

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Sirih Merah**

##### **1. Sistematika tanaman sirih merah**

Klasifikasi tanaman sirih merah adalah sebagai berikut (Sasmito 2017):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Familia	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav

##### **2. Morfologi**

Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) merupakan tanaman yang menjalar dimana batangnya beruas dengan jarak 5-10 cm, bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daun bertangkai, berbentuk jantung dengan bagian atas meruncing, tepi rata dan permukaan daun mengkilap serta tidak berbulu. Panjang daun bisa mencapai 15-20 cm. Warna bagian atas pada daun adalah hijau dan tulang daun bercorak putih keabu-abuan. Daun bagian bawah berwarna merah cerah. Daun berlendir, sangat pahit dan beraroma wangi khas sirih (Sudewo 2005)

##### **3. Nama lain**

Tanaman sirih merah atau dengan nama latin *Piper crocatum* L. mempunyai nama lain yaitu sirih talan (Maluku) (Hariana 2013).

##### **4. Kandungan kimia**

Sirih merah mengandung saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Hariana 2013). Menurut Hidayat (2013) daun sirih merah mengandung senyawa fitokimia alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid. Flavonoid pada daun berfungsi sebagai antioksidan, senyawa fenol yang bersifat sebagai koagulator protein, antifungi, antiseptik, hepatotoksik (Amalia & Normasari 2002). Flavonoid memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan beberapa

mekanisme yang berbeda, antara lain menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Sabir 2005). Alkaloid memiliki mekanisme mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson 1995).

Senyawa tanin berperan sebagai antibakteri karena memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen, jika terbentuk ikatan hidrogen antara tanin dengan protein maka protein akan terdenaturasi sehingga metabolisme bakteri menjadi terganggu (Makkar 1993). Senyawa saponin bekerja dengan cara merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani 1994).

Komponen minyak atsiri dari sirih merah terdiri atas senyawa-senyawa monoterpen ( *$\alpha$ -thujene,  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -myrcene  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -phellandrene,  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -terpineol, terpinolen,  $\alpha$ -terpineol, copaene*), seskuiiterpen (*caryophyllene,  $\alpha$ -caryophyllene dan germacrene*) (Batubara *et al.* 2011). Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil, mekanisme dari minyak atsiri adalah dengan terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein kemudian pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membrane mengalami lisis (Parwata & Dewi 2008)

## **5. Kegunaan**

Sirih merah berasal dari keluarga Piperaceae yang bersifat sebagai antipiretik dan antiinflamasi. Daun segar digunakan untuk mengatasi penyakit seperti bengkak, mimisan, TBC (Hariana 2013). Pengobatan tradisional, sirih merah banyak dimanfaatkan untuk pengobatan hipertensi, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, maag, kanker payudara, nyeri sendi, penurun dan pengontrol kadar gula darah, kosmetika, obat gangguan jantung, tumor payudara, antiseptik untuk mengeliminasi mikroorganisme dari kulit atau luka, obat kumur

dapat membantu mencegah pembentukan plak gigi dan radang gusi (Parfati & Windono 2016).

Berdasarkan penelitian Juliantina *et al.* (2009) ekstrak etanol daun sirih merah terbukti mempunyai efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) 25%. Ekstrak etanol daun sirih merah memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pada konsentrasi 10%, 20%, 40%, 80% dan 100% (Candrasari *et al.* 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Soleha *et al.* (2015) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,125% sudah mampu menghambat *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat 9 mm. Penelitian yang lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi 1% w/v terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 11784 (Kusuma *et al.* 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Kusuma *et al.* (2017) menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berturut-turut sebesar 5% dan 10%.

## B. Tanaman Binahong

### 1. Sistematika tanaman binahong

Klasifikasi tanaman binahong adalah (Cronquist 1981):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Caryophyllales
Familia	: Basellaceae
Genus	: Anredera
Spesies	: <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis

### 2. Morfologi

Tumbuhan binahong merupakan tumbuhan menjalar yang dapat mencapai panjang 6 meter bahkan bila tanah dalam keadaan lembab dan subur dapat tumbuh mencapai 40 meter (Vivian *et al.* 2007). Daun binahong termasuk dalam jenis

daun tunggal dengan bentuk yang khas seperti jantung dengan panjang sekitar 5-10 cm dan lebar 3-7 cm, serta permukaan daun yang licin. Bunga majemuk berbentuk tandan dengan panjang 7-25 cm, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun. Bunga tersusun atas braktea yang berwarna krem keputihan berjumlah 5 helai tidak berlekatan, panjang helai 0,5-1 cm, berbau harum. Putik berwarna putih, kaku, berbentuk elips pada bagian bawah, ujung rata, panjang 0,2-0,3 cm, lebar 0,1-0,2 cm. Benang sari berwarna putih, filamen terletak diujung, serbuk tersebar (Kottaimuthu 2011).

### **3. Nama lain**

Tanaman binahong atau dengan nama ilmiah *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Nama daerah dari tanaman ini adalah gandola (Sunda), gondola (Bali), lembayung (Minangkabau), uci-uci (Jawa), kandula (Madura), dan poiloo (Gorontalo) (Hariana 2013).

### **4. Kandungan kimia**

Kandungan kimia yang terdapat pada daun binahong, antara lain flavonoid, asam oleanolik, protein, asam askorbat, dan saponin (Hariana 2013). Asam askorbat berfungsi sebagai antioksidan dengan melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas serta membantu pembentukan kolagen. Kandungan fenol yang tinggi dapat digunakan melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Asam oleanolik berfungsi sebagai antiinflamasi (Astuti *et al.* 2011). Senyawa fitokimia yang berperan dalam penyembuhan luka adalah alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid, polifenol, tanin dan flavonoid (Anasta *et al.* 2013).

Murdianto *et al.* (2013) membuktikan bahwa terdapat senyawa golongan triterpenoid yang mempunyai aktivitas antibakteri. Steroid/triterpenoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri (Rosyidah *et al.* 2010).

### **5. Kegunaan**

Daun binahong dapat bersifat sebagai antibakteri, antivirus, antiinflamasi, analgetik, dan antioksidan. Daun binahong juga berkhasiat untuk meningkatkan daya tahan tubuh, memperkuat daya tahan sel terhadap infeksi sekaligus

memperbaiki sel yang rusak, melancarkan dan menormalkan peredaran darah serta tekanan darah, mencegah stroke, mengatasi diabetes serta mengobati penyakit maag (Hariana 2013)

Ekstrak etanol daun binahong mempunyai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) pada konsentrasi 200 ppm sehingga bersifat bakteriostatik, sedangkan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada konsentrasi 600 ppm (Sutrisno *et al.* 2014). Berdasarkan penelitian Elyani & Risandiansyah (2017) menunjukkan bahwa KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) ekstrak metanol daun binahong sebesar 12,5 mg/mL. Ekstrak etanol daun binahong juga memberikan efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) sebesar 512 µg/mL (Leliqia *et al.* 2017).

### **C. Kombinasi Obat**

Kombinasi obat merupakan gabungan dua obat atau lebih dalam suatu formulasi yang bertujuan untuk meningkatkan efek farmakologis, penurunan toksisitas, atau pemeliharaan stabilitas. Efek sinergis dan penggunaan dosis yang rendah dianggap sebagai suatu efek menguntungkan dari kombinasi obat (Heinrich *et al.* 2010). Obat tradisional memiliki efek yang sama (efek sinergis). Obat tradisional akan bermanfaat dan aman jika digunakan secara tepat baik takaran, waktu, dan cara penggunaan yang sesuai dengan indikasi dan efek farmakologi yang saling mendukung satu sama lain (efek komplementer) untuk mencapai efektivitas pengobatan (Pramono 2008).

Penggunaan dua obat yang berbeda secara bersama dapat memberikan interaksi yang berlawanan (antagonis) sehingga efeknya melemah dimana obat pertama melemahkan obat yang kedua atau efek saling mendukung (sinergisme) merupakan kerjasama antara dua obat yang terdiri dari dua jenis yaitu adisi dan potensiasi dimana obat memberikan efek yang lebih baik dibandingkan dosis tunggal masing-masing obat (Tjay & Kirana 2007). Efek aditif merupakan interaksi antara dua obat dengan kerja yang serupa, dimana efek kedua obat dapat menjadi yang diinginkan (Joyce & Evelyn 2006).

Kombinasi ekstrak daun sirih merah dengan ekstrak kering lidah buaya pada konsentrasi 1,56% lebih baik dari ekstrak tunggalnya (Suhaimi *et al.* 2018). Kombinasi ekstrak etanol daun binahong dan daun pegagan mempunyai efek bakteriostatik yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak tunggalnya. Diameter zona hambat pada konsentrasi 50 ppm ekstrak daun binahong dan 25 ppm ekstrak herba pegagan sebesar 10,73 mm. Konsentrasi 25 ppm ekstrak daun binahong dan 50 ppm ekstrak herba pegagan mempunyai aktivitas paling tinggi dibanding seri konsentrasi lainnya (Sutrisno *et al.* 2014).

## **D. Ekstraksi**

### **1. Pengertian**

Ekstraksi adalah proses pemisahan substansi dari campurannya dengan pelarut yang sesuai. Ekstraksi berdasarkan bentuknya dibagi menjadi dua, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi berdasarkan prosesnya terdapat dua jenis, yaitu ekstraksi berkesinambungan dan ekstraksi bertahap. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi berkesinambungan menggunakan pelarut yang sama, namun pada ekstraksi bertahap, pelarut yang digunakan baru (Kristanti *et al.* 2008). Bahan yang digunakan dalam ekstraksi hendaknya dalam keadaan segar, bila tidak dimungkinkan maka bahan dikeringkan terlebih dahulu. Metode pengeringan yang digunakan tidak merusak senyawa kima dalam tumbuhan tersebut. Metode pengeringan yang baik adalah dilakukan pada suhu kamar dan sirkulasi udara lancar (Kristanti *et al.* 2008).

### **2. Metode maserasi**

Metode maserasi merupakan metode yang paling banyak digunakan dan merupakan contoh dari ekstraksi padat cair. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dalam pelarut yang sesuai ke dalam wadah tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika sudah mencapai keseimbangan konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Pelarut dipisahkan melalui penaringan apabila proses telah selesai (Mukhrani 2014). Keuntungan dari metode maserasi adalah mudah dilakukan, murah, alat yang digunakan sederhana, dan dapat mengekstraksi senyawa dalam

jumlah banyak dalam satu waktu. Metode ini juga mempunyai kerugian yaitu membutuhkan waktu yang lama, pelarut yang digunakan banyak, serta kurang efektif untuk zat yang tidak dapat diekstraksi pada suhu kamar (Kristanti *et al.* 2008).

### **E. Bakteri**

Bakteri merupakan organisme uniseluler yang relatif sederhana karena materi genetik tidak diselubungi oleh selaput membran inti. Sel bakteri disebut dengan sel prokariot. Sel bakteri secara umum terdiri atas beberapa bentuk, yaitu bentuk basil/batang, bulat atau spiral. Dinding sel bakteri mengandung kompleks karbohidrat dan protein yang disebut peptidoglikan. Berdasarkan perbedaan struktur dinding sel dan pewarnaan Gram, bakteri digolongkan menjadi bakteri Gram positif dan Gram negatif (Radji 2010).

Dinding sel bakteri Gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang tebal dan kaku (20-80 nm). Hal ini yang membedakan dari dinding sel bakteri Gram negatif dimana dinding sel bakteri Gram negatif hanya terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tipis. Dinding sel beberapa bakteri Gram positif mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat (*teichoic acid*) dimana terdapat dua jenis yaitu asam teikoat ribitol dan asam teikoat gliserol. Fungsi dari asam teikoat belum diketahui namun mempunyai sifat antigen spesifik (Radji 2010).

Dinding sel bakteri Gram negatif terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung sedikit lapisan peptidoglikan menyebabkan bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih rumit daripada dinding sel bakteri Gram positif. Membran luar sel bakteri Gram negatif terdiri atas lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida. Membran luar dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai fungsi spesifik yaitu selain dapat menghalangi fagositosis, lapisan membran luar dapat menjadi penghalang beberapa jenis antibiotik dan menghambat kerja dari beberapa enzim (Radji 2010).

### 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dalam mikrobiologi (Jawetz *et al.* 2008):

Kingdom	: Eubacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Coccus
Order	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri Gram positif anaerobik fakultatif berbentuk bulat yang juga dikenal dengan nama “*staph emas*”, memiliki ukuran 0,7-1,2  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu 37°C dan berkelompok seperti buah anggur dan memiliki warna berwarna emas pada Agar darah. *Staphylococcus aureus* bereproduksi dengan cara pembelahan biner. Dua sel anakan tidak terpisah secara sempurna sehingga bakteri ini selalu terlihat membentuk koloni kluster seperti anggur. Bakteri ini bersifat flora normal pada kulit sehat, tetapi dapat menjadi patogen pada jaringan kulit yang terbuka. *Staphylococcus aureus* hidup sebagai saprofit di dalam saluran-saluran pengeluaran lendir dari tubuh manusia dan hewan-hewan seperti hidung, mulut dan tenggorokan dan dapat dikeluarkan pada waktu batuk atau bersin. Bakteri ini juga sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus (Jawetz *et al.* 2008).

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan uji enzim katalase yang dapat membedakan dari bakteri *Streptococcus*. *Staphylococcus* bersifat katalase positif, sedangkan *Streptococcus* bersifat katalase negatif. Uji ini dapat dilakukan dengan menambahkan hydrogen peroksida 3% pada koloni dalam lempeng Agar atau Agar miring. Biakan katalase positif menghasilkan oksigen dan gelembung. Pengujian ini tidak dapat dilakukan dalam Agar darah karena darah sudah mengandung katalase (Radji 2010).



Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Manifestasi klinis yang paling sering ditemukan adalah furunkel pada kulit dan impetigo. Infeksi superfisial ini dapat menyebar ke jaringan yang lebih dalam menimbulkan osteomielitis, artritis, endokarditis dan abses pada otak, paru-paru, ginjal serta kelenjar mammae (Lowy 1998).

## F. Antibakteri

### 1. Definisi antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat atau senyawa yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri. Antibakteri yang digunakan untuk infeksi pada manusia harus memiliki toksisitas selektif, artinya senyawa tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap bakteri tetapi relatif tidak toksik terhadap inang atau hospes. Sifat antibakteri ada dua, yaitu bakteriostatik yang artinya zat atau bahan dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan bakteri dan bakteriosida dimana zat atau bahan dapat membunuh bakteri (Wilson 1982; Djie & Sartini 2008).

### 2. Mekanisme kerja antibakteri

Antibakteri mempunyai beberapa mekanisme, yaitu:

**2.1 Penghambatan dinding sel.** Dinding sel bakteri menentukan bentuk karakteristik dan berfungsi melindungi bagian dalam sel terhadap perubahan tekanan osmotik dan kondisi lingkungan lainnya. Antibakteri ini menghambat sintesis dinding sel terutama dengan mengganggu sintesis peptidoglikan dengan menghambat pembentukan ikatan glikosida sehingga pembentukan dinding sel bakteri terhenti. Peptidoglikan terdiri atas rangkaian N-asetil glukosamin dan asam N-asetil muramat yang tersusun secara bergantian merupakan penyusun dinding sel bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif (Suwandi 1992; Pelczar *et al.* 2008; Ganiswara *et al.* 1995).

**2.2 Penghambatan fungsi membran sel.** Membran sel bersifat tersusun atas fosfolipid dan protein yang berfungsi mengatur keluar masuknya zat-zat tertentu dalam sel yang bersifat semipermeabel. Membran sel dihubungkan dengan ion Mg selama pembentukan membran, dapat meningkatkan permeabilitas

sel atau menyebabkan sel lisis. Beberapa antimikroba bersatu dengan membran dan berfungsi sebagai ionophores, yaitu senyawa yang memberi jalan masuknya ion abnormal yang dapat mengganggu biokimia sel (Pelczar *et al.* 2008; Suwandi 1992).

**2.3 Penghambatan sintesis protein.** Antimikroba dapat berikatan dengan ribosom 30S, berikatan dengan ribosom 50S, serta menghambat translokasi peptidil t-RNA dari situs A ke situs P yang menyebabkan kesalahan pembacaan m-RNA dan mengakibatkan bakteri tidak mampu mensintesis protein (Ganiswara *et al.* 1995).

**2.4 Penghambatan sintesis asam nukleat.** Asam nukleat merupakan bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Kebanyakan sel tergantung pada sintesis DNA untuk pertumbuhannya, sedangkan RNA diperlukan untuk transkripsi dan menentukan informasi sintesis protein dan enzim. Pentingnya DNA dan RNA dalam proses kehidupan sel, hal ini berarti bahwa gangguan yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Dalam hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat, seperti berikatan dengan enzim DNA dependen RNA-polymerase bakteri, memblokir helix DNA (Pelczar *et al.* 2008).

**2.5 Mengganggu metabolisme sel bakteri.** Bakteri umumnya memerlukan *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) untuk mensintesis purin dan pirimidin (prekursor DNA dan RNA), bila asam fosfat tidak ada, sel-sel tidak dapat tumbuh atau membelah. Antimikroba bila bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi dan menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat (Mycek 2001; Brooks *et al.* 2012)

### **3. Ampisilin sebagai antibakteri**

Ampisilin merupakan penisilin semisintetik yang stabil terhadap asam atau amidase tetapi tidak tahan terhadap enzim  $\beta$ -laktamase (Goodman & Gilman 1970). Ampisilin merupakan antibiotik  $\beta$ -laktam golongan aminopenisilin mempunyai spektrum luas dimana mempunyai keaktifan melawan bakteri Gram negatif dan Gram positif (Brander *et al.* 1991).

Ampisilin digunakan sebagai kontrol positif karena diketahui bahwa terapi lini pertama infeksi *Staphylococcus aureus* adalah golongan penisilin semi sintetik, namun bila pasien alergi terhadap penisilin maka digunakan antibiotik golongan sefalosporin generasi I (Bamberger *et al.* 2005). Mekanisme kerja dari ampisilin adalah dengan bergabung dengan *penicillin-binding protein* (PBPs) pada bakteri, kemudian terjadi penghambatan sintesis dinding sel bakteri karena proses transpeptidasi antara rantai peptidoglikan terganggu sehingga terjadi aktivasi enzim proteolitik pada dinding sel bakteri (Gunawan *et al.* 2007).

## G. Pengujian Mikroba

Metode uji aktivitas antimikroba sebagai berikut:

### 1. Metode pengujian mikroba secara difusi

**1.1. Metode *disc diffusion* (tes Kirby & Bauer).** Metode ini untuk menentukan aktivitas antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media Agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media Agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media Agar.

**1.2. Metode *E-test*.** Metode *E-test* digunakan untuk mengestimasi MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (konsentrasi hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini menggunakan strip plastic yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah hingga tertinggi dan diletakkan pada permukaan media Agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media Agar.

**1.3. Metode *ditch-plate technique*.** Metode ini dilakukan dengan sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba.

**1.4. Metode *cup-plate technique*.** Metode ini serupa dengan metode *disk difusi*, dimana dibuat sumur pada media Agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji.

**1.5. Metode *gradient-plate technique*.** Metode ini menggunakan konsentrasi agen antimikroba pada media Agar secara teoritis bervariasi dari 0 hingga maksimal. Media Agar dicairkan dan larutan uji ditambahkan. Campuran kemudian dituang ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring. Nutrisi kedua selanjutnya dituang di atasnya. Plate diinkubasi selama 24 jam untuk memungkinkan agen antimikroba berdifusi dan permukaan media mengering. Mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan pada arah mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. Hasil perhitungan sebagai panjang total pertumbuhan mikroorganisme maksimum yang mungkin dibandingkan dengan panjang pertumbuhan hasil goresan (Pratiwi 2008).

## **2. Metode pengujian antimikroba secara dilusi**

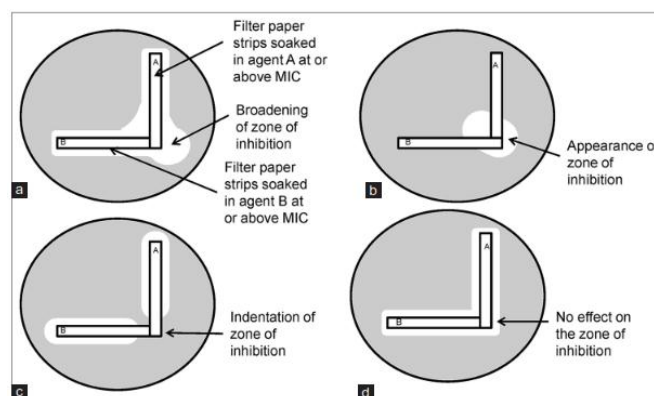
Metode dilusi dibedakan menjadi dua, yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi cair mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum, KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, KBM). Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM. Metode dilusi padat ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (*solid*). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

## **3. Metode pengujian antimikroba secara pita kertas**

Metode strip kertas merupakan salah satu metode uji untuk mengetahui pola interaksi yang terbentuk antar antimikroba secara kualitatif. Strip kertas saring dalam metode ini direndam dalam larutan antimikroba yang berbeda

dengan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yang telah ditentukan kemudian diletakkan dalam media uji membentuk huruf L. Antimikroba dalam strip kertas saring dibiarkan berdifusi dalam media dan diinkubasi selama 24 jam. Pola pertumbuhan mikroorganisme diinterpretasikan sebagai berikut:

- a. Efek aditif : penghambatan dari kedua pita bergabung pada sudut pertemuan dan tidak terdapat zona hambatan yang lebih besar pada pertemuan dua pita
- b. Efek sinergisme : adanya perluasan zona hambat di sekitar sudut pita
- c. Efek antagonism : terjadinya penyempitan di sekitar sudut pertemuan dua pita (Laishram *et al.* 2018).



**Gambar 1.** Uji pita kertas, (a) efek sinergis, (b) efek sinergis, (c) efek antagonis, (d) efek aditif (Laishram *et al.* 2018).

## H. Landasan Teori

Obat-obatan tradisional telah banyak digunakan dan menjadi budaya di Indonesia dalam bentuk ramuan jamu. Obat-obatan tradisional tersebut tidak hanya digunakan dalam fase pengobatan saja, melainkan juga digunakan dalam fase preventif, promotif dan rehabilitasi. Menurut penelitian obat-obatan tersebut memiliki efek samping relatif rendah serta adanya kandungan yang berbeda yang memiliki efek saling mendukung secara sinergis (Katno 2004), contohnya adalah daun sirih merah dan daun binahong.

Sirih merah mengandung saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Hariana 2013). Menurut Hidayat (2013) daun sirih merah mengandung senyawa fitokimia alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid.

Juliantina *et al.* (2009) dalam penelitiannya membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) sebesar 25%. Ekstrak etanol daun sirih merah memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pada konsentrasi 10%, 20%, 40%, 80% dan 100% (Candrasari *et al.* 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Soleha *et al.* (2015) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,125% sudah mampu menghambat *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat 9 mm.

Daun binahong mengandung alkaloid, saponin steroid/triterpenoid, polifenol, tanin dan flavonoid (Anasta *et al.* 2013). Kandungan fenol yang tinggi dapat digunakan melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Asam oleanolik berfungsi sebagai antiinflamasi (Astuti *et al.* 2011). Murdianto *et al.* (2013) membuktikan bahwa terdapat senyawa golongan triterpenoid yang mempunyai aktivitas antibakteri.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa, ekstrak etanol daun binahong mempunyai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) pada konsentrasi 200 ppm sehingga bersifat bakteriostatik, sedangkan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada konsentrasi 600 ppm (Sutrisno *et al.* 2014). Berdasarkan penelitian Elyani & Risandiansyah (2017) menunjukkan bahwa KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) ekstrak metanol daun binahong sebesar 12,5 mg/mL. Ekstrak etanol daun binahong juga memberikan efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) sebesar 512 µg/mL (Leliqia *et al.* 2017).

Penggunaan dua obat yang berbeda secara bersama dapat memberikan interaksi yang berlawanan (antagonis) sehingga efeknya melemah dimana obat pertama melemahkan obat yang kedua atau efek saling mendukung (sinergisme) merupakan kerjasama antara dua obat yang terdiri dari dua jenis yaitu adisi dan potensiasi dimana obat memberikan efek yang lebih baik dibandingkan dosis tunggal masing-masing obat (Tjay & Kirana 2007).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak daun sirih merah dengan ekstrak kering lidah buaya pada konsentrasi 1,56% lebih baik dari ekstrak tunggalnya (Suhaimi *et al.* 2018). Kombinasi ekstrak etanol daun binahong dan daun pegagan mempunyai efek bakteriostatik yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak tunggalnya. Diameter zona hambat pada konsentrasi 50 ppm ekstrak daun binahong dan 25 ppm ekstrak herba pegagan sebesar 10,73 mm. Konsentrasi 25 ppm ekstrak daun binahong dan 50 ppm ekstrak herba pegagan mempunyai aktivitas paling tinggi dibanding seri konsentrasi lainnya (Sutrisno *et al.* 2014).

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif anaerobik fakultatif. Bakteri ini bersifat flora normal pada kulit sehat, tetapi dapat menjadi patogen pada jaringan kulit yang terbuka. Bakteri ini juga sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus (Jawetz *et al.* 2008). Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Infeksi superfisial ini dapat menyebar ke jaringan yang lebih dalam menimbulkan osteomielitis, artritis, endokarditis dan abses pada otak, paru-paru, ginjal serta kelenjar mammae (Lowy 1998).

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah disk difusi dan metode dilusi. Metode disk difusi menggunakan cakram yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media Agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media Agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media Agar. Metode dilusi mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum, KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, KBM) (Pratiwi 2008).

Metode maserasi dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dalam pelarut yang sesuai ke dalam wadah tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika sudah mencapai keseimbangan konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Pelarut dipisahkan melalui penaringan apabila proses telah selesai (Mukhriani 2014). Keuntungan dari

metode maserasi adalah mudah dilakukan, murah, alat yang digunakan sederhana, dan dapat mengekstraksi senyawa dalam jumlah banyak dalam satu waktu (Kristanti *et al.* 2008).

Pelarut etanol merupakan pelarut yang sering digunakan dimana mempunyai ekstraksi power yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang memiliki berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014).

Penelitian ini menggunakan dua tanaman untuk dikombinasikan, karena kombinasi dapat digunakan untuk mengatasi toleransi atau meningkatkan efek farmakologis, penurunan toksisitas, atau pemeliharaan stabilitas. Penelitian ini akan mengkombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong yang diharapkan dari kombinasi ini dapat mempunyai efek antibakteri yang lebih optimal dibandingkan dengan bentuk ekstrak tunggalnya.

### **I. Hipotesa**

Berdasarkan landasan teori dalam penelitian ini dapat ditarik hipotesis antara lain:

Pertama, kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong dengan perbandingan (1:1); (1:2); dan (2:1) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Kedua, kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong perbandingan 1:2 memiliki aktivitas antibakteri teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Ketiga, pola interaksi yang terbentuk kombinasi teraktif ekstrak daun sirih merah dan daun binahong adalah sinergis.