

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sirih (*Piper betle* L.)

Piper betle L. atau juga biasa disebut dengan sirih merupakan salah satu jenis tumbuhan dari famili *Piperaceae* yang sering digunakan sebagai obat dan salah satu bagian dari berbagai budaya masyarakat di Asia termasuk Indonesia. Masyarakat lokal di Asia termasuk yang ada Indonesia memiliki kebiasaan mengunyah daun/bunga sirih yang dinamakan menyirih (Silalahi, 2019).

Daun sirih digunakan secara turun temurun dalam pengobatan tradisional seperti pengobatan batuk, sakit gigi, penyegar dan sebagainya. Bagian-bagian dari tanaman sirih seperti akar, biji dan daun memiliki potensi untuk pengobatan, akan tetapi yang paling sering dimanfaatkan untuk pengobatan daunnya. Pemanfaatan tradisional ini disebabkan adanya sejumlah zat kimia atau bahan alami yang punya aktivitas sebagai senyawa antimikroba pada daun sirih (Putri dkk., 2019).

1. Klasifikasi tanaman sirih (*Piper betle* L.)

Berdasarkan taksonomi tumbuhan sirih (*Piper betle* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Pradhan dkk., 2013; Mubeen, Periyanyagam dan Basha, 2014) :

Kingdom : *Plantae*
Subkingdom : *Tracheobionta*
Super Divisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Sub Kelas : *Magnoliidae*
Ordo : *Piperales*

Famili : *Piperaceae*

Genus : *Piper*

Species : *Piper betle* L.



Dokumen pribadi

Gambar 1. Tumbuhan sirih (*Piper betle* L.)

2. Morfologi tanaman sirih (*Piper betle* L.)

Tanaman ini memiliki penampilan berupa semak berkayu di bagian pangkal, memanjat dan merambat, panjang tanaman kurang lebih mencapai 15 m. Batang sirih berwarna coklat kehijauan berbentuk bulat, beruas dan merupakan tempat keluarnya akar. Daun tanaman sirih berjenis tunggal, berbentuk bulat telur sampai lonjong, dengan duduk daun berseling, panjang 5-15 cm, lebar daun 2-10 cm, dengan tepi daun yang rata dan ujung daun meruncing, serta pangkal daun yang membulat, tulang daun menyirip, dengan aroma yang kuat, dan permukaan yang halus juga licin (Widiyastuti, Haryanti dan Subositi, 2016). Sirih memiliki bunga majemuk dan berbentuk bulir. Pada bulir jantan panjangnya sekitar 1,5 - 3 cm dan terdapat dua benang sari yang pendek sedang pada bulir betina panjangnya sekitar 2,5 - 6 cm dimana terdapat kepala putik tiga sampai lima buah berwarna putih dan hijau kekuningan. Sirih memiliki akar bertipe akar panjat, dimana akar sirih merupakan akar tunggang yang berbentuk bulat dan berwarna coklat

kekuningan. Buah tanaman sirih merupakan buah buni yang berbentuk bulat dengan ujung yang tumpul, bulir pada buah berbulu, tersusun rapat, dan berwarna kelabu (Putri dkk., 2019).

3. Kandungan senyawa aktif tanaman sirih (*Piper betle* L.)

Daun sirih (*Piper betle* L.) mengandung senyawa steroid/terpenoid, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan minyak atsiri (Agustina, Ruslan dan Wiraningtyas, 2016; Rukmini, Utomo dan Laily, 2020). Daun sirih mengandung minyak atsiri 0,8-1,8% yang terdiri atas kavikol, kavibetol (betel fenol), alilpirokatekol (hidroksikavikol). Kandungan senyawa lain adalah alilpirokatekol mono dan diasetat, asam nikotianat, estragol, eugenol metileter, fenilpropan, kadinen, kariofilen, karoten, karvakrol, p-simen, riboflavin, seskuioterpen, sineol, tanin, terpen, tiamin, vitamin C, gula, pati, dan asam amino (Vikash dkk., 2012).

Dwivedi dan Tripathi (2014) menjelaskan ada beberapa senyawa aktif penting yang ada pada daun sirih yaitu kavibetol, *eugenol*, *hydroxychavicol* (HC), *allylpyrocatechol*, quercetin, dan β -caryophyllene.

a. Kavibetol

Kavibetol adalah senyawa alami yang berasal dari kelas fenilpropanoid. Kavibetol adalah salah satu komponen penting yang terdapat pada minyak atsiri dari tanaman sirih. Kavibetol merupakan senyawa aromatik yang memiliki bau pedas, selain itu juga kavibetol merupakan isomer dari eugenol (Bhalerao dkk., 2013).

b. *Eugenol*

Eugenol adalah salah satu penyusun utama dari daun sirih, eugenol telah terbukti memiliki sifat anti-inflamasi dalam berbagai variasi dalam studi dengan

sampel hewan dengan berbagai jenis inflamasi. Selain itu, aktivitas lainnya yang teridentifikasi seperti antimikroba, analgesik, antioksidan, antivirus, antidepresan, dan anti kanker (Kamatou, Vermaak dan Viljoen, 2012; Vikash dkk., 2012).

c. *Hydroxychavicol*

Daun sirih muda mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bermanfaat, di antaranya adalah *hydroxychavicol*, *hydroxychavicol* adalah senyawa fenolik penting yang dilaporkan dimiliki efek *anticarcinogenic*, *antinitrosation*, *antimutagenic* (Vikash dkk., 2012). Selain itu, *hydroxychavicol* memiliki potensi yang cukup besar untuk bertindak sebagai antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, dan memiliki efek antitrombotik tanpa mengganggu fungsi hemostatik. Ekstrak dengan air sebagai pelarutnya (*aqueous extract*) dari daun sirih dilaporkan memiliki efek antimutagenik dan antikarsinogenik, sedangkan ekstrak yang diisolasi dengan pelarut kloroform dari *aqueous extract* daun sirih menunjukkan aksi penghambatan pada patogen yang terdapat pada rongga mulut (Kamatou, Vermaak dan Viljoen, 2012).

d. *Allylpyrocatechol*

Allylpyrocatechol merupakan senyawa fenolik yang diperoleh dari daun tanaman *Piper betle* L., *allylpyrocatechol* menunjukkan aktivitas terhadap bakteri anaerob oral obligat yang bertanggung jawab untuk halitosis. *Allylpyrocatechol* pada ekstrak daun juga memiliki efek stimulasi pada lipase pankreas dan memiliki aktivitas antioksidan (Pradhan, Biswasroy dan Suri, 2014).

e. Quercetin

Quercetin juga telah diverifikasi memiliki sifat antivirus, antibakteri, *anticarcinogenic* dan antiinflamasi. Sifat antikarsinogenik dari senyawa quercetin

memiliki dampak penting dalam peningkatan apoptosis sel yang bermutasi, penghambatan sintesis DNA, dan penghambatan pertumbuhan sel kanker. Dari penelitian dengan sampel hewan membuktikan efek antioksidan quercetin memberikan perlindungan otak, jantung, dan jaringan lain yang dengan cedera fusi iskemia, terpapar senyawa toksik, atau faktor lain yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Gregory dan Kelly, 2011).

f. β -Caryophyllene

β -Caryophyllene adalah senyawa volatil utama yang terbentuk dalam jumlah besar dalam berbagai spesies rempah-rempah dan tanaman pangan. β -Caryophyllene telah terbukti memiliki sifat anti-inflamasi yang cukup kuat. Studi klinis juga membuktikan efisiensi β -caryophyllene dalam mengobati endometriosis. β -Caryophyllene juga memiliki aktivitas anti-reumatik yang menonjol, hal ini mungkin dikaitkan dengan aktivitas anti-inflamasinya (Vijayalaxmi dkk., 2015).

4. Aktivitas senyawa antibakteri daun sirih (*Piper betle* L.)

Daun sirih (*Piper betle* L.) mengandung senyawa steroid/terpenoid, alkaloid, flavonoid, katekin, saponin, tanin dan minyak atsiri yang membuat daun sirih memiliki potensi yang baik sebagai antibakteri (Hanum, Ismalayani dan Syanariah, 2012; Agustina, Ruslan dan Wiraningtyas, 2016; Rukmini, Utomo dan Laily, 2020).

Alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, sehingga terjadinya kematian sel (Amalia, Sari dan Nursanty, 2018).

Flavonoid mempunyai kemampuan untuk berinteraksi dengan DNA pada bakteri, yang menyebabkan penghambatan fungsi membran sitoplasma bakteri dengan cara mengurangi fluiditas dari membran luar dan dalam sel bakteri. Akhirnya pada dinding sel bakteri terjadi kerusakan permeabilitas, sehingga membran sel tidak berfungsi dengan baik, termasuk untuk melakukan pelekatan dengan substrat. Selain itu juga rusaknya membran sitoplasma akan menyebabkan bocornya metabolit penting, sehingga menonaktifkan system enzim pada sel bakteri (Liantari, 2014; Sudirman, 2014).

Steroid yang pada daun sirih akan berinteraksi dengan membran fosfolipid sel bakteri yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa *lipofilik*, hal ini akan menyebabkan integritas membran sel bakteri menurun serta morfologi membran sel berubah, dan akhirnya akan menyebabkan sel menjadi rapuh dan lisis (Madduluri, Babu Rao dan Sitaram, 2013).

Apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri, saponin akan menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel bakteri. Hal ini dikarenakan saponin merupakan zat aktif yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi hemolisis pada sel. Pada kesimpulannya apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri akan menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel bakteri (Madduluri, Babu Rao dan Sitaram, 2013).

Tanin memiliki target pada dinding polipeptida dinding sel bakteri, dimana tanin menyebabkan pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna dan kemudian sel bakteri akan mati. Selain itu, tanin juga memiliki kemampuan untuk menonaktifkan enzim bakteri serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Ngajow, Abidjulu dan Kamu, 2013).

Cara kerja katekin sebagai antibakteri adalah dengan mendenaturasi protein dari bakteri. Protein yang telah mengalami denaturasi akan kehilangan aktivitas fisiologis sehingga tidak dapat berfungsi dengan baik. Perubahan struktur protein pada dinding sel bakteri akan menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, sehingga pertumbuhan sel akan terhambat dan akhirnya mengakibatkan rusaknya sel bakteri (Hanum, Ismalayani dan Syanariah, 2012).

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mengandung minyak atsiri dengan komposisi 30% fenol dan beberapa derivatnya yang sebagian besar terdiri dari *Chavicol paraallyphenol* turunan dari *Chavica betel*. Isomer *Euganol allypyrocatechine*, *Cineol methil euganol* dan *Caryophyllen*, kavikol, kavibekol, estragol, terpinen. Senyawa-senyawa tersebut merupakan turunan dari senyawa fenol yang memiliki sifat antibakteri lima kali lipat lebih besar daripada senyawa fenol biasa. Mekanisme kerja fenol sebagai agen antibakteri adalah sebagai toksin dalam protoplasma, dimana fenol akan merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik memiliki molekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel bakteri meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah (Syahrinastiti, Djamal dan Irawati, 2015).

Menurut Chakraborty dan Shah (2011) sterol adalah senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri pada ekstrak daun sirih. Interaksi permukaan molekul sterol yang ada pada ekstrak dengan dinding dan membran sel bakteri menyebabkan terbentuknya lubang dan degradasi pada komponen bakteri. Sehingga menyebabkan gangguan daya permeabilitas dari struktur membran bakteri.

5. Penelitian terkait aktivitas antibakteri daun sirih (*Piper betle* L.)

Aktivitas antibakteri dari berbagai jenis pelarut pada ekstraksi daun sirih menunjukkan aktivitasnya terhadap organisme, *Bacillus pumalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* (Chakraborty dan Shah, 2011; Agarwal dan Singh, 2012).

Hasil penelitian Agarwal dan Singh (2012) menunjukkan bahwa minyak atsiri dari sirih memiliki MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) untuk *Staphylococcus aureus* pada 125 μ g/mL, *Streptococcus pyogenes* 15,60 μ g/mL. Dan zona hambatan pertumbuhan 67,50mm untuk *Staphylococcus aureus*, 90mm untuk *Streptococcus pyogenes*, hal ini menunjukkan bahwa minyak atsiri dari sirih adalah antibakteri yang sangat efektif.

Kursia, Lebang dan Nursamsiar (2016) dalam hasil penelitiannya menjelaskan ekstrak etil asetat daun sirih hijau pada konsentrasi 5% dan 3% memiliki daya hambat sebesar 15mm dan 9,8mm (kategori kuat dan sedang) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Dalam penelitian Widyaningtiyas, Yustiantara dan Paramita (2014) ekstrak terpurifikasi daun sirih hijau pada konsentrasi 20mg/mL menghasilkan diameter zona hambatan sebesar 21,08mm, sehingga dapat disimpulkan ekstrak terpurifikasi daun sirih hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yang sangat kuat.

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 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi 15% (Manarisip, Fatimawa dan Rotinsulu, 2020).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Kapondo, Jayanti dan Fatimawali, (2020) menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki kandungan senyawa alkaloid jenis indol dimana nilai absorbansinya adalah 0.632 dan 0.582 dengan panjang gelombang 262 nm dan 274 nm. Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan ditandai terjadinya penurunan densitas optik sebelum dan sesudah inkubasi pada konsentrasi 25, 20, 15 dan 10%, sedangkan terjadi kenaikan nilai densitas optik sebelum dan sesudah inkubasi pada konsentrasi 5%, sehingga dapat diketahui nilai KHM berada pada konsentrasi 10%.

Hasil penelitian Willianti, Theodora dan Parmasari (2020) menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri pada rebusan daun sirih dengan zona hambat pertumbuhan yang tertinggi yaitu sebesar 17mm dan yang terendah yaitu 15mm dengan rata-rata 15,81mm, hal ini menunjukkan rebusan daun sirih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

B. Bakteri *Staphylococcus aureus*

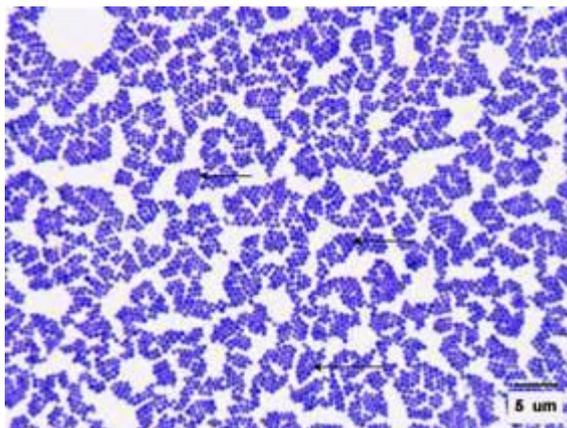
1. Morfologi dan klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Sebagian bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *Staphylococcus aureus* yang patogen bersifat invasif (Brooks dkk., 2012). Adapun klasifikasi dari bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut (Karomah, 2019):

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*
Filum : *Firmicutes*
Kelas : *Bacillis*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram-positif (berwarna ungu jika diwarnai oleh pewarnaan Gram) yang berbentuk *cocci* dan cenderung tersusun dalam *cluster* yang digambarkan berbentuk mirip anggur. Pada media, organisme ini dapat tumbuh pada kadar garam 10%, dan koloni *Staphylococcus aureus* sering berwarna keemasan atau kuning (kata *aureus* berarti emas atau kuning). Organisme ini dapat tumbuh secara aerob atau anaerobik (fakultatif) dan pada suhu antara 18°C dan 40°C. Tes identifikasi biokimia yang umum dilakukan dalam mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* meliputi katalase positif (semua spesies *Staphylococcus* patogen), koagulase positif (untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya), sensitif terhadap novobiocin untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari *Staphylococcus saprophyticus*), dan fermentasi manitol positif (untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus epidermidis*) (Rasigade dan Vandenesch, 2014).



(Taylor dan Unakal, 2020)

Gambar 2. *Staphylococcus aureus* dengan pewarnaan Gram

2. Patofisiologi *Staphylococcus aureus*

Infeksi *Staphylococcus aureus* adalah salah satu infeksi bakteri yang paling umum terjadi pada manusia, termasuk bakteremia, infeksi endokarditis, infeksi kulit dan jaringan lunak (impetigo, folikulitis, furunkel, bisul, selulitis, gejala kulit melepuh, dan lain-lain), osteomielitis, artritis septik, infeksi alat prostetik, infeksi paru (pneumonia dan empiema), gastroenteritis, meningitis, sindrom syok toksik, dan infeksi saluran kemih (Tong dkk., 2015).

Patofisiologi dari infeksi *Staphylococcus aureus* sangat bervariasi tergantung pada jenis infeksi *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* memiliki mekanisme untuk menghindari respon imun inang dengan memproduksi kapsul antiphagocytic, menyamar menjadi Protein A, pembentukan biofilm, memiliki kemampuan bertahan hidup pada intraseluler, dan memblokir kemositaksis leukosit (Taylor dan Unakal, 2020).

Staphylococcus aureus adalah patogen berbahaya yang dapat menyebabkan berbagai penyakit parah. Virulensi *Staphylococcus aureus* ditentukan oleh sejumlah besar faktor virulensi, salah satunya adalah racun yang disekresikan oleh *Staphylococcus aureus*, racun ini memainkan peran utama. Kebanyakan racun dari

bakteri *Staphylococcus aureus* mengakibatkan kerusakan membran biologis, yang menyebabkan kematian sel. Selain daripada itu, *Staphylococcus aureus* menghasilkan hemolisin dan leukotoksin yang kuat yang teridentifikasi berfungsi untuk melisiskan neutrofil. Selain itu, *Staphylococcus aureus* mengeluarkan banyak faktor yang mencegah pertahanan tubuh untuk mengenalinya (Otto, 2014).

Foster dan Geoghegan (2014) menjelaskan protein yang ada pada permukaan bakteri *Staphylococcus aureus*, memungkinkan bakteri melekat pada sel dan jaringan inang, yang berfungsi untuk menyerang epitel dan sel endotel, untuk membentuk biofilm dan menghindari respon imun. Protein yang disekresikan mengganggu komplemen dan menghambat respons kekebalan, sementara racun sitolitik merusak neutrofil dan jenis sel lainnya. Sekresi dari banyak faktor virulensi dikendalikan oleh *accessory gene regulator* (Agr) yang merespon kepadatan sel.

3. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pertama kali dijelaskan di Inggris pada tahun 1961, segera setelah methicillin diperkenalkan ke dalam praktek klinis (Lee dkk., 2018). Koloni *Staphylococcus aureus* dengan sepuluh garis keturunan utama merupakan koloni yang bertanggung jawab atas kebanyakan infeksi. Transfer DNA antar garis keturunan dikendalikan oleh sistem pembatasan modifikasi (*restriction-modification systems*), sebagian dikodekan dalam *genomic island*. Elemen genetika seluler umumnya ditemui dalam isolasi klinis. Mereka mengkodekan faktor virulensi dan resistensi antibiotik. Kromosom akan mengkode kemampuan resistensi terhadap methicillin dan semua antibiotik β -laktam yang tersedia secara klinis (Foster dan Geoghegan, 2014).

Meskipun infeksi MRSA terjadi secara global, hal ini tidak termasuk salah satu jenis pandemi. Sebaliknya, MRSA cenderung terjadi dalam gelombang infeksi, seringkali ditandai dengan munculnya strain dominan secara berantai. Contoh terbaru dari strain MRSA yang muncul adalah *health-care-associated* MRSA (HA-MRSA) *clonal complex 30* (CC30) di Amerika Utara dan Eropa, *community-associated* MRSA (CA-MRSA) USA300 di Amerika Utara dan *livestock-associated* MRSA (ST398) dan ST93 di Australia (McAdam dkk., 2012; Casey dkk., 2013; David dkk., 2014).

MRSA dapat menginfeksi hampir semua bagian tubuh, oleh karena itu penanganan yang efektif merupakan hal yang paling menentukan dalam kasus infeksi. Ekokardiografi dan konsultasi penyakit menular (yaitu, evaluasi oleh dokter dengan pelatihan subspecialisasi penyakit menular) memiliki peran penting pada kasus infeksi *Staphylococcus aureus*. Disisi lain, beberapa antimikroba baru telah dikembangkan untuk melawan MRSA dan dalam berbagai tahap uji klinis, termasuk ceftaroline, ceftobiprole, dalbavancin, oritavancin, iclaprim, dan delafloxacin (McAdam dkk., 2012; Corey dkk., 2016; Huang dkk., 2017; O’Riordan dkk., 2018).

C. Simplisia, Ekstrak dan Metode Ekstraksi

Dalam buku Materia Medika Indonesia, ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral) (Endarini, 2016).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Untuk mendapatkan ekstrak perlu dilakukan ekstraksi, dimana ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang terdapat pada simplisia. Jenis ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Ada dua jenis ekstraksi yang bisa dilakukan yaitu ekstraksi dingin dan ekstraksi panas.

1. Ekstraksi dingin

a. Maserasi

Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar (Tetti, 2014). Namun disisi lain, metode ekstraksi secara maserasi memiliki kelebihan antara lain, peralatan yang digunakan cukup sederhana, teknik pengerjaannya pun relatif sederhana dan mudah dilakukan, biaya operasionalnya juga relatif rendah, baik untuk digunakan dalam mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil karena maserasi dilakukan tanpa pemanasan (Marjoni, 2016).

Selain itu, Marjoni (2016) juga menjelaskan prinsip kerja dari maserasi adalah proses melarutnya zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut atau

disebut juga dengan *like dissolved like*. Ekstraksi zat aktif dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pelarut yang digunakan, akan menembus dinding sel dan kemudian masuk ke dalam sel tanaman yang penuh dengan zat aktif. Pertemuan antara zat aktif dan pelarut akan mengakibatkan terjadinya proses pelarutan dimana zat aktif akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang berada di dalam sel mengandung zat aktif sementara pelarut yang berada di luar sel belum terisi zat aktif, sehingga terjadi ketidakseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dengan konsentrasi zat aktif yang berada di luar sel. Perbedaan konsentrasi ini akan mengakibatkan terjadinya proses difusi, dimana larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar sel dan digantikan oleh pelarut dengan konsentrasi rendah. Peristiwa ini terjadi berulang-ulang sampai didapat suatu kesetimbangan konsentrasi larutan antara di dalam sel dengan konsentrasi larutan di luar sel. Proses maserasi biasanya dilakukan pada suhu antara 15°-20°C dalam waktu selama 3 hari sampai zat aktif yang dikehendaki larut bersama larutan penyari. Namun ada penjelasan lain tentang maserasi, dimana proses maserasi dilakukan dengan cara merendam 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat kehalusan tertentu, dimasukkan ke dalam sebuah bejana, selanjutnya dituangi dengan 70 bagian cairan penyari yang cocok, kemudian ditutup dan biarkan selama 3-5 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian sari. Selanjutnya dipindahkan dalam bejana tertutup dan biarkan di tempat sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, lalu pisahkan endapan yang diperoleh.

Pelarut yang dapat digunakan dalam proses maserasi adalah air, etanol, etanol-air atau eter. Pilihan utama untuk pelarut pada ekstraksi dengan metode maserasi adalah etanol. Adapun kelebihan etanol sebagai larutan penyari diantaranya, etanol bersifat lebih selektif, dapat menghambat pertumbuhan kapang dan kuman, bersifat non toksik atau tidak beracun, bersifat netral, memiliki daya absorpsi yang baik, dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih rendah, dan etanol baik untuk melarutkan berbagai zat aktif (Endarini, 2016; Marjoni, 2016).

b. Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator. Perkolator adalah wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya. Cairan pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode perkolasi adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Disisi lain, kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut, serta memakan banyak waktu (Tetti, 2014).

2. Ekstraksi Panas

1. Soxhlet

Metode *soxhlet* dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) di dalam kelongsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Cairan pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Metode *soxhlet* memiliki kelebihan yaitu proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut

murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kekurangan dari metode soxhlet adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Tetti, 2014).

2. Reflux

Cara kerja reflux adalah dengan memasukkan sampel bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali masuk ke dalam labu (Tetti, 2014). Umumnya pada metode reflux dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sebanyak tiga sampai lima kali, sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018).

3. Destilasi uap

Destilasi uap memiliki proses yang sama dengan metode refluks. Destilasi uap biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai dua bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor (Tetti, 2014).

4. Infusum atau infus

Infusum adalah penyarian simplisia nabati dan air pada suhu 90°C selama 15 menit, simplisia dengan tingkat kehalusan tertentu ditambah aquades sebanyak dua sampai tiga kali berat simplisia (dalam panci I). Selanjutnya panci I dimasukkan kedalam panci II berisi air. Panci II kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 15 menit dihitung mulai ketika panci I mencapai suhu 90°C. kemudian disaring dan cairan yang didapatkan disebut infusa. Konsentrasi yang biasanya digunakan

dalam metode ini adalah 10% (10g simplisia dibutuhkan 100mL air untuk infusa) (Sunarso, 2016).

5. Dekok

Dekok adalah metode ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90–100°C dengan penangas air. Bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur sampai titik didih air. Ekstraksi berlangsung selama waktu tertentu (waktu lebih lama daripada waktu ekstraksi infus) (Rahmatika, 2015; Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018).

6. Digesti

Metode digesti adalah cara ekstraksi dengan maserasi kinetik (dengan pengadukan terus menerus) pada temperatur yang lebih tinggi dari suhu kamar (umumnya dilakukan pada suhu 40-50°C). Keuntungan metode ini adalah kekentalan pelarut berkurang, sehingga dapat mengakibatkan berkurangnya lapisan-lapisan batas, selain itu daya melarutkan cairan penyari akan meningkat (Rahmatika, 2015).

D. Rebusan Daun Sirih (*Piper betle* L.)

Tanaman herbal dapat diolah dengan cara direbus. Prinsip rebusan adalah ekstraksi dengan pelarut air yang dipanaskan dengan api secara langsung hingga mendidih (90°C) (Tias dan Wuryandari, 2019). Dimana rebusan adalah salah satu bentuk olahan yang paling mudah untuk dibuat oleh masyarakat dalam memanfaatkan daun sirih. Dimana kandungan senyawa aktif dan minyak atsiri dalam daun sirih yang terkandung di dalamnya akan keluar dan larut dalam air (Lena, 2017).

Sumarya (2020) juga menjelaskan sirih hijau (*Piper betle* L.) merupakan salah satu tanaman obat yang ada di Indonesia, banyak dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari sebagai bahan obat tradisional dalam bentuk ramuan khususnya oleh masyarakat Bali yang disebut dengan loloh air rebusan daun sirih. Berdasarkan kajian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa loloh air rebusan daun sirih berpotensi sebagai imunomodulator alami yaitu sebagai immunosupresan menekan reaksi hipersensitivitas sehingga berpeluang sebagai obat herbal anti alergi.

Air rebusan daun sirih memiliki antibakteri terhadap bakteri aerob maupun anaerob, hal ini dikarenakan kandungan fenol yang bersifat antibakteri pada daun sirih. Selain itu, komponen utama minyak atsiri terdiri dari fenol dan senyawa turunannya, salah satunya adalah kavikol yang memiliki daya bakterisida. Dan keseluruhan kandungan yang ada dalam daun sirih membuat daun sirih memiliki khasiat sebagai antioksidan dan fungisida (Nuniek, Nurachmah dan Gayatri, 2012).

Air rebusan daun sirih banyak digunakan oleh masyarakat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit termasuk Candidiasis yang disebabkan oleh *Candida albicans* dan menjadi salah satu masalah kesehatan di Indonesia. Air rebusan sirih mempunyai efek daya hambat terhadap pertumbuhan *Candida albicans* karena memiliki kandungan derivat fenol, seperti eugenol, allypyrathochol, *chavicol*, *safrrole*, *anethole*, *cavibetol*, *carvacrol*, *betlefenol* sebagai antifungi (Iqhasari, 2017).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan Lutviandhitarani, Harjanti dan Wahyono (2015), diketahui bahwa rebusan daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki kemampuan efektivitas yang sama jika dibandingkan dengan antibiotik komersial *penicillin dihydrostreptomycin* dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram

positif. Hal ini menunjukkan daun sirih dapat digunakan sebagai antibiotik alternatif.

E. Senyawa Aktif yang Mudah Rusak Oleh Panas

1. Flavonoid

Senyawa Flavonoid adalah golongan senyawa yang tidak tahan panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi (Rompas, Edy dan Yudistira, 2012). komponen bioaktif seperti flavonoid tidak tahan terhadap suhu tinggi diatas 50°C, sehingga mengalami perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah (Ibrahim, Yuniarta dan Sriherfyna, 2014).

2. Tanin

Kadar tanin yang terbesar didapatkan pada suhu 80°C selama 20 menit. Hal ini disebabkan suhu yang semakin tinggi akan membuat semakin banyak tanin yang terekstrak keluar. Akan tetapi tidak disarankan untuk menggunakan suhu lebih dari 80°C karena tanin tidak tahan dengan pemanasan yang terlalu tinggi (Dewi, 2011).

3. Fenol

Senyawa bioaktif seperti fenol dapat rusak pada suhu diatas 50°C karena mengalami perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah (Yuliantari, Widarta dan Permana, 2017)

4. Saponin

Senyawa bioaktif saponin rentan terhadap suhu yang tinggi, hal ini dikarenakan saponin dapat mengalami kerusakan apabila dipanaskan dengan suhu tinggi (Muflihah, 2015). Senyawa saponin dapat hilang setelah dilakukan proses perebusan (Puspitasari dan Desrita, 2019).

F. Metode Pengujian Antibakteri

Uji antimikroba dilakukan untuk mengukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antimikroba. Terdapat dua metode uji antimikroba yang dapat dilakukan yaitu metode dilusi, dan difusi.

1. Metode dilusi

Pada metode dilusi ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari suatu zat antibakteri terhadap bakteri yang diujikan. Metode dilusi memiliki prinsip sebagai berikut bahan antibakteri yang sudah diencerkan ke dalam beberapa konsentrasi kemudian disatukan dengan media bakteri, baik yang berbentuk cair maupun padat (Ibrahim, 2013). Metode dilusi dibedakan menjadi (Prasetyaningrum, 2018):

a. Metode dilusi cair (*Broth dilution test*)

Metode ini dilakukan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). Metode ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba dengan konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Selanjutnya larutan agen antibakteri yang telah ditetapkan sebagai KHM tersebut dikultur ulang pada medium cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi medium cair yang tetap terlihat jernih ditetapkan sebagai KBM.

b. Metode dilusi padat/dilusi agar (solid dilution test)

Metode ini hampir mirip dengan metode dilusi cair, hanya saja menggunakan medium padat (solid). Keuntungan metode ini adalah salah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat dipergunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

2. Metode difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk uji resistensi zat antibakteri. Pada metode ini zat antibakteri diberikan pada media pembedihan yang telah diinokulasi oleh bakteri yang akan diuji, setelah diinkubasi, dihitung diameter zona bening disekitar zat antibakteri, diameter zona bening diinterpretasikan sebagai kekuatan hambat suatu zat terhadap pertumbuhan suatu bakteri (Brooks dkk., 2012; Ibrahim, 2013). Metode difusi terbagi menjadi lima jenis, yaitu *disc diffusion* (uji Kirby & Bauer), *E-test*, *Ditch-Plate Technique*, *Cup-Plate Technique*, dan *Gradient-Plate Technique* (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018; Prasetyaningrum, 2018).

a. *Disc diffusion* (uji Kirby & Bauer)

Cara ini merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan. Pada cara ini, digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disc*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji (Prayoga, 2013).

Metode cakram disk atau cakram kertas ini memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya adalah mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan relatif murah. Sedangkan kelemahannya adalah ukuran zona bening yang terbentuk

tergantung oleh kondisi inkubasi, inokulum, predifusi dan preinkubasi serta ketebalan medium (Prayoga, 2013). Efektivitas antibakteri menurut Permadani (2015) dapat diklasifikasikan pada tabel berikut :

b. *E-Test*

Uji ini dilakukan untuk memperkirakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau disebut juga *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) terhadap suatu jenis bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara meletakkan strip plastik yang mengandung agen antibakteri dari kadar yang tertinggi hingga kadar terendah diatas medium agar yang sebelumnya telah ditanami oleh bakteri yang akan diuji. Area jernih yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018; Prasetyaningrum, 2018).

c. *Ditch-plate technique*

Metode *ditch-plate technique* dilakukan dengan cara memotong bagian tengah dari medium agar hingga terbentuk sumuran, selanjutnya pada sumuran tersebut diisi dengan agen antibakteri (maksimum enam jenis). Kemudian bakteri yang akan diuji digoreskan secara membujur ke arah sumur tersebut (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018; Prasetyaningrum, 2018).

d. *Cup-plate technique*

Metode ini dilakukan dengan membuat beberapa lubang pada media agar yang telah diberi bakteri. Lubang-lubang tersebut diisi dengan berbagai agen antibakteri yang akan diuji di dalamnya, kemudian diinkubasi selama 24 jam, selanjutnya diamati zona hambat yang terbentuk pada sekeliling lubang (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018; Prasetyaningrum, 2018).

e. *Gradient-plate technique*

Metode *gradient-plate technique* dilakukan dengan mencampur media agar dengan larutan uji dalam berbagai konsentrasi. Kemudian campuran tersebut dituangkan ke dalam cawan petri yang diletakkan dengan posisi miring kemudian dituangkan nutrisi kedua. *Plate* yang ada diinkubasi selama 24 jam, selanjutnya digoreskan bakteri yang akan diuji dari arah konsentrasi tertinggi hingga konsentrasi terendah (Muhanshar, Darmawati dan Dewi, 2018; Prasetyaningrum, 2018).