

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL,
PETROLEUM ETER, DAN ETIL ASETAT
DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP
BAKTERI *Streptococcus mutans***

Skripsi



Oleh :

NADIA PUDIARIFANTI

07613081

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2011

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi saya yang berjudul “Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol, etil asetat, petroleum eter daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*” adalah benar-benar hasil penelitian sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Yogyakarta, Oktober 2011

Penulis,

Nadia Pudiarifanti

KATA PENGANTAR



Puji Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan ijin-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL, PETROLEUM ETER, DAN ETIL ASETAT DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans*” ini untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai gelar Sarjana Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.

Skripsi ini tidak akan selesai tanpa adanya bantuan dari banyak pihak, dengan kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Bapak Yandi Syukri, M.Si, Apt, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
2. Bapak M. Hatta Prabowo, M. Si, Apt, selaku Ketua Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
3. Ibu dr. Farida Juliantina R., M. Kes, selaku pembimbing Utama yang selalu sabar, bersedia meluangkan waktu dalam mengarahkan, memotivasi dan membimbing penulis hingga selesainya skripsi ini.
4. Bapak Hady Anshory, S.Si., Apt selaku pembimbing pendamping yang selalu memberi semangat dan dengan kesabaran membimbing penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Daryanto, Ibu Endang, Mas Apin, Mas Ipin, Mbak Alin, dan ponakanku M. Habibie yang selalu memberikan semangat, fasilitas sarana-prasarana, dan doanya hingga skripsi ini terselesaikan.
6. Laboran Laboratorium, Bapak/Ibu Dosen pengajar dan semua staf jurusan Farmasi.

7. Teman-teman seperjuangan Farmasi UII, sahabat-sahabatku Deby, Nur, Lia, Alisa, Obo, Bkti, Iva yang telah memberikan semangat, senyum cerianya, dan tumpangan tempat istirahat.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi hasil yang lebih baik lagi. Penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberi tambahan ilmu bagi pembaca. Amin.

Yogyakarta, 2011

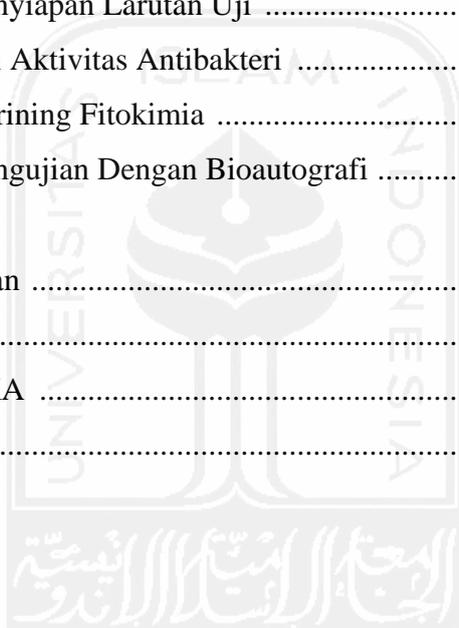


Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
INTISARI	xii
<i>ABSTRACT</i>	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	2
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II. STUDI PUSTAKA	
A. Tinjauan Pustaka	
1. Karies Gigi	4
2. <i>Streptococcus mutans</i>	7
3. Sirih merah (<i>Piper crocatum</i>)	8
4. Kandungan senyawa kimia sirih merah	10
5. Ekstraksi	14
6. Antibakteri dan Metode pengujian	15
7. Bioautografi	19
8. Kromatografi lapis tipis	20
B. Landasan Teori	22
BAB III. METODE PENELITIAN	
A. Rancangan Penelitian	23
B. Tempat dan Waktu Penelitian	23
C. Subjek Penelitian	23
D. Variabel	23
E. Bahan dan Alat	24
F. Cara Penelitian	24

G. Skema I	29
H. Skema II	30
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Determinasi	31
B. Hasil Pemanenan Sirih Merah	31
C. Hasil Penyiapan Serbuk Daun Sirih Merah	32
D. Hasil Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah	32
E. Hasil Pembuatan Media	35
F. Hasil Sterilisasi Alat	35
G. Hasil Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	35
H. Hasil Penyiapan Larutan Uji	35
I. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri	36
J. Hasil Skrining Fitokimia	41
K. Hasil Pengujian Dengan Bioautografi	44
BAB V. PENUTUP	
A. Kesimpulan	46
B. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	50

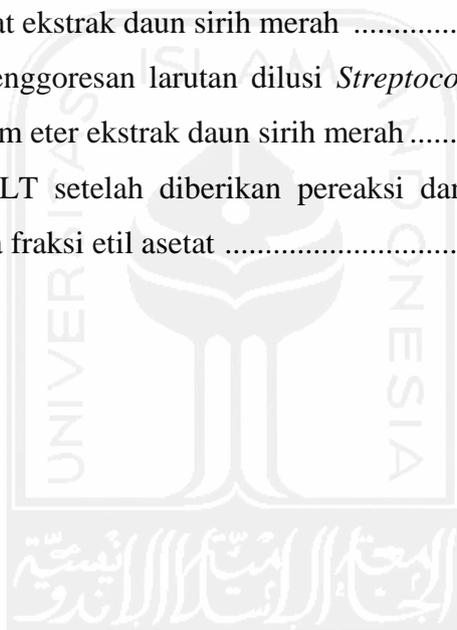


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Karies pada gigi	4
Gambar 2. Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	7
Gambar 3. Tanaman Sirih Merah	9
Gambar 4. Struktur senyawa isoflavon	10
Gambar 5. Struktur flavonoid secara umum	11
Gambar 6. Struktur senyawa golongan tanin	12
Gambar 7. Struktur senyawa alkaloid.....	12
Gambar 8. Struktur saponin	13
Gambar 9. Struktur gugus fenol	14
Gambar 10. Struktur etil asetat.....	34
Gambar 11. Hasil goresan dilusi fraksi metanol.....	39
Gambar 12. Hasil goresan dilusi fraksi etil asetat	40
Gambar 13. Hasil goresan dilusi fraksi petroleum eter	40
Gambar 14. Profil KLT	42
Gambar 15. Hasil bioautografi	44

DAFTAR TABEL

Tabel I. Penilaian risiko karies menurut American Academy of Pediatrics Dentistry	5
Tabel II. Hasil uji fraksi metanol ekstrak daun sirih merah terhadap <i>Streptococcus mutans</i>	38
Tabel III. Hasil uji fraksi etil asetat ekstrak daun sirih merah terhadap <i>Streptococcus mutans</i>	38
Tabel IV. Hasil penggoresan larutan dilusi <i>Streptococcus mutans</i> fraksi metanol ekstrak daun sirih merah	39
Tabel V. Hasil penggoresan larutan dilusi <i>Streptococcus mutans</i> fraksi etil asetat ekstrak daun sirih merah	39
Tabel VI. Hasil penggoresan larutan dilusi <i>Streptococcus mutans</i> fraksi petroleum eter ekstrak daun sirih merah	40
Tabel VII. Hasil KLT setelah diberikan pereaksi dan deteksi golongan senyawa fraksi etil asetat	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I.	Hasil determinasi tanaman sirih merah (<i>Piper crocatum</i>) ...	51
Lampiran II.	Alat dan bahan	52
Lampiran III.	Hasil uji aktivitas bakteri metode dilusi	53
Lampiran IV.	Hasil uji antibiotik amoxicilin	54
Lampiran V.	Hasil dilusi <i>Dimethyl sulfoxide</i> (DMSO).....	55



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL,
PETROLEUM ETER, DAN ETIL ASETAT
DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP
BAKTERI *Streptococcus mutans***

INTISARI

Latar belakang : Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman yang perlu dikembangkan karena memiliki banyak manfaat. Daun sirih merah secara empiris mampu mencegah karies pada gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekstrak fraksi metanol, etil asetat, atau petroleum eter ekstrak sirih merah yang dapat menghambat atau membunuh bakteri *Streptococcus mutans*, untuk mengetahui nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum), serta mengetahui kandungan yang terdapat pada sirih merah.

Metode : Pengujian dilakukan dengan metode serial dilusi. Ekstrak sirih merah difraksinasi berdasarkan polaritas. Perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak sirih merah yaitu 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%, dengan 4 kontrol, yaitu kontrol bakteri, ekstrak, media dan pengujian antibiotik amoxicilin.

Hasil : Hasil menunjukkan aktivitas terbesar terdapat pada fraksi etil asetat ekstrak daun sirih merah, dengan konsentrasi hambat bakteri 6,25%, dan konsentrasi bunuh bakteri 6,25%, diikuti dengan fraksi metanol, sedangkan fraksi petroleum eter tidak memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi yang diujikan yaitu 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Pada ekstrak fraksi etil asetat, diduga terdapat senyawa flavonoid, alkaloid, fenolat, dan saponin yang ditunjukkan oleh hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri setelah diuji dengan bioautografi.

Kesimpulan : Fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar. Hasil ditunjukkan dengan nilai KHM 6,25% dan nilai KBM 6,25%. Pada fraksi ini dideteksi memiliki kandungan senyawa golongan flavonoid, alkaloid, fenolat, dan saponin yang diduga memiliki aktivitas antibakteri.

Kata kunci : Sirih merah (*Piper crocatum*) – Etil asetat – Bioautografi – *Streptococcus mutans* – Kromatografi Lapis Tipis.

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF
RED BETEL VINE (*Piper crocatum*) EXTRACT METHANOL,
ETHYL ACETAT, PETROLEUM ETHER WITH RESPECT TO
*Streptococcus mutans***

ABSTRACT

Background : Red betel vine (*Piper crocatum*) is one of the plant that needs to be developed because it has many benefits. Red betel vine leaves are empirically able to prevent dental caries. The aim of this study was to investigate which fraction of methanol, ethyl acetate or petroleum ether red betel vine extracts can inhibit or kill *Streptococcus mutans* bacteria, to determined MIC (Minimum Inibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Consentration) value, and to determined the content coumpounds of red betel vine.

Methods : Test performed by serial dilution method. The extract fractionated by polarity. The treatment on this study was used concentration of antimicrobia 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, and 0.78% with 4 control, that is bacterial, extract, medium control, and antibiotic test with amoxicillin.

Results : The result showed that ethyl acetat fraction from red betel vine have the best activity antimicroba than the other fraction, with minimum inhibitory concentration 6.25% and minimum bactericidal concentration 6.25%, followed by methanol fraction, while petroleum ether fraction didn't have antibacteria activity on concentration 25%, 12.5% ,6.25%, 3.125%, 1.56%, dan 0.78% . The result from Thin Layer Chromatography (TLC) showed ethyl asetat fraction extract containing flavonoid, alkaloid, phenolat, and saponin compounds and these compounds have antibacterial activity when tested with bioautography.

Conclusion : Ethyl acetat fraction from red betel extract had the best antibacteria activity, with MIC 6.25% and MBC 6.25% and they contain flavonoid, alkaloid, phenolat, and saponin faction coumpound.

Keyword : Red betel vine (*Piper crocatum*) – Ethyl acetat – Bioautography –
Streptococcus mutans – Thin Layer Chromatography.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Plak gigi merupakan penyebab utama terjadinya karies gigi⁽¹⁾. Karies gigi adalah penyakit yang ditandai dengan kerusakan jaringan keras gigi yang dimulai dari permukaan enamel dan meluas ke arah pulpa⁽²⁾. Akibat dari penyakit gigi ini tidak hanya menyebabkan kehilangan gigi, namun bakteri dapat menyebar melalui aliran darah menuju ke organ-organ tubuh yang penting lainnya. Karies dan penyakit pada periodonsium merupakan penyakit gigi dengan prevalensi tinggi, bahkan di negara-negara maju mencapai 50%. Di Indonesia, hasil survei Direktorat Kesehatan Gigi tahun 1994/1995 pada anak usia 12 tahun diperoleh angka prevalensi terjadinya karies dan radang periodontal sebesar 74,41%⁽³⁾. Bakteri utama penyebab terjadinya plak karies adalah *Streptococcus mutans*⁽¹⁾.

Streptococcus mutans adalah bakteri flora normal penghuni rongga mulut yang masih dapat bertukar sifat menjadi patogen⁽⁴⁾. Bakteri ini mampu melekat pada permukaan gigi dan mampu memproduksi enzim glukuronil transferase, yaitu enzim yang dapat menghasilkan glukuron yang tidak larut dalam air dan berperan dalam menimbulkan plak dan koloni pada permukaan gigi⁽³⁾. Diperlukan upaya untuk menjaga keseimbangan flora rongga di mulut. Salah satu upaya tersebut adalah penggunaan bahan antiseptik dari alam maupun sintetis untuk mencegah terjadinya karies pada gigi.

Berbagai penelitian telah dilakukan dengan menggunakan bahan alam untuk menghasilkan obat-obatan yang mendukung program kesehatan gigi, khususnya untuk mencegah penyakit karies gigi. Kembalinya perhatian masyarakat terhadap pengobatan dari bahan alam (*back to nature*) dianggap sangat mendukung program tersebut. Selain itu, efek samping yang merugikan dari bahan alam yang jarang terjadi jika dibandingkan obat sintesis ini juga faktor yang menyebabkan masyarakat beralih ke bahan alam⁽⁵⁾.

Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman herbal yang saat ini marak diperbincangkan. Sirih merah ini memiliki berbagai kandungan senyawa kimia yang mampu mengobati berbagai penyakit dan antibakteri, seperti tanin, flavonoid, polifenol, dan saponin. Salah satu khasiat sirih merah yang

dipercaya oleh masyarakat adalah dapat mencegah kerusakan pada gigi atau memperkuat gigi⁽⁶⁾. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol, petroleum eter, atau etil asetat daun sirih merah terhadap pencegahan pembentukan plak gigi yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus mutans* sehingga dapat menurunkan tingkat kejadian karies gigi di Indonesia serta mengurangi efek samping yang tidak diinginkan dari penggunaan obat-obat bahan sintetik.

B. Perumusan Masalah

1. Apakah fraksi metanol, petroleum eter, dan etil asetat dari ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas untuk menghambat atau membunuh bakteri *Streptococcus mutans*?
2. Berapa kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Streptococcus mutans*?
3. Apa saja senyawa yang terkandung dalam fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang memiliki potensi terbaik sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas fraksi metanol, petroleum eter, dan etil asetat dari ekstrak daun sirih merah yang dapat menghambat atau membunuh bakteri *Streptococcus mutans*.
2. Untuk mengetahui kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap *Streptococcus mutans*.
3. Untuk mengetahui kandungan pada fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang memiliki potensi terbaik sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*.

D. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini, diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan mengenai manfaat ekstrak metanol, petroleum eter dan etil asetat daun sirih merah terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* sehingga dapat digunakan untuk mencegah karies pada gigi dan kehilangan gigi.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat dalam memilih bahan alam yang digunakan untuk mencegah karies pada gigi.
3. Penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan peneliti lain untuk meneliti lebih jauh mengenai efek ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap strain bakteri patogen.



BAB II

STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Karies Gigi

Karies gigi merupakan masalah yang sering terjadi akibat kurangnya kesadaran masyarakat dalam menjaga kesehatan mulut⁽⁷⁾. Karies gigi adalah penyakit yang ditandai dengan kerusakan jaringan keras pada gigi dari permukaan enamel dan meluas ke arah pulpa. Karies gigi dapat menyebabkan infeksi, sakit, bahkan kehilangan gigi⁽⁵⁾.



Gambar 1. Karies pada gigi⁽⁸⁾

Risiko karies adalah kemungkinan berkembangnya karies pada individu atau terjadinya perubahan status kesehatan yang mendukung terjadinya karies pada suatu periode tertentu. Risiko karies bervariasi pada setiap individu tergantung pada keseimbangan faktor pencetus dan penghambat terjadinya karies. Risiko karies dibagi menjadi tiga tingkatan, yaitu risiko karies tinggi, sedang, dan rendah. Penilaian ini digunakan untuk menyesuaikan kondisi dengan pencegahan dan perawatan yang akan dilakukan⁽⁹⁾.

Tabel I. Penilaian risiko karies menurut
American Academy of Pediatrics Dentistry⁽⁹⁾

Indikator risiko karies	Risiko rendah	Risiko sedang	Risiko tinggi
Kondisi-klinis	Tidak ada gigi karies dalam 24 bulan terakhir Tidak ada demineralisasi email Tidak terlihat plak serta gingivitis	Gigi karies dalam 24 bulan terakhir Satu area demineralisasi email Gingivitis	Gigi karies dalam 12 bulan terakhir Lebih dari satu area demineralisasi email Plak terlihat pada gigi anterior Karies email terlihat secara radiografis Banyak jumlah <i>Streptococcus mutans</i> Menggunakan alat ortodonti Hipoplasia email
Karakteristik lingkungan	Paparan fluor optimal secara sistemik dan topikal Konsumsi gula sederhana atau makanan yang berhubungan dengan inisiasi karies terutama saat makan Perawatan gigi di rumah rutin	Paparan fluor sistemik suboptimal, fluor topikal optimal Konsumsi gula sederhana atau makanan yang berhubungan dengan karies sewaktu-waktu Perawatan gigi tidak Teratur	Paparan fluor topikal suboptimal Konsumsi gula sederhana atau makanan yang berhubungan dengan karies sering Ibu dengan karies Aktif
Keadaan kesehatan umum	-	-	Anak-anak berkebutuhan khusus Keadaan yang mengganggu komposisi/aliran saliva

Kejadian karies gigi tidak hanya dialami oleh anak-anak, namun dapat dialami oleh semua kelompok umur. Pada orang tua khususnya mereka dengan permukaan akar gigi yang terekpos merupakan populasi risiko khusus⁽¹⁰⁾. Karies gigi dapat terjadi akibat beberapa faktor yang multifaktorial, yaitu faktor pejamu (*host*), faktor mikroorganisme atau bakteri, karbohidrat dan faktor waktu⁽¹¹⁾. Faktor gigi menjadi penyebab karies karena struktur anatomi gigi yang berlekuk-lekuk sehingga sulit untuk dibersihkan secara sempurna dan dapat mempercepat proses lubang gigi. Faktor mikroorganisme atau bakteri menjadi faktor tercepat terjadinya karies pada gigi. Peran makanan, karbohidrat juga dapat menyebabkan karies.

Penelitian Vipeholm (1945–1953) menyimpulkan bahwa konsumsi makanan dan minuman yang mengandung gula diantara jam makan dan pada saat makan berhubungan dengan peningkatan karies. Faktor waktu, kombinasi faktor makanan, faktor gigi, dan adanya bakteri membutuhkan proses dalam waktu untuk terjadinya karies pada gigi⁽¹²⁾. Pencegahan terjadinya karies pada gigi dapat dilakukan dengan selalu memperhatikan kebersihan mulut, diet, serta penggunaan fluor dan klorheksidin⁽⁹⁾.

Fluor digunakan untuk melindungi gigi dari karies. Fluor bekerja dengan cara menghambat metabolisme bakteri plak yang dapat memfermentasi karbohidrat melalui perubahan hidroksil apatit pada enamel menjadi fluor apatit, sehingga menghasilkan enamel yang lebih tahan terhadap asam sehingga dapat menghambat proses demineralisasi dan meningkatkan remineralisasi yang merangsang perbaikan dan penghentian lesi karies⁽¹³⁾.

Klorheksiden merupakan antimikroba yang digunakan sebagai obat kumur, pasta gigi, permen karet, varnis dan dalam bentuk gel. Silen harus ditempatkan secara selektif pada pasien yang berisiko karies tinggi⁽¹⁴⁾. Prioritas tertinggi diberikan pada molar pertama permanen di antara usia 6–8 tahun, molar kedua permanen di antara usia 11–12 tahun, prioritas juga dapat diberikan pada gigi premolar permanen dan molar susu⁽⁹⁾.

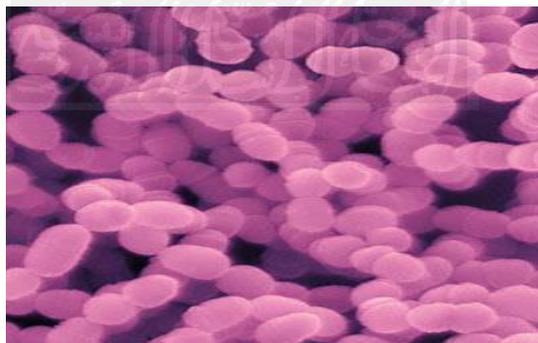
2. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans dikemukakan pertama kali oleh Clark pada tahun 1924 setelah mengisolasi suatu lubang luka, namun hingga pada tahun 1960-an mikroba tersebut tidak ditemukan. Mikroba tersebut dihasilkan ketika peneliti mulai melakukan penelitian pada kerusakan gigi⁽¹⁵⁾.

Streptococcus mutans diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i> ⁽¹⁵⁾

Streptococcus mutans merupakan suatu bakteri Gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°-40°C. *Streptococcus mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies untuk email gigi⁽¹⁵⁾.



Gambar 2. Bakteri *Streptococcus mutans*⁽¹⁵⁾

Streptococcus mutans memiliki sifat asidogenik yaitu menghasilkan asam, asidodurik, mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket disebut dextran. Oleh karena kemampuan ini, *Streptococcus mutans* bisa menyebabkan lengket dan mendukung bakteri lain

menuju ke email gigi, lengket mendukung bakteri- bakteri lain, pertumbuhan bakteri asidodurik yang lainnya, dan asam melarutkan email gigi⁽¹⁵⁾.

Bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri yang terdapat dalam rongga mulut. Bakteri ini mampu menyebabkan karies pada gigi, menyebabkan gigi berlubang, bahkan dapat menyebabkan kehilangan gigi. Perkembangan penyakit karies ini berlangsung secara cepat dan terjadi setelah gigi erupsi, dengan gambaran klinis yang terdiri dari empat tahap, yaitu :

a. Tahap inisial

Tahap ini terjadi pada anak usia 10-20 bulan atau lebih muda. Proses karies diawali dengan terlihatnya garis berwarna putih seperti kapur pada insisivus maksila. Tahap ini masih dapat dikembalikan.

b. Tahap dua

Tahap ini terjadi pada anak berusia 16-24 bulan. Lesi putih pada insisivus berkembang dan menyebabkan demineralisasi enamel sehingga dentin terbuka dan membuat lesi menjadi coklat kemudian hitam. Pada tahap ini pasien mengeluh dan sensitif terhadap rasa dingin.

c. Tahap tiga

Tahap ini terjadi ketika anak berusia 20-36 bulan, lesi sudah meluas dan terjadi iritasi pulpa. Pada tahap ini anak mengeluh sakit ketika mengunyah dan menyikat gigi.

d. Tahap empat

Terjadi ketika anak berusia 30-48 bulan. Lesi meluas ke seluruh enamel, mengelilingi regio servikal, dentin, dan terjadi kerusakan pada mahkota. Pada tahap ini anak akan susah tidur dan menolak untuk makan⁽²⁾.

3. Sirih merah (*Piper crocatum*)

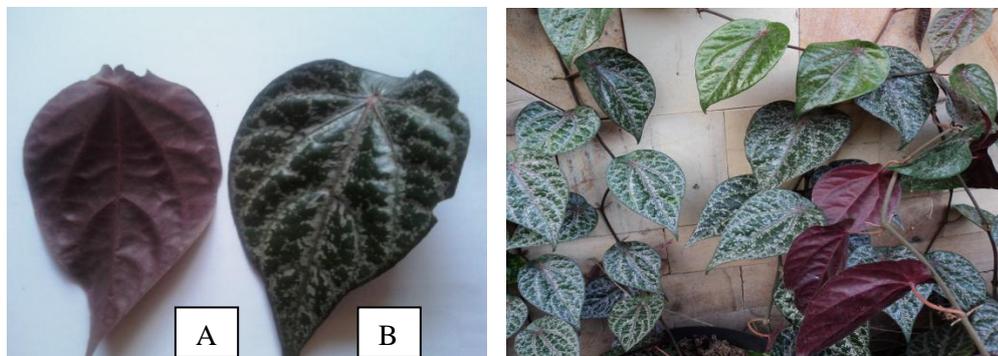
Sirih merah dikenal sebagai tanaman hias oleh masyarakat karena penampilannya yang menarik. Sirih merah sejak dulu telah digunakan oleh masyarakat yang berada di Pulau Jawa sebagai obat untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit dan merupakan bagian dari acara adat, namun tahun-tahun terakhir sering dimanfaatkan sebagai tanaman obat⁽¹⁶⁾.

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) secara tradisional banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti: batuk, asma, radang hidung dan radang tenggorokan⁽⁶⁾, sariawan, mengurangi keputihan akut, serta pembersih luka bahkan berkhasiat juga untuk menyembuhkan penyakit degeneratif, seperti diabetes melitus, penyakit berat seperti jantung koroner, radang prostat, tuberkulosis, asam urat, kanker payudara, penyakit ginjal, hepatitis dan berbagai penyakit lainnya⁽¹⁶⁾.

Klasifikasi tanaman sirih merah menurut Backer (1963)⁽¹⁷⁾ adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Divisio : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Order : Piperales
 Family : Piperaceae
 Genus : *Piper*
 Species : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Tanaman sirih merah tumbuh menjalar seperti sirih hijau. Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atasnya meruncing, bertepi rata, dan permukaannya mengkilap atau tidak berbulu berwarna hijau pada bagian atas dan berwarna merah pada bagian bawah daun. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Pada setiap buku tumbuh bakal akar⁽¹⁶⁾.



Gambar 3. Tanaman sirih merah (*Piper crocatum*). Daun berwarna merah pada bagian bawah (A), berwarna hijau pada bagian atas dan mengkilap (B)

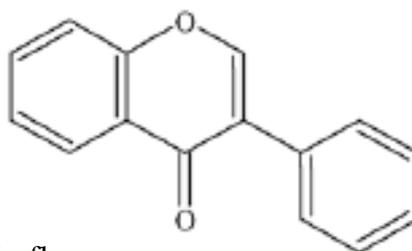
Tanaman sirih merah tidak tumbuh di setiap tempat atau daerah, dan tidak dapat tumbuh subur di daerah yang panas. Sirih merah dapat tumbuh dengan baik di tempat yang teduh dan mendapatkan 60-75% cahaya matahari, tidak terlalu banyak terkena sinar matahari langsung pada siang hari secara terus-menerus karena dapat mengakibatkan warna merah daunnya menjadi pudar, buram, kurang menarik, batangnya akan cepat mengering, namun jika disiram secara berlebihan, akar dan batang akan cepat membusuk⁽¹⁶⁾.

4. Kandungan senyawa kimia sirih merah

Penelitian yang dilakukan oleh Puspitasari diperoleh hasil bahwa sirih merah memiliki kandungan kimia berupa flavonoid, alkaloid, tanin, polifenol, minyak atsiri⁽¹⁶⁾, dan saponin⁽⁶⁾. Kandungan tersebut dimungkinkan memiliki potensi terhadap bakteri. Berikut merupakan uraian kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak sirih merah :

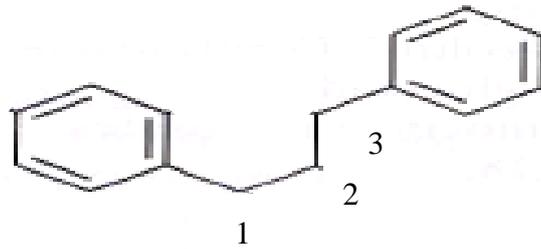
a. Flavonoid

Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri⁽¹⁷⁾. Senyawa flavonoid mengandung C₁₅ yang terdiri atas dua fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon⁽¹⁸⁾. Menurut Dwidjoseputro, flavonoid merupakan senyawa fenol sementara senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein⁽¹⁸⁾. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air, sebagian dapat diekstraksi dengan etanol 70%, dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau ammonia⁽¹⁹⁾.



Isoflavone

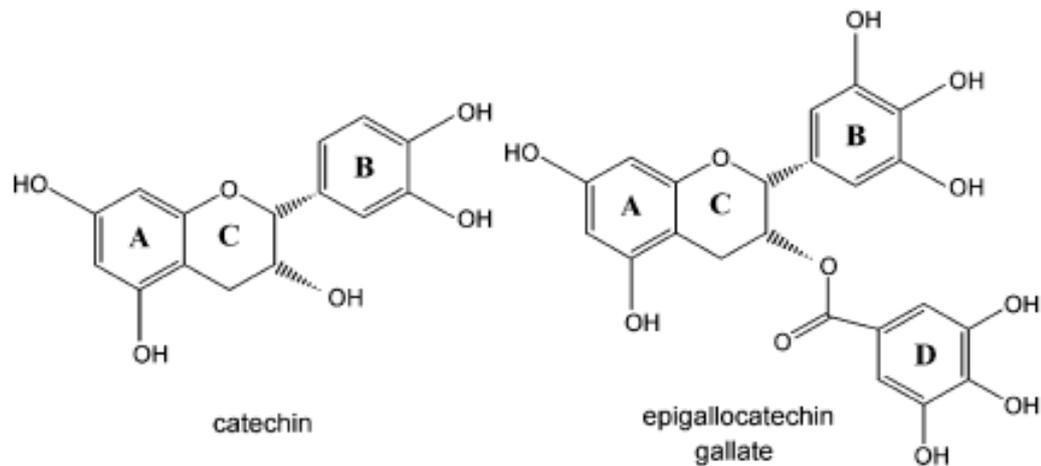
Gambar 4. Struktur isoflavon⁽²⁰⁾



Gambar 5. Struktur flavonoid secara umum⁽²¹⁾

b. Tanin

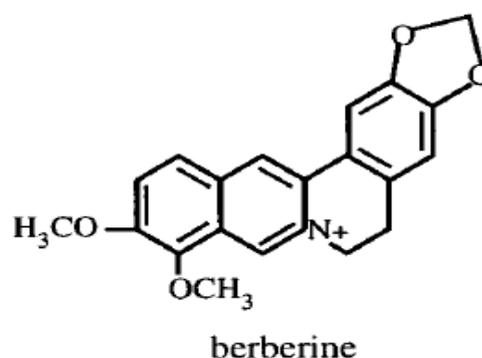
Tannin bersifat sebagai antiseptik pada luka permukaan, bekerja sebagai bakteriostatik yang biasanya digunakan untuk infeksi pada kulit, mukosa dan melawan infeksi pada luka⁽²²⁾. Tanin merupakan polifenol yang larut dalam air. Tanin sering ditemukan pada tanaman herba dan tumbuhan berkayu. Tanin dapat menghambat atau membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*⁽²³⁾. Mekanisme antibakteri oleh tanin diperkirakan sebagai berikut : toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Sementara menurut Ajizah (2004)⁽¹⁷⁾ tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Masduki (1996)⁽¹⁷⁾ menyatakan bahwa tanin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik⁽¹⁷⁾.



Gambar 6. Struktur senyawa golongan tanin⁽²⁴⁾

c. Alkaloid

Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom N, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tanpa warna, kebanyakan berbentuk kristal, hanya sedikit yang berupa cairan. Senyawa alkaloid dapat dideteksi dengan pereaksi Dragendorf⁽¹⁹⁾. Alkaloid dikelompokkan menjadi alkaloid sesungguhnya, protoalkaloid, dan pseudoalkaloid⁽¹⁸⁾. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut⁽¹⁷⁾. Senyawa – senyawa alkaloida yang terdapat pada daun sirih merah belum diketahui secara pasti, namun berdasarkan jenis cincin heterosiklik nitrogen, alkaloida dapat dibedakan menjadi beberapa jenis. Adapun struktur contoh senyawa alkaloida yang mampu sebagai berikut :



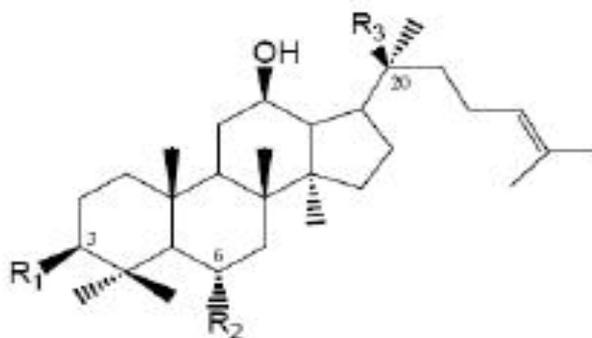
Gambar 7. Senyawa golongan alkaloid⁽²¹⁾

d. Minyak atsiri

Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis⁽¹⁷⁾. Pada minyak atsiri dimungkinkan mengandung suatu senyawa fenol, senyawa ini dapat merusak protein bakteri sehingga aktivitas fisiologis terganggu, menghambat pertumbuhannya dan akan merusak sel⁽²⁵⁾.

e. Saponin

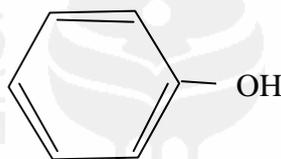
Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit, memiliki masa molekul yang besar, dan kegunaan yang luas⁽²⁶⁾. Saponin mempunyai bagian utama berupa turunan triterpen dengan sedikit steroid. Saponin mempunyai efek membranolitik yaitu membentuk kompleks dengan kolesterol pada membran sel protozoa. Saponin memiliki efek antibakteri dan antijamur. Saponin dapat merusak membran sitoplasma dan membunuh bakteri dengan cara struktur senyawa saponin berikatan dengan molekul hidrofilik dan molekul-molekul organik non polar (lipofilik)⁽²⁷⁾.



Gambar 8. Struktur saponin⁽²⁸⁾

f. Polifenol

Polifenol adalah senyawa fenolik yang memiliki lebih dari satu gugus hidroksil (OH), golongan senyawa ini terdapat pada berbagai jenis tumbuhan yang mempunyai berbagai macam aktivitas biologi⁽²⁹⁾. Mekanisme yang berhubungan dengan toksisitas fenol terhadap mikroorganisme adalah penghambatan enzim oleh senyawa teroksidasi kemungkinan lewat reaksi dengan gugus sulfihidril atau dengan interaksi yang tidak spesifik oleh protein⁽²¹⁾. Senyawa fenol dapat menyebabkan denaturasi protein melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein-fenol dengan ikatan lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi, fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis, mengubah permeabilitas membran bakteri⁽³⁰⁾



Gambar 9. Struktur gugus fenol⁽³¹⁾

5. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstraksi merupakan penarikan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan pelarut tertentu⁽³²⁾. Terdapat beberapa macam metode ekstraksi, yaitu :

a. Maserasi

Eksraksi ini merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Cara eksraksi yaitu dengan merendam simplisia dan disimpan terlindung dari cahaya matahari langsung. Pada proses ekstraksi, rendaman harus dikocok berulang-ulang, agar keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif terjadi, karena dalam kondisi diam menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif⁽³³⁾.

b. Infudasi

Infundasi dilakukan dengan cara mencampur serbuk dengan air secukupnya dalam sebuah panci kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit yang dihitung mulai suhu di dalam panci mencapai 90°C sambil berkali-kali diaduk. Infusa disaring ketika masih panas dengan menggunakan kain flanel. Penyarian cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur⁽³⁴⁾.

c. Sokletasi

Cara ekstraksi yaitu bahan yang akan diekstraksi diletakkan dalam sebuah kantong ekstraksi dalam perkolator yang terletak antara labu pendingin dan dihubungkan dengan labu yang berisi pelarut melalui pipa. Larutan berkumpul dalam wadah setelah mencapai tinggi maksimal. Keuntungan metode ini adalah memerlukan pelarut dalam jumlah kecil, simplisia selalu mendapat suplai bahan pelarut bebas bahan aktif secara terus-menerus. Kerugian metode ini adalah waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi lama, memerlukan energi tinggi, tidak untuk bahan yang tidak tahan panas⁽³³⁾.

d. Perkolasi

Cara ekstraksi ini dilakukan dalam suatu perkolator. Bahan pengestraksi dialirkan secara berlanjut dari atas dan menurun secara lambat melintasi simplisia. Hasil ekstraksi ditentukan oleh lama ekstraksi dan kecepatan penetesan. Jika kecepatan sangat rendah, perbedaan konsentrasi bahan ekstraktif dalam simplisia akan cepat seimbang. Keuntungan metode ini adalah ekstrak bahan aktif yang tinggi, banyak ekstrak, dan waktu pembuatan singkat, namun metode ini memerlukan pengawasan dan pengamatan yang ketat⁽³³⁾.

6. Antibakteri dan Metode Pengujian

a. Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan. Antibakteri termasuk ke dalam antimikroba yang digunakan

untuk menghambat pertumbuhan (bakteriostatik) atau membunuh bakteri (bakteriosidal)⁽³⁵⁾. Salah satu antibakteri yang digunakan adalah antibiotik. Antibiotika adalah suatu substansi (zat-zat) kimia yang dihasilkan atau dibentuk oleh mikroorganisme, dan zat-zat tersebut dalam jumlah yang sedikit mampu menghambat aktivitas mikroorganisme yang lain. Antibiotika dibedakan berdasarkan efektivitasnya dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu antibakteri dengan spektrum luas (*broad spectrum*) dan antibakteri dengan spektrum sempit. Antibakteri dengan spektrum luas adalah antibiotika yang efektif digunakan untuk berbagai spesies bakteri, baik kokus, basil, maupun spiral contohnya tetrasiklin. Antibiotika yang berspektrum sempit artinya adalah bahwa antibiotik tersebut hanya efektif digunakan untuk bakteri dengan spesies tertentu⁽³⁶⁾. Sebagian besar antibiotika memiliki indeks terapeutik yang lebar, yaitu dosis yang menyebabkan efek yang tidak diinginkan jauh lebih besar dibandingkan dosis untuk menghambat perkembangbiakan bakteri⁽³⁷⁾. Antibiotika dapat bersifat sebagai bakteriosida atau bakteriostatik. Antibiotika juga dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya dalam menghambat atau membunuh bakteri. Adapun mekanisme kerja antibiotika dalam mengganggu bagian-bagian yang peka di dalam sel, yaitu :

1) Antibiotika yang mempengaruhi dinding sel

Antibiotika ini akan mengganggu pembentukan dinding sel atau mencegah sintesisnya. Adapun antibiotik yang memiliki aktivitasnya dengan menghambat dinding sel, yaitu antibiotik golongan penisilin, sefalosporin, basitrasin, sikloserin⁽³⁶⁾. Antibiotika ini digunakan untuk bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung peptidoglikan, protein, fosfolipid, lipoprotein dan lipopolysakarida, sedangkan dinding sel bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan, namun bakteri mungkin atau tidak dikelilingi oleh protein⁽³⁸⁾.

2) Antibiotika yang mengganggu fungsi membran sel

Membran sel memiliki peran sebagai pelindung dengan permeabilitas selektif, melakukan pengangkutan aktif, dan mengendalikan susunan

dalam sel, serta mempengaruhi metabolit dan gizi sel⁽³⁶⁾. Sejumlah agen antimikroba dapat menyebabkan disorganisasi membran, yaitu agen kation, anion, dan netral⁽³⁸⁾. Antibiotika dengan mekanisme ini, bekerja dengan merusak atau memperlemah fungsi dari membran sel sehingga menyebabkan gangguan terhadap kehidupan sel. Beberapa antibiotika yang bekerja dengan mekanisme ini adalah amfoterisin B, nistatin, kolistin, polimiksin⁽³⁶⁾.

3) Antibiotika yang menghambat sintesis protein

Bakteri memiliki dua subunit ribosom, yaitu subunit 50S dan 30S dan mungkin memiliki lokasi antibiotik pada satu atau kedua subunit. Isolasi protein ribosom spesifik yang terikat agen dan isolasi bakteri *mutans* yang tidak memiliki protein ribosom⁽³⁸⁾. Sintesis protein merupakan hasil dari proses transkripsi dan translasi. Antibiotika yang mampu menghambat transkripsi atau translasi ini, akan menghambat sintesis protein. Antibiotika yang bekerja dengan mekanisme ini adalah rimfapisin, streptomisin, tetrasiklin, klindamisin, neomisin, kloramfenikol⁽³⁶⁾.

4) Antibiotika yang menghambat sintesis asam nukleat

Antibiotika yang bekerja dengan mekanisme ini adalah asam nalidixat, novobiosin, pirimetamin, trimetoprim, sulfonamida. Obat-obat ini akan menghambat sintesis Asam Deoxyribonukleat (ADN). Obat-obat tersebut akan membentuk kompleks dengan ADN melalui ikatan pada residu deoksiguanosin. Kompleks ADN-aktiomisin akan menghambat polimerase Asam Ribonukleat (ARN) yang tergantung ADN⁽¹⁰⁾. Antibiotika ini dapat mengganggu sintesis purin dan pirimidin atau mengganggu nukleotida⁽³⁸⁾. Antiseptik adalah zat yang digunakan untuk membunuh atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme, biasanya merupakan sediaan yang digunakan pada jaringan hidup. Aktivitas antiseptik sebagai antimikrobia kimia digunakan dipengaruhi oleh lingkungan dari mikroorganisme yang akan dihilangkan, jenis bahan, lama paparan (waktu kontak) antiseptik, kekuatan dan aksi kimia dari antiseptik⁽³⁹⁾.

b. Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas bakteri dapat menggunakan media yang sesuai dengan bakteri yang akan diuji. Adapun metode yang dapat dilakukan adalah :

1) Metode difusi

i. Metode *disc diffusion* (tes Kirby dan Bauer)

Metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikrobia. Area jernih pada media agar yang ditanami mikroorganisme mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar⁽⁴⁰⁾. Pengukuran zona hambat dengan metode ini menggunakan standar zona hambat sebagai kontrol untuk bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. Aureginosa*. Pengukuran zona harus diukur dan dicatat dalam mm kemudian hasil akan diinterpretasikan menurut diameter standarnya⁽⁴¹⁾.

ii. E-test

Metode ini digunakan untuk mengestimasi MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimum suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini menggunakan strip plastik yang mengandung antimikroba yang diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan⁽⁴⁰⁾.

iii. *Ditch-plate technique*

Metode ini dilakukan dengan agen antimikroba yang diletakkan pada parit. Potong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba⁽⁴⁰⁾.

iv. *Cup-plate technique*

Metode ini mirip dengan *disc diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi antimikroba yang akan diuji⁽⁴⁰⁾.

v. *Gradient-plate technique*

Metode ini menggunakan berbagai konsentrasi antimikroba. Media agar dicairkan dan larutan uji ditambahkan. Campuran kemudian dituang ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring kemudian diinkubasi 24 jam untuk memungkinkan antimikroba berdifusi dan permukaan mengering. Mikroba digoreskan ke media. Hasil diperhitungkan sebagai panjang total pertumbuhan mikroorganisme maksimum yang mungkin dibandingkan dengan panjang pertumbuhan hasil goresan⁽⁴⁰⁾.

2) Metode dilusi

Metode dilusi dibagi menjadi dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi digunakan untuk mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (kadar hambat minimum) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau KBM (kadar bunuh minimum). Hasil larutan antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan merupakan KHM. Hasil pada media cair yang diberi antimikroba dan mikroba pada penentuan KHM, digoreskan di media agar dan diinkubasi. Media agar yang tidak ditumbuhi oleh bakteri pada konsentrasi terkecil dinyatakan sebagai KBM⁽⁴⁰⁾.

Metode dilusi padat menggunakan media padat. Keuntungan metode ini adalah salah satu konsentrasi antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji⁽⁴⁰⁾.

7. Bioautografi

Metode bioautografi merupakan metode sederhana yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri atau antikapang. Metode ini menggabungkan penggunaan teknik kromatografi lapis tipis dengan respons dari mikroorganisme yang diuji berdasarkan aktivitas biologi dari analit berupa antibakteri, antikapang ataupun antiprotozoa. Metode ini digunakan untuk mencari antibakteri baru, kontrol kualitas antimikroba, dan mendeteksi golongan senyawa⁽⁴²⁾.

Uji bioautografi merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, antivirus. Keuntungan metode ini adalah efisien untuk mendeteksi senyawa antimikroba karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran kompleks. Kerugian metode ini adalah tidak dapat digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Metode bioautografi, yaitu :

a. Bioautografi langsung

Plat KLT langsung disemprot dengan suspensi mikroorganisme atau menyentuhkannya pada media agar yang ditanami mikroorganisme. Setelah diinkubasi, terlihat area jernih dengan latar belakang keruh.

b. Bioautografi overlay

Penuangan media agar yang telah dicampur mikroorganisme di atas permukaan plat KLT, media ditunggu padat kemudian diinkubasi. Area hambatan terlihat dengan penyemprotan tetrazolium klorida. Senyawa aktif antimikroba terlihat jernih dengan latar belakang ungu⁽¹⁷⁾.

8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Definisi dan Prinsip Kromatografi

TLC (*Thin-Layer chromatography*) atau yang sering disebut dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), merupakan suatu metode kromatografi yang paling sederhana. TLC digunakan untuk memisahkan dan menganalisis hasil secara kuantitatif dan kualitatif. Dengan optimisasi teknik dan bahan beserta peralatannya, akan didapatkan pemisahan yang efisien, akurat, dan presisi⁽⁴³⁾. Keuntungan KLT adalah banyak digunakan untuk tujuan analisis, identifikasi dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau radiasi, dapat dilakukan elusi secara naik, menurun atau 2 elusi dimensi, lebih tepat dalam penentuan kadar karena bercak tidak bergerak, serta peralatannya sederhana⁽⁴⁴⁾.

b. Fase diam

Fase diam yang digunakan adalah penjerap dengan diameter partikel 10-30 μ m. Semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik

kinerja KLT dalam efisiensinya dan resolusinya. Fase diam yang sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa⁽⁴⁴⁾.

c. Fase gerak

Fase gerak yang digunakan merupakan campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut mudah diatur sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Syarat pemilihan fase gerak adalah harus memiliki kemurnian yang tinggi, memiliki harga Rf (faktor retensi) antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan, solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya⁽⁴⁴⁾. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan angka rf atau hrf. Adapun rumus yang digunakan :

$$Rf = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}}$$

Angka rf berjangka antara 0,00-1,00 dan hanya ditentukan dua desimal. Hrf adalah angka rf dikali faktor 100, menghasilkan nilai 0-100⁽⁴⁵⁾.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi :

- 1) Struktur kimia senyawa yg dipisahkan,
- 2) Sifat penjerap dan derajat aktivitas,
- 3) Tebal dan kerataan dari lapisan penjerap,
- 4) Derajat kejenuhan pengembang,
- 5) Teknik percobaan,
- 6) Suhu,
- 7) Keseimbangan⁽⁴⁵⁾.

d. Pengembangan

Bejana kromatografi merupakan tempat penjenjuran fase gerak yang dilapisi kertas saring. Dikatakan jenuh ketika fase gerak telah mencapai ujung kertas saring. Selama proses ini bejana harus ditutup rapat. Beberapa teknik pengembangan dalam kromatografi lapis tipis adalah pengembangan menaik (*ascending*), pengembangan menurun (*descending*), melingkar, dan mendatar. Namun, yang paling sering dilakukan adalah pengembangan menaik⁽⁴⁴⁾.

B. Landasan Teori

Salah satu tanaman yang saat ini mulai dikembangkan adalah sirih merah (*Piper crocatum*). Tanaman ini dikenal oleh masyarakat sebagai tanaman yang dapat mengatasi penyakit infeksi, mengobati sakit gigi, mencegah gigi berlubang, mengobati diabetes melitus, jantung, ginjal. Masyarakat meyakini dengan berkumur-kumur menggunakan rebusan daun sirih merah dapat mengatasi sakit gigi, namun belum terdapat penelitian yang mendukung keterangan tersebut.

Rachmawaty (2009) telah berhasil membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian yang dilakukan oleh Ariesdyanata (2009) juga telah membuktikan bahwa ekstrak daun sirih merah memiliki aktivitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak daun sirih hijau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan demikian dimungkinkan ekstrak daun sirih merah juga dapat menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif lainnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Puspitasari, sirih merah mengandung senyawa seperti golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, minyak atsiri dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut diduga mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan keterangan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas fraksi metanol, petroleum eter, dan etil asetat dari ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* sebagai penyebab utama terjadinya karies gigi. Disamping itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengeksplorasi kandungan senyawa pada fraksi yang memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga nantinya tanaman ini dapat dikembangkan dan menjadi alternatif baru dalam menangani karies gigi.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian dilakukan secara *in vitro* dengan metode dilusi cair serta mengidentifikasi senyawa antibakteri yang terdapat pada ekstrak fraksi daun sirih merah yang dilakukan secara eksplorasi.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Universitas Islam Indonesia. Pelaksanaan penelitian di laboratorium dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2011.

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bakteri *Streptococcus mutans* dari isolat gigi. Isolat diperoleh di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada.

D. Variabel

Data yang dikumpulkan berupa data primer. Variabel yang digunakan pada penelitian ini :

1. Variabel bebas : kadar ekstrak daun sirih merah.
2. Variabel tergantung : kejernihan suspensi sampel (untuk uji KHM), tingkat pertumbuhan koloni bakteri pada media Agar darah (untuk uji KBM).

Peneliti melakukan eksplorasi kandungan senyawa pada fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat bakteri *Streptococcus mutans*.

E. Bahan dan Alat

1. Alat

- a. Alat-alat untuk proses ekstraksi bahan : oven, timbangan digital, toples kaca, pengaduk, *rotary evaporator*, *aluminium foil*, corong *Buchner*.
- b. Alat untuk uji mikrobiologi, yaitu autoklaf, inkubator, cawan petri, tabung reaksi, ose steril, pelubang gabus, mikro pipet, tabung reaksi, gelas beker, lampu bunsen, *yellow tip*, *blue tip*, erlemeyer, LAF (*Laminar Air Flow*).
- c. Alat untuk KLT, terdiri dari bejana pengembang, lampu UV 254 mm dan 365 mm, pipa kapiler dan pinset.

2. Bahan

- a. Bahan untuk proses ekstraksi : daun sirih merah (*Piper crocatum*), metanol, petroleum eter, dan etil asetat.
- b. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri : kultur bakteri *Streptococcus mutans*, media BHI, *Blood Agar*.
- c. Untuk uji KLT- bioautografi : etil asetat, kloroform, serta pereaksi dragendroff, silika gel F₂₅₄, uap amoniak dan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, FeCl₃.

F. Cara Penelitian

Adapun proses pengerjaan adalah sebagai berikut:

1. Determinasi daun sirih merah

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Islam Indonesia. Determinasi dilakukan sesuai dengan standar yang telah ditentukan.

2. Sterilisasi alat

Sterilisasi menggunakan autoklaf digunakan untuk sterilisasi medium, gelas ukur, gelas kimia, erlemeyer dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15-20 menit.

Sterilisasi dengan api langsung dilakukan terhadap peralatan seperti ose, pinset, mulut tabung biakan dan batang pengaduk. Alat yang telah disterilkan, didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

Sterilisasi dengan oven digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam.

3. Pengumpulan dan penyiapan bahan

Bahan daun sirih merah didapatkan dari penjual tanaman Toga. Daun didapatkan di daerah Purwosari, Sinduadi, Melati, Sleman. Adapun proses pemanenan daun sirih merah yang dilakukan adalah pemetikan dilakukan dengan menggunakan gunting, daun dikumpulkan dalam wadah, ditimbang sebanyak 3 kg dan dimasukkan dalam wadah. Daun yang kotor, cacat, berlubang serta warnanya kusam, layu atau menguning dibuang. Proses ini disebut tahap sortasi. Daun dicuci dan dibersihkan. Daun yang terkena tanah dan sarang-sarang serangga, dicuci dengan tangan langsung hingga bersih dengan air mengalir sebanyak 3 kali pembilasan. Daun yang telah bersih, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan selama setengah hari. Setelah kadar air dari pencucian sedikit, daun dikeringkan dengan oven selama 2-3 hari. Simplisia kering di blender hingga terbentuk serbuk.

4. Ekstraksi daun sirih merah

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Pemerian maserasi meliputi wujud, warna, rasa, dan bau dari masing-masing ekstrak. Serbuk daun sirih merah dimaserasi bertingkat secara berurutan menggunakan metanol, dan diambil filtratnya melalui penyaringan. Hasil saringan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan hasil ekstrak yang kental. Setelah didapatkan ekstrak yang sangat kental, dilakukan fraksinasi ekstrak berdasarkan kepolarannya, yaitu ekstrak yang bersifat polar, semi-polar, dan non-polar. Masing-masing ekstrak yang telah dipisahkan, diuapkan kembali hingga masing-masing pelarut benar-benar hilang.

Pembuatan seri kadar ekstrak untuk pengujian antimikroba dilakukan dengan mengencerkan setiap fraksi dari ekstrak daun sirih merah menggunakan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO).

5. Penyiapan suspensi *Streptococcus mutans*

Bakteri dari biakan murni diambil sebanyak satu ose disuspensikan dalam larutan media. Suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hal ini dimaksudkan untuk meremajakan bakteri agar dapat bergenerasi kembali. Kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan standart McFarland yang menunjukkan kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml. Apabila suspensi bakteri masih terlalu keruh maka dapat diencerkan menggunakan NaCl 0,9%.

6. Uji pendahuluan

Suspensi bakteri yang telah disamakan kekeruhannya dengan standart McFarland, dicampurkan pada larutan media agar yang telah steril dan tidak terlalu panas, kemudian dituangkan dalam cawan petri hingga membeku. Media agar yang membeku dibuat lima lubang sumuran dan masing-masing fraksi dari ekstrak daun sirih merah ditambahkan pada lubang yang telah ditandai. Fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang terbukti memiliki aktivitas antibakteri akan memiliki zona hambat berupa zona jernih pada sekitar lubang agar.

7. Uji daya antibakteri

- a. Uji kemampuan antibakteri menggunakan metode dilusi cair dengan media *Brain Heart Infussion* (BHI)

Bakteri disiapkan dalam bentuk suspensi. Selanjutnya larutan masing-masing fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang digunakan diencerkan dan dicampurkan pada media sehingga didapatkan seri kadar (b/v) 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, kemudian pada masing-masing tabung ditambahkan 10 μ l suspensi bakteri sehingga konsentrasi bakteri yang terdapat dalam tabung adalah 10^6 CFU/ml. Kontrol yang digunakan adalah kontrol ekstrak, kontrol bakteri, media dan pengujian terhadap antibiotika amoksisillin.

Konsentrasi sampel terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan sebagai KHM/MIC (kadar hambat minimum) yang diketahui dari kejernihan larutan dilusi. KBM/MBC (kadar bunuh minimum) diketahui dengan cara menggoreskan setiap serial kadar larutan dilusi dari

masing-masing fraksi ekstrak daun sirih merah pada media *Blood Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kadar bunuh minimum ditentukan pada konsentrasi terkecil dimana pada media yang digoreskan larutan dilusi tidak terdapat pertumbuhan kuman.

b. Pengujian kandungan senyawa dengan KLT

Pengujian dilakukan dengan metode KLT. Pengujian dilakukan pada fraksi dari ekstrak daun sirih merah yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik. Plat KLT silika gel GF₂₅₄ berukuran 1,5 cm x 10 cm disiapkan. Tandai dan ukur 1 cm pada masing-masing pada ujung plat. Fraksi terbaik dari ekstrak daun sirih merah ditotolkan sebanyak 3 totolan pada salah satu ujung plat KLT yang telah ditandai. Plat yang telah ditotolkan dikembangkan dalam fase gerak yang sesuai. Plat yang telah dikembangkan diangin-anginkan, kemudian dilakukan deteksi senyawa dengan menggunakan pereaksi semprot yang sesuai dengan senyawa yang dikehendaki. Pereaksi yang digunakan untuk skrining fitokimia dengan metode KLT :

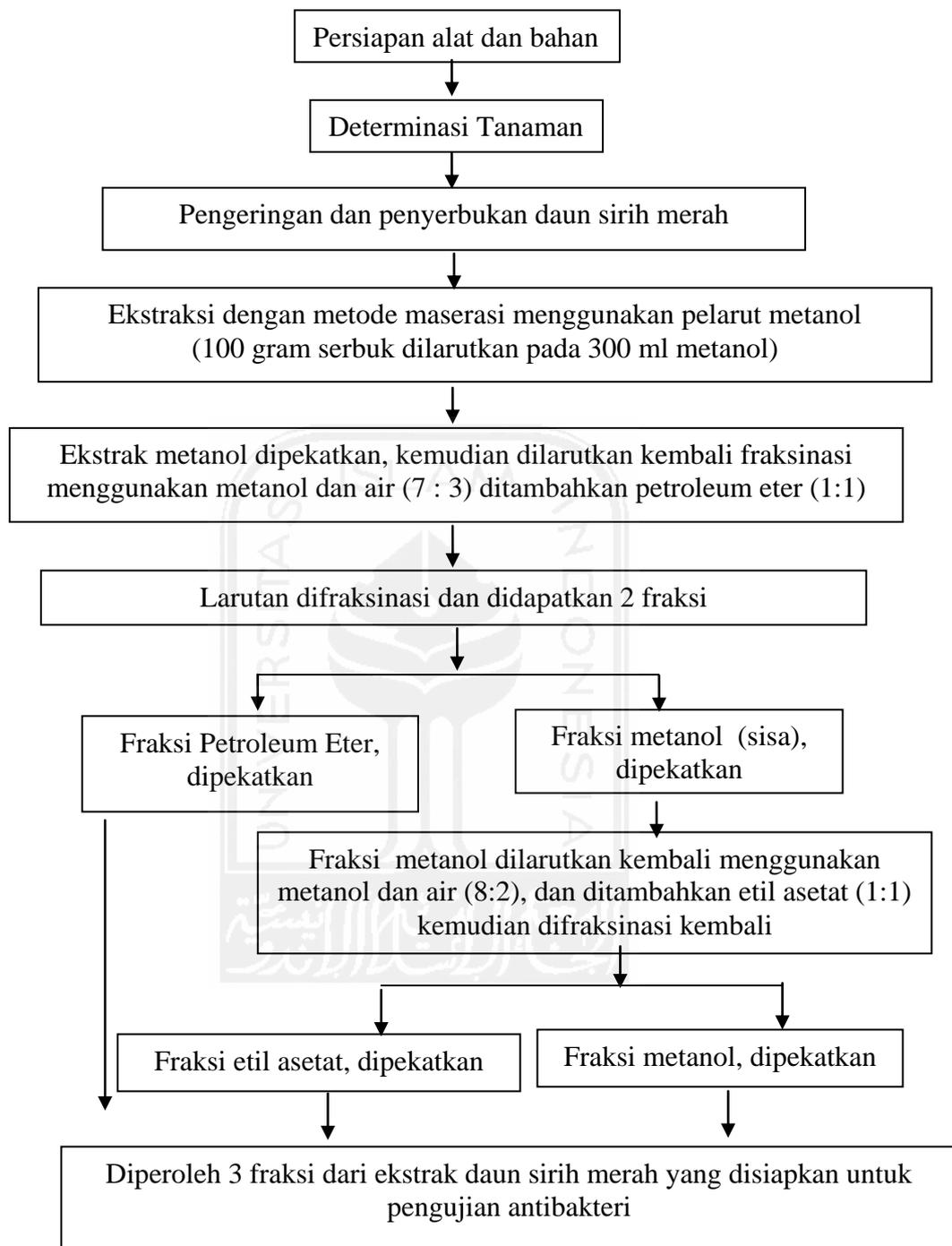
- i. Pereaksi dragendorff : jika menimbulkan warna coklat atau jingga setelah penyemprotan dengan Dragendorff akan menunjukkan adanya senyawa alkaloid dalam ekstrak. Bila tanpa pereaksi dan dilihat melalui lampu UV 365 nm, alkaloid akan berfluoresens biru, biru-hijau atau ungu⁽⁴³⁾.
- ii. Uap amoniak : jika menimbulkan warna kuning atau kuning-cokelat setelah diuapkan menunjukkan adanya flavonoid. Jika tanpa pemberian pereaksi kimia dan dilihat melalui lampu UV 365 nm, flavonoid akan berfluoresensi biru, kuning, atau hijau⁽⁴⁴⁾.
- iii. FeCl₃ : jika menimbulkan warna hitam setelah penyemprotan dengan FeCl₃ menunjukkan adanya senyawa polifenol dalam ekstrak⁽⁴⁶⁾.
- iv. Anisaldehyda asam sulfat : jika menimbulkan warna ungu-merah atau ungu setelah penyemprotan pereaksi anisaldehyda asam sulfat menunjukkan adanya terpenoid⁽⁴⁴⁾.

8. Identifikasi senyawa antibakteri dengan metode bioautografi

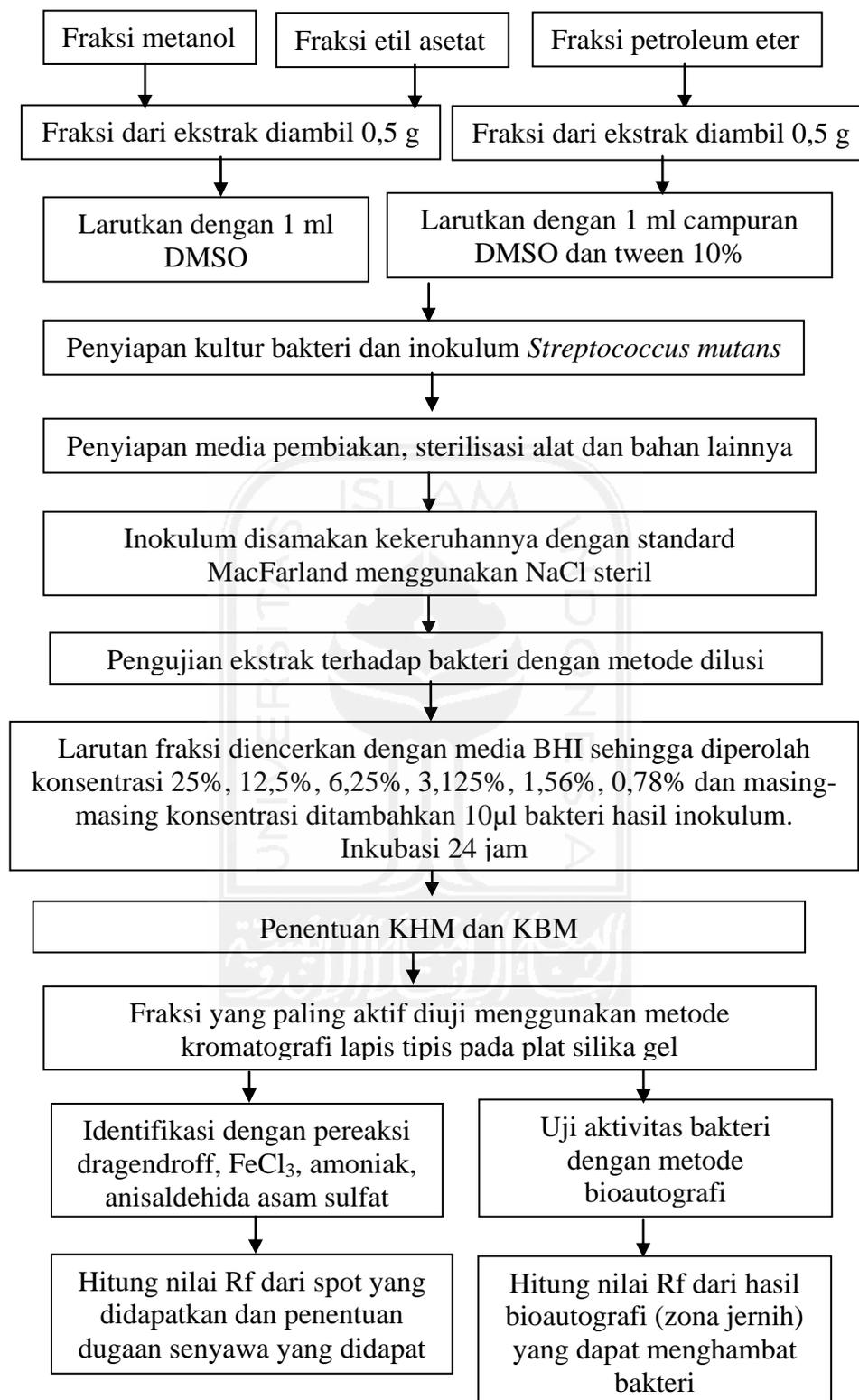
Pada pengujian aktivitas bakteri dengan metode dilusi yang telah menunjukkan fraksi ekstrak daun sirih merah yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik, akan dilanjutkan dengan proses identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri. Pertama-tama disiapkan plat KLT berukuran 1,5 cm x 10 cm, dan tandai 1 cm dari masing-masing ujung plat. Kadar sampel yang digunakan untuk uji bioautografi disesuaikan pada kadar sampel yang menunjukkan kadar hambat minimum saat pengujian pendahuluan. Fraksi terbaik dari ekstrak daun sirih merah ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄ (Merck) yang telah dilarutkan menggunakan pelarut asal fraksi. Plat ditotolkan sedikit demi sedikit hingga total volume yang ditotolkan adalah 20 µL. Plat yang telah ditotolkan didiamkan sesaat hingga totolan mengering, kemudian dilakukan proses pengembangan pada bejana dengan menggunakan perbandingan pelarut kloroform : etil asetat (8 : 2).

Plat silika gel yang telah dielusikan dengan pengembang, diangin-anginkan hingga pelarut pengembang menguap. Plat yang telah diangin-anginkan ditempelkan pada permukaan media agar yang telah ditanami bakteri selama 30 menit. Setelah 30 menit, plat KLT dilepas dari permukaan media agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, diamati zona daya hambat pada tempat tiap-tiap bercak KLT dan bandingkan nilai R_f dari zona hambat yang terbentuk dengan plat KLT yang telah diuji dengan pereaksi semprot untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Alur penelitian disusun sebagai berikut :



Skema I. Penyiapan ekstrak



Skema II. Penentuan nilai MIC, MBC dan analisis kandungan senyawa antibakteri pada ekstrak metanol, petroleum eter, dan etil asetat daun sirih merah dengan metode KLT-Bioautografi.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sirih merah dilakukan di Universitas Islam Indonesia. Determinasi dilakukan untuk meminimalkan kesalahan dalam pemilihan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian. Determinasi dilakukan berdasarkan pada buku *Flora of Java*, yaitu buku determinasi tanaman karangan Bakhuizen van den Brink tahun 1965. Buku ini akan membandingkan secara morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci-kunci determinasi. Hasil pengamatan determinasi tanaman sirih merah didapatkan kuncinya sebagai berikut:

- 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a..... (golongan 4)
- 41b-42b-43b-54b-59b-61b-62b-63b-64b.....(Piperaceae)
- 37.1 Piper 1a-2b-3b.....(*Piper crocatum* Ruiz&Pav.)

Keterangan hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran I.

B. Hasil Pemanenan Sirih Merah

Daun sirih merah didapatkan dari penjual tanaman “Toga” yang didapatkan di daerah Kampung Purwosari, Sinduadi, Melati, Sleman. Pengambilan daun sirih merah dilakukan pada pukul 08.00 WIB dengan menggunakan gunting, karena pada waktu tersebut diharapkan kandungan senyawa pada daun dalam tingkat optimal, dipagi hari daun dalam kondisi segar, dan senyawa belum hilang karena pemanasan matahari. Daun yang digunakan adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, yaitu berumur 3-4 bulan. Daun sirih merah yang telah dipanen, disortasi, dan dibersihkan menggunakan air mengalir lalu diangin-anginkan. Sortasi dilakukan untuk membuang atau memisahkan bahan lain selain daun sirih merah yang mungkin terikut saat pemanenan. Tahap pencucian ini diharapkan agar kotoran yang melekat pada daun dapat terlepas.

C. Hasil Penyiapan Serbuk Daun Sirih Merah

Daun sirih merah sebanyak 3 kg yang telah bersih, dikeringkan menggunakan oven selama 3 hari dengan suhu 50°C. Pengeringan menggunakan oven memiliki kelebihan dibandingkan menggunakan panas matahari secara langsung, yaitu daun dapat kering dengan suhu yang stabil sehingga dapat menghindari kerusakan zat aktif, dan terlalu banyak menguapnya zat yang mudah menguap, menghindari kebasahan, menjamin kualitas daun agar tetap baik. Pada saat proses pengeringan, daun sesekali dibalik agar daun dapat mengering merata dan optimal. Tujuan pengeringan ini adalah untuk mengurangi kadar air, mencegah tumbuhnya jamur, menghindari pembusukan pada bahan dan menjaga agar kualitas kandungan kimia terjaga dengan baik. Pengeringan dilakukan dengan suhu 50°C, karena pengeringan dengan suhu tinggi dapat mengakibatkan kerusakan pada senyawa aktif yang tidak tahan panas.

Daun yang telah kering diserbukkan dengan menggunakan blender. Penyerbukan dilakukan untuk memperoleh partikel yang lebih kecil sehingga pada saat penyarian dapat dilakukan secara efektif dikarenakan luas permukaan serbuk daun lebih luas ketika bertemu penyari sehingga mempermudah perpindahan zat aktif dari simplisia ke dalam cairan penyari. Berat basah daun sirih merah dari 1000 g, didapatkan bobot kering berupa serbuk 100 g. Serbuk sirih merah selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

$$\text{Rendemen} : \frac{100 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 100\% = 10 \%$$

D. Hasil Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

Ekstraksi merupakan penarikan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan pelarut tertentu⁽³²⁾. Metode ekstraksi yang digunakan adalah perendaman (maserasi). Metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam simplisia dan disimpan terlindung dari cahaya matahari langsung⁽³³⁾. Metode penyarian ini dipilih dengan alasan yaitu cara kerja dan peralatan yang digunakan relatif sederhana dan mudah dilakukan serta tidak melibatkan panas sehingga dapat menghindari perubahan-perubahan senyawa kimia yang terkandung pada daun sirih merah, walaupun ada

beberapa kerugian menggunakan metode ini yaitu membutuhkan waktu pengerjaan yang lama serta memerlukan volume pelarut yang banyak.

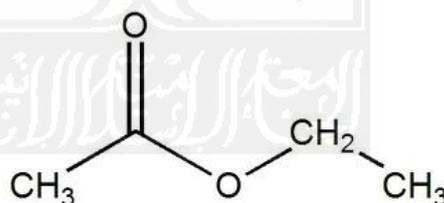
Bahan yang digunakan adalah 100 gram serbuk daun sirih merah, direndam menggunakan 300 ml metanol. Perendaman dilakukan berulang selama 10 hari disertai penyaringan dan pergantian pelarut setiap hari dengan perbandingan yang sama. Rendaman sesekali diaduk untuk membantu proses pendistribusian pelarut ke dalam sel tanaman. Perendaman dilakukan hingga warna cairan tidak pekat yang menandakan bahwa senyawa-senyawa dari daun sirih merah telah terangkat oleh metanol. Perendaman ini dapat menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar dinding sel sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi optimal. Metanol merupakan pelarut universal, yaitu pelarut yang mampu menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar, semi-polar, maupun non-polar, dan juga karena semua senyawa dari tanaman yang diduga sebagai senyawa antimikroorganisme adalah senyawa yang terlarut pada pelarut organik sehingga dapat diperoleh melalui ekstraksi dengan pelarut metanol. Pelarut metanol memiliki struktur kimia CH_3OH , gugus alkil (CH_3 -) menandakan bahwa ikatan ini cenderung bersifat non-polar dikarenakan elektronegativitas karbon dan hidrogen hampir sama sehingga mampu menarik senyawa non-polar, sedangkan gugus ($-\text{OH}$) yang dapat membentuk ikatan hidrogen (ikatan antara atom yang memiliki elektron bebas dengan suatu molekul yang memiliki H parsial positif) yang menandakan sifat kepolarannya.

Larutan hasil maserasi disaring kembali menggunakan corong *buchner* kemudian dipekatkan menggunakan *rotary-evaporator* pada suhu $40\text{-}50^\circ\text{C}$, dengan kecepatan 60 rpm. Penggunaan suhu 40°C - 50°C ini bertujuan untuk mencegah kerusakan senyawa dalam ekstrak akibat suhu tinggi. Hasil ekstrak yang didapatkan adalah 11,59 gram. Ekstrak yang didapat kemudian difraksinasi menggunakan pelarut petroleum eter, dan etil asetat untuk memisahkan senyawa-senyawa ekstrak berdasarkan polaritasnya dengan metode fraksinasi cair-cair.

Fraksinasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu ekstrak berdasarkan polaritasnya.

Ekstrak daun sirih merah yang didapatkan, dilarutkan dengan pelarut metanol-air (7:3) dan ditambahkan petroleum eter (1:1), sehingga diharapkan senyawa-senyawa dari ekstrak dapat terpisah melalui pelarut berdasarkan polaritasnya. Perbandingan yang digunakan berdasarkan pengujian sehingga pemisahan dapat dilakukan. Petroleum eter merupakan pelarut yang bersifat non-polar, sehingga diharapkan mampu untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat non-polar. Masing-masing fraksi petroleum eter dan fraksi metanol-air dipekatkan. Bobot fraksi petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah adalah 2,57 gram, sedangkan fraksi metanol-air harus dilakukan fraksinasi kembali dengan etil asetat.

Fraksi sisa fraksinasi dengan petroleum eter pekat kemudian dilarutkan kembali dengan metanol-air (2:8), dan difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat (1:1). Bobot fraksi etil asetat yang diperoleh adalah 2,66 gram, sedangkan bobot fraksi metanol dari ekstrak daun sirih merah yang bersifat polar adalah 3,42 gram. Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar, sehingga pelarut ini mampu melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat semi polar. Terlihat dari molekul senyawa yang dimiliki oleh etil asetat. Ikatan kovalen yang terbentuk dan ikatan hidrogen namun lemah akibat tidak adanya ikatan pada atom yang elektronegatif. Fraksi etil asetat dan metanol dipekatkan kembali.



Gambar 10. Struktur etil asetat

Pelarut dihilangkan sehingga didapatkan 3 fraksi dari ekstrak daun sirih merah dengan kepolaran yang berbeda.

$$\text{Rendemen} : \frac{\text{bobot ekstrak fraksi}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen fraksi petroleum eter} : \frac{2,57 \text{ g}}{11,59 \text{ g}} \times 100 = 22,17 \%$$

$$\text{Rendemen fraksi etil asetat} : \frac{2,66 \text{ g}}{11,59 \text{ g}} \times 100 = 22,95 \%$$

$$\text{Rendemen fraksi metanol} : \frac{3,42 \text{ g}}{11,59 \text{ g}} \times 100 = 29,51 \%$$

E. Hasil pembuatan media

Media adalah kumpulan zat-zat anorganik maupun organik yang digunakan sebagai tempat menumbuhkan bakteri dengan cara tertentu yang digunakan dalam pemeriksaan laboratorium mikrobiologi. Media yang digunakan untuk uji antibakteri dilusi adalah BHI (*Brain Heart Infusion*). Pembuatan larutan media dilakukan dengan cara melarutkan 0,925 gram agar BHI dalam 25 ml aquades. Larutan dilarutkan dengan bantuan pemanasan hingga agar terlarut sempurna.

F. Hasil sterilisasi alat

Sterilisasi merupakan suatu proses pemusnahan mikroorganisme pada suatu bahan atau alat. Proses ini diperlukan untuk mengurangi faktor-faktor pengganggu yang dapat mempengaruhi hasil pengujian. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan uap panas bertekanan tinggi melalui autoklaf. Bahan dan alat yang tahan panas dimasukkan dalam autoklaf kemudian dipanaskan dengan suhu 121°C dan dibiarkan 15 menit.

G. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi dilakukan sebelum pengujian. Konsentrasi suspensi bakteri pada penelitian ini adalah 10^6 CFU/ml. Bakteri *Streptococcus mutans* diinokulasi pada media BHI kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Inokulasi dilakukan untuk meremajakan bakteri. Setelah inokulasi didapatkan, inokulum disesuaikan dengan standar McFarland dengan cara menyamakan kekeruhannya. Standar McFarland yang akan menunjukkan kepadatan bakteri yaitu 10^8 CFU/ml. Inokulum yang masih terlalu keruh dapat ditambahkan larutan NaCl 0,9% hingga kekeruhannya sesuai dengan standar. NaCl 0,9% merupakan larutan yang menyerupai cairan fisiologis tubuh sehingga tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri

H. Hasil penyiapan larutan uji

Fraksi metanol, etil asetat dan petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah ditimbang masing-masing 2 gram. Fraksi metanol dan fraksi etil asetat dari

ekstrak daun sirih merah dilarutkan dalam 4 ml DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) 100%. Fraksi petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah dilarutkan dengan campuran pelarut, yaitu DMSO dan Tween 80. Masing-masing fraksi diaduk hingga terlarut dan dijadikan sebagai stok untuk pengujian yang dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan suatu bahan yang tidak larut dalam air, sehingga dapat dengan baik melarutkan fraksi metanol dan etil asetat, sedangkan fraksi petroleum eter dalam melarutkannya membutuhkan bahan pembantu untuk melarutkan sehingga dapat bercampur dalam media. Pelarut DMSO dengan konsentrasi dibawah 50% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*.

I. Hasil uji aktivitas antibakteri

Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan metode dilusi. Tabung reaksi sebanyak 8 tabung yang telah ditandai berdasarkan konsentrasi, yaitu 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%, serta 4 tabung kontrol ekstrak diisi dengan 1 ml media BHI. Tabung kontrol yang digunakan yaitu kontrol bakteri, kontrol ekstrak, media dan pengujian aktivitas antibakteri juga dilakukan terhadap antibiotik amoxicilin, karena antibiotik ini pada penelitian sebelumnya merupakan antibiotik yang efektif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Masing-masing tabung kontrol memiliki fungsi masing-masing. Kontrol bakteri berfungsi untuk membuktikan kualitas bakteri yang digunakan dalam pengujian. Kontrol antibiotik digunakan untuk melihat resistensi bakteri terhadap antibiotik amoxicillin. Kontrol ekstrak berfungsi untuk menguji ekstrak telah terkontaminasi atau masih dalam kondisi baik. Kontrol media berfungsi untuk melihat kualitas media yang digunakan.

Konsentrasi larutan fraksi awal yang dijadikan sebagai stok adalah 50%. Konsentrasi 50% dibuat dengan cara mengambil 0,5 gram fraksi dari ekstrak daun sirih merah, kemudian dilarutkan dengan 1 DMSO (untuk 1 kali pengujian). Tabung reaksi disiapkan sebanyak 8 tabung dan ditandai (tabung A, B, C, D, E, F), kontrol ekstrak tabung kontrol antibiotik, kontrol media, dan kontrol bakteri. Setiap tabung diisi dengan 1 ml media BHI. Ambil 1 ml larutan stok konsentrasi 50% ke dalam tabung A, kemudian dari tabung A diambil 1 ml dan dimasukkan

ke dalam tabung B. Pada tabung B, diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung C. Perlakuan ini dilakukan hingga tabung F. Pada tabung F diambil kembali 1 ml kemudian dibuang, sehingga setiap tabung memiliki campuran media dan ekstrak dengan volume total 1 ml dan didapatkan konsentrasi fraksi pengujian sebesar 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Tabung yang telah berisi fraksi dari ekstrak daun sirih merah, ditambahkan dengan suspensi bakteri sebanyak 10 μ l sehingga kepadatan bakteri dalam larutan adalah 10⁶ CFU/ml, sedangkan tabung kontrol ekstrak tidak ditambahkan bakteri. Kontrol antibiotika amoxicilin 0,078 mg/ml. antibiotik dilarutkan, kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung yang berisi 1 ml media, dihomogenkan. Campuran antibiotik-media diambil kembali 1 ml dan dibuang, sehingga volume di dalam tabung 1 ml, kemudian berikan 10 μ l bakteri. Tabung kontrol media dibiarkan tanpa diberi perlakuan. Inkubasi semua tabung tersebut pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilihat kekeruhannya dan dari masing-masing larutan digoreskan pada media agar darah untuk melihat aktivitas antibakteri.

Pelarut DMSO diuji dengan metode dilusi seperti perlakuan pengujian pada ekstrak daun sirih merah yaitu dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, hingga 0,78%. Pengujian memperoleh hasil bahwa DMSO konsentrasi 100% dan 50% memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Pelarut DMSO dengan konsentrasi diantara 25% hingga 50% sudah tidak memiliki aktivitas antibakteri. Pelarut DMSO dengan konsentrasi 25% telah terbukti tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, sehingga DMSO yang digunakan seharusnya adalah DMSO konsentrasi 25%. Namun penelitian ini melakukan pengujian menggunakan DMSO 100%, sehingga data yang dapat dijadikan acuan adalah data yang memiliki konsentrasi ekstrak 12,5%. Pengujian fraksi metanol, etil asetat, dan petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 25% yang mengandung konsentrasi 50% DMSO tidak dapat dijadikan acuan dikarenakan kemungkinan DMSO ikut berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Kadar hambat minimum (KHM) ditentukan pada larutan sampel terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu dilihat dari kekeruhan pada

larutan dilusi. Pada penelitian ini, sulit untuk menentukan kadar hambat minimumnya karena setiap fraksi ekstrak daun sirih merah ini menimbulkan warna, sehingga sulit untuk melihat kekeruhannya, terutama untuk fraksi petroleum eter dikarenakan warna dihasilkan pekat dan tidak terlalu larut dalam media. Pada fraksi metanol, didapatkan hasil KHM ditunjukkan pada konsentrasi 12,5%, sedangkan untuk fraksi etil asetat, KHM ditunjukkan pada kadar 6,25%.

Tabel II. Hasil uji fraksi metanol ekstrak daun sirih merah terhadap *Streptococcus mutans*

Replikasi	Konsentrasi (%)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	K ekstrak	K bakteri	K media	K antibiotik
I	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
II	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
III	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-

Keterangan :

(+) Larutan keruh (adanya pertumbuhan bakteri)

(-) Jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri)

Tabel III. Hasil uji fraksi etil asetat dari ekstrak sirih merah terhadap *Streptococcus mutans*

Replikasi	Konsentrasi (%)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	K ekstrak	K bakteri	K media	K antibiotik
I	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
II	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
III	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-

Keterangan :

(+) Larutan keruh (adanya pertumbuhan bakteri)

(-) Jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri)

Penentuan selanjutnya adalah pengujian KBM (Kadar Bunuh Minimum) bakteri *Streptococcus mutans* terhadap masing-masing fraksi dari ekstrak daun sirih merah berdasarkan serial dilusi. Setiap serial dilusi yang didapatkan digoreskan pada media agar darah. Inkubasi kembali media selama 24 jam pada suhu 37°C. KBM ditentukan pada konsentrasi terkecil yang ditandai dengan tidak

adanya pertumbuhan bakteri pada wilayah agar yang digoreskan dengan larutan dilusi.

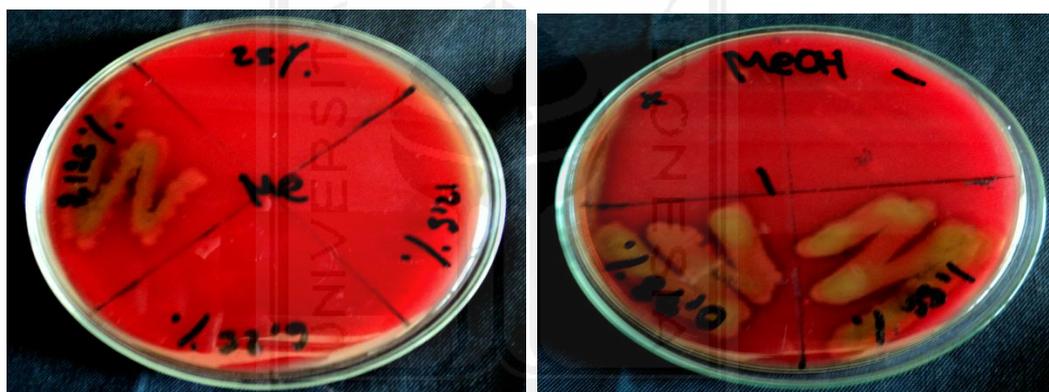
Tabel IV. Hasil penggoresan larutan dilusi *Streptococcus mutans* fraksi metanol ekstrak daun sirih merah

Replikasi	Konsentrasi (%)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	K ekstrak	K bakteri	K media	K antibiotik
I	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
II	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
III	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-

Keterangan :

(-) menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri



Gambar 11. Hasil goresan dilusi replikasi II ekstrak metanol terhadap *Streptococcus mutans*.

Tabel V. Hasil penggoresan larutan dilusi *Streptococcus mutans* fraksi etil asetat ekstrak daun sirih merah

Replikasi	Konsentrasi (%)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	K ekstrak	K bakteri	K media	K antibiotik
I	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
III	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-

Keterangan :

(-) menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri



Gambar 12. Hasil goresan dilusi replikasi II ekstrak fraksi etil asetat terhadap *Streptococcus mutans*

Tabel VI. Hasil penggoresan larutan dilusi *Streptococcus mutans* fraksi petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah

Replikasi	Konsentrasi (%)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	K ekstrak	K bakteri	K media	K antibiotik
I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
II	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
III	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

Keterangan :

(-) menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri



Gambar 13. Hasil goresan dilusi replikasi I fraksi petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah terhadap *Streptococcus mutans*

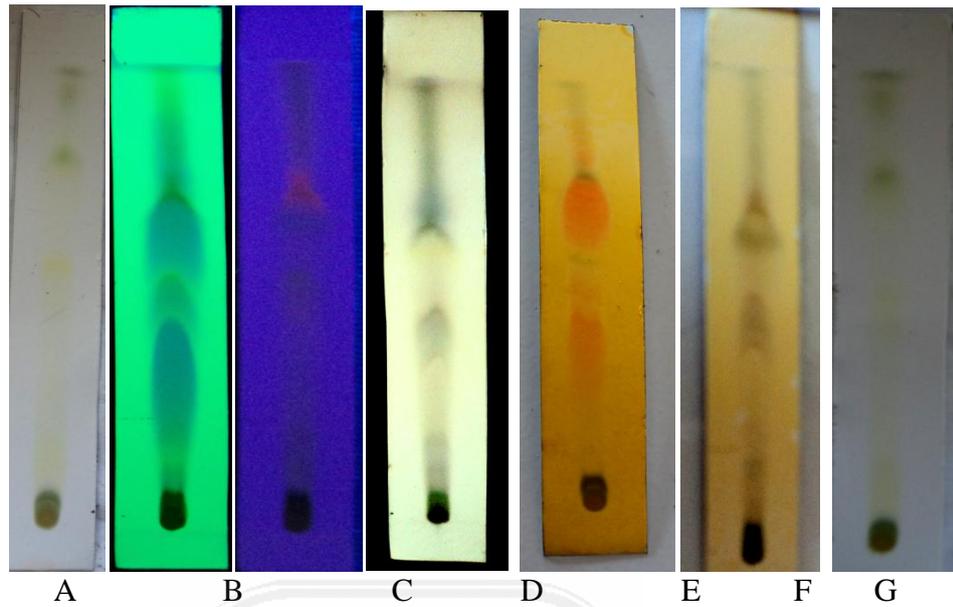
Pengujian penentuan nilai kadar hambat minimum pada ekstrak metanol dan etil asetat, didapatkan hasil yang tidak sama. Hasil tersebut dimungkinkan akibat ketidakteelitian peneliti dalam pengujian. Pengujian aktivitas bakteri *Streptococcus mutans* yang dilakukan terhadap antibiotik amoxicilin, menunjukkan adanya penghambatan. Mekanisme kerja antibiotik amoxicilin dengan cara mengganggu pembentukan dinding sel bakteri⁽³⁰⁾.

J. Hasil Skrining Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Skrining fitokimia dilakukan terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih merah yang bersifat semi-polar. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih merah ini memiliki aktivitas antibakteri yang paling baik dibandingkan fraksi metanol maupun petroleum eter dari ekstrak daun sirih merah ketika diuji dengan metode dilusi. Hal ini kemungkinan terjadi akibat senyawa-senyawa antibakteri baik yang bersifat polar atau non polar lainnya terlarut pada larutan semi polar.

Hasil penelitian kromatografi lapis tipis fraksi etil asetat dari ekstrak sirih merah, menggunakan pengembang kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 8 : 2, dan penampak bercak menggunakan sinar UV 254, dan 366 nm. Hasil yang didapatkan setelah dielusikan dengan fase gerak, terjadi pemisahan yang berekor. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbandingan fase gerak yang kurang dapat memisahkan dengan baik, atau diakibatkan oleh kurang jenuhnya fase gerak. Pada panjang gelombang 254 nm terdapat bercak berwarna cokelat, kuning, ungu, kuning, ungu, kuning, ungu, hijau kecokelatan, ungu, hijau, masing-masing dengan. Pada UV 366 nm terdapat bercak berwarna kuning, jingga, kuning, jingga kecokelatan.

Penentuan golongan senyawa dapat dilihat dari warna yang dihasilkan setelah penyemprotan, karena biasanya bahan alam mengandung senyawa yang tidak berwarna. Penyemprotan dengan anisaldehida-asam sulfat akan mendeteksi senyawa saponin. Deteksi akan terbaca ketika bercak akan menimbulkan warna biru setelah disemprotkan dengan pereaksi anisaldehida-asam sulfat dan dikeringkan dengan oven pada suhu 100°C.



Gambar 13. Profil KLT (*Kromatografi Lapis Tipis*).

Keterangan :

- A : hasil KLT tanpa pereaksi
- B : hasil KLT dilihat dengan lampu UV 254 nm
- C : hasil KLT dilihat dengan lampu UV 366 nm
- D : hasil KLT dengan pereaksi Anisaldehyda asam sulfat
- E : hasil KLT dengan pereaksi Dragendorff
- F : hasil KLT dengan pereaksi FeCl_3
- G : hasil KLT dengan pereaksi amoniak

Tabel VII. Hasil KLT setelah diberi pereaksi dan deteksi dugaan golongan senyawa fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih merah

No	Pereaksi	Warna Pada Kromatogram	Harga Rf	Senyawa	
1.	Tanpa pereaksi	UV 366 nm	Cokelat	0	-
			Kuning	0,12	Flavonoid
			Jingga	0,73	Alkaloid
			Kuning	0,8	Flavonoid
			Jingga	0,93	Alkaloid
		UV 254	Cokelat	0,06	-
			Kuning	0,12	Flavonoid
			Kuning	0,44	-
			Ungu	0,5	-
			Kuning	0,55	-
			Ungu	0,65	-
			Hijau-cokelat	0,74	Alkaloid
			Ungu	0,83	Flavonoid
2.	Amoniak	Cokelat	0	-	
		Kuning	0,5	Flavonoid	
		Kuning-kecokelatan	0,77	Flavonoid	
		Kuning	0,83	Flavonoid	
		Kuning kecokelatan	0,93	Flavonoid	
3.	FeCl ₃	Hitam	0	Tanin	
		Hijau-kecokelatan	0,04	Tanin	
		Ungu	0,19	Tanin	
		Merah muda	0,45	Polifenol	
		Ungu-kecokelatan	0,65	-	
		Merah muda	0,73	Polifenol	
4.	Anisaldehyda asam sulfat	Cokelat	0	-	
		Hijau	0,04	Saponin	
		Cokelat muda	0,1	-	
		Violet	0,25	Saponin	
		Abu-abu	0,41	Saponin	
		Kuning-kecokelatan	0,56	-	
		biru-keunguan	0,7	Saponin	
5.	Dragendroff	Cokelat	0	Alkaloid	
		Jingga	0,3	Alkaloid	
		Jingga	0,69	Alkaloid	
		Jingga	0,81	Alkaloid	

K. Hasil Pengujian dengan bioautografi

Bioautografi merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT atau kromatografi kertas yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, ataupun antiviral. Bioautografi dapat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa, mencari antibakteri, antikapang baru, dan kontrol kualitas antimikroba.

Bioautografi dilakukan dengan menempelkan hasil plat silika gel KLT yang telah ditotolkan 20 μ l fraksi etil asetat dari ekstrak daun sirih merah dan telah dielusikan menggunakan fase gerak tanpa diberikan pereaksi pendeteksi senyawa. Plat KLT kemudian ditempelkan pada permukaan media agar selama 30 menit, dan melepaskannya, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Waktu 30 menit diharapkan senyawa-senyawa yang terletak pada plat KLT berdifusi ke permukaan media agar yang telah mengandung bakteri. Adanya senyawa antimikroba ditandai dengan adanya zona jernih pada media agar yang mengandung bakteri.



Gambar 13. Hasil bioautografi ekstrak sirih merah fraksi etil asetat dan hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil bioautografi memperlihatkan zona jernih yang terletak pada Rf 0,38-0,73. 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 dragendrooff,

anissaldehida asam sulfat, FeCl_3 dan penguapan amoniak. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa pada zona tersebut diduga senyawa golongan alkaloid, flavonoid, fenol, dan saponin memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Namun, hasilnya tidak begitu memuaskan dikarenakan terjadinya “*tailing*” atau pengekoran pada hasil KLT kemungkinan diakibatkan pada jumlah totalan ekstrak yang terlalu banyak atau fase gerak yang digunakan tidak terlalu cocok.



BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Fraksi etil asetat yang bersifat semi polar dan fraksi metanol yang bersifat polar memiliki aktivitas untuk menghambat atau membunuh bakteri *Streptococcus mutans*, sedangkan fraksi petroleum eter tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*.
2. Hasil pengujian menunjukkan bahwa KHM (Kadar hambat minimum) ekstrak sirih merah fraksi metanol pada konsentrasi 12,5% dengan KBM (kadar bunuh minimum) 12,5%, KHM fraksi etil asetat pada konsentrasi 6,25% dengan KBM 6,25%, sedangkan pada fraksi petroleum eter pada konsentrasi yang diujikan (25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%) tidak diperoleh nilai KHM dan KBM.
3. Hasil identifikasi KLT yang diperoleh dari fraksi etil asetat ekstrak daun sirih merah diduga mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid, saponin, dan polifenol (termasuk tanin). Berdasarkan hasil uji bioautografi, yang ditunjukkan pada faktor retensi 0,38-0,73 diperoleh bahwa senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* diduga merupakan senyawa golongan flavonoid, alkaloid, polifenol, dan saponin.

B. Saran

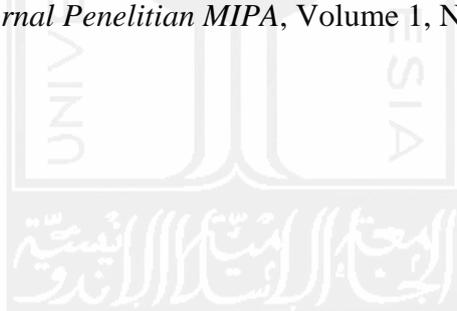
1. Perlu dilakukan pengujian lanjut terhadap aktivitas ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif lainnya.
2. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap fase gerak pada pengujian KLT (*Kromatografi Lapis Tipis*).
3. Dapat dilakukan isolasi senyawa zat aktif untuk pengujian lebih lanjut dan pembuatan sediaan produk untuk kesehatan gigi dan mulut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sunarintyas, S., Siswomiharjo W., Maryati N., 2008, Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Air dan Etanol Kulit Batang *Azadirachta indica* terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi* Vol. 23, No. 4 : 170-174.
2. Asfria, I., 2009, *Early Childhood Caries (ECC)*, *repository.usu.ac.id* (diakses 15 Februari 2011).
3. Zaenab, Mardiasuti, H.W., Anny V.P., Logawa B., 2004, Uji antibakteri siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap *Streptococcus mutans* (ATC31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*, *Makara, Kesehatan*, Vol. 8, No. 2 : 37-40.
4. Budiyo, 2004, Uji Potensi Ekstrak Daun Cempaka (*Michelia champaca*) untuk Mengendalikan Pertumbuhan Bakteri Patogen *Streptococcus mutans* Penyebab Penyakit Caries Gigi : suatu penelitian in vitro, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Semarang.
5. Shabir, A., 2005, Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona sp* Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (*In vitro*), *Majalah Kedokteran Gigi* (Dent. J.), Vol. 38. No. 3 : 135-141.
6. Haryadi, R.B., 2010, Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro* sebagai Materi Praktikum Mikrobiologi, *Thesis*, Jurusan Farmasi, Universitas Negeri Malang, Malang.
7. Indrawati, I., 2009, Potensi Ekstrak Air, Ekstrak Metanol, dan Minyak Atsiri Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Kultivar batu Terhadap Isolat Bakteri Asal Karies Gigi, *Jurnal Biotika*, Vol. 7, No. 1 : 40-48.
8. Saunders, 2007, *Dental Caries*, *medical-dictionary-thefreedictionary.com* (diakses 23 September 2011).
9. Angela, A., 2005, Pencegahan Primer Pada Anak yang Berisiko Karies Tinggi, *Majalah Kedokteran Gigi* (Dent. J.), Vol. 38. No. 3 : 130-134.
10. Douglas, B., Petersen, P.E., Ramanathan, J., Stjernsward and Brown, J., 2008, Craniofacial Disease and Disorder, *Medicine National Institutes of Health*, Chapter 38.
11. Satria, B.I., 2009, The Differences Level of CFU of Mutans Streptococci in Saliva of Schoolchildren During Fasting and Non-fasting, Presented at KPIKKG2009 1st Scientific Meeting and Refresher Course in Dentistry Faculty of Dentistry Universitas Indonesia, Jakarta Convention center Indonesia.
12. Eriska, R., 2005, Pengenalan dan Perawatan Kesehatan Gigi Anak Sejak Dini, Seminar Sehari Kesehatan-Psikologi Anak.
13. Featherstone JDB, 2000, The science and practice of caries prevention, *Journal of the American Dental Association* 131.
14. Scottish Intercollegiate Guidelines Network SIGN Guideline, 2000, Preventing dental caries in children at high caries risk; targeted prevention of dental caries in the permanent teeth of 6–16 years olds presenting for dental care. Edinburgh : SIGN Publication 47.
15. Ari, W., 2008, *Streptococcus mutans*, Si Plak Dimana-mana, *mikrobia.files.wordpress.com* (diakses 25 Februari 2011).
16. Bambang, S., 2005, *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*, Agromedia, Jakarta.

17. 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.
18. Sastrohamidjojo, H., 1996, *Sintesis Bahan Alam*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
19. Januar, 2009, UMS, Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Binahong Terhadap Jamur *Candida albicans*, *Thesis*, Jurusan Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
20. Cushine, T. T., Lamb, A. J., 2005, Review : Antimicrobial Activity of Flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents* 26.
21. Cowan, 1999, *Clinical Microbiology Reviews*, *Plant Product as Antimicrobial Agents*, Vol. 12, No. 4 : 564-582.
22. Hermawan, A., 2007, Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode Difusi *Disk*, Artikel Ilmiah, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.
23. Akiyama, Fujii, Yamasaki, Oono, T., Iwatsuki, 2001, Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 48, Issue 4 : 487-491.
24. Williamson, M., McCormick, T., Nance, C. L., Shearer, W. T., 2006, Epigallocatechin gallate, The Main Polyphenol in Green Tea, Binds to The T-Cell Receptor, CD4 : Potential for HIV-1 Therapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 118, No. 6 : 1369-1371.
25. Hidayaningtias, P., 2008, Perbandingan Efek Antibakteri Air Seduhan Daun Sirih (*Piper betle Linn*) Terhadap *Streptococcus mutans* Pada Waktu Kontak dan Konsentrasi yang Berbeda, *Artikel Karya Tulis Ilmiah*, Fakultas Kedokteran, Semarang.
26. Bogoriani, 2008, Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong, *Jurnal Kimia 2* .
27. Indrayudha, P., Hariyani, J. dan Iravati, S., 2005, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* (Linn)) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas sp* (Non Aeruginosa) Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *Pharmacom*, Vol. 6, No. 2 : 57-62.
28. Wang, C., Yuan, C., 2008, Potensial Role of Gingseng in the Treatment of Colorectal Cancer, *Journal China Medicine*, Vol. 36, No.6 : 1027-1028.
29. Widowati, W., Safitri R., Rumumpuk R., Siahaan M., 2005, Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase pada Berbagai Tanaman, *Artikel Penelitian*, Vol. 5, No. 1 : 33-39.
30. Soekardjo, B. dan Siswandono, 2000, *Kimia Medisinal*, Edisi ke-2, Airlangga University Press, Surabaya.
31. Wilbraham, A., Matta, M., 1992, *Pengantar Organik dan Hayati*, ITB, Bandung.
32. Ansel, H., 2005, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, UIP, Jakarta.
33. Voight, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
34. Dianasari, N., 2009, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella*

- dysentriae* serta Bioautografinya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
35. Siswando, Soekardjo, B. 1995, *Kimia Medisinal*, Surabaya: Airlangga University.
 36. Waluyo, L., 2005, *Mikrobiologi umum*, UMMPress, Malang.
 37. Gillespie, S., 2007, *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*, Erlangga, Jakarta.
 38. Harold, C., Thomas, D., 1996, Antimikrobiaal Chemotherapy, *BookShelf*, Chapter 11, *Medicine National Institutes of Health*.
 39. Dhika, 2007, Perbandingan Efek Antibakterial berbagai Konsentrasi Daun Sirih (*Piper betle Linn*) Terhadap *Streptococcus mutans*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Diponegoro.
 40. Pratiwi, S.T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, EMS Jakarta.
 41. Vandepitte, Engbaek, Rohner, Piot, Heuck, 2005, *Prosedur Laboratorium Dasar Untuk Bakteriologi Klinis*, EGC, Jakarta.
 42. Kusumaningtyas, E., Astuti, E., Darmono, 2008, Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar Overlay dalam Penentuan Senyawa Antikapang, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol. 6, No.2 : 75-79.
 43. Sherma, Joseph, Bernard, F., 2003, *Handbook of Thin-Layer Chromatography, Third Edition*, Maercel Dekker, USA.
 44. Gandjar, I.G., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
 45. Sastrohamidjojo H., 2002, *Kromatografi*, Edisi Kedua, Liberty, Yogyakarta.
 46. Marliana, E., 2007, Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang Berfungsi Sebagai Antioksidan, *Jurnal Penelitian MIPA*, Volume 1, No.1 : 23-26.





LAMPIRAN

Lampiran I. Hasil determinasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum*)

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
BAGIAN BIOLOGI FARMASI

SURAT KETERANGAN

Nomor:50/UII/Jur Far/det/IV/2011

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : Nadia Pudiarifanti
NIM : 07613081
Pada tanggal : 28 April 2011

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan Dra.Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut: *Piper crocatum*, Ruiz&Pav. (sirih merah)

Demikian surat keterangan ini di buat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 28 April 2011
Bagian Biologi Farmasi
Kepala,


Hady Anshory T.S.Si., Apt.
NIP.056130703

Lampiran II. Alat dan bahan

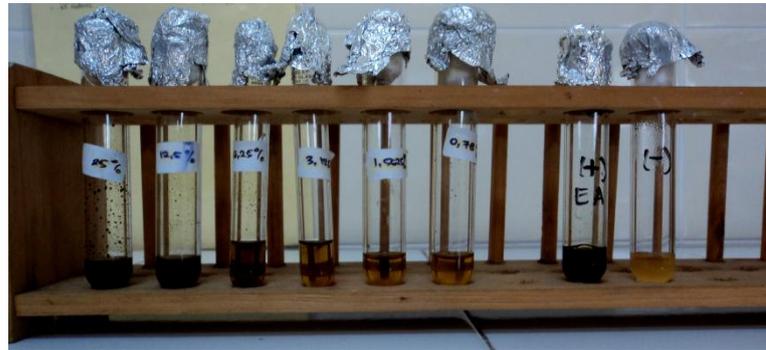


Gambar 1. Alat dan bahan yang digunakan



Gambar 2. LAF (*Laminar Air Flow*).

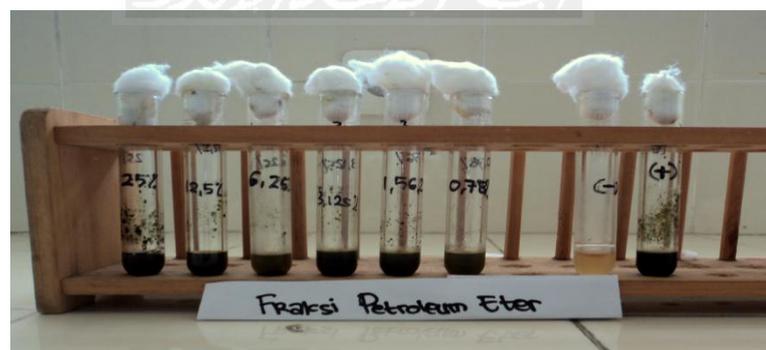
Lampiran III. Hasil uji aktivitas bakteri metode dilusi



Gambar 1. Hasil percobaan ke II dilusi *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi ekstrak fraksi etil asetat 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, serta kontrol bakteri dan kontrol ekstrak.

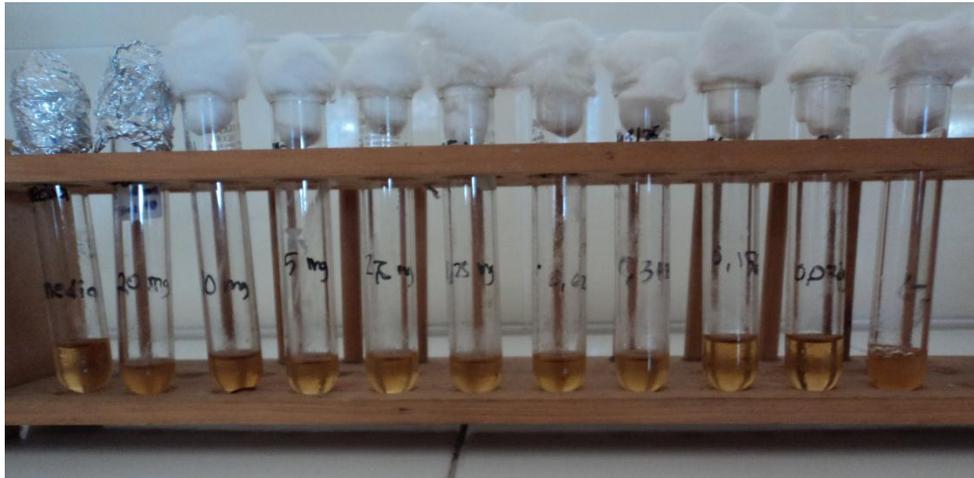


Gambar 2. Hasil percobaan ke I dilusi *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi ekstrak fraksi metanol 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, serta kontrol bakteri dan kontrol ekstrak.



Gambar 3. Hasil percobaan ke I dilusi *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi ekstrak fraksi petroleum eter 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, serta kontrol bakteri dan kontrol ekstrak.

Lampiran IV. Hasil uji antibiotik amoxicilin

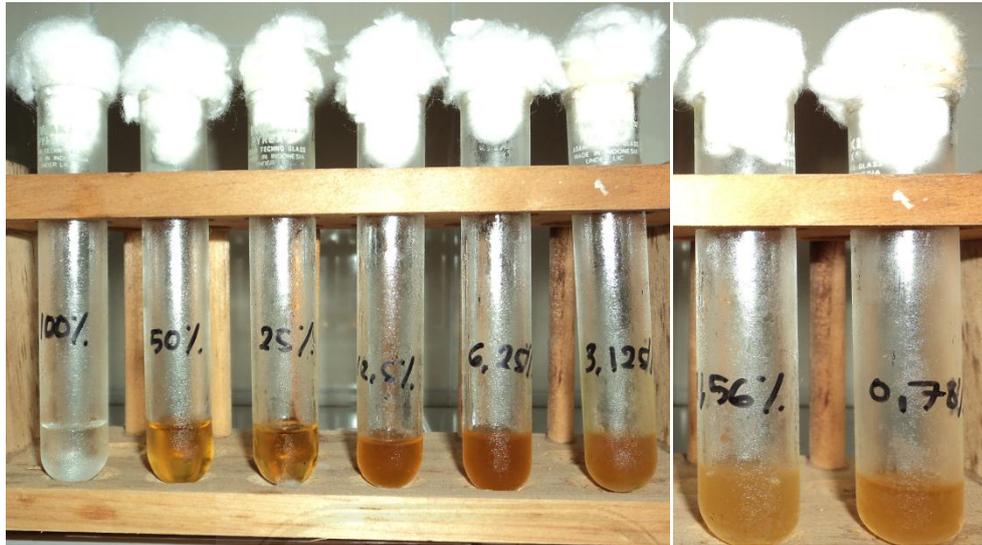


Gambar 4. Hasil uji dilusi antibiotika terhadap *Streptococcus mutans*



Gambar 5. Hasil penggoresan dilusi antibiotik

Lampiran V. Hasil uji *Dimethyl sulfoxide* (DMSO)



Gambar 6. Hasil pengujian DMSO konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% terhadap *Streptococcus mutans*.



Gambar 7. Hasil penggoresan dilusi DMSO