

AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) DAN PERASAN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE COMBINATION OF RED BETEL LEAF ETHANOL EXTRACT (*Piper crocatum*) AND LIME (*Citrus aurantifolia*) JUICE AGAINST THE BACTERIA *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*

Rizkina Elistya Febriani, Rima Munawaroh*
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

***E-mail: rm127@ums.ac.id**

Abstrak

Infeksi termasuk dalam masalah kesehatan yang umum di negara maju ataupun negara berkembang seperti di Indonesia karena jumlah penyakit dan kematian yang relatif tinggi. Bakteri merupakan penyebab utama infeksi, bakteri dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif, salah satu bakteri gram negatif yaitu bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*. Daun sirih merah dan jeruk nipis diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi kombinasi kedua ekstrak tanaman tersebut sebagai agen antibakteri pada bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*. Daun sirih merah diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol 96% sedangkan buah jeruk nipis diperas dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* dengan loading ekstrak 10, 5, 2,5, dan 1,25 mg/disk. Antibiotik ciprofloxacin digunakan sebagai kontrol positif dan DMSO 100% digunakan sebagai kontrol negatif. Ekstrak daun sirih merah dan perasan jeruk nipis dapat menghambat kedua bakteri tersebut. Kombinasi ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis dengan perbandingan konsentrasi 5: 1,25, 2,5:2,5, dan 1,25:5 mg/disk menghasilkan diameter zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* lebih kecil dibandingkan dengan penambahan uji ekstrak tunggal. Hasil KLT Bioautografi menunjukkan senyawa aktif dalam sirih merah adalah flavonoid dan flavonol sedangkan yang dari jeruk nipis adalah flavonoid dan flavonol.

Kata Kunci: Daun sirih merah, perasan jeruk nipis, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, antibakteri, bioautografi

Abstract

Infection is a common health problem in developed or developing countries such as Indonesia because of the relatively high number of illnesses and deaths. Bacteria are the main cause of infection, bacteria are divided into gram-positive and gram-negative bacteria, one of the gram-negative bacteria is *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* bacteria. Red betel leaf and lime are known to have antibacterial activity. This study aims to see the potential of the combination of the two plant extracts as antibacterial agents in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* bacteria. Red betel leaf was extracted by maceration using 96% ethanol while lime juice was squeezed and tested for its antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* bacteria with extract loadings of 10, 5, 2.5, and 1.25 mg/disk. The antibiotic ciprofloxacin was used as a positive control and 100% DMSO was used as a negative control. Red betel leaf extract and lime juice extract can inhibit these two bacteria. The combination of red betel leaf extract and lime juice extract with a concentration ratio of 5: 1,25, 2,5:2,5, and 1,25:5 mg/disk resulted in a smaller diameter of the inhibition zone against *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* bacteria. with the addition of a single extract test. The results of TLC-Bioautography show that the active compounds in red betel are flavonoids and flavonols, while those from lime are flavonoids and flavonols.

Keywords: Red betel leaf, lime juice, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, antibacterial, bioautography

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan yang banyak ditemukan baik di negara maju maupun di negara berkembang. Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri, virus, parasit atau jamur. Penyakit infeksi dapat menyebar, secara langsung atau tidak langsung, dari satu orang ke orang lain (WHO, 2017). Bakteri merupakan mikroorganisme tersering penyebab infeksi. Secara garis besar, bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Salah satu bakteri Gram negatif adalah *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* (Syahrurachman, et al., 2014).

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang bermanfaat sebagai macam-macam obat. Obat-obatan tradisional hanya diwarisi dari masyarakat sekitar tanpa adanya suatu pengujian atau penelitian, maka diperlukannya pengujian dan pengembangan khasiat dan keamanan suatu tumbuhan. Salah satu tanaman hayati yang dapat bermanfaat adalah daun sirih merah dikarenakan tanaman ini memiliki senyawa flavonoid, senyawa polifenolat, dan minyak atsiri (Indriati, 2012). Selain daun sirih, jeruk nipis juga telah dimanfaatkan sebagai agen antibakteri karena terdapat kandungan flavonoid dan minyak atsiri di dalamnya (Khanifah, 2015). Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks yang menghambat sintesis asam nukleat dalam sel bakteri menghambat fungsi membran sel bakteri dan menghambat metabolisme energi sel bakteri (Azmi et al., 2020).

Penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak etanol 96% daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada konsentrasi 500µg dengan zona hambat 20 mm (Astuti et al., 2014). Sedangkan jeruk nipis pada bakteri *Shigella sp.* telah diteliti secara in vitro menghasilkan zona hambatan dengan rata-rata diameter 15 mm dengan konsentrasi 100% (Mukhtisari, 2012). Berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kombinasi ekstrak daun sirih dan ekstrak perasan jeruk nipis terhadap bakteri penyebab diare yaitu *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*.

METODE

Alat dan Bahan

Tabung reaksi, rak, ose bulat, beaker glass, pipet tetes, mikropipet, eppendof, blue tip, white tip, spreader glass, cawan petri, autoclave, waterbath, incubator, pinset, alumunium foil, timbangan digital, shaker, vortex, batang pengaduk, Plat KLT, Sinar UV, spritus, vakum buchner. Bahan yang digunakan: daun sirih merah (*Piper crocatum*) serbuk dan Air Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh dari CV Bina Agro, Bantul; biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* diperoleh dari lab Biologi Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta; aquadest, aquades steril, media MH dan BHI, Etanol 96%, NaCl steril, disk, DMSO 100%, alumunium foil, blue tip, white tip eppendof, alumunium foil, Plat KLT, spritus, reagen ammonia, sitroborat, vanillin-H₂SO₄.

Ekstraksi Daun Sirih Merah

Serbuk daun sirih merah 500 g, dimaserasi dalam 2,5 L etanol 96%. Perendaman dilakukan selama 24 jam dan diaduk setiap 1 jam pada suhu ruang. Sari kemudian disaring menggunakan vakum burner dan diuapkan dalam rotary evaporator 70°C. Setelah itu dikentalkan di atas

waterbath dengan suhu 60 °C, kemudian dilakukan pengulangan penyarian 3 kali. Setelah dihasilkan ekstrak yang kental, ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya (Listyorini, 2019).

Ekstraksi Perasan Jeruk Nipis

Air jeruk nipis sebanyak 500 ml, disaring menggunakan vakum buchner. Sari kemudian diuapkan dalam rotary evaporator 70 °C. Setelah itu dikentalkan di atas waterbath dengan suhu 60 °C. Setelah dihasilkan ekstrak yang kental, ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya.

Pembuatan Media

Media BHI sebanyak 3,70 gram dilarutkan dalam 100 ml akuades dengan bantuan pemanasan. Sterilisasi media menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, didinginkan pada suhu kamar, dan disimpan di lemari es hingga saatnya digunakan. Penimbangan media MH sebanyak 3,8 g yang ditambahkan dalam 100 ml akuades, disterilkan, kemudian dituang ke dalam petri sehingga diperoleh kedalaman agar ± 4 mm.

Sterilisasi Alat

Alat yang telah bersih dan kering, dibungkus kertas, ditutup aluminium foil untuk tabung reaksi, dan disterilkan menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 170 °C. Alat yang rentan terhadap panas disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Torar, 2015).

Pembuatan Larutan Uji Daun Sirih Merah

Ekstrak daun sirih merah diambil 1000, 500, 250, 125 mg/ml kemudian ditambahkan DMSO 100% hingga 1 ml dilakukan dengan bertingkat. Kemudian masing-masing seri konsentrasi diambil 10 μ L dan dimasukkan ke dalam disk kosong dan didiamkan selama 30 menit sampai disk kering.

Pembuatan Larutan Uji Perasan Jeruk Nipis

Ekstrak daun sirih merah diambil 1000, 500, 250, 125 mg/ml kemudian ditambahkan dengan DMSO 100% hingga 1 ml dengan dilakukan dengan bertingkat. Kemudian masing-masing seri konsentrasi diambil 10 μ L dan dimasukkan ke dalam disk kosong dan didiamkan selama 30 menit sampai disk kering.

Penyiapan Inokulum Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* diambil dari stok bakteri menggunakan ose steril. Kemudian bakteri yang telah diambil digoreskan pada media MH dengan metode streak plate, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Kemudian diambil 3-5 koloni dari streakplate untuk membuat suspensi bakteri, dan dilarutkan di dalam BHI steril sebanyak 4-5 mL dan dishaker selama 2-3 jam. Hasil diambil sebanyak 200 μ L dan ditambahkan NaCl steril kemudian dilihat kekeruhannya sama dengan standard Mc Farland 10⁸ CFU/mL.

Sensitivitas Antibiotik

Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* dituangkan di masing-masing media MH, kemudian didiamkan selama 3-5 menit sampai mengering. Beberapa disk antibiotik diletakkan ke media MH, disk antibiotik yang digunakan adalah ciprofloxacin, kotrimoxazol, ampicilin, dan tetrasiklin. Disk diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37 °C.

Uji Tunggal Aktivitas Antibakteri

Media MH steril dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml atau setengah dari cawan petri, kemudian media MH didiamkan di suhu ruang hingga mengeras. Sebanyak 200 μ L bakteri yang telah disamakan kekeruhannya dengan Mc Farland, kemudian diratakan menggunakan spreader glass, dan didiamkan selam 3-5 menit sampai bakteri kering. Kemudian diletakkan disk yang telah diberikan beberapa konsentrasi dari ekstrak, dengan kontrol positif

ciprofloxacin dan control negative DMSO 100%. Cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Uji Kombinasi Aktivitas Antibakteri

Media MH steril dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml atau setengah dari cawan petri, kemudian media MH didiamkan di suhu ruang hingga mengeras. Sebanyak 200 µL bakteri yang telah disamakan kekeruhannya dengan Mc Farland, dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian diratakan menggunakan spreader glass, dan didiamkan selama 3-5 menit sampai bakteri kering. Kemudian diletakkan disk kombinasi, dengan setiap disk diberi 5 µL daun sirih merah dan 5 µL perasan jeruk nipis. Konsentrasi yang digunakan 1000/250, 500/500, dan 250/1000. Menggunakan kontrol positif ciprofloxacin dan kontrol negatif DMSO 100%. Cawan petri dimasukkan inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37 °C.

Uji Bioautografi

Pembuatan larutan stok dari masing-masing ekstrak, kemudian ditotolkan ke plat KLT 1 µL sebanyak 4 kali total sampai terlihat jelas dibawah sinar UV 254, kemudian plat KLT dielus dengan pelarut N-Hexan: Etil asetat (7:3). Plat KLT yang telah terelus dengan baik kemudian diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm kemudian dihitung Rf tiap noda. Permukaan dari lempeng KLT ditempelkan di media MH yang sudah diinokulasikan bakteri selama 30 menit, kemudian plat KLT dilepaskan dan media yang telah ditempelkan oleh plat klt tersebut dimasukkan kedalam inkubator selama 18 jam pada suhu 37 °C. Kemudian dihitung zona hambat yang terlihat (Prasetya *et al.*, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Pengujian ini merupakan salah satu cara kerja untuk melihat bahwa tanaman yang digunakan merupakan tanaman daun sirih merah dan perasan jeruk nipis. Determinasi tanaman ini dilakukan di Universitas Setia Budi pada Laboratorium Morfologi Sistematis Tumbuhan, Surakarta. Determinasi tanaman ditentukan berdasarkan buku FLORA Untuk Sekolah di Indonesia (Van Steenis, 1992).

Daun sirih merah terdapat dalam perdu, berbentuk sulur dan berbatang terbagi dengan jarak 5-10 cm, dan pada setiap ruas membentuk akar. Daun bertangkai, lonjong, runcing, subakut dengan ujung meruncing di pangkal, rata, mengkilap atau tidak berbulu. Memiliki panjang x lebar 9-12 cm x 4-5 cm. Urat daun pinnatus dari separuh bagian bawah, urat daunnya 4-5 x 2, bullulatus-lacunosa. Petiolus, panjang 10 mm, spike panjang 90-110 mm, tebal 5 mm. Daun bagian atas berwarna hijau tua, dengan daerah sekitar tulang daun keperakan, dan bagian bawah berwarna ungu. Daun berlendir, pahit dan berbau. Dengan hasil determinasi: 16 - 2b - 3b - 4b - 6b - 7b- 9a- 416- 42b - 43b - 54b - 59 - 616 - 62b - 63a - 64a> Fam. Piperaceae> Piper >la > *Piper crocatum* Ruiz and Pav.

Jeruk nipis adalah pohon dengan banyak cabang, ukuran tanaman daun sirih dengan rata-rata tingginya 1,5-3,5 m dan panjang duri 0,3-1,2 cm. Memiliki tangkai daun ke arah ujung kadang-kadang bersayap sedikit, dengan model sayap beringgit melekok ke dalam memiliki panjang 0,5-2,5. Setiap daun berbentuk bulat telur ellipstis atau bulat telur memanjang, dengan pangkal bulat dan ujung tumpul, sedikit melengkung; tepi beringgit; panjang 2,5-9 cm. Bunga 1,5-2,5 cm diameternya. Daun mahkota dari luar putih kuning. Buah bentuk bola, kuning, diameter 3,5-5 cm; kulit 0,2-0,5 cm tebalnya; daging buah kuning kehijauan. Dengan hasil

determinasi: 1b-26 - 3b - 46 - 6b -76 - 9b - 10b - 11b - 12b - 13b - 14a - 15a - 109b - 119b - 120b - 128b - 129b - 135b - 136b - 1396 - 140b - 142b - 143b - 146a - 1476 - 150a- Fam. Rutaceae› la-Citrus-16 - 3b-*Citrus aurantifolia* Swingle

Hasil dari determinasi tanaman di universitas setia budi adalah benar bahwa serbuk daun sirih yang digunakan adalah *Piper crocatum* Ruz and Pav dan perasan jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian ini benar termasuk *Citrus aurantifolia* Swingle.

Ekstraksi

Ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode maserasi karena metode ini memiliki keuntungan yang lebih dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lainnya. Salah satu keuntungan utama dari metode maserasi adalah tidak dilakukan pemanasan sehingga senyawa alam tidak terurai. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi dingin yang memungkinkan banyak senyawa terekstrak (Puspitasari, 2017). Hasil rendemen ditunjukkan pada tabel 1. Rendemen ekstrak daun sirih merah yaitu 12,7% dan ekstrak perasan jeruk nipis 11,8%. Hasil rendemen ekstrak sirih merah yang baik adalah tidak kurang dari 17% (Kemenkes, 2017). Sedangkan hasil yang didapatkan kurang dari 17% dikarenakan pemanasan di waterbath terlalu lama sehingga ekstrak yang dihasilkan terlalu kering, sehingga rendemen yang dihasilkan kurang baik.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak

	Daun Sirih Merah	Jeruk Nipis
Bobot Serbuk (g)	500	500
Bobot Ekstrak Kental (g)	63,5	59,5
% Rendemen	12,7	11,8

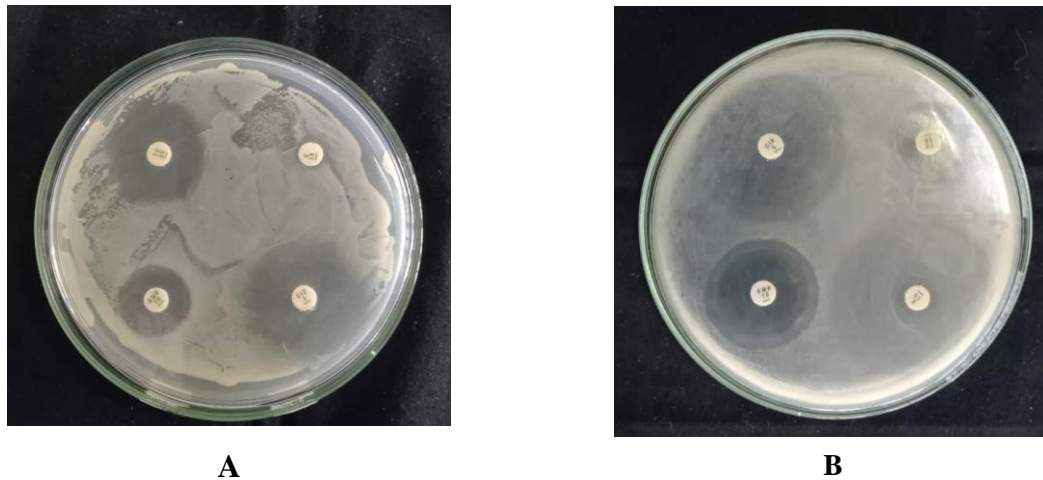
Uji Sensitivitas Antibakteri

Uji sensitivitas antibiotik merupakan tes yang digunakan untuk menguji kepekaan suatu bakteri terhadap antibiotik. Uji sensitivitas dilakukan untuk mengetahui daya hambat suatu bakteri (Wahyutomo, 2009). Semakin besar zona hambat yang dihasilkan oleh beberapa antibiotik yang diuji pada bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* maka semakin besar kemungkinan untuk menghentikan pertumbuhan bakteri.

Pada penelitian ini dilakukan uji sensitivitas antibakteri menggunakan antibiotik tetrasiklin, ampisilin, eritromicin, dan siprofloksasin. Keempat antibiotik yang diujikan bersifat sensitif terhadap bakteri uji (CLSI, 2020). Namun, berdasarkan hasil dari zona bening di sekitar disk pada gambar 1, antibiotik dengan zona hambat terbesar yaitu antibiotik siprofloksasin dengan ukuran 35 mm pada bakteri *Escherichia coli* dan 30 mm pada bakteri *Shigella flexneri*. Oleh karena itu, siprofloksasin pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif.

Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis masing-masing diujikan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* menggunakan metode difusi dengan masing-masing loading ekstrak yaitu 10, 5, 2,5, dan 1,25 mg/disk. Semakin besar konsentrasi yang diberikan, daya hambat yang dihasilkan juga semakin besar, seperti terlihat pada tabel 2. Hal ini telah sesuai dengan teori karena besarnya konsentrasi berbanding lurus dengan senyawa antibakteri yang dikeluarkan sehingga memudahkan senyawa ekstrak untuk masuk ke dalam sel (Maleki *et al.*, 2008).



Gambar 1. (A) Hasil Uji Aktivitas Antibiotik Terhadap *Escherichia coli*, (B) Hasil Uji Aktivitas Antibiotik Terhadap *Shigella flexneri*

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak daun sirih merah pada konsentrasi 500 µg memiliki rata-rata zona hambat sebesar 20 mm pada bakteri *Escherichia coli* dengan metode sumuran (Astuti *et al.*, 2014). Ekstrak perasan jeruk nipis konsentrasi 100% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella sp* sebesar 5 mm dengan metode sumuran (Mukhtisari, 2012). Pada penelitian ini didapatkan zona hambat yang dihasilkan memiliki nilai zona hambat terbesar di loading ekstrak 10 mg/disk.

Hal ini membuktikan bahwa baik *Escherichia coli* maupun *Shigella flexneri*, dapat dihambat pertumbuhannya dengan ekstrak daun sirih merah dan ekstrak jeruk nipis sehingga dapat dikembangkan menjadi obat antidiare. Nilai uji daya hambat ekstrak perasan jeruk nipis terhadap bakteri *Shigella flexneri* lebih besar daripada terhadap bakteri *Escherichia coli* dan sebaliknya ekstrak daun sirih merah memiliki zona hambat yang lebih baik pada bakteri *Escherichia coli* daripada bakteri *Shigella flexneri* dapat dilihat pada tabel 2. Sebagai analisis data lanjutan, dilakukan pengujian analisis One Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan konsentrasi uji dengan besarnya zona hambat. Didapatkan hasil ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis keduanya signifikan dikarenakan hasil analisis kedua ekstrak terhadap masing-masing bakteri <0,05 dengan nilai masing-masing 0,02 untuk bakteri *Escherichia coli* dan 0,02 untuk bakteri *Shigella flexneri* dan 0,03 untuk bakteri *Escherichia coli* dan 0,04 untuk bakteri *Shigella flexneri*.

Ekstrak daun sirih dan ekstrak jeruk nipis memiliki hasil yang positif terhadap uji ekstrak tunggal, maka dilakukan penelitian yang lebih mendalam yakni dengan mengkombinasikan kedua ekstrak. Kombinasi dilakukan dengan tujuan untuk melihat daya hambat yang lebih baik antara uji tunggal dan kombinasinya. Pengujian ini merupakan pembaruan dari penelitian sebelumnya.

Zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi pada uji bakteri *Escherichia coli* lebih kecil dari hasil penambahan uji ekstrak tunggalnya seperti yang terlihat pada tabel 2, hasil penambahan untuk konsentrasi 5:1,25; 2,5:2,5; dan 1,25:5 memiliki hasil penambahan zona hambat ekstrak tunggal 16,9; 19,3; dan 15,5. Hal ini membuktikan bahwa uji ekstrak kombinasi

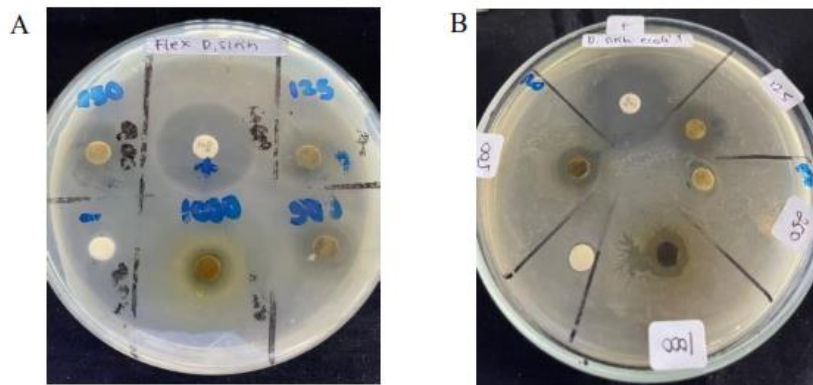
terhadap bakteri *Escherichia coli* memiliki nilai yang lebih kecil dari penjumlahan ekstrak uji tunggalnya dan dapat disimpulkan bahwa uji ekstrak kombinasi memiliki nilai aditif.

Zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi pada uji bakteri *Shigella flexneri* lebih kecil dari hasil pertambahan uji ekstrak tunggalnya (Tabel 2), dilihat dengan hasil pertambahan untuk konsentrasi 5:1,25, dan 2,5:2,5 memiliki hasil pertambahan zona hambat ekstrak tunggal 16,8, dan 18,7. Hal ini membuktikan bahwa uji ekstrak kombinasi terhadap bakteri *Shigella flexneri* memiliki nilai yang lebih kecil dari penjumlahan ekstrak uji tunggalnya dan dapat disimpulkan bahwa uji ekstrak kombinasi memiliki nilai aditif. Loading disk untuk konsentrasi 1,25:5 memiliki hasil pertambahan zona hambat ekstrak tunggal 14,8, memiliki hasil yang antagonis dikarenakan memiliki hasil yang lebih kecil daripada ekstrak tunggalnya.

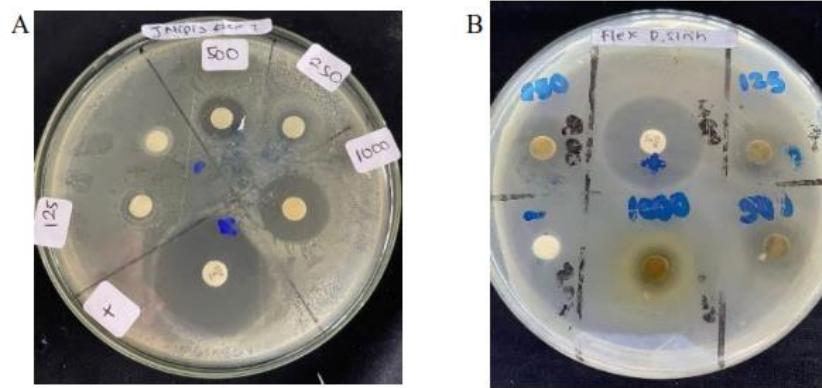
Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*

Jenis ekstrak	diameter zona hambat* (rerata ± SD mm, n=3)								K + ciprofloxacin 5 µg/disc	K - DMSO 10 µl/disc
	loading ekstrak (mg/disc)				loading ekstrak kombinasi(mg/disc) Jeruk nipis: Daun sirih					
	1,25	2,5	5,0	10	5:1,25	2,5:2,5	1,25:5			
Uji terhadap <i>E. coli</i>										
sirih merah	9,5 ± 3,3	11 ± 2,0	13 ± 2,8	14 ± 2,2	16,7 ± 1,2	14,7 ± 1,1	13,7 ± 1,2	37,5 ± 2,1	6,0 ± 0,0	
jeruk nipis	6,5 ± 0,8	8,3 ± 1,2	9,3 ± 0,6	11,7 ± 1,5				37,5 ± 2,1	6,0 ± 0,0	
Uji terhadap <i>S. flexneri</i>										
sirih merah	7,3 ± 2,3	8,7 ± 1,7	10,8 ± 0,5	12,7 ± 1,6	15,2 ± 1,2	12,2 ± 0,2	8,7 ± 0,8	37,5 ± 2,1	6,0 ± 0,0	
jeruk nipis	6,3 ± 0,6	10, ± 0,0	13,5 ± 1,5	18,3 ± 1,7				37,5 ± 2,1	6,0 ± 0,0	

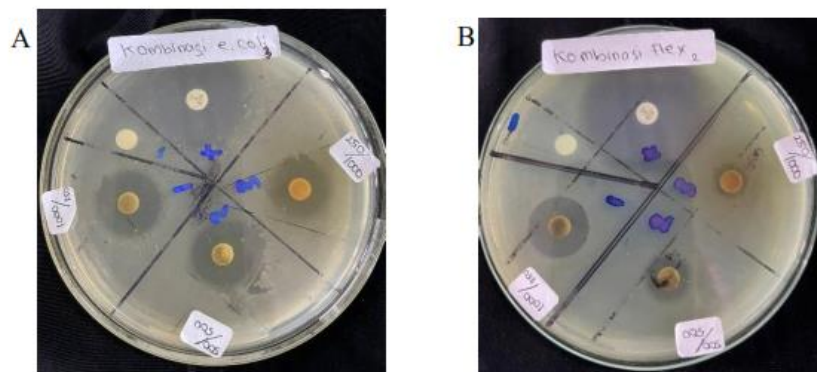
* Diameter zona hambat termasuk diameter *paper disc* 6 mm



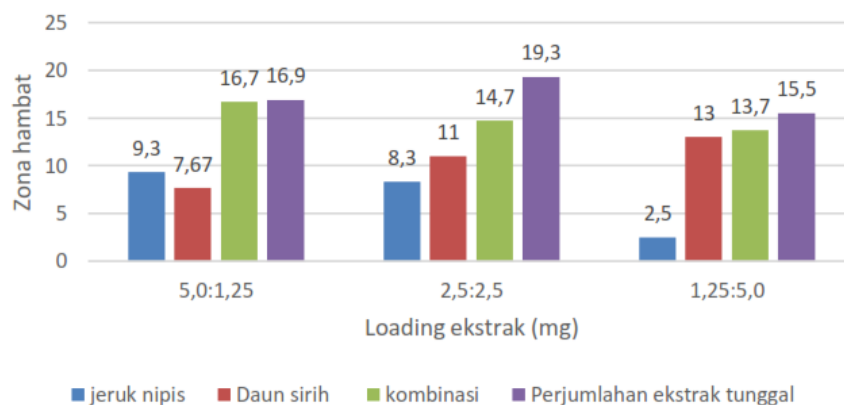
Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri (A) Ekstrak Daun Sirih Merah dan (B) Ekstrak perasan jeruk terhadap *Shigella flexneri*



Gambar 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri (A) Ekstrak Daun Sirih Merah dan (B) Ekstrak Perasan Jeruk Nipis Terhadap *Shigella flexneri*



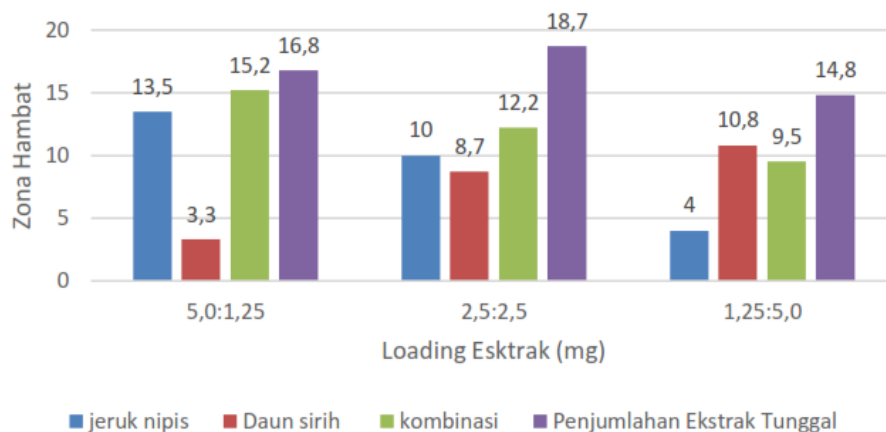
Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kombinasi (A) Bakteri *Escherichia coli* dan (B) Bakteri *Shigella flexneri*



Gambar 5. Hasil Rerata Zona Hambat Ekstrak Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Uji ekstrak kombinasi setiap konsentrasi memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan uji ekstrak tunggal keduanya terhadap bakteri *Escherichia coli*. Tetapi jika dibandingkan dengan jumlah dari kedua seri konsentrasi ekstrak tunggal maka nilai zona hambat kombinasi lebih kecil dari jumlah kedua seri konsentrasi (Gambar 5). Dapat disimpulkan bahwa uji ekstrak kombinasi memiliki nilai aditif. Begitu juga dengan kombinasi 5: 1,25 dan 2,5:2,5 terhadap bakteri *Shigella flexneri* (Gambar 6) bersifat aditif. Pada kombinasi 1,25:5,0 terhadap bakteri

Shigella flexneri memiliki nilai antagonis dikarenakan hasil kombinasi lebih kecil daripada ekstrak tunggal daun sirih merah. Sebagai analisis data lanjutan, dilakukan pengujian analisis One Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan konsentrasi uji dengan besarnya zona hambat. Didapatkan hasil ekstrak kombinasi keduanya signifikan terhadap ekstrak tunggalnya, dikarenakan hasil analisis kedua ekstrak terhadap masing-masing bakteri <0,05 dengan nilai masing-masing 0,06 pada bakteri *Escherichia coli* dan 0,01 pada bakteri *Shigella flexneri*.



Gambar 6. Hasil Rerata Zona Hambat Ekstrak Terhadap Bakteri *Shigella flexneri*

Uji Bioautografi

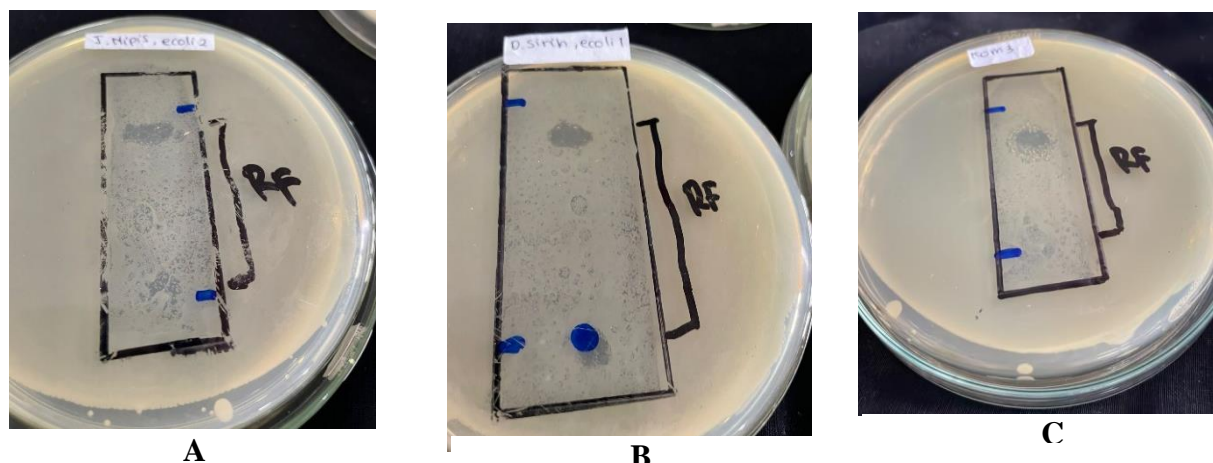
KLT-Bioautografi adalah metode pendeteksian untuk menemukan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisir aktivitas antimikroba pada kromatogram. Bioautografi yang dilakukan adalah bioautografi langsung yang merupakan metode untuk melihat senyawa antimikroba yang belum diidentifikasi dengan cara meletakkan plat KLT pada media yang telah ditumbuhi oleh bakteri (Akhyar, 2010).

Pada bioautografi ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Shigella flexneri* terdapat zona hambat bercak aktif pada nilai Rf masing-masing Rf 0,82 dan 0,84. Sedangkan Rf bercak aktif ekstrak perasan jeruk nipis diperoleh dengan nilai 0,71 dan 0,73. Rf bercak aktif kombinasi ekstrak sirih merah dan ekstrak jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* memiliki nilai 0,73 (Tabel 3, gambar 7 dan 8). Ekstrak kombinasi yang diujikan untuk bioautografi hanya dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* dikarenakan bakteri tersebut memiliki nilai yang aditif di semua perbandingan kombinasi.

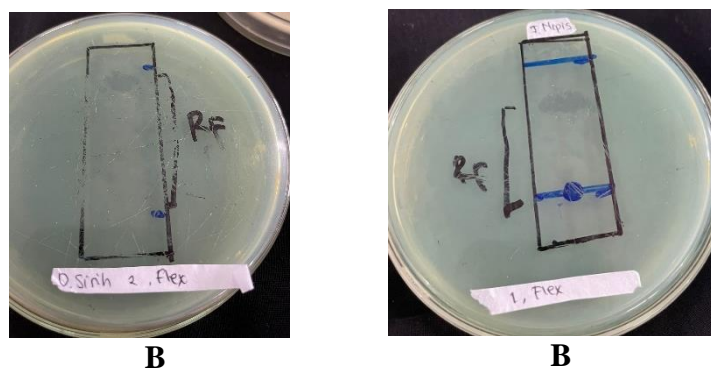
Penentuan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada bioautografi dilakukan dengan membandingkan zona jernih yang terbentuk pada media dengan hasil identifikasi KLT yang telah direaksikan menggunakan pereaksi Ammonia, Sitroborat, dan Vanilin-H₂SO₄ 10%. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa pada zona tersebut diduga senyawa golongan flavonoid dan fenol memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*.

Tabel 8. Hasil Uji Bioautografi

	Rata-rata Rf	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Kombinasi	0,73	Tidak diujikan
Daun Sirih Merah	0,82	0,84
Jeruk Nipis	0,71	0,73



Gambar 5. Hasil Uji Bioautografi Ekstrak Pada Bakteri *Escherichia coli*. (A) Uji Bioautografi Jeruk Nipis; (B) Uji Bioautografi Daun Sirih Merah; (C) Uji Bioautografi Kombinasi



Gambar 6. Hasil Uji Bioautografi Ekstrak Pada Bakteri *Shigella flexneri*. (A) Uji Bioautografi Jeruk Nipis; (B) Uji Bioautografi Daun Sirih Merah

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan pengujian yang bertujuan untuk melihat pemisahan komponen kimia yang terkandung di dalam suatu ekstrak berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi dengan bantuan fase diam dan fase gerak. Pergerakan yang terjadi setelah diberi fase gerak disebabkan karena adanya daya serap adsorben terhadap senyawa kimia yang tidak sama sehingga senyawa kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat polaritasnya (Stahl, 2013).

Pada penelitian ini dilakukan uji KLT ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis yang dielusi dengan fase gerak N-Hexan: Etil Asetat (7:3) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254, pada penelitian ini menggunakan UV 254 nm dan UV 366 nm untuk mengetahui senyawa apa saja yang terdapat di dalam ekstrak daun sirih merah dan ekstrak jeruk nipis dengan menggunakan reagen semprot ammonia untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid, reagen sitroborat untuk mengetahui kandungan senyawa flavonol, dan reagen vanillin asam sulfat 10% untuk mengetahui kandungan senyawa terpenoid.

Tabel 4. Hasil Uji KL T pada Ekstrak Daun Sirih Merah

Nomor bercak	Rf	UV	UV	Ammonia		Sitroborat	Vanillin- H ₂ SO ₄	Senyawa
		254	366	Vis	UV 366	UV 366	Vis	
1	0	P	H	K	B	B	-	Flavonoid
2	0,2	P	M	-	B	-	-	Flavonoid
3	0,4	P	M	-	M	M	-	-
4	0,5	P	U-M	C	U-M	U-M	-	-
5	0,7	P	H	-	P	H	-	Flavonol
6	0,8	P	P	C	B	-	-	Flavonoid

Keterangan :

K : Kuning

B : Biru

P : Pemasaman

U-M : Ungu Merah

C-K : Coklat Kekuningan

C : Coklat

H: Hijau

J-K : Jingga Kecoklatan

M : Merah

Hasil uji KLT pada ekstrak daun sirih memiliki nilai Rf 0 karena pada tempat penotolan ekstrak masih terdeteksi adanya senyawa flavonoid, hal ini mungkin disebabkan oleh senyawa yang belum terelusi dengan sempurna. Senyawa flavonoid dapat dilihat menggunakan reagen semprot ammonia dengan hasil positif berwarna kuning pada sinar tampak dan warna biru pada UV 366 (Gandjar, 2007). Rf 0, Rf 0,2, dan Rf 0,8 positif mengandung senyawa flavonoid. Sehingga hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa antibakteri flavonoid, jenis flavonoid yang mungkin terkandung di dalam ekstrak daun sirih merah yaitu isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas (Markham,1988). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat dalam sel bakteri menghambat fungsi membran sel bakteri dan menghambat metabolisme energi sel bakteri (Azmi *et al.*, 2020). Menurut Sitepu *et al.*, (2020), reagen semprot sitroborat akan menghasilkan spot berwarna hijau kekuningan pada sinar UV 366 nm, dilihat pada tabel 4 yang menghasilkan warna hijau pada Rf 0, 7, hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sirih memiliki senyawa flavonol. Secara teori senyawa flavonol yang ada pada daun sirih yaitu flavonoid, lignin, dan tannin (Harboner,1987) (Tabel 4).

Ekstrak perasan jeruk nipis masih memiliki nilai Rf 0 yaitu bercak pada totolan, hal ini membuktikan bahwa senyawa belum terelusi dengan sempurna, nilai Rf 0, 7 dan 0,8 memiliki senyawa flavonoid (Tabel 5). Kombinasi ekstrak daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis memiliki senyawa flavonoid dan flavonol dilihat pada Rf 0,2, 0,7 dan 0,8 (Tabel 6). Menurut Gandjar (2007), ekstrak positif mengandung terpenoid apabila setelah disemprot menggunakan reagen vanillin-asam sulfat 10% lalu dipanaskan di dalam oven selama 5 menit pada suhu 105 °C ketika diamati secara visual akan terlihat adanya noda/spot berwarna ungu kemerahan atau ungu. Tetapi pada hasil uji KLT ini setelah disemprot dengan reagen vanillin-asam sulfat 10% secara visual tidak terlihat adanya noda berwarna ungu kemerahan atau ungu, hal itu dikarenakan pereagen semprot yang digunakan sudah rusak atau kandungan minyak atsiri yang telah menguap saat pemanasan di waterbath.

Tabel 5. Hasil Uji KLT pada Ekstrak Perasan Jeruk Nipis

Nomor bercak	Rf	UV		Ammonia		Sitroborat	Vanillin- H ₂ SO ₄	Senyawa
		254	366	Vis	UV 366	UV 366	Vis	
1	0	P	C	C	K	K	-	-
2	0,2	P	-	-	-	H	-	Flavonol
3	0,4	P	P	-	-	-	-	-
4	0,5	P	-	-	-	-	-	-
5	0,7	P	P	K	B	B	-	Flavonoid
6	0,8	P	P	K	B	-	-	Flavonoid

Keterangan:

K : Kuning

B : Biru

H : Hijau

C : Coklat

P : Pemadaman

Tabel 6. Hasil Uji KLT pada Ekstrak Kombinasi

Nomor bercak	Rf	UV		Ammonia		Sitroborat	Vanillin- H ₂ SO ₄	Senyawa
		254	366	Vis	UV 366	UV 366	Vis	
1	0	P	C	C	K-M	K	-	-
2	0,2	P	P	-	-	K-H	-	Flavonol
3	0,4	P	P	-	M	-	-	-
4	0,5	P	-	-	-	U	-	-
5	0,7	P	P	K	B	B	-	Flavonoid
6	0,8	P	P	K	H	H	-	Flavonol

Keterangan:

K : Kuning

B : Biru

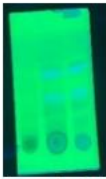
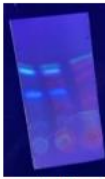




K-M: Kuning-Kemerahan

C : Coklat

P : Pemadaman

H: Hijau

Tabel 7. Hasil Uji KL T

Sebelum		Setelah			
UV 254	UV 366	Amonia		Sitroborat	Vanilin-H ₂ SO ₄
		Vis	UV 366	UV 366	Vis
					
A B C	A B C	A B C	A B C	A B C	A B C

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol Daun sirih merah dan perasan jeruk nipis dapat menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* dalam konsentrasi terbesar dan dapat disimpulkan semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar pula zona hambat yang dihasilkan. Berdasarkan ekstrak tunggal yang diperoleh dapat dikombinasikan kedua ekstrak dan menghasilkan zona hambat terbesar pada 16,7 mm pada bakteri *Escherichia*

coli dan 15,2 mm pada bakteri *Shigella flexneri*. Uji KLT-Bioautografi ekstrak daun sirih merah dan perasan jeruk nipis positif terdapat senyawa flavonoid, fenolik, dan minyak atsiri.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sirih merah dan ekstrak perasan jeruk nipis dapat menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar pula zona hambat yang dihasilkan. Ekstrak tunggal ekstrak perasan jeruk nipis menghasilkan daya hambat yang lebih baik pada bakteri *Shigella flexneri* sedangkan ekstrak daun sirih merah lebih baik terhadap *Escherichia coli*. Uji kombinasi yang diperoleh bernilai aditif untuk konsentrasi 5:1,25 dan 2,5:2,5 pada bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri*. Uji kombinasi pada konsentrasi 1,25:5,0 bakteri *Shigella flexneri* memiliki nilai antagonis dikarenakan nilai kombinasi lebih kecil daripada ekstrak tunggal daun sirih. Rf bercak aktif yang dapat menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* adalah senyawa flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti P., Wahyono and Nababan O.A., 2014, Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (Suppl 2), S592-S596.
- Betina, *Analytical Microbiology*, Vol.II, Academic Press, London, New York.1972
- Cahyono, Wulan. 2013. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper corcatum* Ruiz and Pav) Dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* *Shigella dysenteriae*, dan *Staphylococcus aureus* Beserta Bioautografinya. *Naskah Publikasi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- CLSI, 2020, CLSI M100-ED29: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th Edition, Dalam CLSI,
- Cronquist, A. (1981) *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York, 248-250.
- Dian, S., 2011. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih terhadap Daya Hambat *Escherichia coli*. *Jurnal UN Gorontalo*.
- Di Carlo, G. 1999, Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs, *Life. Sci.*, 65 (4): 337-53
- Gandjar, I.G., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- GBIF S., 2021, *Aloe vera*, GBIF.org Terdapat di: <https://www.gbif.org/species/2777724>
- Harbone, *Metode Fitokimia Penuntun Teknik Analisa Cara Moderen*. Chapman and Hill, London, 1987.
- Hendarto, Dano. 2019. *Khasiat Jitu Daun Kelor dan Daun Sirih Merah Tuntas Penyakit*. Yogyakarta : Laksana.
- Istiqomah. (2013). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*). *Skripsi Jurusan Farmasi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*.

- Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, 327-335, 362-363, Penerbit Salemba Medika, Jakarta
- Juliantana, F., 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Kemenkes, 2017, *Farmakope Herbal Indonesia* Edisi II, Kemenkes, Jakarta.
- Kemenkes, 2014, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Terdapat di: <https://www.kernkes.go.id/article/view/13010200028/diare.html>
- Listyorini, Desi. 2019. Uji Daya Hambat Antibakteri Kombinasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. Karya Tulis Ilmiah: D 3 Farmasi STIKES Bhakti Husada Mulia.
- Maleki S., Seyyednejad S.M., Mirzaie Damabi N. and Motamedi H., 2008, Antibacterial activity of the fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens, *Pakistan journal of biological sciences: PJSB*, 11 (9), 1286-1289. Terdapat di: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18819541/>
- Mirzoeva, 1997, Antimicrobial Action of propolis and Some of Its Components: the Effect on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria, *Microbial. Res.*, 152 (5):239-46.
- Mukhtasari, D.A., 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*, Swingle) Terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. *Skripsi* : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Owusu-Asiedu A., Nyachoti C.M. and Marquardt R.R., 2003, Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic, *Journal of animal science*, 81 (7), 1790-1798.
Terdapat di: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12854816/> [Diakses pada June 28, 2022].
- Prasetya F., Arifuddin M. and Ibrahim A., 2021, Identifikasi Senyawa Marker Dominan Ekstrak Daun Sirih Hitam dan Kuantifikasi Berdasarkan Perbedaan Lokasi Tanam, *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3 (2), 147-157.
- Puspitasari, A.D., Prayogo, L.S., 2017, Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*), *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 1 (2), 1-8.
- Rachmawaty, F.J., Dewa, A., Bunga, N., Nurmasitoh, Endrawati, 2009, Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, Vol 1, No 1.
- Stahl, E., 2013, *Thin-Layer Chromatography*. Terdapat di: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-88488-8>
- Verma, P., 2007, *Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interaction : Synerg Testing, Time-Kill Curves, and Population Analysis*. In Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (eds.) *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, Boca Raton: CRC Press.
- Wahyutomo, R., 2009, Resistensi antibiotika. Terdapat di: <https://drridhowahyutomo.blogspot.com/2009/08/resistensi-antibiotika.html>

WHO, 2014, *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*, Terdapat
di:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/92455>