

**STANDARDIZATION OF GREEN BETEL LEAF EXTRACTS (*Piper betle L.*) AND
ANTIBACTERIAL TEST AGAINST *Pseudomonas aeruginosa***

**STANDARISASI EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle L.*) DAN UJI
ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa***

Geraldin Ester Manarisip^{1)*}, Fatimawali¹⁾, Henki Rotinsulu¹⁾

1) Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*geraldinmanarisip@gmail.com

ABSTRACT

*This study aims to determine the standardization of betel leaf extracts and determine the concentration of extracts that can inhibit bacteria. In this study, the extraction was carried out by the maceration method. The specific parameters were identity of the extracts, organoleptic test, levels of water, ethanol soluble compounds, and chemical content, meanwhile, the non-specific parameters were drying loss, moisture content, and specific gravity. The results of the standardization of specific parameters showed the name of the Green Betel leaf extract (*Piper betle L.*), organoleptic (thick, dark green color, and strong betel odor), water-soluble and ethanol-soluble extracts content (68.27% and 82%), containing alkaloid compounds, steroids, and tannins. The results of non-specific parameters showed drying shrinkage (10.91%), moisture content (22.73%), and specific gravity (0.874 g / mL). Antibacterial test against *Pseudomonas aeruginosa* showed that betel leaf extracts at a concentration of 25%, 20%, and 15% experienced a decrease in Optical Density (OD) values respectively -0.192, -0.065, -0.098 while at concentrations of 10% and 5% had an increase Optical Density (OD) values were 0.512, 0.767, respectively. From the results obtained, it was concluded that the betel leaf extracts (*Piper betle L.*) fulfilled specific and non-specific parameters and had the ability to inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria with an MIC value of 15%.*

Keywords: *Betel leaf (*Piper betle L.*), Standardization, Antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*.*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan standarisasi ekstrak daun sirih hijau dan menentukan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat bakteri. Dalam penelitian ini penyarian dilakukan dengan metode maserasi. Parameter spesifik yaitu identitas ekstrak, uji organoleptik, kadar senyawa larut air dan larut etanol, dan kandungan kimia, sedangkan parameter non spesifik yaitu susut pengeringan, kadar air, dan bobot jenis. Hasil standarisasi parameter spesifik menunjukkan nama ekstrak etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*), organoleptik (kental, warna hijau pekat, dan bau khas sirih yang tajam), kadar sari larut air dan larut etanol masing masing (68,27% dan 82%), dengan kandungan senyawa alkaloid, steroid, tanin. Hasil parameter non spesifik menunjukkan nilai susut pengeringan (10,91%), kadar air (22,73%), dan bobot jenis (0,874 g/mL). Uji antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih pada konsentrasi 25%, 20%, dan 15% mengalami penurunan nilai *Optical Density* (OD) berturut-turut -0,192, -0,065, -0,098 sedangkan pada konsentrasi 10% dan 5% mengalami kenaikan nilai *Optical Density* (OD) berturut-turut 0,512, 0,767. Dari hasil yang diperoleh disimpulkan bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) memenuhi parameter spesifik dan non spesifik dan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai KHM 15%.

Kata kunci: Daun Sirih (*Piper betle L.*), Standarisasi, Antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa*.

PENDAHULUAN

Salah satu mikroorganisme flora normal rongga mulut adalah *Pseudomonas aeruginosa*, walaupun sebagai flora normal rongga mulut namun pada keadaan tertentu bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat berubah menjadi patogen karena adanya faktor pendukung, misalnya kebersihan rongga mulut yang rendah. Bakteri ini akan masuk ke dalam aliran darah melalui gigi yang berlubang dan gusi yang berdarah atau bakterimia (Brooks *et al.*, 2005).

Salah satu jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat adalah daun Sirih (*Piper betle*). Daun sirih (*Piper betle*) banyak digunakan sebagai bahan obat alternatif untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti obat pembersih mata, menghilangkan bau badan, mimisan, sariawan, pendarahan gusi, batuk, *bronchitis*, keputihan dan obat kulit sebagai perawatan untuk kecantikan atau kehalusan kulit. (Bustanussalam dkk., 2015).

Peningkatan kualitas bahan baku obat dapat dilakukan dengan usaha budidaya dan standarisasi terhadap bahan baku tersebut, baik yang berupa simplisia atau berbentuk ekstrak. Standarisasi adalah serangkaian parameter, prosedur, dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait seperti paradigma mutu yang memenuhi standar dan jaminan stabilitas obat (Hariyati, 2005).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Najib, dkk (2016), standarisasi ekstrak tanaman obat baik secara spesifik dan non spesifik menunjukkan tanaman yang distandarisasi memenuhi standar mutu bahan baku. Kandungan senyawa aktif dan mutu ekstrak dari tanaman obat tidak dapat dijamin akan selalu berada dalam jumlah yang konstan karena adanya variabel bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara) panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Proses standarisasi ekstrak sangat diperlukan untuk menghasilkan ekstrak yang berkualitas baik sebelum diproduksi dalam skala industri.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sutasmi dan Natsir (2014), *Pseudomonas aeruginosa* ditemukan sekitar 5,55% pada periodontitis apikalis kronis. Bakteri ini juga merupakan penyebab utama terjadinya infeksi nosokomial.

Pada penelitian Suliantri (2008), ekstrak daun sirih hijau yang diperoleh dengan pelarut etanol mempunyai aktivitas antibakteri terhadap

beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif yang salah satunya adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu, pada penelitian Tohari (2016), menunjukan ekstrak daun sirih hijau yang diperoleh dari daerah Kabupaten Jombang, Jawa Timur dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 10% dan 15%.

Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan standarisasi ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan uji antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* untuk mengetahui apakah ekstrak yang digunakan memenuhi parameter standarisasi dan memiliki kemampuan menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 - Maret 2020 di Laboratorium Farmasi Lanjut Program Studi Farmasi, Universitas Sam Ratulangi.

Alat dan Bahan

Alat

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, neraca analitik, rak tabung reaksi, oven, batang pengaduk, alumunium foil, timbangan digital, autoklaf, gelas ukur, kertas saring, *hotplate magnetic stirrer*, beker gelas, lemari pendingin, jarum ose, *laminar air flow*, rotary evaporator, Spektrofotometri UV-Vis, blender, mikropipet, cawan petri, kertas label dan spritus.

Bahan

Bahan yang akan digunakan adalah daun sirih hijau yang diambil dari Kabupaten Minahasa, bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, etanol 96%, media Nutrient Agar, Nutrient Broth, aquades, bubuk magnesium, larutan Besi (III) klorida, etil asetat, kloroform, H₂SO₄, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, asam asetat glasial, HCl, DMSO, dan antibiotik Cyprofloxacin.

Prosedur Penelitian

Penyiapan dan Pembuatan Simplisia

Daun sirih hijau sebanyak 6 kg yang telah diambil dari perumahan warga yang ada di Desa Tempang, Kabupaten Minahasa kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Selanjutnya daun sirih dikeringkan dengan cara diangin-

inginkan dan dilanjutkan dengan dioven pada suhu 40°C. Setelah daun sirih benar-benar kering lalu ditimbang dan dihancurkan menggunakan blender hingga menjadi serbuk kemudian diayak, dan disimpan dalam wadah tertutup.

Sterilisasi Alat

Sebelum alat digunakan harus dilakukan sterilisasi dengan cara dibungkus menggunakan aluminium foil kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi selama 15 menit waktu tersebut dihitung setelah suhu mencapai 121°C (Kapondo, 2020).

Pembuatan Ekstrak

Simplisia daun sirih sebanyak 300 gr ditimbang, kemudian dimasukan ke dalam toples dan ditambahkan 1500 ml pelarut etanol 96 %. Kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia selama 5 hari sesekali dilakukan pengadukan. Setelah 5 hari disaring menggunakan kertas saring, dihasilkan filtrat 1 dan residu 1. Residu 1 yang ada kemudian direndam lagi (remaserasi) dengan pelarut yang sama selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, sampel disaring sehingga menghasilkan filtrat 2 dan residu 2. Filtrat 1 dan filtrat 2 dicampurkan menjadi satu lalu diuapkan didalam oven sehingga diperoleh ekstrak kental lalu di timbang.

Penetapan Parameter Spesifik

a. Parameter Identitas Ekstrak

Parameter identitas ekstrak dilakukan dengan tujuan memberikan identitas objektif dari nama tumbuhan. Deskripsi tata nama mencakup nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan serta nama Indonesia tumbuhan (Depkes RI, 2000).

b. Uji Organoleptik

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin. Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

c. Uji Senyawa yang Larut Dalam Air

Ekstrak sebanyak 5 gram dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform menggunakan labu bersumbat sambil dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. Lapisan kloroform dan air dipisahkan. Uapkan 20 ml filtrat lapisan air hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Hitung

kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air terhadap berat ekstrak awal (Depkes RI, 2000).

d. Kadar Senyawa yang Larut Dalam Etanol

Ekstrak sebanyak 5 gram dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol terhadap berat ekstrak awal (Depkes RI, 2000).

Uji Kandungan Kimia Ekstrak

Prosedur Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sampel sebanyak 4 gram diambil kemudian ditambahkan kloroform secukupnya, selanjutnya ditambah 10 mL amoniak dan 10 mL kloroform. Kemudian larutan disaring ke dalam tabung reaksi dan filtrat ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2N. Campuran dikocok dengan teratur, dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian masing-masing tabung tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Apabila terbentuk endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi Mayer membentuk endapan putih, dengan pereaksi Wagner membentuk endapan warna coklat dan pereaksi Dragendorff membentuk endapan warna jingga (Kala'Rante, 2020).

b. Uji Triterpenoid dan Steroid

Sampel sebanyak 50-100 mg diambil kemudian ditambahkan asam asetat glasial sampai semua sampel terendam, dibiarkan selama 15 menit kemudian 6 tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu, sedangkan stereroida ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru (Kala'Rante, 2020).

c. Uji Tanin

Sampel sebanyak 20 mg ditimbang kemudian ditambahkan etanol sampai terendam semuanya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan

dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau kehijauan (Kala'Rante, 2020).

d. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 200 mg ditimbang kemudian diekstrak dengan 5 mL etanol dan dipanaskan selama lima menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua selama tiga menit (Kala'Rante, 2020).

e. Uji Saponin

Sampel sebanyak 2 g diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Kala'Rante, 2020).

Penetapan Parameter Non Spesifik

a. Penetapan susut pengeringan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 g sampai 2 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol hingga merupakan lapisan setebal kurang 5 mm sampai 10 mm, kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering. Dibuka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga botol tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Kemudian keringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap (Depkes RI, 2000).

b. Kadar Air

Metode Gravimetri

Lebih kurang 1 gram ekstrak dimasukkan dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 3-5 jam. Setelah itu didinginkan dalam eksikator dan kemudian ditimbang (Depkes RI, 2000).

c. Bobot jenis

Gunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Atur hingga suhu ekstrak cair lebih kurang 20°C, masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak

dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000).

Aktivitas Antibakteri

Penyiapan Larutan Uji dan Larutan Kontrol

Ekstrak kental daun sirih sebanyak 7,5 g ditimbang dan dibuat konsentrasi ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Pembuatan larutan ekstrak diawali dari pembuatan larutan uji konsentrasi 25% ditimbang 2,5 g, timbang 2 g untuk konsentrasi 20%, ditimbang 1,5 g untuk konsentrasi 15%, ditimbang 1 g untuk konsentrasi 10%, ditimbang 0,5 g untuk konsentrasi 5%. Dilarutkan dengan sedikit DMSO, kemudian dicukupkan sampai volume 10 mL.

Untuk kontrol positif, tablet Ciprofloxacin 500 mg digerus lalu dilarutkan ke dalam akuades steril sebanyak 25 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dicukupkan dengan aquadest sampai volumenya 100ml hingga didapatkan konsentrasi 5 mg/ml. Kemudian diambil 1 ml larutan stok ciprofloxacin 5 mg/ml dan ditambahkan akuades steril sehingga mencapai 100 ml sehingga didapat konsentrasi larutan 50 µg/ml.

Pengujian Antibakteri

Metode yang digunakan pada pengujian ini adalah dengan metode dilusi cair. Disiapkan dua puluh satu tabung reaksi yang telah disterilkan, tiga tabung larutan uji dan bakteri uji sebagai kontrol negatif, tiga tabung larutan antibiotik (Ciprofloxacin) dan bakteri uji sebagai kontrol positif. Lima belas tabung lainnya selanjutnya diisi dengan 4 ml medium *Nutrient Broth* dan ditambahkan 0,5 ml larutan uji pada tabung reaksi dan di vortex (Kapondo, 2020).

Masing-masing tabung kemudian ditambahkan 0,5 ml suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan divortex. Sebelum diinkubasi, setiap tabung diamati seksama dan diukur absorbansinya pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Kemudian seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, setiap tabung diamati seksama dan diukur absorbansi kembali pada spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 600 nm. Penentuan KHM ditentukan dengan melihat hasil inkubasi dari tabung dengan membandingkan kekeruhan sebelum dan sesudah inkubasi (Kapondo,2020).

Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari data diameter hambat dan variasi konsentrasi pengujian aktivitas antibakteri di lakukan pengolahan data dengan menggunakan model penyajian dalam bentuk tabel, gambar dan analisis secara deskriptif.

Untuk mengetahui rata- rata absorbansi digunakan Rumus :

$$\frac{\text{Replika (1 + 2 + 3)}}{3}$$

Untuk mengetahui *optical density* Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) / *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) digunakan Rumus :

OD Setelah Diinkubasi– OD Sebelum Diinkubasi (Kapondo, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ekstraksi tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi, meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Nurhasnawati., dkk, 2017). Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut Etanol 96% karena pelarut ini menyari hampir keseluruhan kandungan simplisia baik non polar, semi polar maupun polar (Anshori, dkk., 2009). Pelarut ini bersifat selektif, tidak beracun dan bersifat universal yang cocok untuk mengekstrak semua golongan senyawa metabolit sekunder (Kristanti dan Novi, 2008).

Hasil pengujian standarisasi parameter spesifik ekstrak etanol daun Sirih dapat dilihat pada Tabel 1:

Hasil identifikasi tanaman menunjukkan bahwa benar tanaman yang digunakan yaitu Sirih Hijau (*Piper betle L.*). Berdasarkan dari hasil identifikasi tanaman, Identitas ekstrak yang digunakan diperoleh hasil nama ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle L*) dengan bagian tanaman yang digunakan adalah bagian daun. Parameter identitas ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk memberikan identitas objektif dari nama tumbuhan.

Pengujian organoleptik meliputi warna, bau, dan bentuk menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Sirih memiliki warna hijau pekat dengan bau yang khas tanaman sirih, dan berkon-

Tabel 1. Hasil Standarisasi Parameter Spesifik Daun Sirih

No	Pengujian	Hasil
1	Identitas Ekstrak	Nama latin : <i>Piper betle L.</i> Nama Indonesia : Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau Bagian tanaman: Daun
2	Uji Organoleptik	Kental, warna hijau pekat, bau khas sirih yang tajam
3	Kadar sari larut air	68, 27%
4	Kadar sari larut etanol	82%
5	Kandungan kimia	Alkaloid, Steroid, Tanin

sistensi kental. Parameter organoleptik ekstrak bertujuan untuk memberikan pengenalan awal terhadap ekstrak dengan menggunakan pancaindra (Depkes RI., 2000).

Pengujian senyawa yang larut dalam air pada ekstrak daun sirih didapati kadar sari larut air sebesar 68,27%, sedangkan untuk kadar sari larut etanol sebesar 82%. Hasil penetapan kadar senyawa larut air dan kadar senyawa larut etanol ini bertujuan sebagai perkiraan banyaknya kandungan senyawa-senyawa aktif bersifat polar (larut dalam air) dan bersifat polar-nonpolar (larut dalam etanol) (Saifudin, dkk., 2011). Hasil yang diperoleh menunjukkan besarnya kadar sari larut air sebesar 68,27% dan kadar sari larut etanol sebesar 82%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar senyawa yang terkandung dalam ekstrak terdiri dari senyawa polar dan non polar dengan perbandingan senyawa polar lebih banyak dibandingkan dengan senyawa nonpolar dilihat dari besarnya nilai persen senyawa yang larut dalam air dan larut dalam etanol.

Uji kandungan kimia bertujuan untuk memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia pada sampel (Depkes RI, 2000). Hasil uji kandungan kimia terhadap ekstrak etanol daun sirih menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih mengandung senyawa Alkaloid, Steroid, dan Tanin. Alkaloid sebagai antibakteri dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Steroid dalam mekanisme

antibakteri berhubungan dengan lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivkan adhesin sel mikroba sehingga bakteri tidak dapat berikatan dengan reseptor sel inang, menginaktivkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Cowan, 1999).

Hasil pengujian standarisasi parameter non spesifik ekstrak etanol daun Sirih dapat dilihat pada Tabel 2:

Tabel 2. Hasil Standarisasi Parameter Non Spesifik Daun Sirih

No	Nama	Kandungan (%)	Standar Acuan (%)
1.	Penetapan Susut Pengerinan	10,91	<11,00
2.	Pengujian Kadar Air	22,73	10
3.	Bobot Jenis	0,874	

Susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Standar besarnya nilai susut pengeringan suatu ekstrak adalah < 11,00% (Depkes RI, 2008). Hasil penentuan parameter susut pengeringan ekstrak etanol daun sirih diperoleh nilai sebesar 10,91%. Massa yang dapat hilang selama proses pemanasan dapat meliputi minyak atsiri, pelarut etanol, dan air. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak yang diperoleh memenuhi syarat yaitu tidak lebih besar dari 11%.

Kadar air merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan residu air setelah proses pengeringan. Metode yang digunakan pada pengujian kadar air adalah metode gravimetri. Prinsipnya yaitu dilakukan penguapan dengan cara dipanaskan. Metode ini dipilih karena Ekstrak kental memiliki kadar air antara 5-30% (Voight, 1994). Hasil yang diperoleh untuk kadar air pada ekstrak etanol daun sirih adalah sebesar 22,73%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak yang diperoleh belum memenuhi standar yang diperbolehkan yaitu tidak melebihi 10% (Farmakope Herbal Indonesia, 2008). Kadar air yang terlalu tinggi (>10%) menyebabkan tumbuhnya mikroba yang akan menurunkan stabilitas ekstrak (Saifudin, dkk., 2011). Ekstrak yang digunakan merupakan ekstrak kental sehingga kemungkinan disebabkan oleh proses pengeringan yang kurang optimal (Prasetyo dan Inorah, 2013). Kadar air yang tinggi juga dapat

disebabkan karena adanya pelarut yang ikut terhitung pada perhitungan kadar air ekstrak.

Penentuan bobot jenis ini bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak (Depkes RI, 2000). Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang sudah diencerkan 5% dengan etanol. Hasil yang diperoleh besarnya nilai bobot jenis pengenceran ekstrak daun sirih adalah 0,874 g/mL, dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Utami., dkk, 2017), nilai bobot jenis yang diperoleh dari pengenceran ekstrak daun leilem adalah sebesar 1,0479 g/mL. Bobot jenis alkohol adalah 0,81, artinya bobot jenis alkohol 0,81 kali bobot volume air yang setara (Ansel, 2006). Nilai bobot jenis yang diperoleh mendekati nilai bobot jenis alkohol dikarenakan digunakan pelarut etanol dalam proses pengenceran. Perbedaan nilai bobot jenis dengan hasil dari penelitian (Utami., dkk, 2017) dikarenakan pelarut yang digunakan pada proses pengenceran berbeda. Pengenceran yang dilakukan menggunakan pelarut air.

Pada pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi cair diperoleh hasil yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba diencerkan sehingga diperoleh beberapa konsentrasi. Oleh karena itu ekstrak etanol daun sirih dibuat beberapa seri konsentrasi yang digunakan, yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak daun sirih ini menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Metode dilusi cair pada dasarnya digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan dilanjutkan penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Pratiwi, 2008).

Bakteri uji yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri Gram negatif, sedangkan untuk kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ciprofloxacin. Ciprofloxacin aktif terhadap bakteri Gram positif dan terutama aktif terhadap kuman Gram negatif termasuk *Salmonella*, *Shigella*, *Campilobakter*, *Neisseria*, dan *Pseudomonas* (BPOM, 2008). Pelarut yang digunakan adalah DMSO 10%. DMSO memiliki kemampuan untuk menembus membran sel, namun pada penggunaan DMSO sebagai pelarut, konsentrasi akhir DMSO tidak boleh melebihi 10% karena dapat menyebabkan pecahnya membran sel. Pelarut DMSO 10% merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal (Reynolds, 1996). Selain itu pelarut ini dapat

melarutkan hampir semua senyawa polar maupun non polar. Kontrol negatif yang digunakan adalah media *nutrien broth*.

Penentuan KHM pada pengujian antibakteri ini dilakukan menggunakan metode dilusi cair. Keuntungan penggunaan metode ini adalah penggunaan media yang lebih efisien. Parameter yang digunakan adalah kekeruhan (ada pertumbuhan bakteri) dan kejernihan (tidak ada pertumbuhan bakteri), yang dapat dilihat setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Namun, hal ini cenderung bersifat subjektif, sehingga digunakan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi untuk membantu menentukan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

Sebelum diinkubasi, terlebih dahulu diukur serapannya kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Suhu 37°C dipilih untuk menyesuaikan dengan suhu tubuh manusia. Setelah diinkubasi selama 24 jam,

semua tabung kembali diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis, kemudian dibandingkan dengan nilai absorbansi sebelum inkubasi.

Hasil penelitian menggunakan Spektrofotometer UV-Vis melalui nilai absorbansi menunjukkan bahwa pada konsentrasi 15%, 20%, dan 25% terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan penurunan nilai absorbansi setelah inkubasi. Namun, pada konsentrasi yang lebih kecil, yaitu 5% dan 10% terjadi kenaikan nilai absorbansi seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 3. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi ini ekstrak daun sirih tidak lagi mampu menghambat dan membunuh bakteri. Tingginya nilai absorbansi yang diperoleh disebabkan karena selain kekeruhan yang dihasilkan oleh bakteri yang ditambahkan juga dipengaruhi oleh banyaknya larutan uji yang di-

Tabel 3. Hasil Pengukuran Daya Hambat dengan Metode Dilusi

Konsentrasi (mg/mL)	Nilai Rata-Rata OD KHM			Ket.
	Sebelum inkubasi	Sesudah inkubasi	Δ OD	
25%	2,257	2,065	-0,192	Turun
20%	2,116	2,051	-0,065	Turun
15%	2,978	2,879	-0,098	Turun
10%	1,426	1,928	0,512	Naik
5%	0,810	1,577	0,767	Naik
K(+)	0,073	0,325	0,252	Naik
K(-)	0,065	0,621	0,554	Naik

Ket: “Naik” menunjukkan nilai absorbansi setelah inkubasi > nilai absorbansi sebelum inkubasi, yang berarti bahwa terdapat pertumbuhan bakteri; sedangkan “Tetap” atau “Turun” menunjukkan nilai absorbansi setelah inkubasi ≤ nilai absorbansi sebelum inkubasi, yang berarti bahwa pertumbuhan bakteri terhambat. OD=Optical Density

tambahkan. Keuntungan utama metode spektrofotometri adalah bahwa metode ini memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil. Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Yahya, 2013). Kekurangan metode dilusi dengan spektrofotometri UV-Vis dalam selektivitas untuk membedakan sampel dengan partikel-partikel lain yang menyerap cahaya dalam panjang gelombang yang sama,

untuk itu konsentrasi sampel berpengaruh terhadap serapan densitas optik (*Optical Density*) atau tingkat kekeruhannya sehingga semakin tinggi konsentrasi serapannya juga tinggi (Geisler, 2015).

Pada kontrol negatif terjadi kenaikan nilai absorbansi yang menunjukkan bahwa media yang digunakan tidak menghambat bakteri, sedangkan pada kontrol positif juga terjadi kenaikan nilai absorbansi, hal ini dapat disebabkan karena pengenceran yang dilakukan menyebabkan Ciprofloxacin menjadi tidak stabil dan terjadi

penurunan efektivitas. Hal ini dapat berkaitan dengan proses disolusi yaitu proses larutnya molekul obat dari bentuk padat ke dalam suatu larutan medium (Abdou, 1989). Perbandingan banyaknya pelarut yang digunakan untuk melarutkan obat dan lamanya penyimpanan menyebabkan terjadinya penurunan kestabilan obat.

KESIMPULAN

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari Desa Tempang, Kabupaten Minahasa, memenuhi semua parameter spesifik dan non spesifik kecuali kadar air sehingga memenuhi standar suatu obat.

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan terjadinya penurunan nilai *Optical Density* (OD) pada konsentrasi 15%, 20%, dan 25% dan terjadi kenaikan nilai *Optical Density* (OD) pada konsentrasi 5% dan 10%, sehingga diperoleh nilai KHM pada konsentrasi 15%.

SARAN

Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan formulasi suatu obat dengan bahan aktif ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan menguji aktivitasnya sebagai suatu obat, menggunakan bagian lain dari tanaman sirih untuk dilakukan standarisasi, pembuatan larutan uji dilakukan dengan menggunakan larutan stok, dan menggunakan pelarut lain serta kontrol positif yang sesuai pada uji aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou, H. M. 1989. *Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence*. Mack Publishing Company, Ezzton-Pennsylvania, hlm 56, 151-153
- Ansel, H.C., dan Prince, S.J. 2006. *Kalkulasi Farmasetik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Anshori, M dan Iswanti, S. 2009. *Buku Ajar: Metodologi Penelitian Kuantitatif*. Surabaya: Airlangga University Press
- BPOM RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- BPOM RI. 2008. *Informatorium Obat Nasional Indonesia*. Jakarta : Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
- Brooks, G. .F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., dan Mietzner, T. A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Jawets, Melnick & Adelberg's Edisi XXII*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E. Jakarta: Penerbit Salemba Medika
- Bustanussalam, Apriasi, D., Suhardi, E., dan Jaenudin, D. 2015. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* Linn) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Fitofarmaka*. 5 (2) : 58-64.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:564-582
- Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Geisler J, Thompson T. Choosing the best detection method: Absorbance vs. Fluorescence. *Biocompare*, 2015. Available from: <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/173963-Choosing-the-Best-Detection-Method-Absorbance-vs-Fluorescence/>
- Hariyati, S. 2005. Standarisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia. *InfoPOM*. 6 (4): 1-5
- Kala'Rante., T.R, Simbala., H.E.I, Mansauda., K.L.R. 2020. Skrining Fitokomia dan Potensi Antioksidan Dari Ekstrak Daun Tumbuhan Ekor Tikus (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) dengan Metode 1.1 Diphenyl-2-Picrylhydracyl (Dpph). *Jurnal MIPA*. 9(2):91-96
- Kapondo., G.L, Fatimawali, Jayanti., M. 2020. Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *eBiomedik*. 8(1):172-178
- Kristanti., Novi, A. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga Press

- Najib, A., Malik, A., Ahmad, A., Handayani, V., Syarif, R., Waris, R. 2016. Standarisasi Ekstrak Air Daun Jati Belanda dan Teh Hijau. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4 (2): 241-243
- Nurhasnawati, H., Sukarmi, Handayani, F. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.). *Jurnal Kimia Manuntung*. 3(1): 91-95
- Prasetyo, MS, Inorihah, E. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Siplisia)*. Bengkulu: Badan Penelitian Fakultas UNIB
- Pratiwi, S., T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga:Jakarta
- Reynolds, J.E.F. 1996. *Martindale, The Extra Pharmacopeia 31th Edition*. London: The Royal Pharmaceutical Society Press
- Saifudin, A., Rahayu., Teruna. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Suliantri. 2008. Aktivitas antibakteri ekstrak sirih hijau (*Piper betle* L) terhadap bakteri patogen pangan. *Jurnal teknol dan industri pangan*. Vol 1 (1)
- Sutasmi, Nurhayati, N.. 2014. Identifikasi Bakteri pada Saluran Akar Gigi Dengan Diagnosis Periodontitis Apikalis Kronis. *Jurnal Dentofasial*. 13 (3) : 183-184
- Tohari, C. 2016. Gambaran Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Artikel Ilmiah*.
- Utami, Y.P, Umar, A.H, Syahrini, R., dan Kadulla, I. 2017. Standarisasi Siplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn.). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*. 2 (1):32-39
- Voight, R. 1994. *Buku Pengantar Teknologi Farmasi, 572-574*, diterjemahkan oleh Soedani, N., Edisi V. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press
- Yahya, S. 2013. *Spektrofotometri UV-Vis*. Jakarta: Erlangga