



CURRENT BIOCHEMISTRY

ISSN: 2355-7877

e-ISSN: 2355-7931

Journal homepage: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj>

Journal E-mail: current.biochemistry@gmail.com

CB Current
Biochemistry

Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Red Betel Leaves (*Piper crocatum*) and Its Fractions against *Escherichia coli* pBR322

(Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Fraksinya terhadap *Escherichia coli* pBR322)

Fernanda Chairunisa¹, Mega Safithri^{1,2*}, Maria Bintang¹

¹ Department of Biochemistry, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

² Tropical Biopharmaca Research Center, LPPM IPB University, Indonesia

Received: 18 August 2021 ; Accepted: 20 March 2022

*Corresponding author : Mega Safithri, Departemen Biokimia IPB; e-mail: safithri@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Red betel leaf (Piper crocatum) is one of the typical Indonesian herbal plants that has an antibacterial function. This study aimed to test and measure the activity of 70% ethanol extract of red betel leaf and its fractions (n-hexane, ethyl acetate, and water fractions) as antibacterial against specific bacteria Escherichia coli pBR322 based on activity and minimum inhibitory concentration. Extraction was carried out using the maceration method and continued with fractionation based on the level of solvent polarity. Antibacterial activity was indicated by the presence of inhibition zones. The minimum inhibitory concentration was indicated by the appearance of the inhibition zone at the minimum concentration. Results showed that extraction process resulted in crude extract yield of 19.49%. The best antibacterial activity was shown by 1000 ppm n-hexane fraction with an inhibition zone of 2.40 mm ± 0.14. The best minimum inhibitory concentration was 100 ppm n-hexane fraction with an inhibition zone of 0.60 mm ± 0.56.

Keywords: Antibacterial activity, *Escherichia coli* pBR322, Minimum inhibition concentration, Red betel leaf

ABSTRAK

Daun sirih merah (Piper crocatum) merupakan salah satu tanaman herbal khas Indonesia yang memiliki fungsi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan menguji serta mengukur aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun sirih merah dan fraksinasinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) terhadap bakteri spesifik Escherichia coli pBR322 berdasarkan aktivitas dan konsentrasi hambat minimum. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran pelarut. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan keberadaan zona hambat yang muncul pada beberapa konsentrasi. Konsentrasi hambat minimum ditunjukkan dengan munculnya zona hambat pada konsentrasi minimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bahwa proses ekstraksi menghasilkan rendemen kasar sebesar 19.49%. Aktivitas antibakteri terbaik dihasilkan oleh fraksi n-heksana konsentrasi 1000 ppm dengan zona hambat sebesar nilai 2.40 mm ± 0.14. Konsentrasi hambat minimum terbaik dihasilkan oleh fraksi n-heksana konsentrasi 100 ppm dengan zona hambat sebesar 0.60 mm ± 0.56.

Kata kunci: Aktivitas antibakteri, Daun sirih merah, *Escherichia coli* pBR322, Konsentrasi hambat minimum.

1. PENDAHULUAN

Interaksi manusia dengan lingkungan yang kurang sehat menjadi rutinitas yang tanpa disadari dapat menyebabkan berbagai penyakit infeksi sehingga masalah resistensi meningkat. Tambunan (2018) menyatakan bahwa masalah resistensi umumnya terjadi akibat adanya “*pressure selection*” dari hasil penggunaan antibiotik yang tidak terkendali dan bijak. Berbagai macam mekanisme biokimiawi dan fisiologi dari lingkungan mempengaruhi terjadinya masalah resistensi. Pencegahan dan pengendalian akan masalah resistensi masih sangat sedikit. Antibiotik telah digunakan dalam berbagai pengobatan dalam banyak hal namun perkembangan antibiotik ini juga disertai dengan berkembangnya masalah kemunculan resisten strain yang begitu cepat (Davies dan Davies 2010). Hal tersebut menyebabkan kebutuhan akan obat antimikroba berbahan dasar alami semakin diperhatikan.

Obat-obatan berbahan dasar alami telah dipercaya memiliki manfaat yang besar karena memiliki senyawa alami yang sangat berpengaruh terhadap kesehatan manusia. Lutviandhitarani *et al.* 2015 menyatakan bahwa rebusan daun sirih (*Piper betle* L) memiliki kemampuan sebagai antibiotik berbahan dasar herbal yang memiliki kesamaan efektivitas dengan antibiotik komersil *penicillin-dihydrostreptomycin* sebagai alternatif untuk pengobatan mastitis. Manfaat besar yang dimiliki bahan alami telah banyak diminati untuk diidentifikasi sifatnya dari efek biologis serta dikembangkannya terapi baru dalam melawan berbagai penyakit (Ji *et al.* 2019). Salah satu bahan dasar alami yang dapat dijadikan obat yakni sirih merah.

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) memiliki zat-zat aktif yakni alkaloid, tanin, saponin, gula pereduksi, flavonoid, glukosida, steroid glikosida, eugenol, dan minyak atsiri (Irawan *et al.* 2017). Zat aktif tersebut dapat berfungsi sebagai antibakteri. Menurut

Juliantina *et al.* (2009), pertumbuhan bakteri dapat dihambat kerjanya oleh daun sirih merah baik bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 maupun Gram negatif seperti *Escherichia coli* ATCC 35218 yang cenderung stabil dalam menghambat bakteri Gram negatif di konsentrasi 6.25%, sedangkan pada Gram positif cenderung tidak stabil dengan konsentrasi minimum 6.25% dalam menghambat bakteri. Menurut Puspita *et al.* (2018), pertumbuhan bakteri *E. coli* tidak dapat dihambat kinerjanya oleh ekstrak etanol 70% daun sirih merah hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dan refluks namun dapat menghambat bakteri *B.subtilis* dan *P.aeruginosa* dengan daya hambat yang rendah.

Manfaat lainnya dari daun sirih merah yakni sebagai antioksidan. Penelitian Ramadani (2018) menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etanol 70% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yakni pada fraksi n-heksana sebesar 31.9 μmol troloks/g ekstrak dengan metode CUPRAC dan mengandung total tanin tertinggi dengan nilai 9.8 mg/g dengan metode kadar total tanin. Penelitian Septiani (2017) menunjukkan daun sirih merah fraksi etil asetat dengan metode DPPH memiliki aktivitas antioksidan terbaik dengan hasil IC_{50} sebesar IC_{50} 13,15 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Wedasari (2018) menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etanol 70% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi menggunakan metode rancimat dengan nilai FP sebesar 1.38. Daun sirih merah telah banyak diujikan terhadap aktivitas antioksidan serta antibakterinya dengan berbagai metode, namun pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri spesifik *Escherichia coli* pBR322 menggunakan ekstrak etanol 70% dan fraksinya yang diperoleh melalui fraksinasi bertingkat dengan n-heksana, etil asetat, dan air, belum pernah dilakukan.

Penelitian ini bertujuan mengukur dan menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun sirih merah dan fraksinasinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) terhadap bakteri spesifik *Escherichia coli* pBR322 berdasarkan aktivitas dan konsentrasi hambat minimum (KHM). Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun sirih merah dan fraksinya mengandung senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri. Penelitian ini diharapkan bermanfaat memberikan informasi ilmiah mengenai senyawa aktif yang terdapat didalam ekstrak etanol 70% daun merah ekstrak dan fraksinya yang berpotensi sebagai sebagai antibakteri.

2. METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni daun sirih merah yang telah dikeringkan dengan ukuran 60 mesh yang diperoleh dari kebun Pusat Studi Biofarmaka Tropika IPB. Bahan yang diperlukan untuk ekstraksi simplisia yaitu pelarut etanol 70%. Bahan untuk metode fraksinasi ekstrak etanol adalah etanol CAS-No: 64-17-5 (Merck), pelarut n-heksana, etil asetat dan akuades. Uji aktivitas antibakteri menggunakan bahan tripton OXOID LP0042, yeast ekstrak CRITERION Cat.no: C7341, NaCl, agar OXOID LP0011, antibiotik ampisilin Kimia Farma, antibiotik tetrasiklin Bernofarm, antibiotik kanamisin Meiji, H₂SO₄, BaCl₂ EMSURE CAS-No: 10226-27-9 NaCl fisiologis, kanamisin, DMSO 20% CAS-No:67-68-5 (EMSURE), bakteri *Escherichia coli* pBR322.

Alat yang digunakan pada preparasi sampel adalah oven NDO-700, blender, saringan 60 mesh, shaker EYELA, kain saring, cawan porselin, desikator, timbangan, alat-alat gelas, sonikator DECON, micropipet RAINAN Pipet-lite XLS, blue tip, yellow tip, rotary evaporator R-300 BUCHI, autoklaf TOMY ES-315, kapas steril, kertas cakram.

Preparasi Sampel

Daun sirih merah dibersihkan menggunakan air mengalir kemudian ditiriskan. Daun sirih merah yang telah bersih kemudian di oven selama 3 hari dengan suhu 50°C. setelah kering, daun kemudian diblender dan disaring menggunakan saringan berukuran 60 mesh (Alfarabi et al. 2010).

Pengukuran Kadar Air

Cawan porselin di oven dengan suhu 105°C selama 30 menit lalu dibiarkan dingin di dalam desikator selama 30 menit kemudian bobot kosongnya ditimbang. Simplisia dimasukkan kedalam cawan kosong sebanyak 2 gram kemudian di oven pada suhu 105°C selama 3 jam dan didinginkan dalam desikator Simplisia yang telah didinginkan ditimbang kembali hingga mendapatkan bobot konstan. Pengukuran ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Kadar air simplisia ditentukan berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{a-b}{a} \times 100$$

Keterangan:

a= Bobot sebelum pengeringan (g)

b= Bobot setelah pengeringan (g)

(AOAC 2007).

Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi simplisia dilakukan dengan metode maserasi. Simplisia direndam dalam pelarut dengan perbandingan 1:4. Sebanyak 25 g simplisia dilarutkan dengan 100 mL etanol 70%. Maserasi dilakukan 3 kali pembilasan lalu ekstrak simplisia diambil filtratnya setelah dilakukan penyaringan dan kemudian dilakukan pemekatan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C sehingga diperoleh rendemen kasar. Ekstraksi dilakukan dengan 3 kali ulangan. Rendemen ekstrak dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot akhir sampel}}{\text{Bobot awal sampel} \times (1 - \text{kadar air})} \times 100\%$$

(Alfarabi et al. 2010 dengan modifikasi).

Fraksinasi Ekstrak Etanol

Fraksinasi ekstrak etanol 70% dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda-beda. pelarut non polar menggunakan n-heksana, semipolar menggunakan etil asetat dan polar menggunakan air. Perbandingan yang digunakan untuk fraksinasi yaitu dengan volume 1:1 untuk masing-masing pelarut.

Fraksinasi dengan n-heksana. Sebanyak 1 g ekstrak etanol 70% dilarutkan dengan 75 mL akuades dan 75 mL pelarut awal n-heksana yang kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah ukuran 500 mL. Campuran kemudian dihomogenkan dengan cara diputar-putar secara horizontal selama 5 menit. Keran corong sesekali dibuka untuk mengeluarkan udara yang terperangkap dalam corong dan menurunkan tekanan. Campuran kemudian didiamkan sehingga terbentuk dua fase dengan fase n-heksana berada diatas dan air berada di bawah kemudian masing-masing larutan dipisahkan dan diulang fraksinasinya sebanyak tiga kali ulangan.

Fraksinasi dengan etil asetat. Fraksi air atau fraksi tidak terlarut dalam n-heksana dimasukkan ke dalam corong kemudian ditambahkan 75 mL etil asetat lalu dihomogenkan dengan cara diputar-putar secara horizontal selama 5 menit. Keran corong sesekali dibuka untuk mengeluarkan udara yang terperangkap dalam corong dan menurunkan tekanan. Campuran kemudian didiamkan sehingga terbentuk dua fase yang terpisah layaknya hasil fraksinasi n-heksana. Fraksinasi etil asetat dilakukan ulangan sebanyak tiga kali.

Fraksinasi dengan air. Fraksi air atau fraksi tidak terlarut dalam etil asetat dihomogenkan menggunakan penambahan 75 mL akuades selama 5 menit. Kran corong sesekali dibuka untuk mengeluarkan udara yang terperangkap dalam corong dan menurunkan tekanan. Fraksinasi dengan akuades dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

Hasil fraksinasi kemudian dipekatan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C. Rendemen fraksi yang dinyatakan dalam persen dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{bobot awal ekstrak}} \times \frac{\text{total bobot awal sampel}}{\text{Bobot awal sampel} \times (1 - \text{kadar air})} \times 100\%$$

(Firdausi et al. 2015 dengan modifikasi).

Peremajaan Bakteri *Escherichia coli* pBR322

Bubuk Luria Bertani Broth (Trypton 2,5 gr, Yeast ekstrak 1,25 g, NaCl 2,5 g) dilarutkan dengan 250 mL akuades dan dipanaskan diatas penangas air dan diaduk menggunakan stirrer hingga mendidih. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan kemudian didiamkan selama setengah jam pada suhu ruangan dalam keadaan steril. Media selanjutnya ditambahkan antibiotik ampisilin dan tetrasiklin (50 µg/mL ; 15 µg/mL) kemudian dihomogenkan. Media dituangkan dalam tabung steril dan diinokulasikan isolasi Bakteri *Escherichia coli* pBR322 kemudian ditutup rapat menggunakan kapas steril dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lamanya.

Media Luria Bertani Agar dibuat dari campuran tripton 2,5 g, yeast ekstrak 1,25 g, NaCl 2,5 g, dan agar 5 g dalam 250 mL akuades yang dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih. Campuran selanjutnya di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Media yang masih dalam keadaan hangat selanjutnya ditambahkan antibiotik ampisilin dan tetrasiklin (50 µg/mL ; 15 µg/mL) dan dituangkan secara merata ke dalam cawan petri steril secara aseptik dan dibiarkan memadat. Bakteri *Escherichia coli* pBR322 hasil inkubasi dari Luria Bertani Broth selanjutnya dipindahkan ke dalam media Luria Bertani Agar lalu diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri *Escherichia*

coli pBR322 yang tumbuh kemudian diambil 2 sampai 3 koloni kemudian dilakukan penyesuaian dengan standar Mc. Farland 0,5. (Dima et al. 2016 dengan modifikasi).

Pembuatan Larutan Standard Mc. Farland 0,5

Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 99,5 mL dicampurkan dengan 0,5 BaCl₂ 1,175%. Larutan gabungan kemudian dikocok hingga terbentuk warna keruh yang kemudian digunakan sebagai standar kekeruhan bakteri dimana setiap mL larutan setara dengan konsentrasi bakteri 1,5x10⁸ CFU/mL (*Colony Forming Unit*) (Ngajow et al. 2013).

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* pBR322 pada media Luria Bertani Agar diambil menggunakan ose. Bakteri yang telah terambil kemudian dimasukkan ke dalam 10 mL NaCl fisiologis 0,9%. Suspensi bakteri kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan disesuaikan kekeruhannya dengan larutan standar Mc. Farland 0,5 (Ngajow et al. 2013).

Uji Aktivitas dan Konsentrasi hambat Minimum (KHM) Antibakteri terhadap *Escherichia coli* pBR322

Sebanyak 10mL Luria Bertani agar yang telah mengandung antibiotik ampicilin dan tetrasiklin (50 µg/mL ; 15 µg/mL) dimasukkan ke dalam 2 cawan petri steril per sampel. Masing-masing cawan petri selanjutnya diberikan garis penanda yang membagi cawan petri menjadi 5 bagian yang sama. Media didiamkan hingga memadat, kemudian suspensi bakteri sesuai standar Mc.Farland 0,5 dipipet 100 µL ke dalam permukaan media Luria Bertani Agar dan diratakan menggunakan kaca *Spreader*. Selanjutnya kertas cakram masing-masing diberikan ekstrak dan fraksi dengan volume 20 µL pada konsentrasi 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm.

Kanamisin dengan konsentrasi 20 ppm digunakan sebagai kontrol positif dan DMSO 20% sebagai kontrol negatif. Kertas cakram selanjutnya ditempatkan pada permukaan media kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk menunjukkan keberadaan aktivitas antibakteri. Daya hambat sampel terhadap bakteri pada konsentrasi minimum juga ditentukan (Sari et al. 2010).

3. HASIL

Kadar Air, Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah

Penentuan kadar air dari simplisia daun sirih merah dilakukan berdasarkan metode gravimetri dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil kadar air simplisia didapatkan rerata sebesar 8.13% (Tabel 1). Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3 kali pembilasan yang kemudian hasilnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C menghasilkan rerata rendemen ekstrak sebesar 19.49% (Tabel 1). Ekstrak etanol 70% selanjutnya difraksinasi bertingkat yang kemudian tiap hasil dari pelarut dipekatkan sehingga didapatkan rendemen fraksi dengan hasil terbaik yaitu fraksi air sebesar 3.85%.

Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri daun sirih merah ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening. Ekstrak kasar etanol 70% dilarutkan dalam DMSO dan diambil 20 µL dengan sampel yang memiliki konsentrasi 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm, dengan kontrol positif dan negatif yaitu kanamisin 20 ppm dan DMSO 20%. Aktivitas ekstrak etanol 70% dapat ditemukan pada konsentrasi 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, dan 10000 ppm. Aktivitas tertinggi dari ekstrak etanol 70% terbentuk pada konsentrasi 1000 ppm dan terendah pada konsentrasi 2000, 4000, dan 10000 ppm. Hasil

fraksinasi menghasilkan aktivitas tertinggi dan terendah yaitu fraksi n-heksana tertinggi di 1000 ppm dan terendah di 8000 dan 10000 ppm, Fraksi etil asetat dikonsentrasi 6000 ppm dan pada 4000 ppm, fraksi air tertinggi pada 1000 ppm dan terendah pada 8000 ppm. Diameter zona hambat dari aktivitas antibakteri terbaik ditunjukkan oleh fraksi n-heksana dengan besar $2.40 \text{ mm} \pm 0.14$.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan menggunakan metode difusi pada media agar Luria Bertani. Media ditetaskan suspensi bakteri *E.coli*

pBR322 yang sesuai dengan standar Mc.Farland pada absorbansi 660 nm. Pengujian konsentrasi hambat minimum dilakukan pada 4 sampel yang telah dipekatkan dengan *rotary evaporator* yakni ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan masing-masing konsentrasinya yaitu 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm. Kontrol positif yang digunakan adalah kanamisin 20 ppm sedangkan sebagai kontrol negatif adalah DMSO 20%. Pengujian dilakukan dengan dua kali ulangan. Pengamatan dilakukan pada jam ke-24 dengan hasil yang berbeda-beda.

Tabel 1 Kadar air, rendemen ekstrak dan fraksi daun sirih merah

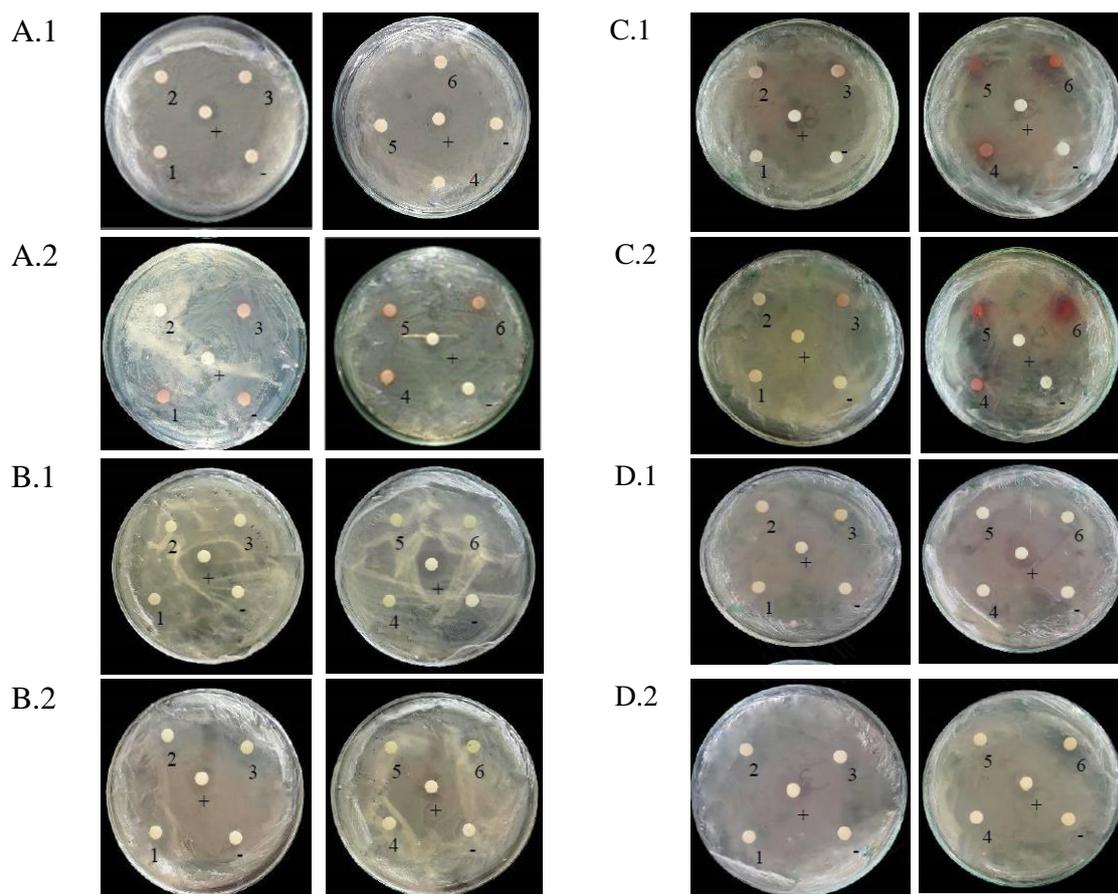
Pengujian	Hasil rerata (%)
Kadar air simplisia	8.13
Rendemen simplisia (ekstrak etanol 70%)	19.49
Rendemen Fraksi	
<i>n</i> -heksana	16.03
etil asetat	22.50
Air	47.99

Tabel 2 Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi etanol 70% daun sirih merah

Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm) setelah inkubasi 24 jam			
	Ekstrak etanol	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
1000	1.05 ± 1.06^b	2.40 ± 0.14^a	1.25 ± 0.77^a	1.77 ± 1.17^a
2000	0.00 ± 0.00^a	1.00 ± 1.41^a	1.50 ± 1.27^a	1.50 ± 1.27^a
4000	0.00 ± 0.00^a	0.95 ± 0.07^a	1.10 ± 0.98^a	1.25 ± 0.71^a
6000	0.20 ± 0.28^a	0.40 ± 0.28^a	2.90 ± 0.71^a	0.25 ± 0.21^a
8000	0.05 ± 0.07^a	0.00 ± 0.00^a	1.35 ± 0.35^a	0.20 ± 0.14^a
10000	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a	1.90 ± 0.00^a	1.45 ± 1.06^a
+	10.10 ± 0.63^d	12.0 ± 0.14^c	10.65 ± 1.20^c	9.92 ± 0.95^c
-	5.10 ± 0.00^c	5.10 ± 0.00^b	5.10 ± 0.00^b	5.10 ± 0.00^b

Keterangan: Data aktivitas diinterpretasikan oleh rata-rata \pm standar deviasi dari 2 kali pengulangan dengan huruf yang sama pada data menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dengan taraf kenyataan 5%

(+) : kontrol kanamisin (-): kontrol DMSO 20%



Gambar 1 Hasil pengamatan aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi etanol 70% daun sirih merah

Keterangan: A1 dan A2 merupakan ekstrak etanol 70%, A1(Simplo 1000-10000) dan A2 (Duplo 1000-10000), B1 dan B2 merupakan fraksi n-heksana, B1(Simplo 1000-10000) dan B2 (Duplo 1000-10000), C1 dan C2 merupakan fraksi etil asetat, C1(Simplo 1000-10000) dan C2 (Duplo 1000-10000), D1 dan D2 merupakan fraksi air, D1(Simplo 1000-10000) dan D2 (Duplo 1000-10000). (+) merupakan kontrol kanamisin, (-): kontrol DMSO 20%, 1: 1000ppm, 2: 2000ppm, 3: 4000ppm, 4: 6000ppm, 5: 8000ppm, 6:10000ppm

Tabel 3 menyajikan data konsentrasi hambat minimum. Hasil pengujian dapat dilihat pada Gambar 2. Ekstrak etanol 70% menunjukkan zona hambat minimum pada konsentrasi 1000 ppm. Fraksinasi bertingkat diawali dengan pelarut non polar yakni n-heksana yang menunjukkan zona hambat minimumnya pada konsentrasi 100 ppm. Fraksinasi kedua menggunakan pelarut semipolar yaitu etil asetat yang menunjukkan zona hambat minimum pada konsentrasi 100 ppm. Fraksinasi terakhir menggunakan pelarut polar yakni air yang menunjukkan zona hambat minimumnya pada konsentrasi 1000 ppm. Fraksi n-heksana menjadi fraksi yang memiliki zona hambat minimum terbesar pada konsentrasi minimum 100 ppm.

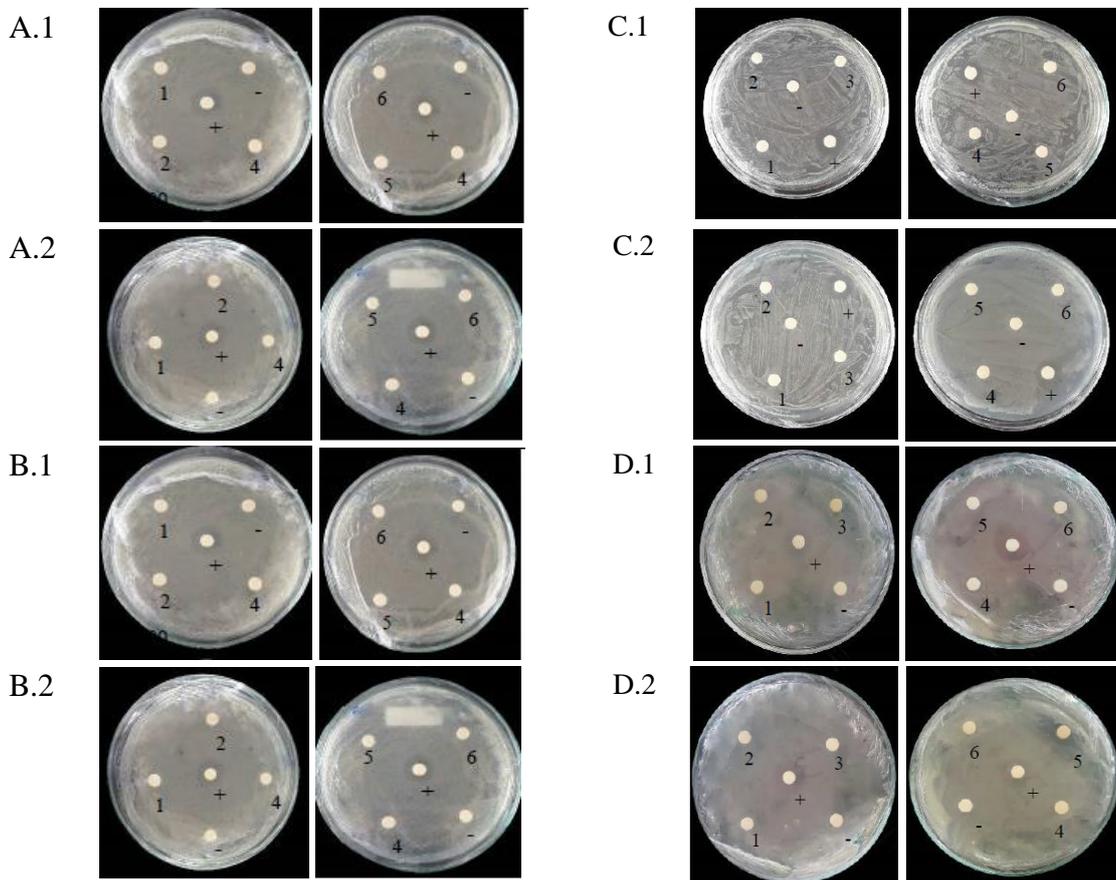
Penentuan konsentrasi hambat

minimum (KHM) dilakukan setelah mengetahui aktivitas antibakteri daun sirih merah terbaik pada konsentrasi tertentu. Nilai KHM tiap jenis pelarut dan sampel berbeda-beda bergantung pada kandungan aktif dalam suatu sampel yang dilarutkan pada pelarut tertentu. DMSO dijadikan sebagai pelarut yang melarutkan semua rendemen kemudian tiap rendemen dengan konsentrasi tertinggi dijadikan sebagai stok untuk diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yang lebih rendah. Diameter zona hambat kontrol negatif DMSO 20% sebesar 5.10 mm merupakan ukuran dari *paper disk* yang digunakan untuk mengurangi diameter zona hambat yang didapatkan dari masing-masing sampel sehingga DMSO tidak berpengaruh terhadap penghambatan bakteri.

Tabel 3 Konsentrasi hambat minimum

Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm) 24 jam			
	Ekstrak etanol	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
100	0.00± 0.00 ^a	0.60 ± 0.56 ^a	0.40 ± 0.56 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
200	0.00 ± 0.00 ^a	1.05 ± 0.07 ^a	0.70 ± 0.14 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
400	0.00 ± 0.00 ^a	2.20 ± 0.42 ^a	0.70 ± 0.14 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
600	0.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.424 ^a	0.75 ± 0.07 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
800	0.00± 0.00 ^a	0.60 ± 0.56 ^a	0.25 ± 0.35 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
1000	1.05± 1.10 ^a	2.40 ± 0.14 ^b	1.25 ± 0.77 ^a	1.77 ± 1.17 ^b
+	10.10 ± 0.63 ^c	1.20 ± 0.14 ^d	10.65 ± 1.20 ^c	9.92 ± 0.95 ^d
-	5.10± 0.00 ^b	5.10 ± 0.00 ^c	5.10 ± 0.00 ^b	5.10 ± 0.00 ^a

Keterangan: Data KHM diinterpretasikan oleh rata-rata ± standar deviasi dari 2 kali pengulangan dengan huruf yang sama pada data menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dengan taraf kenyataan 5%. (+) merupakan Kanamisin, (-) merupakan DMSO 20%



Gambar 2 Hasil pengamatan konsentrasi hambat minimum

Keterangan: A1 dan A2 merupakan ekstrak etanol 70%, A1(Simplo 1000-10000) dan A2 (Duplo 1000-10000), B1 dan B2 merupakan fraksi *n*-heksana, B1(Simplo 1000-10000) dan B2 (Duplo 1000-10000), C1 dan C2 merupakan fraksi etil asetat, C1(Simplo 1000-10000) dan C2 (Duplo 1000-10000), D1 dan D2 merupakan fraksi air, D1(Simplo 1000-10000) dan D2 (Duplo 1000-10000). (+) merupakan kontrol kanamisin, (-): kontrol DMSO 20%, 1: 1000ppm, 2: 2000ppm, 3: 4000ppm, 4: 6000ppm, 5: 8000ppm, 6:10000ppm

4. PEMBAHASAN

Kadar Air, Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah

Suatu sampel dapat diketahui jumlah kandungan airnya melalui metode penentuan kadar air yang berpengaruh langsung terhadap masa simpan bahan. Tinggi rendahnya kadar air berpengaruh terhadap aktivitas mikroba yang berbanding lurus dengan cepat lambatnya proses pembusukan dan ketengikan. Metode lainnya untuk pengujian kadar air yaitu pengeringan dengan gelombang mikro (*microwave*), destilasi, titrasi Karl Fischer, dan gravimetri atau pengeringan dengan oven. Penelitian ini menggunakan metode gravimetri untuk analisis kadar air dengan menggunakan alat berupa oven untuk proses pengeringan sampel pada suhu 105°C selama 3 jam dengan 3 kali pengulangan sampai bobot konstan. Metode pengeringan dapat menghentikan reaksi enzimatik sehingga simplisia tidak mudah rusak. Selama bahan simplisia masih mengandung sejumlah air, enzim tertentu dapat menguraikan senyawa aktif yang terdapat dalam sel suatu bahan bahkan setelah sel mati sekalipun (Atma 2018).

Nilai kadar air simplisia daun sirih merah yang didapat pada penelitian ini yakni sebesar 8.13% (Tabel 1). Nilai tersebut lebih besar jika dibandingkan dengan hasil penelitian Kusuma dan Andriani (2019) sebesar 6.79% dan lebih kecil jika dibandingkan dengan hasil penelitian Safithri et (2012) sebesar 9.27%. Nilai kadar air simplisia pada penelitian ini tergolong baik karena memiliki nilai dibawah 10% yang menjadi standar kadar air maksimum untuk simplisia dari tumbuhan obat (Depkes 2008). Tinggi rendahnya kadar air bahan dipengaruhi oleh suhu dan durasi pengeringan. Maka dari itu, pengeringan dengan suhu dan durasi yang sesuai dilakukan dengan tujuan agar dalam penyimpanan jangka waktu panjang sampel tetap dalam kondisi baik. Kenaikan suhu

berbanding lurus dengan kelarutan sampel dan koefisien difusi untuk menghasilkan laju ekstraksi yang tinggi (Perina et al. 2007).

Zat-zat aktif dalam daun sirih merah dapat dipisahkan menggunakan metode ekstraksi yang memiliki prinsip menggunakan pelarut yang sesuai untuk pemisahan suatu komponen dari suatu bahan. Ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa metode yakni maserasi, perkolasi, dan sokletasi. Metode maserasi yang digunakan pada penelitian ini berupa ekstraksi padat-cair dan umum dilakukan karena sederhana dan dapat digunakan untuk analit baik yang tidak tahan maupun tahan terhadap proses pemanasan. Kelemahan dari metode ini yakni terlalu banyak menggunakan pelarut (Leba 2017). Proses maserasi dilakukan dengan merendam sampel selama 1-5 hari dengan pelarut sesuai untuk melarutkan komponen sampel pada suhu ruang yang sesekali diaduk untuk mempercepat proses pelarutan.

Pemilihan pelarut menjadi salah satu faktor terpenting dalam ekstraksi yang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti daya melarutkan senyawa, titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar, waktu, ukuran sampel, perbandingan sampel dan pelarut, serta keadaan penyimpanan sampel (Sayuti 2017). Pelarut etanol 70% digunakan pada penelitian ini. Etanol 70% merupakan pelarut yang bersifat semipolar karena etanol memiliki sisi dengan komposisi gugus polar berupa gugus -OH dan gugus nonpolar berupa CH_2CH_3 sehingga proses ekstraksi dapat dilakukan secara optimal. Pelarut etanol 70% memiliki kelebihan yakni tidak merusak komponen daun yang dilihat dengan tidak adanya perubahan warna, ekonomis yang dapat digunakan pada ekstraksi dari sampel makanan, nilai titik didih yang cukup rendah dan cenderung lebih aman untuk digunakan (Azis et al. 2014).

Rendemen ekstrak merupakan salah satu parameter mutu suatu ekstrak yang

dibandingkan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Jumlah ekstrak yang didapat berbanding lurus dengan nilai rendemennya (Wijaya *et al.* 2018). Ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan sampel dan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:4. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali pembilasan. Bobot total simplisia sebesar 250 yang menghasilkan rendemen kasar sebesar 19.49% (Tabel 1) dalam bentuk pasta hasil pemekatan filtrat menggunakan *rotary evaporator*. Hasil rendemen tersebut lebih besar dibandingkan dengan rendemen ekstrak etanol 70% Weni (2014), Septiani (2017), dan Wedasari (2018) dengan nilai rendemen berurutan 17.84% dan 10.10%, dan 9.21%. Perbedaan hasil rendemen diakibatkan oleh rasio antar sampel dengan pelarut, waktu, suhu, dan ukuran partikel. Menurut Nurashiah (2010), maserasi tidak memiliki bantuan gaya apapun yang hanya menggunakan teknik perendaman yang membantu terjadinya proses osmosis pelarut secara statis ke dalam padatan walaupun telah dilakukan pergantian pelarut. Menurut Azwanida (2015), luas permukaan antar sampel dan pelarut yang semakin luas berkorelasi dengan semakin kecilnya ukuran partikel sehingga berpengaruh langsung kepada hasil rendemen.

Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya dalam bentuk cair-cair yang sehingga antara larutan asal dan pelarut pengestraknya dapat terpisah (Nurika dan Suhartini 2019). Proses fraksinasi menggunakan 3 pelarut yang diurutkan berdasarkan tingkat kepolarannya yakni *n*-heksana bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar, dan air bersifat polar. Ekstrak etanol 70% hasil pemekatan diambil 1 g untuk dilakukan fraksinasi. Rendemen fraksi yang dihasilkan dari terbesar hingga terkecil adalah air sebesar 3.85%, etil asetat 2.87%, dan *n*-heksana 1.72%. Nilai rendemen fraksi menunjukkan seberapa banyak metabolit

sekunder dari daun sirih merah yang terlarut dalam pelarut sesuai dengan kepolarannya (Septiani 2017). Penelitian Septiani (2017) memiliki hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% lebih kecil dibandingkan penelitian ini yakni sebesar *n*-heksana 0.42%, etil asetat 1.75%, dan air 7.32%. Nilai rendemen air lebih besar dikarenakan senyawa metabolit yang bersifat polar pada daun sirih merah tertarik pada pelarut yang bersifat polar maupun semipolar.

Aktivitas Antibakteri

Metode difusi cakram dipilih pada penelitian ini untuk menentukan aktivitas antibakteri dengan tujuan untuk menentukan aktivitas sampel dalam menghambat bakteri *E.coli* pBR322. Aktivitas antibakteri dapat ditentukan dengan munculnya zona hambat yang semakin besar zonanya maka semakin baik aktivitasnya (Novita 2016). Aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan sampel ekstrak etanol 70% dan fraksinya. Penelitian ini mengujikan ekstrak dan fraksinya pada beberapa konsentrasi. Masing-masing ekstrak dan fraksi diujikan aktivitasnya terhadap bakteri *E.coli* pBR322 (resisten ampisilin dan tetrasiklin). Media untuk bakteri *E.coli* pBR322 diberikan antibiotik ampisilin dan tetrasiklin untuk membuktikan bakteri yang digunakan benar resisten terhadap kedua antibiotik dan membantu dalam pertumbuhan bakteri agar tidak mudah terkontaminasi.

Aktivitas antibakteri (Tabel 2), hasil pengamatan ditunjukkan pada Gambar 1. Aktivitas tertinggi hingga terendah secara berurutan yakni untuk fraksi etil asetat pada konsentrasi 6000 ppm yaitu $2.90 \text{ mm} \pm 0.71$, fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 1000 ppm yaitu $2.40 \text{ mm} \pm 0.14$, fraksi air pada konsentrasi 1000 ppm yaitu $1.77 \text{ mm} \pm 1.17$, dan ekstrak pada konsentrasi 1000 ppm yaitu $1.05 \text{ mm} \pm 1.10$. Aktivitas fraksi etil asetat memiliki aktivitas lebih besar dari pada fraksi *n*-heksana, namun fraksi etil asetat baru menunjukkan aktivitas antibakterinya pada

konsentrasi 6000 ppm sedangkan *n*-heksana pada konsentrasi 1000 ppm. Penelitian Mere (2018) menyatakan bahwa daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang berasal dari Pulau Timor memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* pBR322 tertinggi yakni fraksi etil asetat dengan diameter zona hambat 13.61 ± 0.02 mm pada konsentrasi 1000 ppm. Fraksi *n*-heksana memberikan hasil besar dalam konsentrasi minimum dikarenakan daun sirih merah mengandung total tanin sebanyak 98.9 mg/g yang berfungsi sebagai antibakteri dan bersifat non polar yang selaras dengan sifat dari pelarut *n*-heksana sehingga dapat melarutkan beberapa senyawa yang berperan sebagai antibakteri di dalam daun sirih merah (Ramadani 2018).

Diameter zona hambat mengalami peningkatan dan penurunan yang kurang teratur tidak sesuai dengan semakin besarnya konsentrasi maka zona hambat yang dihasilkannya pun semakin besar. Hasil tersebut dimungkinkan karena adanya beberapa kandungan penting yang terdapat dalam daun sirih merah, lingkungan, dan suhu dapat mempengaruhi aktivitasnya. Menurut Yanti dan Mitika (2017), korelasi antara diameter zona hambat dengan kenaikan konsentrasi tidak selalu berbanding lurus dikarenakan pada media agar kecepatan difusi senyawa antibakteri berbeda. Selain itu, konsentrasi dan jenis dari senyawa juga berpengaruh besar terhadap pembentukan diameter zona hambat yang berbeda dan berpengaruh terhadap aktivitasnya.

Ampisilin merupakan antibiotik golongan penisilin yang dapat menghambat pembentukan dinding dan permeabilitas membran sel. Karakter golongan penisilin yakni efektif dalam melawan bakteri Gram positif namun tidak efektif untuk bakteri Gram negatif yang disebabkan oleh struktur bakteri. *Inner* dan *outer* membran yang melapisi peptidoglikan yang tipis membuat bakteri Gram negatif sulit untuk ditembus oleh

antibiotik. Resistensi bakteri terhadap ampisilin disebabkan karena bakteri membentuk enzim β -laktamase yang mengakibatkan cincin β -laktam pada ampisilin dan sefalosporin terbuka sehingga dapat merusak aktivitas ampisilin (May *et al.* 2009).

Tetrasiklin merupakan bakteri spektrum luas yang dapat membunuh baik bakteri positif maupun negatif. Tetrasiklin bekerja dengan cara menghambat tidak langsung pada tahap translokasi atau penyusunan peptida, namun menghambat pada tahap terminasi rantai peptida pada kodon terminasi. Resistensi terjadi dikarenakan meningkatnya efflux pump oleh transpor aktif pompa protein pada bakteri Gram negatif. Bakteri menjadi resisten terhadap tetrasiklin dikarenakan *efflux* pump dari bakteri terus mengeluarkan antibiotik yang berdifusi kedalam bakteri yang terlalu rendah dibandingkan dengan pengeluarannya (Pages dan Amaral 2009).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Daun sirih merah mengandung beberapa zat yang berfungsi sebagai antibakteri adalah alkaloid, polivenolad, tanin, dan minyak atsiri (Mardiana 2012). Senyawa fitokimia seperti alkaloid, polivenolad, dan tanin memiliki sifat sebagai antibakteri yang dapat mengganggu integritas membran sel bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler. Alkaloid menyebabkan kerusakan membran sel. Polivenolad pada membran sel bekerja untuk membuat membran sel lisis dengan melakukan proses denaturasi pada ikatan protein membran sehingga dapat menembus ke dalam inti sel (Candrasari *et al.* 2012).

Ekstrak etanol 70% dan fraksi daun sirih merah diuji konsentrasi hambat minimum (KHM) dengan metode difusi yang memiliki keunggulan dalam menentukan kesensitifan suatu sampel dan estimasi konsentrasi hambat minimum yang mampu menghambat bakteri

secara visual, memiliki fleksibilitas tinggi, dan mudah diterapkan (Agnes 2015). Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) pada penelitian ini dilakukan menggunakan 4 sampel berupa ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan konsentrasi yang diujikan sebesar 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm. Adanya zona bening yang terbentuk menunjukkan daya hambat sampel terhadap bakteri berdasarkan konsentrasi minimum.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) diujikan sebanyak dua kali ulangan yang diamati setelah 24 jam untuk tiap sampel. Hasil diameter zona hambat minimum (Tabel 2) dari ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki diameter kurang dari 5 mm. Menurut Susanto et al. 2012), suatu sampel dikatakan memiliki respon hambat pertumbuhan yang lemah jika diameter zona hambatnya kurang dari 5 mm, respon sedang dengan diameter 6-10 mm, dan respon kuat dengan diameter 11-20 mm, dan respon sangat kuat dengan diameter diatas 21 mm. Fraksi n-heksana dan etil asetat menghasilkan diameter yang tidak jauh berbeda dengan konsentrasi minimumnya pada konsentrasi 100 ppm namun diameter keseluruhan n-heksana lebih besar dibandingkan dengan etil asetat.

Konsentrasi hambat minimum terbaik diperoleh oleh pelarut n-heksana yang merupakan pelarut non polar. Penelitian Ramadani (2018) menyatakan bahwa daun sirih merah memiliki total tanin yang mengandung senyawa aktif yaitu metil eugenol, L-(+)-arginin hidroklorida dan asam protokatekuat. Eugenol dapat berfungsi sebagai antimikroba, antiseptik, dan bahan baku obat lainnya (Nurdjannah 2004). Arginin merupakan salah satu asam amino yang memiliki pengaruh besar terhadap aktivitas peptide untuk antibakteri (Carrillo dan Ramos 2018). Asam protokatekuat berfungsi untuk

aktivitas antioksidan, antimikroba, dan anti inflamasi (Lin et al. 2007).

Tanin bersifat mudah larut air, namun beberapa jenis tanin memiliki bobot molekul sekitar sekitar 900-5000 g/mol bersifat kurang larut air atau semakin besar bobot molekulnya maka semakin sulit untuk terlarut dalam air. Tanin memiliki sifat sebagai antibakteri yang dapat merusak bagian penting dari sel bakteri yakni membran selnya dengan cara mengganggu protein ekstraseluler dengan pembentukan senyawa kompleks. Protein akan mengendap untuk menghasilkan senyawa tidak larut dan menjadikannya ciut (Mardiana 2012).

Bakteri *E.coli* pBR322 merupakan bagian dari golongan bakteri Gram negatif dengan struktur dinding sel yang memiliki porin dan lipopolisakarida. Sifat dari porin itu sendiri yakni hidrofilik menyebabkan molekul molekul ekstrak dan fraksi etanol 70% sulit masuk kedalam sel bakteri Gram negatif. Kompleksitas struktur dan komponen yang menyusun bakteri Gram negatif menjadikan bakteri ini lebih resisten dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Selain itu, ekstrak dan fraksi etanol yang masuk kedalam bakteri resisten oleh efflux pump dikeluarkan kembali sehingga bakteri resisten (Darwish dan Aburjai 2010).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada keluarga dan Departemen Biokimia atas kesempatannya bagi saya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya dengan harapan tulisan ini bermanfaat bagi orang banyak.

DAFTAR PUSTAKA

[AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2007. *Official Methods of Analysis* Ed.18. Washington DC (US): Association of Official Analytical Chemists.

- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta (ID): DepKes RI.
- Agnes SH.2015. *Mikrobiologi Kesehatan: Peran Mikrobiologi dalam Bidang Kesehatan*. Yogyakarta(ID): Penerbit Andi.
- Alfarabi M, Bintang M, Suryani, Safithri M. 2010. The comparative ability of antioxidant activity of piper crocatum in inhibiting fatty acid oxidation and free radical scavenging. *Hayati Journal of Biosciences*. 17(4): 201-204.
- Atma Y. 2018. *Prinsip Analisis Komponen Pangan: Makro & Mikro Nutrien*.Yogyakarta(ID): Deepublish.
- Azis T, Febrizky S, Mario AD. 2014. Pengaruh jenis pelarut terhadap persen yield alkaloid dari daun salam india (*Murraya koenigii*). *Tek. Kim*. 2(20): 1-6.
- Azwanida NN. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength, and limitation [ulasan]. *Med Aromatic Plants*. 4:196. doi:10.4172/2167-0412.100196.
- Candrasari A, Romas MA, Hasbi M, Astuti OR. 2012. Uji daya antimikroba ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Candida albicans* ATCC 10231 secara in vitro. *Biomedika*. 4(1):9-16.
- Carrillo W, Lucio A, Gaibor J, Morales D, Vasquez G. 2018. Isolation of antibacterial hydrolysates from hen egg white lysozyme and identification of antibacterial peptides. *Journal Medical Food*. 21:808-818.
- Davies D, Davies J. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(3): 417–433.
- Darwish RM, Aburjai TA. 2010. Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10(9): 1-8.
- Dima LRH, Fatimawali, Lolo WA. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor (*moringa oleifera* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *JIF*. 5(2):282-289.
- Firdausi I, Retnowati R, Sutrisno. 2015. Fraksinasi ekstrak metanol daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dengan pelarut n-butanol. *J Kim Stud*. 1(1): 785-790.
- Irawan C, Foliatina, Hanafi. 2017. GC-MS composition of leaf extract of *Piper cf. arcuatum* blume and their antioxidant activity and toxicity studies. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(4):461-468.
- Ji HF, Li XJ, Zhang HY. 2009. Natural products and drug discovery. *Viewpoint*.10(3):194-200.
- Juliantina F, Citra DA, Nirwani B, Nurmasitoh T, Bowo ET. 2009. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen anti bakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *JKKI*. 1(1): 1-10.
- Kurniawati D, Rukmi I, Lunggani AT. 2014. Aktivitas antimikroba kombinasi rebusan daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap *Candida albicans*. *Journal Biology* 3(1): 55-61.
- Kusuma EW, Andriani D. 2019. Karakterisasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*, Ruiz&Pav) sebagai obat antidiabetes menuju obat herbal terstandar. *Jurnal Kesehatan Husada*. 1(1): 71-76.
- Leba MAU. 2017. *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Yogyakarta(ID): Deepublish
- Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. 2007. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation.

- International Journal of Cancer*. 120 (11): 2306–2316.
- Lutviandhitarani G, Harjanti DW, Wahyono F. 2015. Green antibiotic daun sirih (*Piper betle* l.) sebagai pengganti antibiotik komersial untuk penanganan mastitis. *Agripet*. 15(1): 28-32.
- Mardiana L. 2012. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta(ID): Penebar Swadaya.
- May T, Ito A, Okabe S. 2009. Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(11): 4628-4639.
- Mere JK. 2018. aktivitas antibakteri dari daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) asal pulau timor terhadap *Escherichia coli* pBR322 [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ngajow M, Abidjulua M, Kamua VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri staphylococcus aureus secara in vitro. *Jurnal Mipa Unstrat Online*. 2 (2) 128-132.
- Novita. 2016. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih (*Piper betle*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro. *JMJ*. 4(2):140-155.
- Nurasiah ES. 2010. Pengoptimuman ekstraksi andrografolida dari sambiloto dengan rancangan fraksional faktorial [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurika I, Suhartini S. 2019. *Bioenergi dan Biorefinery*. Malang(ID): UB Press.
- Pages JM, Amaral L. 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1(1): 826-833.
- Perina I, Satiruaomo, Soetredjo FE, Hindarso H. 2007. Ekstraksi pektin dari berbagai macam kulit jeruk. *Widya Teknik*. 6 (1): 1-10.
- Puspita PJ, Safithri M, Sugiharti NP. 2018. Antibacterial activities of sirih merah (*Piper crocatum*) leaf extracts. *Current Biochemistry*. 5(3):1-10.
- Ramadani F. 2018. Aktivitas antioksidan, total tanin ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan identifikasi dengan LC-MS [skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor
- Safithri M, Fahma F, Marlina PWN. 2012. Analisis proksimat dan toksisitas akut ekstrak daun sirih merah yang berpotensi sebagai antidiabetes. *Jurnal Gizi dan Pangan*. 7(1): 43-48.
- Sari YD, Djannah SN, Nurani LH. 2010. Uji aktivitas antibakteri infusa daun sirih (*Annona muricata L.*) secara in vitro terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 serta profil kromatografi lapis tipisnya.
- Sayuti M. 2017. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*Isis hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*. 1(3): 166-174.
- Septiani R. 2017. Ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) sebagai antioksidan dengan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Susanto D, Sudrajat, Ruga. 2012. Studi kandungan bahan aktif tumbuhan meranti merah (*Shorea leprosula* Miq) sebagai sumber senyawa antibakteri. *Mulawarman Scientifies*. Vol. 11 (2): 181-190.
- Tambunan T. 2018. Antibiotic resistance control (ARCP) in Indonesia. *Prosiding Simposium LXXIV A to Z About Infections Pediatric Antibiotic Stewardship: How to Prevent of Antibiotic Resistance?*. Jakarta, 29-30 April 2018
- Wedasari IAI. 2018. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan metode

rancimat dan identifikasi dengan LC-MS [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

Weni M. 2014. Aktivitas penghambatan ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap pembentukan malondialdehida (MDA) dan enzim tirosinase [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

Wijaya H, Novitasari, Jubaidah S. 2018. Perbandingan metode ekstraksi terhadap rendemen ekstrak daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 4(1): 79-83.

Yanti YN, Mitika S. 2017. Uji efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*.2(1): 158-168.