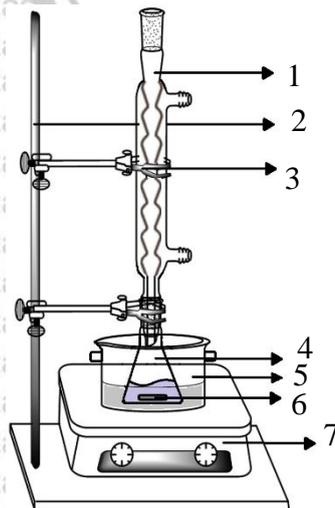
3.6.1 Alat Penelitian

Alat pada penelitian ini antara lain : erlenmeyer, *rotary evaporator*, *beaker glass*, gunting, neraca digital, botol vial, gelas ukur, autoklaf, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, labu ukur, rangkaian alat filtrasi *vacuum* (corong *buchner*, pompa *vacuum*, kertas saring, *buchner flask*), lemari pendingin, pipet tetes, *cotton swab*, penggaris, *hot plate stirrer*, *magnetic stirrer*, kondensor allihn, pompa kondensor, jarum ose, *bunsen burner*, spatula, spreader, turbidimeter.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan pada penelitian ini antara lain : daun sirih hijau segar, tiga jenis pelarut (heksana, etil asetat, dan etanol), bubuk *nutrient agar*, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), bubuk *nutrient broth*, aluminium foil, kertas coklat, kertas cakram, aquades, $BaCl_2$, H_2SO_4 , alkohol 96%.

3.7 Rangkaian Alat



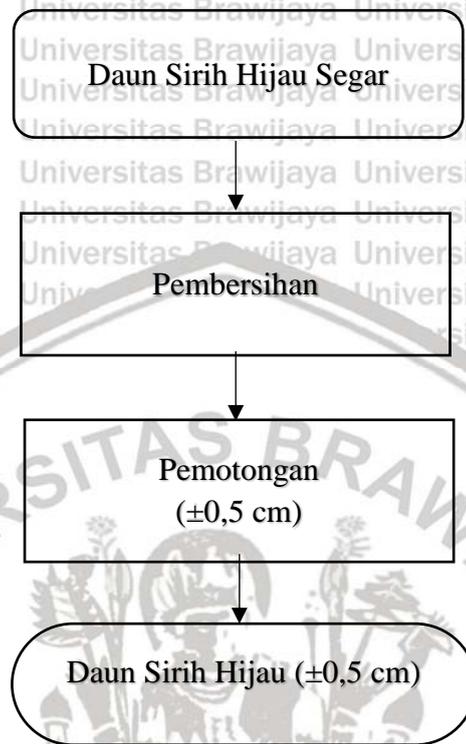
Keterangan :

1. Kondensor
2. Tiang statif
3. Klem
4. Erlenmeyer
5. *Waterbath*
6. *Magnetic stirrer*
7. *Hotplate stirrer*

Gambar 3.1 Rangkaian Alat Ekstraksi Refluks

3.8 Diagram alir tahapan Penelitian

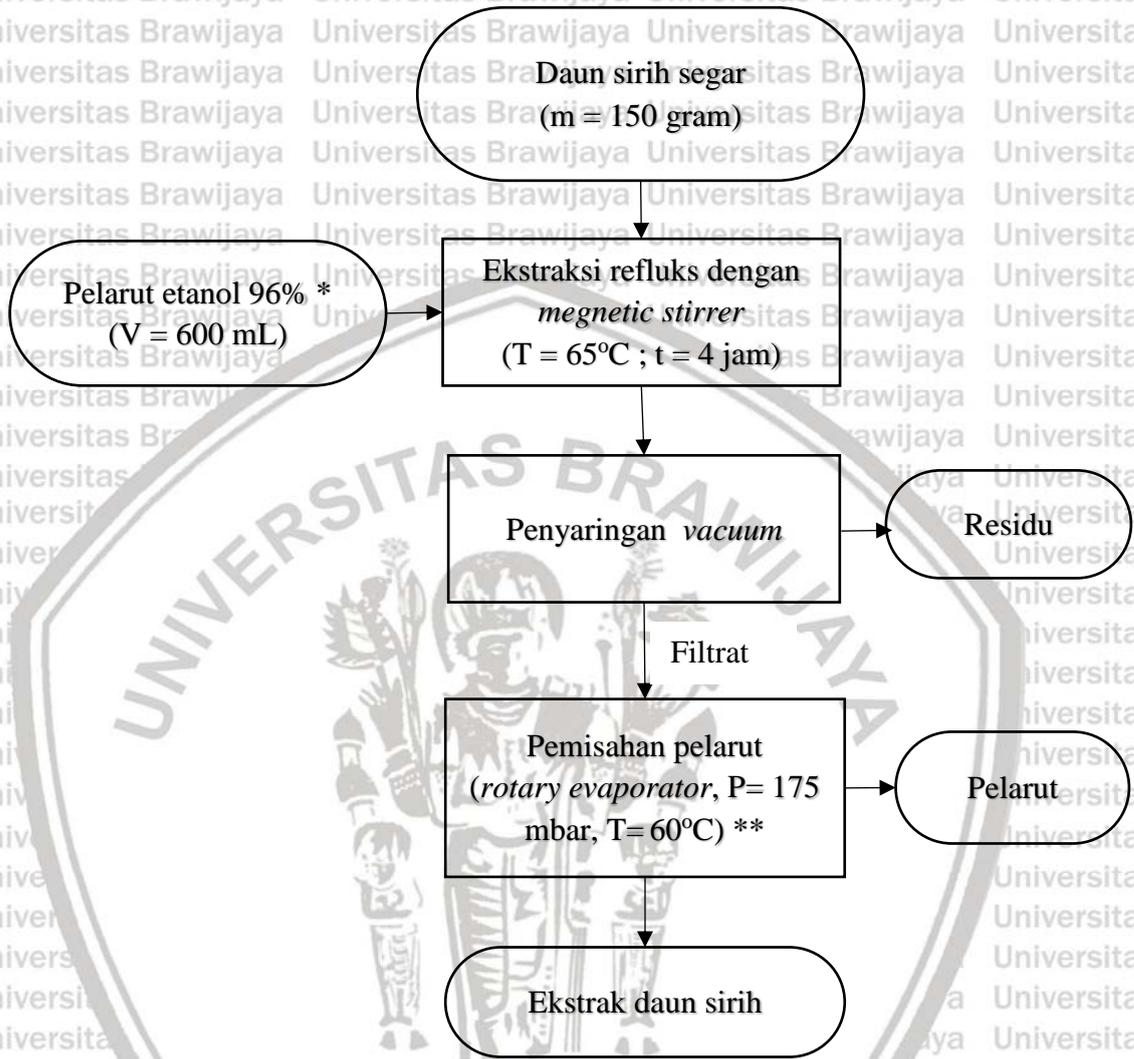
3.8.1 Persiapan Daun Sirih Hijau Segar



Gambar 3.2 Persiapan Daun Sirih Hijau Segar

Gambar 3.2 menunjukkan diagram alir pada tahap persiapan daun sirih hijau. Daun sirih hijau segar dilakukan pemilahan untuk memisahkan kotoran dan bahan asing yang mungkin terikat pada bahan baku uji dan hanya menggunakan daun berwarna hijau. Kemudian dibersihkan menggunakan lap kain yang bertujuan untuk mengurangi jumlah pengotor yang menempel pada daun sirih dan langsung dilakukan pemotongan lebih kecil sekitar 0,5 cm.

3.8.2 Proses Ekstraksi Daun Sirih



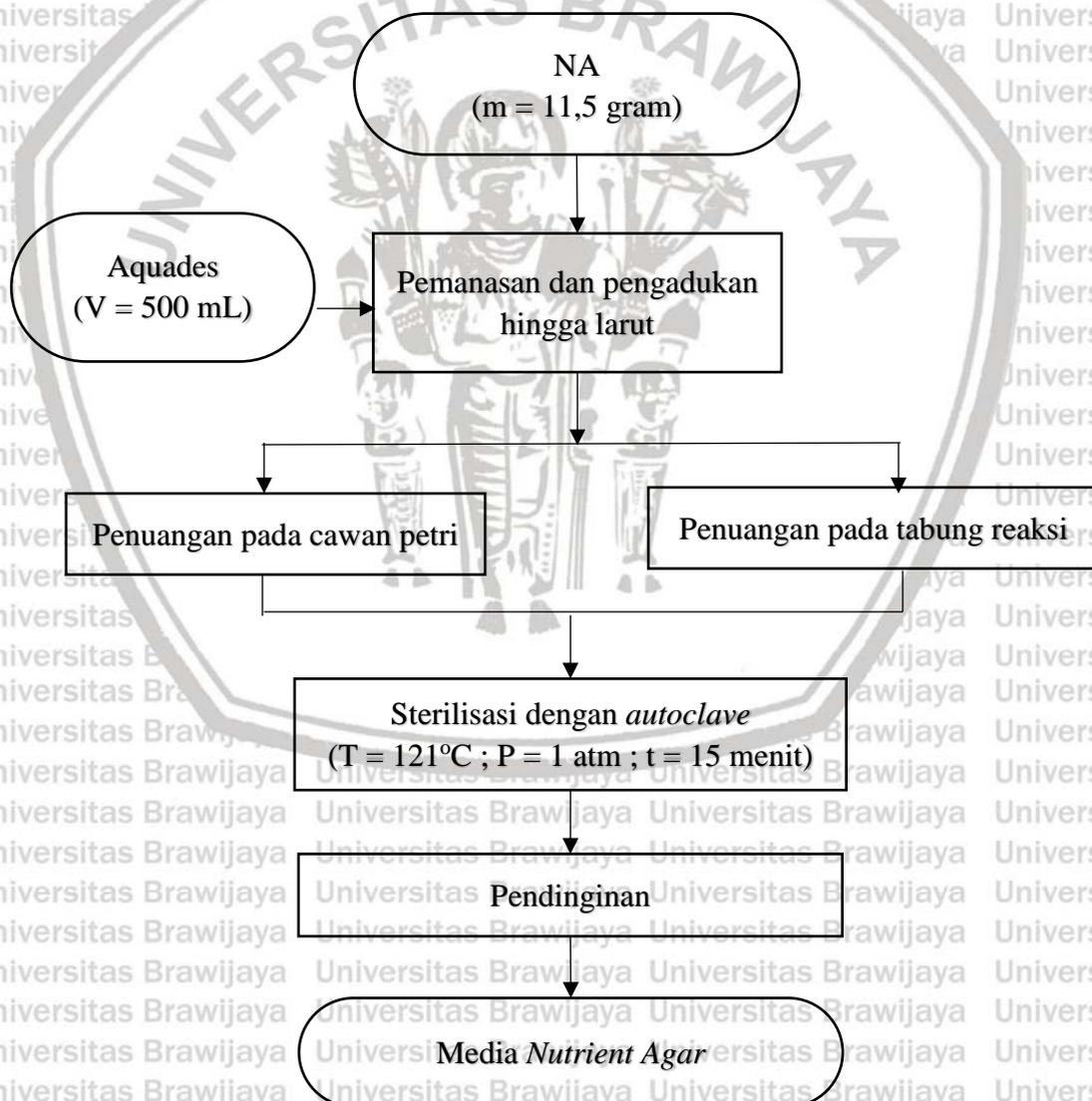
Keterangan : * Prosedur diulang untuk pelarut etil asetat dan heksana
 ** Pelarut etil asetat (rotary evaporator, P= 360 mbar, T= 60°C)
 pelarut heksana (rotary evaporator, P= 240 mbar, T= 60°C)

Gambar 3.3 Proses Ekstraksi Daun Sirih

Gambar 3.3 merupakan diagram alir pada tahap proses ekstraksi daun sirih. Proses ekstraksi daun sirih hijau menggunakan metode refluks. Daun sirih hijau segar yang telah disiapkan sebelumnya dilakukan penimbangan sebanyak 150 gram kemudian dilakukan perendaman pada pelarut etanol sebanyak 600 ml. Hal ini dilakukan juga untuk pelarut etil asetat dan pelarut heksana. Ekstrasi refluks ini menggunakan *magnetic stirrer* untuk

pengadukan yang dilakukan selama 4 jam pada suhu 65°C kemudian disaring menggunakan rangkaian sistem filtrasi *vacuum*. Lalu filtrat dipisahkan dengan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Pelarut etanol (*rotary evaporator* P= 175 mbar, T= 60°C), pelarut etil asetat (*rotary evaporator*, P= 360 mbar, T= 60°C), dan pelarut heksana (*rotary evaporator*, P= 240 mbar, T=60°C). Ekstrak cair-kental bebas pelarut yang dihasilkan akan dilakukan perhitungan rendemen, uji kadar fenol, dan uji fitokimia saponin serta tanin untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut terhadap hasil ekstraksi. Kemudian tiap ekstrak daun sirih hijau tersebut digunakan untuk penelitian uji antibakteri.

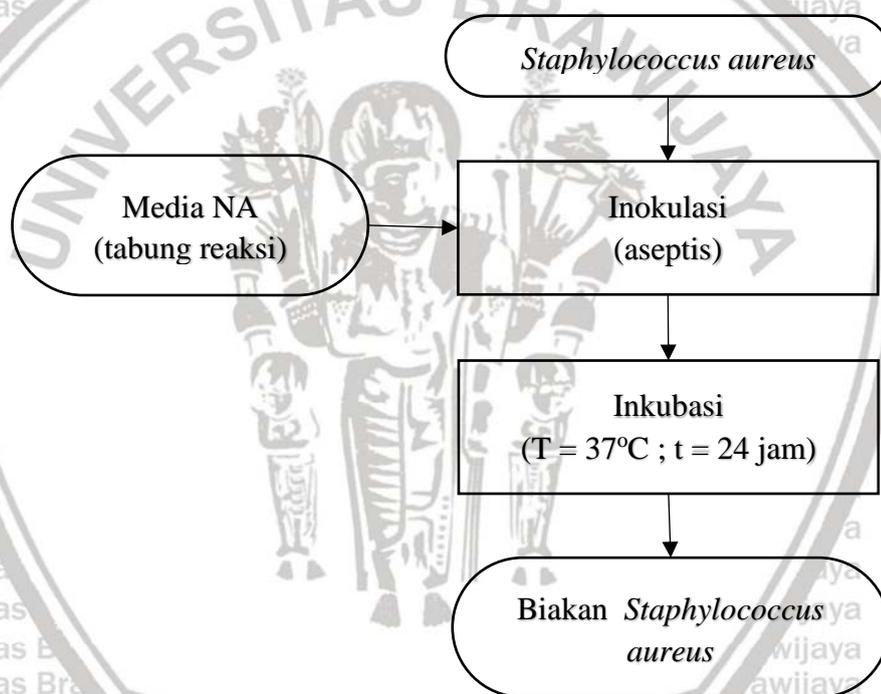
3.8.3 Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)



Gambar 3.4 Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

Gambar 3.4 merupakan diagram alir pada tahap pembuatan *nutrient agar*. Dilakukan penimbangan NA sebanyak 11,5 gram yang kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 500 ml. Dilakukan penambahan aquades sebanyak 500 ml pada gelas beaker tersebut. Selanjutnya dilakukan pemanasan dan pengadukan hingga larut. Selanjutnya dilakukan penuangan pada cawan petri dan tabung reaksi. Sterilisasi dilakukan pada keduanya dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Dilakukan pendinginan dan didapatkan media NA dalam cawan petri dan media NA dalam tabung reaksi.

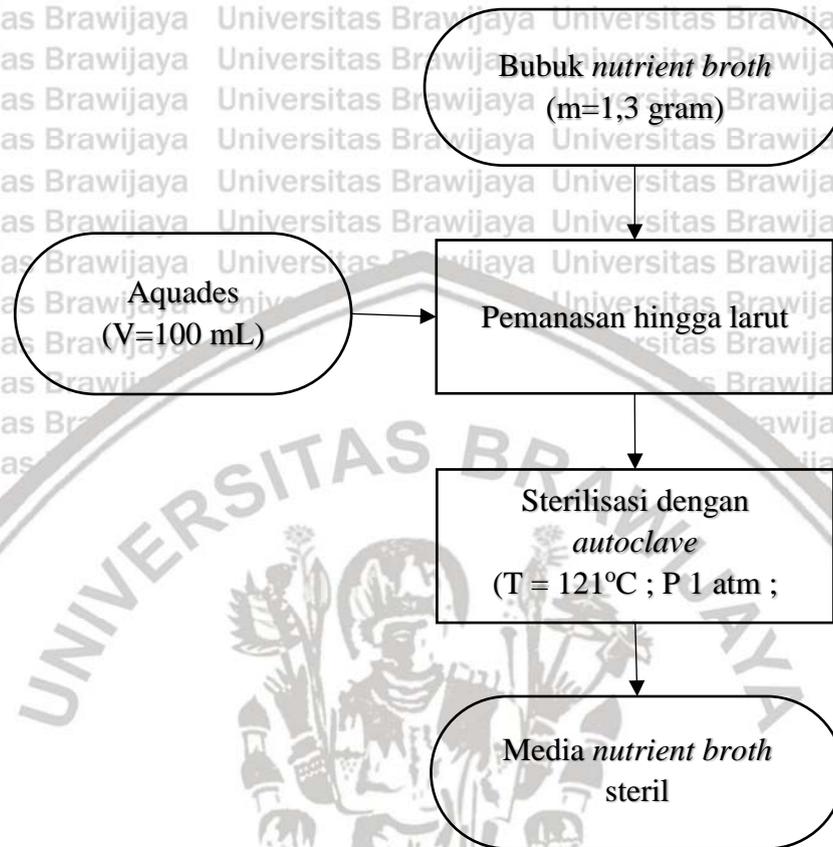
3.8.4 Proses Regenerasi Bakteri



Gambar 3.5 Proses Regenerasi Bakteri

Gambar 3.5 merupakan diagram alir pada tahap proses regenerasi bakteri *S.Aureus*. Dilakukan inokulasi biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) secara aseptis sebanyak 1 ose ke dalam media NA tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C di dalam inkubator.

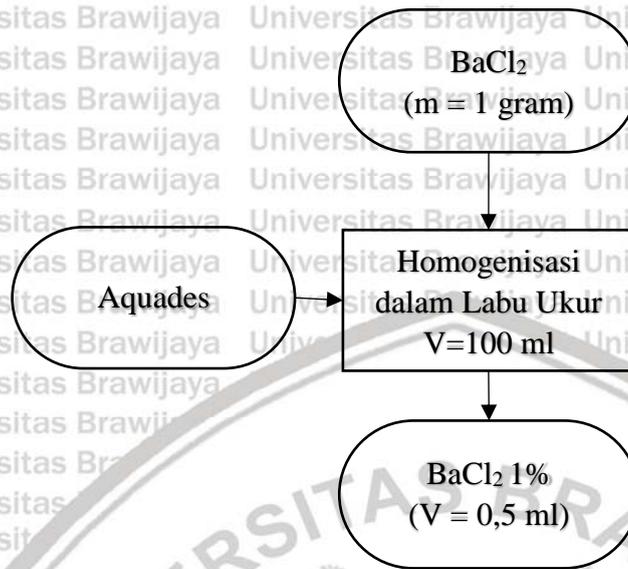
3.8.5 Pembuatan Media *Nutrient Broth*



Gambar 3.6 Pembuatan Media *Nutrient Broth*

Gambar 3.6 merupakan diagram alir pada tahap pembuatan media *nutrient broth*. Bubuk *nutrient broth* dilakukan penimbangan sebanyak 1,3 gram yang kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. Dilakukan penambahan akuades sebanyak 100 ml pada gelas beaker tersebut. Selanjutnya dilakukan pemanasan dan pengadukan hingga semua bubuk *nutrient broth* larut. Larutan media dipindahkan ke erlenmeyer. Kemudian dilakukan sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

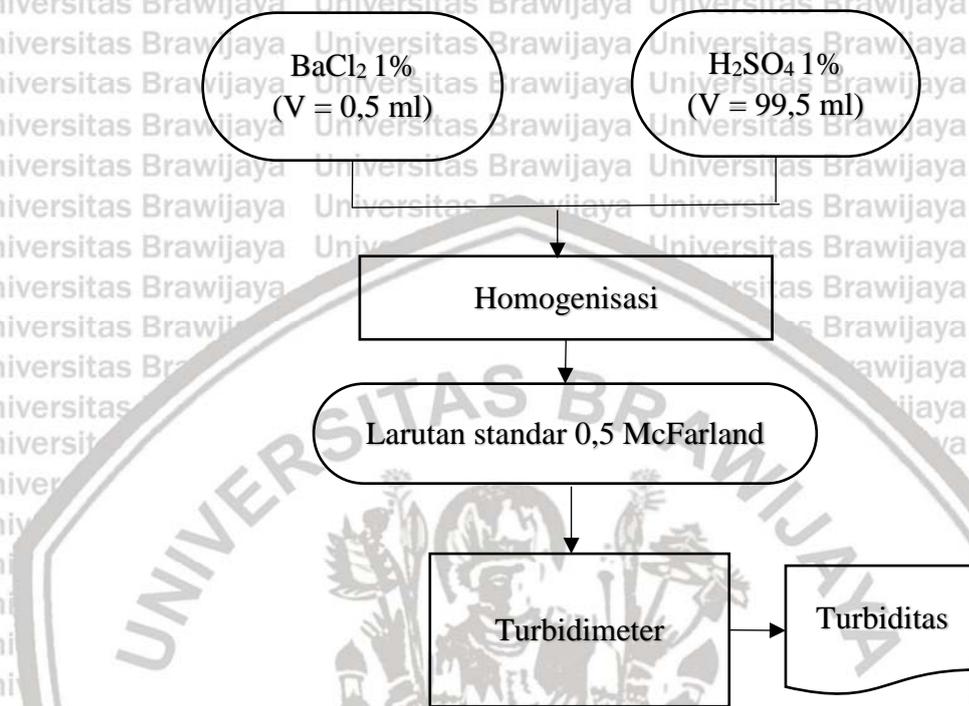
3.8.6 Pembuatan Larutan BaCl₂ 1%



Gambar 3.7 Pembuatan Larutan BaCl₂ 1%

Gambar 3.7 merupakan diagram alir pada tahap pembuatan larutan BaCl₂ 1%. Pembuatan larutan BaCl₂ 1% dilakukan dengan menimbang serbuk BaCl₂ sebanyak 1 gram dan diencerkan dengan penambahan aquades pada labu ukur hingga volume 100 ml. Pembuatan larutan ini dimaksudkan untuk pembuatan larutan standar 0,5 McFarland.

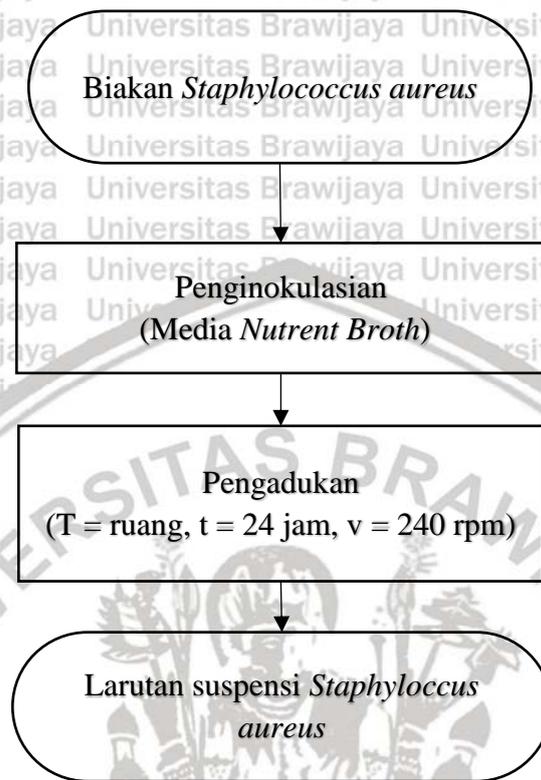
3.8.7 Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc Farland



Gambar 3.8 Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc Farland

Gambar 3.8 merupakan diagram alir pada tahap pembuatan larutan standar 0,5 Mc Farland. Larutan standar 0,5 Mc Farland didapatkan dengan cara dicampurkannya 99,5 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1% sehingga volume menjadi 100 ml, lalu dihomogenisasikan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian dilakukan pengujian turbiditas agar dapat membandingkan kekeruhan suspensi bakteri. Kekeruhan suspensi bakteri yang paling mendekati dengan Larutan standar 0,5 Mc Farland dianggap telah sesuai syarat yaitu memiliki jumlah bakteri sebesar $1,5 \times 10^8$ bakteri/ml.

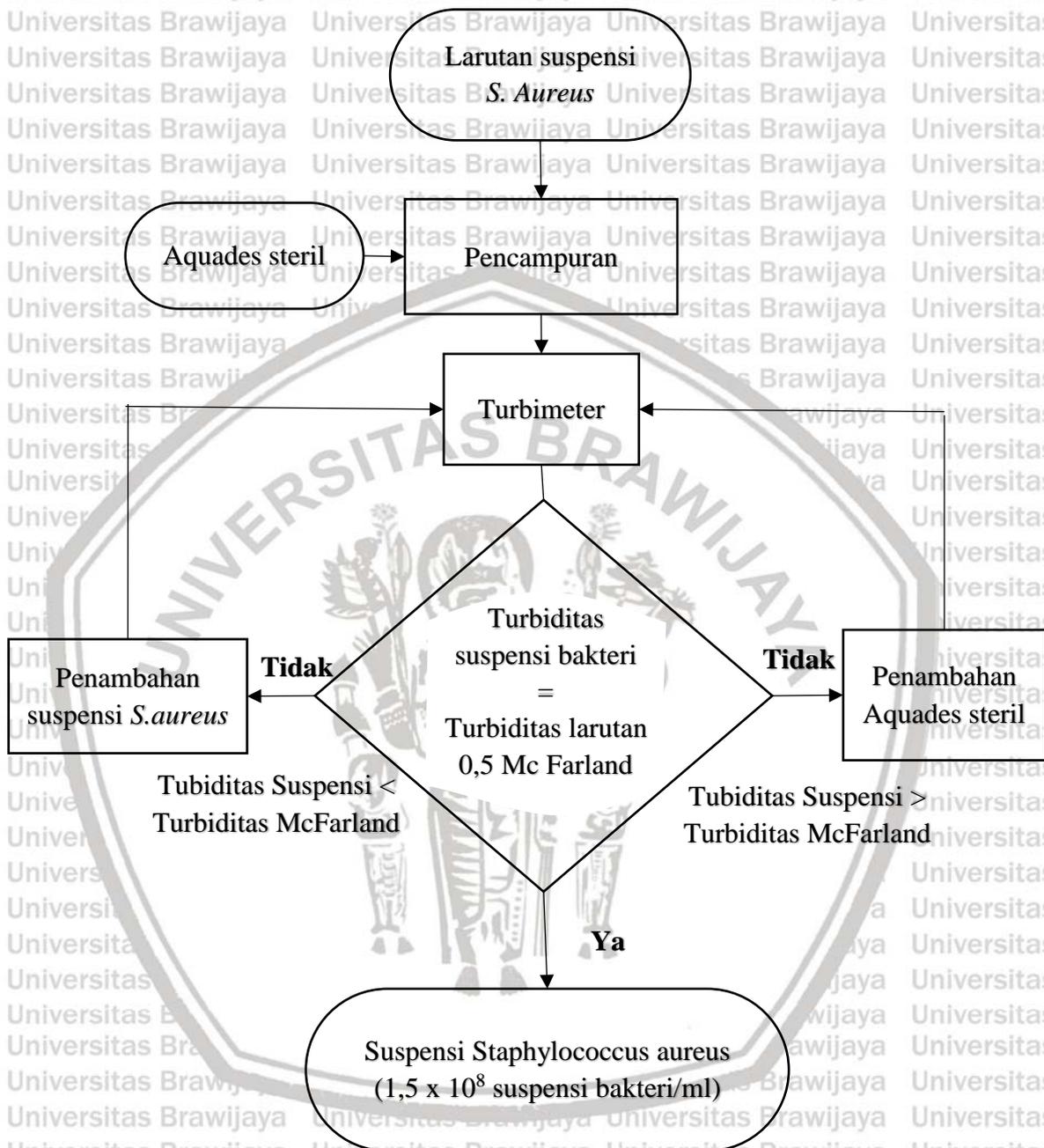
3.8.8 Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri *Staphylococcus Aureus*



Gambar 3.9 Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Gambar 3.9 merupakan diagram alir pada tahap pembuatan larutan suspensi bakteri *S.Aureus*. Dilakukan penginokulasian bakteri *S.Aureus* sebanyak 2 ose dari biakan induk dalam media NA tabung reaksi, disuspensikan dalam media *nutrient broth*. Dilakukan homogenisasi dan penumbuhan bakteri di shaker dengan kecepatan 240 rpm selama 24 jam.

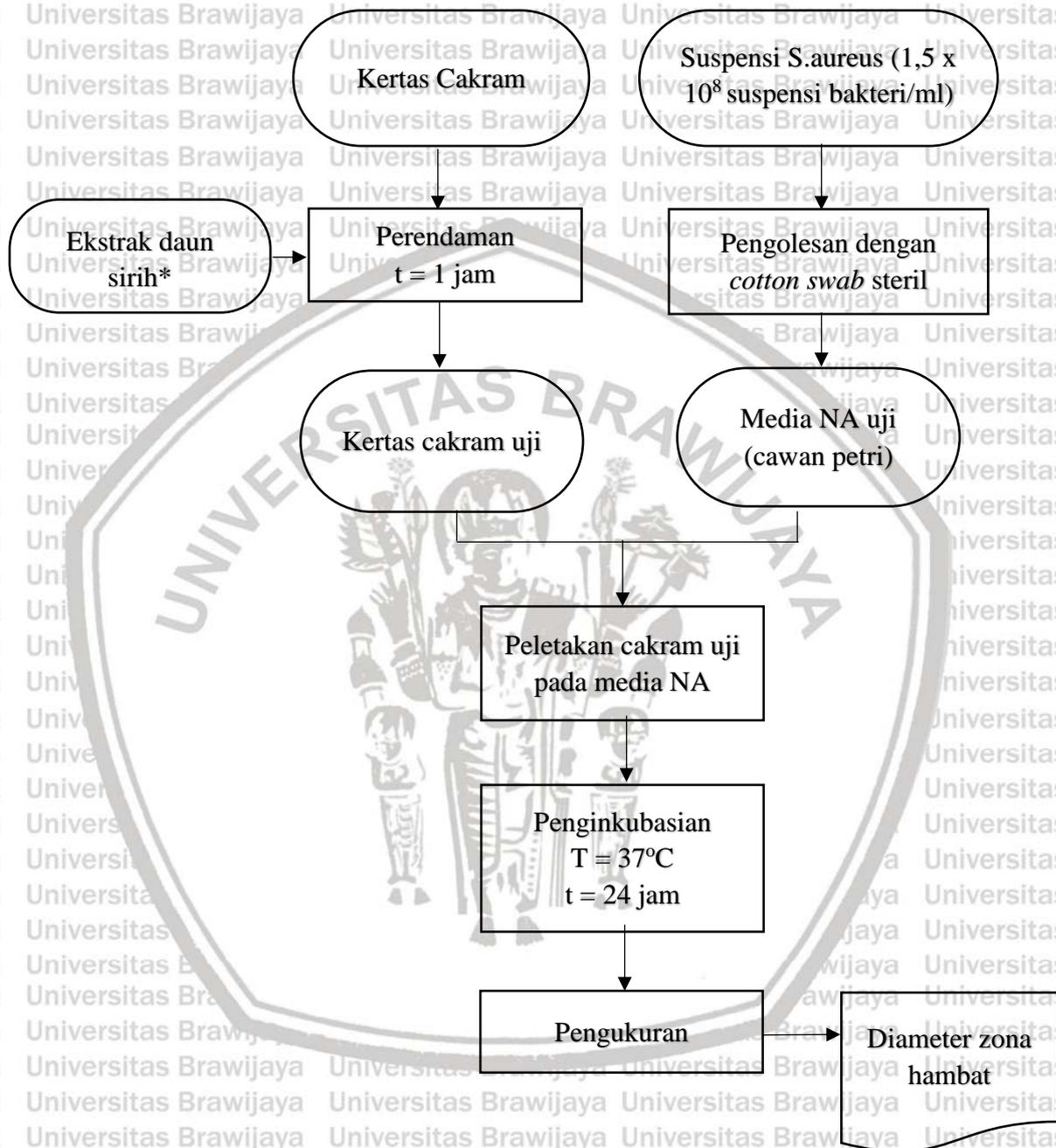
3.8.9 Pengukuran Larutan Suspensi Bakteri Sesuai Larutan Baku 0,5 McFarland



Gambar 3.10 Pengukuran Larutan Suspensi Bakteri Sesuai Larutan Baku 0,5 McFarland

Gambar 3.10 merupakan diagram alir pada tahap pengukuran larutan suspensi bakteri sesuai larutan baku 0,5 Mc farland. Larutan suspensi bakteri dipindahkan sebagian ke tabung reaksi kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan vortex kemudian diukur turbiditas suspensi dan distandarisasi dengan konsentrasi 0,5 Mc Farland agar jumlah bakteri memenuhi syarat untuk uji kepekaan ($1,5 \times 10^8$ suspensi bakteri/ml).

3.8.10 Uji Anti Bakteri *Staphylococcus Aureus*



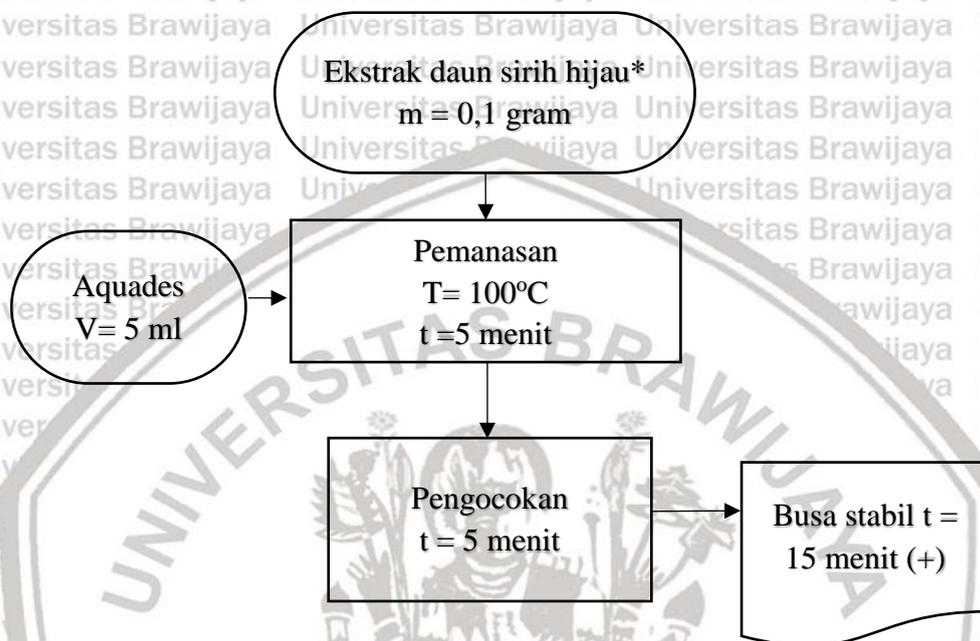
Keterangan : *Proses diulangi untuk tiap ekstrak daun sirih segar dengan pelarut etanol, etil asetat, dan heksana.

Gambar 3.11 Uji Anti Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Gambar 3.11 merupakan diagram alir pada tahap uji antibakteri. Dilakukan perendaman kertas cakram dengan ekstrak daun sirih selama 1 jam. Sementara itu, larutan suspensi bakteri yang telah distandarisasi McFarland dioleskan pada media pertumbuhan NA cawan petri menggunakan *cotton swab* steril. Lalu diinkubasi dalam inkubator pada

suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan penggaris.

3.8.11. Uji Fitokimia Saponin Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

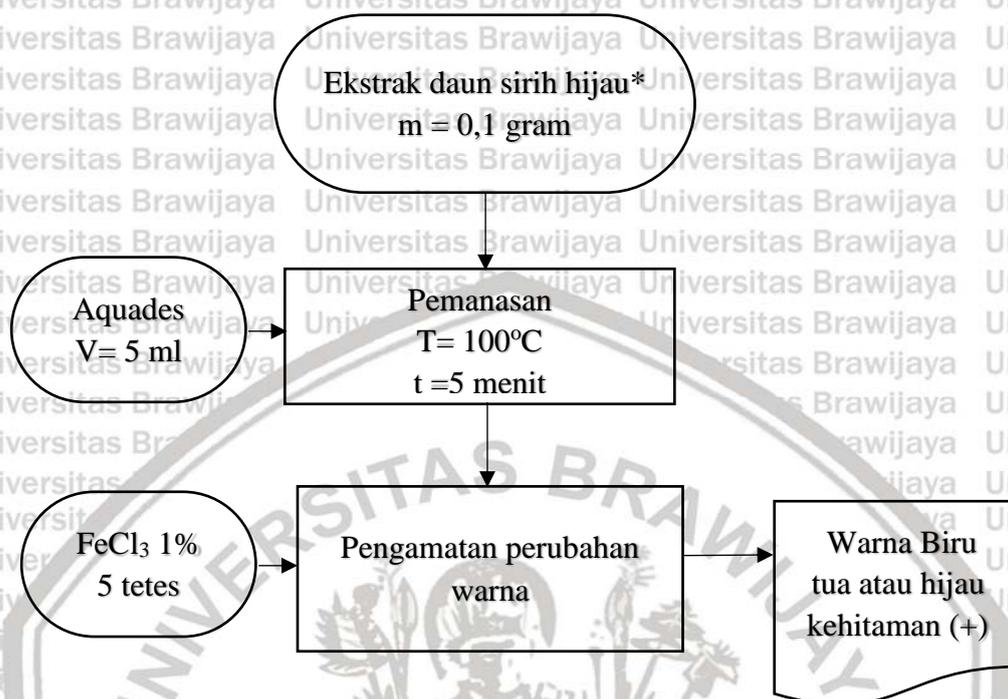


Keterangan : *Proses diulangi untuk tiap ekstrak daun sirih segar dengan pelarut etanol, etil asetat, dan heksana.

Gambar 3.12 Uji Fitokimia Saponin pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

Gambar 3.12 merupakan diagram alir pada tahap uji fitokimia senyawa saponin pada ekstrak daun sirih hijau. Dilakukan penimbangan ekstrak daun sirih hijau sebesar 0,1 gram kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 5 ml pada *beaker glass* dan dipanaskan pada *hotplate* pada suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian dipindahkan pada tabung reaksi dan dikocok selama 5 menit. Jika mengandung saponin maka akan terbentuk busa yang stabil selama 15 menit.

3.8.12. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau : Tanin



Keterangan : *Proses diulangi untuk tiap ekstrak daun sirih segar dengan pelarut etanol, etil asetat, dan heksana.

Gambar 3.13 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Hijau : Tanin

Gambar 3.13 merupakan diagram alir pada tahap uji fitokimia senyawa tanin pada ekstrak daun sirih hijau. Dilakukan penimbangan ekstrak daun sirih hijau sebesar 0,1 gram kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 5 ml pada *beaker glass* dan dipanaskan pada *hotplate* pada suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian ditetaskan larutan FeCl₃ 1% sebanyak 5 tetes. Jika mengandung tanin maka akan berubah warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman.

3.9 Analisis data

Data hasil penelitian ekstraksi berupa rendemen, kadar fenolik, senyawa saponin, dan senyawa tanin pada hasil ekstraksi daun sirih hijau segar dengan tiga pelarut berbeda yaitu etanol, etil asetat dan heksana. Data rendemen yang dinyatakan dalam persen didapatkan melalui perhitungan pada persamaan 3-1.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{jumlah ekstrak yang dihasilkan (gram)}}{\text{jumlah bahan baku yang digunakan (gram)}} \times 100\% \quad (3-1)$$

Selanjutnya, untuk mengetahui banyaknya kandungan senyawa fenolik yang berperan sebagai zat antibakteri pada daun sirih hijau perlu dilakukan uji kadar fenolik pada tiap sampel. Pengujian kadar fenolik dilakukan dengan mengirimkan sampel uji ke laboratorium kimia FMIPA UB, Malang. Pengujian keberadaan senyawa saponin dan tanin dilakukan secara kualitatif dengan metode skrining fitokimia. Data rendemen, kadar fenolik, kandungan senyawa saponin dan tanin tersebut kemudian dilakukan analisa untuk mengetahui pelarut yang menghasilkan ekstrak terbaik pada proses ekstraksi daun sirih hijau.

Selain data hasil penelitian ekstraksi, pada penelitian ini juga akan didapatkan data hasil pengujian daya antibakteri ekstrak daun sirih hijau terhadap aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian daya anti bakteri ekstrak daun sirih hijau dilakukan dengan mengukur zona terang (zona hambat) yang terbentuk pada media pertumbuhan NA. Diameter dari masing-masing zona hambatan (termasuk diameter piringan) diukur dari bagian bawah pelat menggunakan kaliper, penggaris transparan, atau templat. Zona diukur dan dicatat hingga milimeter terdekat. Semakin besar zona hambat yang terbentuk maka semakin besar pula daya antibakteri pada ekstrak daun sirih hijau tersebut. Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan daya antibakteri pada tiap ekstrak daun sirih hijau.



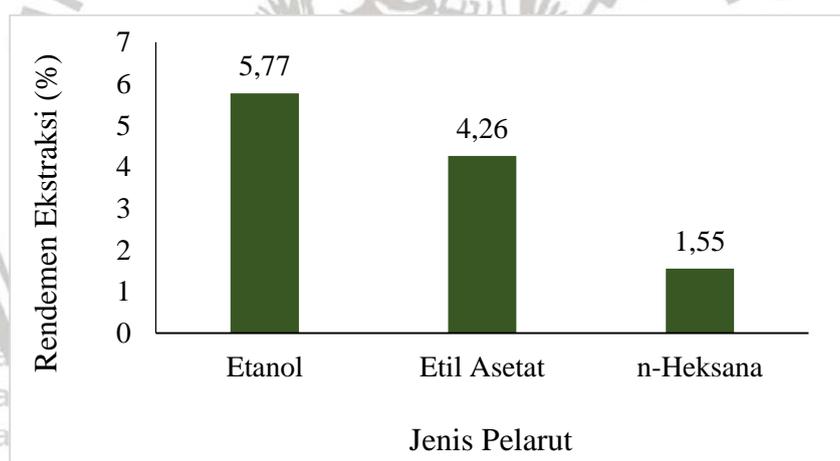
Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi daun sirih hijau menggunakan tiga jenis pelarut menghasilkan tiga sampel yaitu EDS-E ekstrak daun sirih dengan pelarut etanol polar, EDS-EA ekstrak daun sirih dengan pelarut etil asetat semi polar dan EDS-H ekstrak daun sirih dengan pelarut heksana non polar. Ekstraksi menggunakan berbagai pelarut tersebut berpengaruh terhadap hasil ekstraksi antara lain pada rendemen ekstrak, uji kualitatif saponin dan tanin pada ekstrak, kadar fenol yang terkandung dalam tiap ekstrak, serta daya antibakteri tiap ekstrak terhadap aktivitas bakteri *S.Aureus*.

4.1. Rendemen Ekstrak Daun Sirih



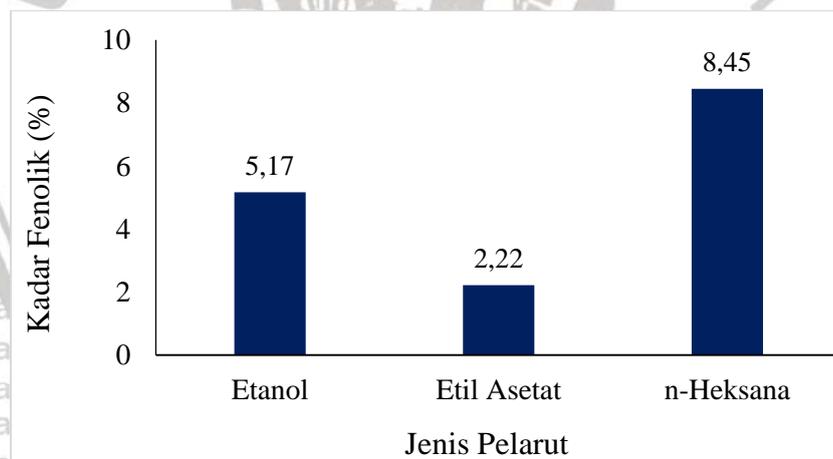
Gambar 4.1 Rendemen Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut

Gambar 4.1 merupakan grafik yang menunjukkan hubungan antara jenis pelarut dengan rendemen ekstrak daun sirih hijau yang dihasilkan. Berdasarkan gambar 4.1 rendemen semakin menurun seiring dengan menurunnya sifat kepolaran dari pelarut yang digunakan. Rendemen tertinggi terdapat pada EDS-E jika dibandingkan dengan pelarut lainnya yaitu sebesar 5,77%. Rendemen EDS-EA sebesar 4,26% dan rendemen terendah terdapat pada EDS-H yaitu sebesar 1,55%.

Dari hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa senyawa dalam daun sirih hijau memiliki sifat senyawa yang larut dalam pelarut polar sehingga pada ekstraksi yang menggunakan pelarut bersifat polar akan menarik lebih banyak senyawa di dalam daun sirih hijau dan didapatkan rendemen tertinggi pada pelarut bersifat polar yaitu etanol (EDS-E). Namun, senyawa polar yang banyak terkandung dalam ekstrak tersebut belum tentu menjadi senyawa yang berperan penting dalam uji antibakteri.

4.2. Kadar Senyawa Fenolik Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

Tiap ekstrak daun sirih hijau dengan berbagai pelarut dilakukan uji kadar senyawa fenolik untuk mengetahui banyaknya fenolik yang terkandung dalam ekstrak sebagai uji kuantitatif. Uji kadar fenolik menggunakan metode spektrofotometri dengan pereaksi asam sulfanilat yang dilakukan pada tempat yang berbeda yaitu di Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Brawijaya, Malang. Satuan kadar fenolik yaitu berupa persen (%).



Gambar 4.2 Kadar Fenol Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut

Gambar 4.2 merupakan grafik hubungan antara jenis pelarut ekstraksi dengan kadar fenolik yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau yang dihasilkan. Kadar fenolik tertinggi terdapat pada EDS-H yaitu sebesar 8,45%. Kemudian, diikuti oleh EDS-E sebesar 5,17% dan EDS-EA sebesar 2,22%. Sehingga, dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa fenolik pada daun sirih memiliki sifat non polar. Hal ini didukung dengan literatur oleh Munishwar (1997) yang menunjukkan bahwa senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak daun sirih memiliki polaritas rendah melalui koefisien partisi. Adapun senyawa fenolik tersebut diikuti nilai koefisien partisinya antara lain adalah chavicol ($\log P = 2.50 \pm$

0.21), chavibetol ($\log P = 2.30 \pm 0.23$), chavibetol asetat ($\log P = 2.39 \pm 0,24$), dan Eugenol ($\log P = 2.20 \pm 0.23$). Koefisien partisi biasanya sering digunakan untuk memperkirakan lipofilisitas senyawa fenolik. Dimana lipofilisitas merupakan kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid, dan pelarut non-polar seperti heksana atau toluena. Koefisien partisi dari senyawa fenolik pada ekstrak daun sirih digolongkan pada senyawa dengan polaritas rendah dikarenakan nilainya lebih tinggi dari nol (Munishwar, dkk., 1997).

Dikarenakan senyawa fenolik dari ekstrak daun sirih memiliki polaritas rendah (non-polar) maka pelarut yang memiliki polaritas yang mirip yaitu heksana mampu melarutkan lebih banyak senyawa fenolik yang dimiliki oleh daun sirih dan ditunjukkan dengan memiliki kadar fenolik tertinggi yaitu sebesar 8,45% pada penelitian ini.

4.3. Senyawa Aktif Saponin dan Tanin pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

Pengujian pada ekstrak daun sirih hijau dilakukan secara kualitatif yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak daun sirih hijau. Senyawa aktif yang diuji yaitu saponin dan tanin. Pengujian kualitatif dilakukan dengan cara skrining fitokimia menggunakan reagen yang disesuaikan dengan senyawa aktif yang akan diuji. Skrining fitokimia pada ekstrak daun sirih hijau didapatkan beberapa hasil positif adanya senyawa aktif dalam ekstrak yang ditunjukkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Senyawa Aktif pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

No.	Senyawa Aktif	Reagen	Hasil Pada Tiap Sampel		
			EDS-E	EDS-EA	EDS-H
1.	Saponin	Aquades	+	++	-
2.	Tanin	Aquades + FeCl ₃ 1%	+	+	+

Keterangan dalam tabel :

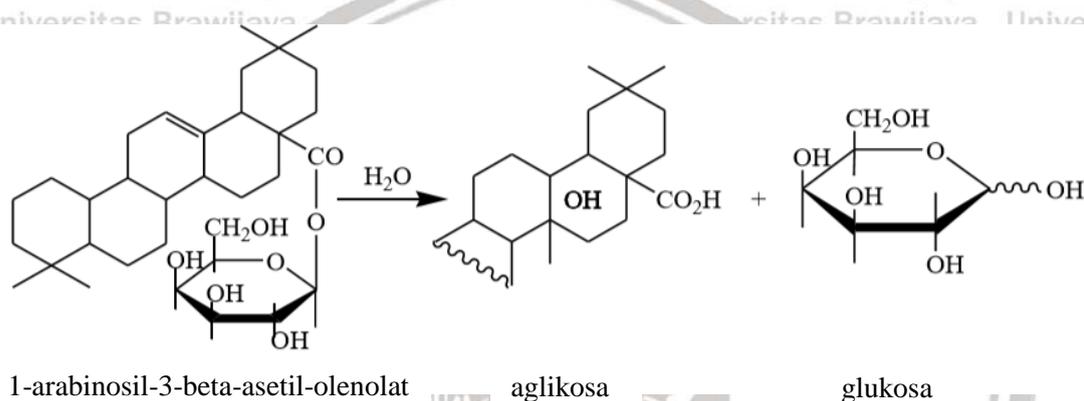
++ : terdapat senyawa aktif yang diuji (lebih sensitif dan stabil)

+ : terdapat senyawa aktif yang diuji

- : tidak terdapat senyawa aktif yang diuji

Hasil dari pengujian secara kualitatif dengan skrining fitokimia sesuai dengan tabel 4.1 menunjukkan bahwa EDS-E positif mengandung senyawa aktif saponin dan tanin. EDS-EA positif mengandung tanin dan saponin (lebih sensitif dan stabil). Sedangkan pada EDS-H positif mengandung tanin namun tidak terdapat kandungan saponin.

Hasil positif pada pengujian senyawa aktif saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil. Hal ini dikarenakan senyawa saponin memiliki sifat surfaktan yang larut dalam air dan dapat membentuk larutan koloid yang berbusa setelah dikocok (Schenkel dkk., 2007). Reaksi hidrolisis saponin dalam air menghasilkan gugus polar glukosa bersama dengan gugus aglikosa bersifat non polar yang memungkinkan saponin untuk menurunkan tegangan permukaan dalam sistem cairan dan membentuk busa yang stabil (Patra, 2012 : 312).



Gambar 4.3 Reaksi Hidrolisis Saponin Dalam Air

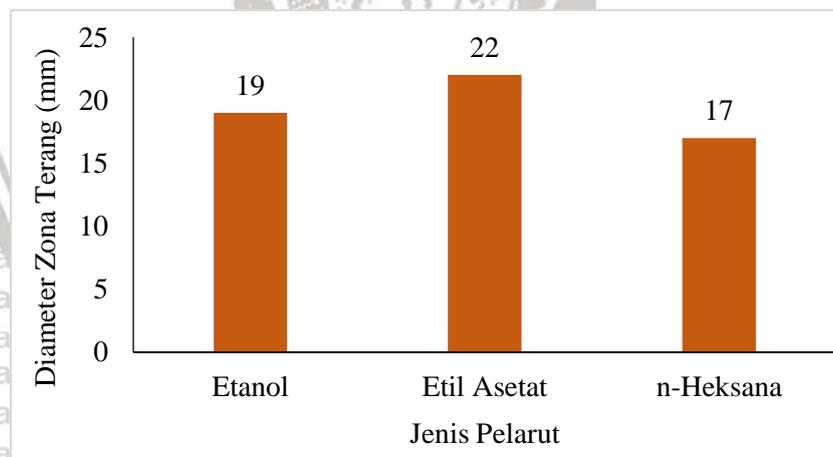
Menurut Chwalek (dalam Patra, 2012 : 313) terdapat hubungan antara aktivitas biologis saponin sebagai antijamur, antibakteri, dan antiprotozoa dengan aktivitas hemolitik atau kemampuan berbusa. Pengujian senyawa aktif saponin pada EDS-EA menunjukkan hasil yang paling sensitif yaitu terbentuk busa yang stabil setinggi 9 mm selama 15 menit. Sedangkan untuk uji saponin pada EDS-E menunjukkan hasil positif dengan munculnya busa setinggi 2 mm yang termasuk kurang sensitif terhadap uji dan tidak stabil selama 15 menit setelah pengocokan. EDS-H tidak menunjukkan hasil positif dikarenakan tidak muncul busa sama sekali. Kecenderungan saponin yang lebih kuat pada EDS-EA yang bersifat semi polar ini dikarenakan senyawa aktif saponin merupakan senyawa yang bersifat semi polar akibat adanya gugus yang bersifat polar dan non-polar (Patra, 2012 : 312).

Pada pengujian senyawa tanin hasilnya ditandai dengan adanya perubahan warna pada ekstrak setelah diberi penambahan larutan FeCl_3 1%. Hasil positif pengujian senyawa tanin ditunjukkan dengan adanya perubahan warna ekstrak dari warna coklat kehijauan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman beberapa saat setelah ditambahkan larutan FeCl_3 1% (Hostettmann, 2014). Perubahan warna menjadi biru kehitaman merupakan hasil dari

adanya golongan tanin terhidrolisis dan perubahan warna menjadi hijau kehitaman sebagai hasil dari adanya golongan tanin terkondensasi atau flavolan. Perubahan warna ini terjadi karena adanya reaksi antara FeCl_3 yang ditambahkan pada uji dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin (Sangi dkk, 2008). Ekstrak daun sirih hijau dengan ketiga pelarut berbeda yang telah diuji menunjukkan hasil positif adanya senyawa tanin dalam tiap ekstrak. Hasil positif tersebut ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman pada EDS-E. Sedangkan hasil positif pada EDS-EA dan EDS-H ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

4.4. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*)

Ekstrak daun sirih hijau dengan berbagai pelarut dilakukan uji antibakteri untuk mengetahui efektivitas daya antibakteri tiap ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*).



Gambar 4.4 Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau Pada Berbagai Jenis Pelarut

Gambar 4.4 merupakan grafik hubungan antara jenis pelarut pada proses ekstraksi dengan diameter zona terang yang terbentuk pada uji antibakteri terhadap bakteri gram positif *staphylococcus aureus* (*S. Aureus*). Zona terang yang terbentuk pada uji antibakteri tersebut menunjukkan respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak daun sirih hijau. Bakteri gram positif *staphylococcus aureus* (*s.aureus*) sensitif terhadap suatu senyawa antibakteri jika terbentuk zona terang lebih dari

10 mm pada uji antibakteri (Parija, 2012 : 180). Berdasarkan gambar 4.4 hasil uji antibakteri ekstrak daun sirih hijau dengan ketiga pelarut yang berbeda tersebut memiliki diameter zona terang lebih dari 10 mm, hal ini menunjukkan bahwa bakteri gram positif *staphylococcus aureus* (*s.aureus*) sensitif terhadap ekstrak daun sirih hijau pada berbagai jenis pelarut.

Besarnya diameter zona terang yang terbentuk pada media uji antibakteri juga dapat digunakan untuk menentukan tingkat daya hambat pertumbuhan bakteri yang dihasilkan oleh suatu senyawa antibakteri. Tingkat daya hambat pertumbuhan bakteri dari suatu senyawa antibakteri diklasifikasikan menjadi tiga yaitu antibakteri kuat, sedang, dan lemah. Berdasarkan gambar 4.2 EDS-EA memiliki diameter zona terang terbesar dibandingkan dengan ekstrak yang menggunakan pelarut lainnya yaitu sebesar 22 mm. Diameter zona terang EDS-E sebesar 19 mm dan EDS-H sebesar 17 mm. Hal ini menunjukkan bahwa EDS-EA memiliki efektivitas daya antibakteri tertinggi dibandingkan dengan kedua pelarut lainnya. Berdasarkan tabel 2.7 daya antibakteri EDS-EA dapat di klasifikasikan sebagai antibakteri kuat. Sedangkan untuk EDS-E dan EDS-H di klasifikasikan sebagai antibakteri sedang.

4.5. Hubungan Antara Daya Antibakteri, Senyawa Tanin dan Saponin, Serta Kadar Fenol Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau

Tabel 4.2 Zona terang, Senyawa Tanin dan Saponin, Serta Kadar Fenol Pada Ekstrak Daun Sirih Tiap Jenis Pelarut

Jenis Pelarut	Zona terang (mm)	Kadar Fenol (%)	Tanin	Saponin
Etanol	19	5,17	+	+
Etil Asetat	22	2,22	+	++
N - heksana	17	8,45	+	-

Pada pengujian kualitatif dengan skrining fitokimia tiap ekstrak daun sirih hijau diketahui terdapat senyawa aktif saponin dan tanin. Diduga saponin merupakan senyawa antibakteri utama pada ekstrak daun sirih hijau yang berperan aktif dalam aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus*. Saponin memiliki beberapa sifat biologis seperti kemampuan untuk hemolisis sel darah merah, menekan populasi protozoa, dan menghambat pertumbuhan mikroba (Patra, 2012 : 313). Hal tersebut didukung oleh pernyataan Rahimi (dalam Rao, 2012 : 319) bahwa senyawa saponin memiliki beragam aktivitas biologis termasuk antimutagenik, antivirus, dan anti inflamasi.

Saponin dapat menjadi senyawa antibakteri karena memiliki zat aktif permukaan yang mirip dengan sabun (sifat surfaktan), akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri (Harborne, 1984 : 121).

Senyawa saponin diduga sebagai senyawa antibakteri utama juga dikarenakan keberadaan senyawa saponin pada uji fitokimia berbanding lurus dengan daya antibakteri tiap ekstrak daun sirih hijau pada uji antibakteri. Pada pengujian fitokimia senyawa saponin, busa yang terbentuk hanya terlihat pada EDS-EA dan EDS-E. Dimana, pada EDS-EA memiliki busa yang lebih banyak dan cenderung lebih stabil dibandingkan busa yang muncul pada EDS-E. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa saponin terbaik berturut-turut terdapat pada EDS-EA kemudian pada EDS-E.

Berdasarkan tabel 4.2 Dapat dilihat bahwa hubungan antara daya antibakteri yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat terhadap kadar fenol memiliki hubungan yang berbanding terbalik. Dimana EDS-EA yang memiliki daya antibakteri terbaik dengan diameter zona hambat paling tinggi yaitu sebesar 22 cm memiliki kadar fenol dengan nilai yang paling rendah diantara ekstrak daun sirih hijau dengan pelarut lainnya yaitu sebesar 2,22%. Sehingga, hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenol bukan merupakan senyawa utama yang mempengaruhi aktivitas daya antibakteri pada ekstrak daun sirih hijau melainkan sebagai senyawa antibakteri pendukung.

Pada uji antibakteri memberi hasil bahwa daya antibakteri terbesar dimiliki oleh EDS-EA yang memiliki diameter zona terang sebesar 22 mm. Daya antibakteri ini dipengaruhi oleh senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau. EDS-EA termasuk antibakteri kuat karena mengandung senyawa antibakteri penting yakni saponin dan mengandung senyawa antibakteri lain seperti tanin dan fenol. Begitu juga pada EDS-E yang memiliki kandungan senyawa utama antibakteri saponin dan didukung dengan senyawa antibakteri lain yakni tanin dan fenol. EDS-E memiliki zona terang sebesar 19 mm termasuk antibakteri sedang dan tidak digolongkan dalam antibakteri kuat karena senyawa saponin yang terkandung didalamnya cenderung kurang stabil saat uji fitokimia. Sedangkan pada EDS-H yang tidak mengandung senyawa antibakteri utama saponin masih memiliki zona terang sebesar 17 mm yang berarti memiliki daya antibakteri tingkat sedang. Hal tersebut dikarenakan pada EDS-H masih mengandung senyawa antibakteri lain yakni tanin dan mengandung kadar fenol tertinggi yakni 8,45%.



Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Senyawa polar dalam daun sirih hijau lebih banyak terekstrak dibandingkan dengan senyawa non-polar. EDS-E memiliki rendemen tertinggi yaitu sebesar 5,77% dan EDS-H memiliki rendemen terendah yaitu sebesar 1,55%.
2. Ekstrak daun sirih hijau memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* (*s.aureus*) yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona terang pada uji antibakteri. Daya antibakteri terbaik didapatkan dari ekstrak dengan pelarut etil asetat. EDS-EA termasuk kategori daya antibakteri kuat dengan diameter zona terang sebesar 22 mm. Daya antibakteri EDS-EA merupakan yang paling kuat dibandingkan EDS-E dan EDS-H yang termasuk dalam kategori daya antibakteri sedang dengan diameter zona terang berturut-turut sebesar 19 mm dan 17 mm.
3. Senyawa antibakteri dalam ekstrak daun sirih hijau yang berperan penting dalam penghambatan pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* (*s.aureus*) yaitu senyawa aktif saponin serta didukung oleh senyawa antibakteri lainnya yaitu fenol dan tanin.

5.2. Saran

1. Dapat dilakukan pengembangan pengujian proses ekstraksi mengenai variasi campuran pelarut yang digunakan.
2. Dapat dilakukan pengembangan pengujian proses ekstraksi mengenai variasi rasio pelarut dengan bahan baku.
3. Dapat dilakukan pengembangan optimasi uji antibakteri dengan menentukan *MIC* (*minimum inhibitor concentration*).
4. Dapat dikembangkan dengan pengujian antibakteri terhadap bakteri gram negatif.
5. Dapat dilakukan pengembangan pengujian menggunakan suhu ekstraksi yang disesuaikan dengan titik didih pelarut yang digunakan.



Halaman ini sengaja dikosongkan



DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama, dkk, 2001. *Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus*. Jepang : Jornal of Antimicrobial Chemotherapy
- Anam, Choirul. Sirojudin dkk. April 2007. *Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FT-IR. Berkala Fisika*. Vol 10 no.1. 79 – 85
- Arisman. 2008. *Keracunan Makanan: Buku Ajar Ilmu Gizi*. Jakarta (ID): Penerbit Buku Kedokteran EGC hlm 90-93.
- As, Noorhamdani, 2016. *Skin Infection It's A Must Know Disease : Infeksi Bakteri MRSA pada Kulit*. Malang : UB Press.
- Bulugahapitiya,Vajira P., 2013. *Plants Based Natural products Extraction, Isolation and Phytochemical screening methods*. Ruhuna : Indika Graphic Network.
- Bustanussalam,dkk, 2015. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (Piper Betle Linn) Terhadap Staphylococcus Aureus ATCC 25923*. Bogor : Fitofarmaka LIPI.
- Cheesbrough, M., 2009. *District Laboratory Practice in Tropical Countries*,Part 1, 2nd Edition. Cambridge : Cambridge University Press.
- Dallyn B. 2014. *McFarland standard*. Catalogue No. TM50-TM60.
- Dwivedi, Vandana dan Shalini Tripathi, 2014. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry : Review study on potential activity of Piper betle*. India : Phytojournal.
- Gandjar dan Rohman. 2018. *Spektroskopi Molekuler Untuk Analisis Farmasi*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Harborne, J.B., 1984. *Phytochemical methods*, 2nd Ed. London : Chapman and Hall Ltd.
- Hostettmann, K. 2014. *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*. Switserlad : Champex-Lac
- Inayatullah, Seila. 2012. *Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper Betle L.) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus Aureus (S.Aureus)*. Jakarta : Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Jaya, F. 2017. *Produk-Produk Lebah Madu dan Hasil Olahannya*. Malang : UB press.
- Leba, Maria Aloisia Uron. 2017. *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Yogyakarta : Deepublish.

- Mabberley, DJ., 1997. *The Plant Book*, Vol. 560, 2nd Ed. Cambridge : Cambridge University Press.
- Munishwar, N. G. 1997. *Polarity Index: the Guiding Solvent Parameter for Enzyme Stability in Aqueous-Organic Cosolvent Mixtures*. *Journal Biotechnology Progress*, Vol. 13, pp 284-288.
- Munoz-Bonilla, dkk., 2014. *Polymeric Materials with antimicrobial activity*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry
- Nikmatul Hidayah dkk. 2016. *Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas Staphylococcus aureus*. Semarang : Universitas Negeri Semarang.
- Sirois, Margi., 2017, *Principle & Practice of Veterinary Technology*. Missouri : Elsevier.
- Sirois, Margi. 2020. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians E-Book*. China : Elsevier
- O'Sullivan, Gwen & Sandau, Court. 2014, *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Amsterdam: Elsevier B.V.
- Parija, S. C., 2012, *Textbook of Microbiology & Immunology* 2nd Ed, Elsevier Inc.
- Patra, A. K. 2012. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. India : Springer.
- Pin, KY, dkk. 2010. *Antioxidant And Anti-Inflammatory Activities Of Extracts Of Betel Leaves (Piper Betle) From Solvents With Different Polarities*. Malaysia : Forest Research Institute Malaysia.
- P.N., Sridhar Rao, 2006. *Bacterial Culture Media*. Davangere : JJMMC.
- Pradhan, dkk. 2013. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Golden Heart of the Nature: Piper betle L*. Vol. 1 No. 6. India : Phytojournal.
- Rao, Venketeshwer. 2012 . *Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Kroasia : InTech.
- Rollando. 2019. *Senyawa Antibakteri dari Fungi Endofit*. Malang : Seribu Bintang.

- Sabbineni, Joshita. 2016. *Phenol-An effective antibacterial Agent*. Vol. 3. Visakhapatnam : JOMC.
- Sangi, M., M.R.J. Runtuwene., H.E.I. Simbala., V.M.A. Makang. 2008. *Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara*. *Jurnal Chem. Prog.* 1(1): 47-53.
- Sarker, S.D, Latief, Z., dan Gray, A. 2006. *Natural Products Isolation*. New Jersey : Humana Press.
- Sarma, dkk, 2018. *Antioxidant and antimicrobial potential of selected varieties of Piper betle L. (Betel leaf)*. India : Annals of the Brazilian Academy of Sciences.
- Satyal, Prabodh dan Willian N Setzer, 2012. *Chemical Composition and Biological Activities of Nepalese Piper betle L*. Vol 1. Hunstville : IJPHA.
- Schenkel, E. P.; Gosmann, G. & Athayde, M. L. (2007). Saponinas. *Journal saponins*. pp. 711-740. ISBN : 9788570259271.
- Sutrisna, E.M. 2016. *Herbal Medicine : Suatu Tinjauan Farmakologis*. Surakarta : muhammadiyah university press.
- Trubus. 2009. *Minyak atsiri*, vol: 7. Trubus info kit.
- Vifta R.L., Wansyah M., dan Hati A. 2017. *Perbandingan Total Rendemen dan Skrining Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (Piper Betle L.) Secara Mikrodilusi*. Semarang : Jurnal Ilmiah Farmasi.
- Zhang, dkk. 2018. *Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review*. Cina : BMC.



Halaman ini sengaja dikosongkan



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. PERHITUNGAN DAN DATA PENELITIAN

A. Perhitungan Rendemen Hasil Ekstraksi

A.1 Ekstrak daun sirih - etanol

Massa daun segar	=	150 gram	
Massa botol	=	11,57 gram	
Massa botol + ekstrak	=	20,22 gram	
Massa ekstrak	=	8,65 gram	
% rendemen	=	$\frac{\text{massa ekstrak yang dihasilkan}}{\text{massa daun segar (bahan baku)}} \times 100\%$	
	=	$\frac{8,65 \text{ gram}}{150 \text{ gram}}$	$\times 100\%$
	=	5,77 %	

A.2 Ekstrak daun sirih - etil asetat

Massa daun segar	=	150 gram	
Massa botol	=	11,03 gram	
Massa botol + ekstrak	=	17,42 gram	
Massa ekstrak	=	6,39 gram	
% rendemen	=	$\frac{\text{massa ekstrak yang dihasilkan}}{\text{massa daun segar (bahan baku)}} \times 100\%$	
	=	$\frac{6,39 \text{ gram}}{150 \text{ gram}}$	$\times 100\%$
	=	4,26 %	

A.3 Ekstrak daun sirih - heksana

Massa daun segar	=	150 gram	
Massa botol	=	11,52 gram	
Massa botol + ekstrak	=	13,85 gram	
Massa ekstrak	=	2,33 gram	
% rendemen	=	$\frac{\text{massa ekstrak yang dihasilkan}}{\text{massa daun segar (bahan baku)}} \times 100\%$	
	=	$\frac{2,33 \text{ gram}}{150 \text{ gram}}$	$\times 100\%$
	=	1,55 %	



B. Data Penelitian Rendemen dan Diameter Zona Terang

Tabel B.1 Data Penelitian Rendemen Ekstrak Dan Diameter Zona Terang

No.	Sample	Rendemen Ekstraksi (%)	Diameter Zona Terang (mm)	Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri
1.	Ekstrak daun sirih hijau - etanol	5,77	19	sedang
2.	Ekstrak daun sirih hijau - etil asetat	4,26	22	kuat
3.	Ekstrak daun sirih hijau - heksana	1,55	17	sedang

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN 2. HASIL UJI KADAR FENOL

No.	Sample	Kadar fenol (%)
1.	Ekstrak daun sirih hijau - etanol	5,17
2.	Ekstrak daun sirih hijau – etil asetat	2,22
3.	Ekstrak daun sirih hijau – heksana	8,45



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA
 JURUSAN KIMIA
 Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp : 162-341-575838, fax : 162-341-554403
<http://kimia.ub.ac.id> e-mail kimia_UB@ub.ac.id

LAPORAN HASIL ANALISIS
 NO : C.16 / RT.5 / T.1 / R.0 / TT. 150803 / 2020

1. Data Konsumen
 - Nama : Kania Salsabila Putri
 - Instansi : Fakultas Teknik Universitas Brawijaya
 - Alamat : Jl. MT Haryono Malang
 - Telepon : 081332973164
 - Status : Mahasiswa S-1
 - Keperluan Analisis : Uji Kualitas
2. Sampling Dilakukan Oleh : Konsumen
3. Identifikasi Sampel
 - Nama Sampel : *Ekstrak Daun Sirih (EDS-E; EDS-EA; EDS-H)*
 - Wujud : Cair
 - Warna : Cokelat dan Hijau Kehitaman
 - Bau : Ada Bau
4. Prosedur Analisis : Dilakukan oleh Unit Analisis dan Pengukuran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang
5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Diambil Langsung
6. Tanggal Terima Sampel : 19 Februari 2020
7. Data Hasil Analisis :

No	Kode	Parameter	Hasil Analisis		Metode Analisis	
			Kadar	Satuan	Pereaksi	Metode
1.	EDS-E	Fenol	5,17 ± 0,04	%	Asam Sulfanilat	Spektrofotometri
2.	EDS-EA	Fenol	2,22 ± 0,02	%	Asam Sulfanilat	Spektrofotometri
3.	EDS-H	Fenol	8,45 ± 0,03	%	Asam Sulfanilat	Spektrofotometri

Catatan:

1. Hasil analisis ini adalah nilai rata-rata pengerjaan analisis secara duplo,
2. Hasil analisis ini hanya berlaku untuk sampel yang kami terima dengan kondisi sampel saat itu.



Masturi, S.Si., M.Si., Ph.D.
 NIP. 19731020 200212 1 001

Malang, 28 Februari 2020

Ketua Unit Analisis dan Pengukuran,

Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si.
 NIP. 19700720 199702 1 001



LAMPIRAN 3. DOKUMENTASI PENELITIAN

A. Proses Ekstraksi Daun Sirih Hijau

No.	Dokumentasi	Keterangan
1.		<p>Persiapan bahan baku dilakukan pemotongan daun sirih hijau segar.</p>
2.		<p>Ekstraksi menggunakan rangkaian metode refluks</p>
3.		<p>Filtrasi vacuum</p>

4.		Rotary evaporator
5.		Hasil ekstrak kental daun sirih hijau

B. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus Aureus*

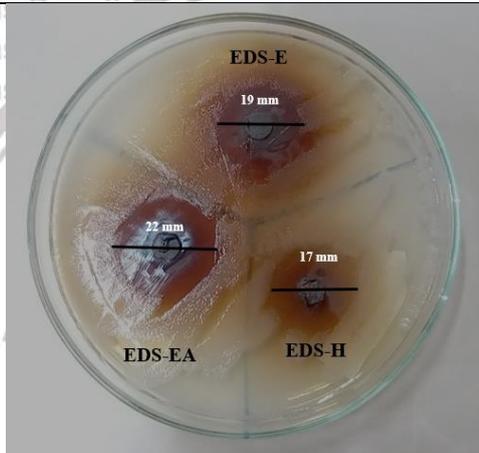
No.	Dokumentasi	Keterangan
1.		Pembuatan media NA dan sterilisasi menggunakan autoklaf

2.		Biakan bakteri <i>staphylococcus aureus</i> setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
----	---	---

C. Standarisasi 0,5 Mc Farland Pada Suspensi Bakteri *Staphylococcus Aureus*

No.	Dokumentasi	Keterangan
1.		Suspensi bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i> dalam media <i>nutrient broth</i>
2.		Pembuatan larutan standar 0,5 Mc Farland dan pengukuran turbiditasnya menggunakan turbidimeter.
3.		Pembuatan suspensi bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i> dengan turbiditas sesuai standar 0,5 McFarland yaitu sebesar 67,8 NTU

D. Uji Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus*

No.	Dokumentasi	Keterangan
1.		Pembuatan ekstrak daun sirih hijau konsentrasi 70% dengan pelarut DMSO.
2.		Peletakkan kertas cakram yang telah direndam ekstrak daun sirih hijau selama 1 jam ke dalam media NA cawan petri yang telah dinokulasi dengan suspensi bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i> turbiditas 67,8 NTU. Kemudian setelah 24 jam inkubasi didapatkan hasil seperti gambar di samping. Hasil uji antibakteri terdapat zona terang yang menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i> .

E. Uji Fitokimia Tiap Ekstrak Daun Sirih Hijau

No.	Dokumentasi	Keterangan
1.		Hasil uji fitokimia senyawa saponin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut etanol.

2.		<p>Hasil uji fitokimia senyawa saponin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut etil asetat.</p>
3.		<p>Hasil uji fitokimia senyawa saponin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut heksana.</p>
4.		<p>Hasil uji fitokimia senyawa tanin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut etanol.</p>
5.		<p>Hasil uji fitokimia senyawa tanin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut etil asetat.</p>
6.		<p>Hasil uji fitokimia senyawa tanin pada ekstrak daun sirih hijau-pelarut heksana.</p>

LAMPIRAN 4. RIWAYAT HIDUP

Mahasiswa 1

Kania Salsabila Putri. Lahir di Kota Jayapura, 23 November 1999, merupakan anak dari ayah Hendro Wibowo dan Ibu Sri Kurniyati Tuguis. Riwayat pendidikan yang pernah dijalani adalah TK Persit Jayapura pada tahun 2003-2005, SD Hikmah I Yapis Jayapura pada tahun 2005-2011, SMP Negeri 1 Jayapura pada tahun 2011-2014, SMA Negeri 4 Jayapura pada tahun 2014-2016, dan pendidikan strata 1 di jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2016-2020. Pernah menjadi asisten praktikum Operasi Teknik Kimia pada tahun 2019. Pengalaman kerja diperoleh dari praktik kerja lapang di PT. Pertamina *Refinery Unit 4* Cilacap selama 2 bulan di bagian *process engineering* pada tahun 2019.

Malang, 25 Maret 2020

Penulis



Mahasiswa 2

Nur Hayati. Lahir di Kota Mojokerto, 28 Oktober 1998, merupakan anak dari ayah Almarhum Usman dan Ibu Qumaiyah. Riwayat pendidikan yang pernah dijalani adalah TK Nurul Huda 2 Mojokerto pada tahun 2002-2004, MI Nurul Huda 2 Mojokerto pada tahun 2004-2010, SMP Negeri 4 Mojokerto pada tahun 2010-2013, SMA Negeri 3 Mojokerto pada tahun 2013-2016, dan pendidikan strata 1 di jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2016-2020. Pengalaman organisasi adalah menjadi staff departemen akademik Himpunan Mahasiswa Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya pada tahun 2017-2018. Pengalaman kerja diperoleh dari praktik kerja lapang di PT. *Pertamina Refinery Unit 4 Cilacap* selama 2 bulan di bagian *process engineering* pada tahun 2019.

Malang, 25 Maret 2020

Penulis



