

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengolahan Tanaman

1. Determinasi sirih merah dan binahong

Penelitian ini pertama kali melakukan determinasi tumbuhan dari sirih merah dan binahong. Determinasi dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran dari suatu tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan sampel serta tercampurnya bahan sampel dengan tanaman lainnya. Hasil determinasi yang diperoleh dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dimana hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2.

2. Penyiapan simplisia

Daun sirih merah dan daun binahong diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah di bulan Agustus 2019. Daun yang diambil adalah tidak terkena hama, berwarna hijau, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua serta dipetik pagi hari. Kedua daun disortasi dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih yang ditandai dengan tidak adanya debu dan kotoran yang menempel pada daun, kemudian ditiriskan dengan cara diangin-anginkan. Kedua daun tersebut kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam daun serta memudahkan dalam penyerbukan, selanjutnya dihitung bobot kering terhadap bobot basah daun sirih merah dan binahong yang dapat dilihat pada Tabel 1 dengan hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada Lampiran 14.

Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun sirih merah dan binahong

Daun	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Presentase (%)
Sirih merah	10350	1800	17,39
Binahong	20000	1807	9,04

Hasil dari bobot basah daun sirih merah 10350 gram kemudian diperoleh bobot kering 1800 gram dan diperoleh presentase rendemen 17,39% b/b. Hasil

untuk bobot basah daun binahong 20000 gram kemudian diperoleh bobot kering 1807 gram dan diperoleh presentase rendemen 9,04% b/b.

3. Karakterisasi serbuk daun sirih merah dan daun binahong

3.1. Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan daun binahong dilakukan sebanyak tiga kali dengan *moisture balance*. Gambar hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih merah dan daun binahong

No	Bobot serbuk (g)	Susut pengeringan (%)	
		Serbuk daun sirih merah	Serbuk daun binahong
1	2,0	7,5	7,5
2	2,0	8,0	8,0
3	2,0	7,5	8,0
	Rata-rata	7,67 ± 0,29	7,83 ± 0,29

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong adalah 7,83%. Nilai ini menyatakan senyawa yang menguap atau hilang pada proses pengeringan. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak atsiri dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air. Menurut Farmakope Herbal Indonesia (2010) nilai susut pengeringan daun sirih tidak lebih dari 10% sedangkan berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2011) nilai susut pengeringan serbuk daun binahong tidak lebih dari 10%, sehingga nilai nilai susut pengeringan daun sirih merah dan daun binahong dalam penelitian ini memenuhi syarat. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan mikroorganisme dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk.

3.2. Penetapan kadar air. Penetapan kadar air dilakukan untuk serbuk sirih merah, serbuk daun binahong, ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong menggunakan pelarut xilen jenuh air dengan alat *Sterling Bidwell*. Penentuan kadar air pada serbuk bertujuan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya dalam serbuk simplisia, semakin tinggi kadar air maka semakin mudah ditumbuhi jamur maupun kapang sehingga dapat menurunkan aktivitas biologi serbuk simplisia dalam masa penyimpanan. Hasil kadar air dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Hasil kadar air serbuk daun sirih merah dan daun binahong

Replikasi	Penimbangan (g)	Volume air		Kadar air (%)	
		A	B	A	B
1	20	1,3	1,3	6,5	6,5
2	20	1,4	1,3	7,0	6,5
3	20	1,4	1,3	7,0	6,5
Rata-rata				6,68 ± 0,29	6,5 ± 0,0

Keterangan:

A : serbuk daun sirih merah

B : serbuk daun binahong

Kadar air yang dipersyaratkan menurut Peraturan BPOM No. 12 Tahun 2014 adalah kurang dari 10%, sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar air serbuk sirih merah 6,68%, serbuk daun binahong 6,5% memenuhi persyaratan mutu.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah dan daun binahong

Metode maserasi dipilih karena proses pengerjaannya yang mudah, kemudian alat yang digunakan sederhana dan murah serta metode ini cocok digunakan untuk senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan. Wadah yang digunakan untuk maserasi berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung yang dapat merusak senyawa pada saat proses maserasi. Pelarut etanol dipilih karena etanol merupakan pelarut universal, mempunyai rentang polaritas yang lebar sehingga sebagian kandungan zat aktif baik polar, semi polar, maupun non polar akan terlarut dalam etanol.

Tahap awal dalam pembuatan ekstrak dengan menimbang masing-masing serbuk daun sirih merah dan daun binahong sebanyak 800 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca gelap tertutup dan ditambah pelarut yaitu etanol 70% (untuk daun sirih merah) dan etanol 96% (untuk daun binahong) yang selanjutnya dilakukan proses maserasi. Penggojokan selama perendaman serbuk pada 6 jam pertama agar tidak terjadi pengendapan serta partikel serbuk dapat bersentuhan langsung dengan pelarut sehingga pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif dari luar dan dalam sel.

Penguapan pelarut dilakukan menggunakan *rotary evaporator*, prinsip dari alat tersebut adalah penguapan dengan tekanan rendah sehingga terjadi penguapan dibawah titik didih pelarut dan suhu yang digunakan pada saat penguapan adalah 50°C. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditampung dalam gelas kaca yang

sebelumnya sudah ditimbang, kemudian dikeringkan lebih lanjut di dalam oven pada suhu 50°C untuk memperoleh ekstrak kental dengan bobot konstan yang selanjutnya dihitung rendemen ekstrak pada Tabel 4. Data perhitungan berat ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 16.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun sirih merah dan daun binahong

Serbuk	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Daun sirih merah	800	111,47	13,93
Daun binahong	800	102,00	12,75

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2010) rendemen ekstrak daun sirih tidak kurang dari 5%, sedangkan menurut Farmakope Herbal Indonesia (2011) rendemen ekstrak daun binahong tidak kurang dari 11,91%. Rendemen ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong pada penelitian ini sudah memenuhi rendemen ekstrak berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia dimana rendemen ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong secara berturut-turut adalah 13,93% dan 12,75%.

5. Uji kadar air ekstrak daun sirih merah dan daun binahong

Penetapan kadar air dilakukan pada ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong menggunakan pelarut xilen jenuh air dengan alat *Sterling Bidwell*. Hasil kadar air dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5. Hasil kadar air ekstrak daun sirih merah dan daun binahong

Replikasi	Penimbangan (g)	Volume air		Kadar air (%)	
		A	B	A	B
1	20	1,9	1,3	9,5	6,5
2	20	2,0	1,3	10	6,5
3	20	1,9	1,4	9,5	7,0
Rata-rata				9,67 ± 0,29	6,67 ± 0,29

Keterangan:

A : ekstrak daun sirih merah

B : ekstrak daun binahong

Penentuan kadar air pada ekstrak bertujuan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya dalam ekstrak, semakin tinggi kadar air maka semakin mudah ditumbuhi jamur maupun kapang sehingga dapat menurunkan aktivitas biologi ekstrak dalam masa penyimpanan. Kadar air ekstrak daun sirih merah adalah 9,67% dan ekstrak daun binahong adalah 6,67%. Kedua ekstrak memenuhi persyaratan mutu kadar air masing-masing ekstrak, dimana menurut Farmakope Herbal Indonesia (2010) kadar air untuk ekstrak daun sirih

merah tidak lebih dari 10% sedangkan menurut Farmakope Herbal Indonesia (2011) kadar air ekstrak daun binahong tidak lebih dari 8,85%.

6. Uji bebas etanol ekstrak etanol daun sirih merah dan daun binahong

Ekstrak yang didapat selanjutnya dilakukan uji bebas etanol dimana bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan etanol dalam ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji bebas etanol

Ekstrak	Prosedur	Hasil	Pustaka
Sirih merah & binahong	Ekstrak + H ₂ SO _{4conc} + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes 1997)

Hasil uji bebas etanol tabel diatas menunjukkan ekstrak daun sirih merah dan daun binahong sudah terbebas atau tidak mengandung pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sirih merah dan daun binahong metode tabung

Identifikasi kandungan kimia dengan metode tabung dilakukan pada kedua serbuk dan ekstrak daun sirih merah dan daun binahong. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada tanaman daun sirih merah dan daun binahong. Gambar hasil identifikasi senyawa kimia dapat dilihat pada Lampiran 5 dan 6.

Serbuk dan ekstrak daun sirih merah merah pada penelitian ini positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan steroid. Senyawa flavonoid yang terbentuk pada serbuk dan ekstrak daun sirih merah adalah flavonon, karena memberikan warna jingga hingga merah (Harbone 1966) yang dapat dilihat pada Tabel 7. Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Reduksi dengan serbuk Mg dengan HCl pekat menghasilkan warna merah, kuning, atau jingga pada flavonoid (Robinson 1995). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Novilia *et al.* (2017) dimana hasil identifikasi serbuk daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun sirih merah

Kandungan kimia	Pustaka	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna hijau pada lapisan amil alkohol (+)	Terbentuk warna jingga pada lapisan amil alkohol (+)
Alkaloid	Terbentuk endapan krem atau putih bila ditambah dengan pereaksi Mayer (Velavan 2015) dan endapan coklat bila ditambah pereaksi Burchard (Depkes 1995)	Pereaksi Mayer : tidak terbentuk endapan krem (-) Pereaksi Burchard : terbentuk endapan coklat (+)	Pereaksi Mayer : terbentuk endapan krem (+) Pereaksi Burchard : terbentuk endapan coklat (+)
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman (+)	Terbentuk warna coklat kehitaman (+)
Saponin	Terbentuk busa stabil 1-10 cm setelah penambahan HCl 2 N	Terbentuk buih (+)	Terbentuk buih (+)
Steroid	Terbentuk warna hijau kebiruan	Terbentuk warna hijau kebiruan (+)	Terbentuk warna hijau kebiruan (+)

Identifikasi kandungan kimia serbuk daun binahong pada penelitian ini mengandung alkaloid, tanin, saponin, dan steroid. Senyawa flavonoid pada serbuk daun binahong negatif karena menghasilkan warna hijau pada lapisan amil alkohol. Hal ini kemungkinan disebabkan tidak maksimalnya penyarian senyawa dalam serbuk daun binahong.

Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun binahong

Kandungan kimia	Pustaka	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna hijau pada lapisan amil alkohol (+)	Terbentuk warna jingga pada lapisan amil alkohol (+)
Alkaloid	Terbentuk endapan krem atau putih bila ditambah dengan pereaksi Mayer (Velavan 2015) dan endapan coklat bila ditambah pereaksi Burchard (Depkes 1995)	Pereaksi Mayer : tidak terbentuk endapan krem (-) Pereaksi Burchard : terbentuk endapan coklat (+)	Pereaksi Mayer : terbentuk endapan krem (+) Pereaksi Burchard : terbentuk endapan coklat (+)
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman (+)	Terbentuk warna coklat kehitaman (+)
Saponin	Terbentuk busa stabil 1-10 cm setelah penambahan HCl 2 N	Terbentuk buih (+)	Terbentuk buih (+)
Steroid	Terbentuk warna hijau kebiruan	Terbentuk warna hijau kebiruan (+)	Terbentuk warna hijau kebiruan (+)

Ekstrak daun binahong mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan steroid. Senyawa flavonoid pada ekstrak daun binahong merupakan golongan flavonon, karena memberikan warna jingga kemerahan (Harbone 1973). Senyawa

saponin pada ekstrak daun sirih merah lebih kuat dibandingkan serbuk daun sirih merah, hal ini dapat terlihat buih yang terbentuk lebih tinggi pada ekstrak.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Novilia *et al.* (2017) dimana hasil identifikasi ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin. Ekstrak daun binahong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, dan saponin (Betriksia *et al.* 2018).

8. Hasil identifikasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak daun sirih merah dan daun binahong yang telah dilakukan uji tabung kemudian dilakukan uji KLT (Kromatografi Lempeng Tipis) dimana gambar KLT dapat dilihat pada Lampiran 7. Identifikasi menggunakan KLT (Kromatografi Lempeng Tipis) meliputi golongan flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, dan minyak atsiri.

8.1. Flavonoid. Identifikasi flavonoid pada ekstrak daun sirih merah dan daun binahong Kromatografi lapis tipis (KLT) ditunjukkan pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil identifikasi flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Rf	Hasil			Interpretasi hasil
		UV 254	UV 366	Visual Sitroborat	
Ekstrak daun sirih merah	0,35	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,39	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,43	Peredaman	-	-	-
	0,65	Peredaman	Berfluoresensi kuning-hijau	Kuning coklat	+
Ekstrak daun binahong	0,35	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,7	Peredaman	Berfluoresensi kuning-hijau	Kuning coklat	+
Baku rutin	0,39	Peredaman	Peredaman	Kuning coklat	+

Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:26) dengan baku rutin dengan pereaksi semprot sitroborat. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah dan daun binahong positif mengandung flavonoid karena setelah disemprot pereaksi sitoborat menunjukkan warna kuning pudar dan pada UV 366 nm memberikan hasil fluoresensi kuning kehijauan setelah disemprot sitroborat (Ahmad *et al.* 2015).

8.2. Alkaloid. Identifikasi alkaloid pada ekstrak daun sirih merah dan daun binahong Kromatografi lapis tipis (KLT) ditunjukkan pada Tabel 10. Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : metanol : air (9:2:2) dengan baku pembanding piperin.

Tabel 10. Hasil identifikasi alkaloid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Rf	Hasil			Interpretasi hasil
		UV 254	UV 366	Visual Dragendorf	
Ekstrak daun sirih merah	0,58	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,73	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,84	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,94	Peredaman	Berfluoresensi biru	Kuning	+
Ekstrak daun binahong	0,82	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,86	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,96	Peredaman	Berfluoresensi biru	Kuning	+
Baku piperin	0,94	Peredaman	Berfluoresensi biru	Kuning	+

Hasil KLT menunjukkan bahwa visual setelah penyemprotan dengan reagen Dragendorf memberikan spot berwarna kuning yang menunjukkan hasil positif adanya alkaloid dimana awal sebelum penyemprotan tidak tampak noda kuning, pada sinar UV 254 terjadi peredaman dan UV 366 berfluoresensi biru. Rf yang dihasilkan baku pembanding dengan kedua ekstrak mirip, sehingga ekstrak mengandung senyawa alkaloid berupa piperin.

8.3. Tanin. Identifikasi tanin pada ekstrak daun sirih merah dan daun binahong Kromatografi lapis tipis (KLT) ditunjukkan pada Tabel 11. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : air (6:4) dengan baku pembanding adalah asam galat.

Tabel 11. Hasil identifikasi tanin secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Rf	Hasil			Interpretasi hasil
		UV 254	UV 366	Visual FeCl ₃ 1%	
Ekstrak daun sirih merah	0,6	Peredaman	Berfluoresensi biru	Hijau kehitaman	+
Ekstrak daun binahong	0,58	Peredaman	Berfluoresensi biru	Coklat kehitaman	+
Baku asam galat	0,71	Peredaman	Berfluoresensi biru	Kehitaman	+

Hasil KLT menunjukkan bahwa visual setelah penyemprotan dengan reagen FeCl_3 1% memberikan spot berwarna hijau kehitaman pada ekstrak daun sirih merah dan coklat kehitaman pada ekstrak daun binahong yang menunjukkan hasil positif adanya tanin.

8.4. Steroid. Identifikasi steroid pada ekstrak daun sirih merah dan daun binahong Kromatografi lapis tipis (KLT) ditunjukkan pada Tabel 12. Fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (9:1) dengan baku stigmasterol

Tabel 12. Hasil identifikasi steroid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Rf	Hasil		Visual Liebermann Burchard	Interpretasi hasil
		UV 254	UV 366		
Ekstrak daun sirih merah	0,35	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,4	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,46	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,69	Peredaman	Berfluoresensi biru	Hijau	+
	0,81	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
Ekstrak daun binahong	0,92	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,38	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,44	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,5	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
	0,69	Peredaman	Berfluoresensi biru	Hijau	+
Baku stigmasterol	0,94	Peredaman	Berfluoresensi biru	-	-
Baku stigmasterol	0,56	Peredaman	Berfluoresensi biru	Biru	+

Hasil KLT menunjukkan bahwa visual setelah penyemprotan dengan reagen Liebermann Burchard memberikan spot berwarna hijau yang menunjukkan hasil positif adanya steroid. kedua ekstrak mempunyai Rf yang sama yaitu 0,69 yang menandakan bahwa kedua ekstrak mempunyai senyawa golongan steroid yang sama.

8.5. Minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri pada ekstrak daun sirih merah dan daun binahong Kromatografi lapis tipis (KLT) ditunjukkan pada Tabel 13. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F_{254} dengan fase gerak yang digunakan adalah toluene : etil asetat (93:7). Pereaksi semprot yang digunakan adalah anisaldehyd-asam sulfat serta baku pembanding adalah eugenol.

Tabel 13. Hasil identifikasi minyak atsiri secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Rf	Hasil			Interpretasi hasil
		UV 254	UV 366	Visual anisaldehyd-sulfat	
Ekstrak daun sirih merah	0,29	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
	0,36	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
	0,44	Peredaman	Peredaman	Ungu	+
	0,49	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
Ekstrak daun binahong	0,31	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
	0,44	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
	0,49	Peredaman	Berfluoresensi merah	-	-
Eugenol	0,6	Peredaman	Peredaman	Ungu	+

Hasil uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah positif mengandung minyak atsiri dengan ditandai hasil visual setelah disemprot pereaksi anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan warna ungu, pada sinar UV 254 mengalami peredaman dan pada UV 366 berfluoresensi merah sedangkan ekstrak daun binahong tidak mengandung minyak atsiri. Baku eugenol menunjukkan bercak ungu setelah disemprot dengan anisaldehyd-asam sulfat. Rf ekstrak daun sirih merah tidak sejajar dengan baku pembanding (eugenol) yang menandakan bahwa didalam ekstrak tidak terdapat eugenol.

B. Pengujian Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



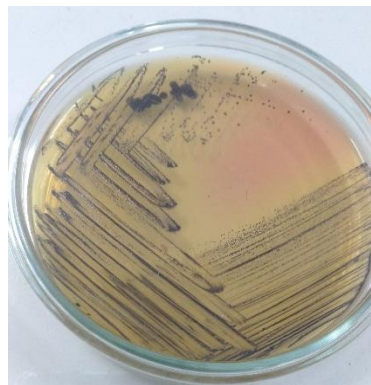
Gambar 6. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (kanan)

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan larutan 10 mL NaCl steril ditambahkan 2-3 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 hingga kekeruhan suspensi bakteri setara dengan standar Mc. Farland 0,5. Standar Mc.

Farland 0,5 setara dengan jumlah bakteri 10^6 CFU/mL dalam suatu suspensi bakteri.

2. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

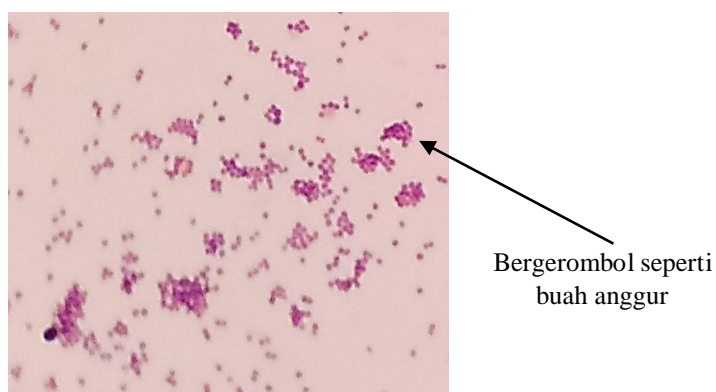
2.1. Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada medium VJA (*Vogel Johnson Agar*) dalam cawan petri yang telah berisi kalium telurit 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil goresan menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan koloni berwarna hitam dengan tepi rata dan media sekitar koloni berwarna kuning. Koloni berwarna hitam karena kemampuan dari *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang mereduksi kalium telurit, serta media disekitar koloni berubah menjadi kuning karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol menjadi asam dimana hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 7. Produk yang dihasilkan bakteri ini adalah asam organik yang mengubah indikator pH di media VJA dari berwarna merah menjadi kuning cerah (Tambayong 2009).



Gambar 7. Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.2. Identifikasi morfologi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram. Tujuan pewarnaan Gram adalah menentukan apakah bakteri uji tergolong Gram positif atau Gram negatif. Identifikasi morfologi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram pada mikroskop perbesaran 100x menunjukkan sel berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur pada Gambar 8. Sel bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berwarna ungu membuktikan bahwa bakteri tergolong Gram positif karena bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) mempunyai

peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan Gram negatif, sehingga pada pewarnaan Gram dapat mempertahankan warna ungu dari Gram A (kristal violet). Perbedaan ketebalan dinding ini mengakibatkan perbedaan kemampuan afinitas dengan pewarnaan Gram (Purves & Sadava 2003).



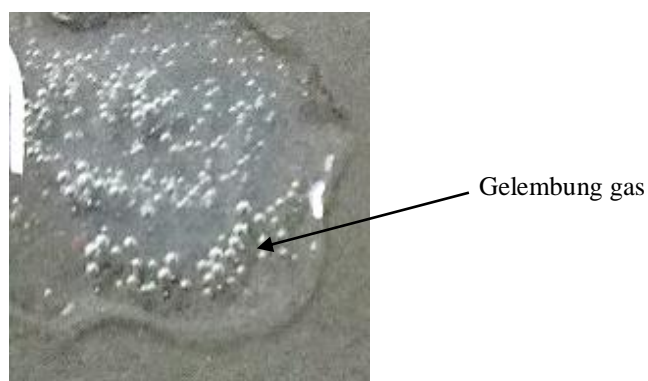
Gambar 8. Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.3. Uji katalase. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara biokimia adalah dengan uji katalase dimana hasil dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji katalase

Pengujian	Pustaka	Hasil
Katalase	Terbentuk gelembung gas	Terbentuk gelembung gas (+)

Hasil uji menunjukkan positif pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan terbentuknya gelembung gas pada kaca benda seperti pada Gambar 8. Katalase positif ditunjukkan adanya gelembung gas (O_2) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus* (Toelle & Viktor 2014).



Gambar 9. Uji katalase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

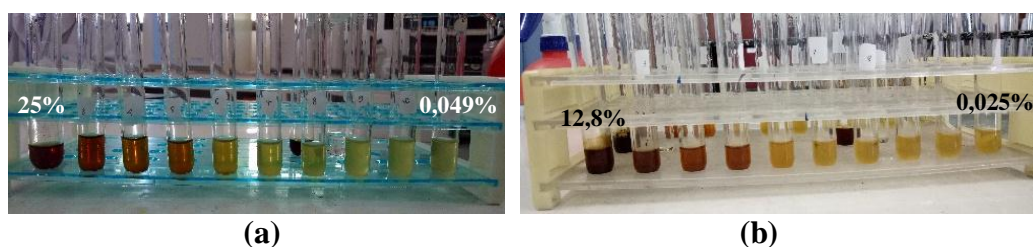
Uji katalase ini mendeteksi enzim katalase pada bakteri yang bersifat anaerobik fakultatif serta pada bakteri berbentuk kokus digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* dimana kelompok *Staphylococcus* memberikan reaksi positif sedangkan *Streptococcus* memberikan hasil negatif (Lay 1994).

2.4. Uji koagulase. Uji koagulase pada penelitian ini menggunakan metode *slide* atau *clumping factor* yang digunakan untuk mengetahui adanya ikatan koagulase (Dewi 2013). Penelitian ini menunjukkan hasil positif dengan adanya gumpalan putih pada kaca benda seperti Gambar 10. Koagulase merupakan salah satu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat dalam serum (Karimela *et al.* 2017). Reaksi *clumping factor* terjadi karena reaksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan fibrinogen yang terdapat dalam serum yang ditunjukkan dengan adanya gumpalan koagulase pada kaca benda (Brückler *et al.* 1994).



Gambar 10. Uji katalase *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi



Gambar 11. Uji dilusi (a) ekstrak daun sirih merah (b) ekstrak daun binahong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Uji aktivitas antibakteri secara dilusi dilakukan pada ekstrak tunggal daun sirih merah dan daun binahong. Pengujian aktivitas dengan metode dilusi digunakan 12 seri tabung dimana terdiri dari kontrol negatif (-), kontrol positif (+) dan seri konsentrasi dari masing-masing ekstrak tunggal. Uji dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak tunggal daun sirih merah dan daun binahong. KHM merupakan konsentrasi terendah atau terkecil suatu sampel yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (dalam penelitian ini bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) yang ditandai dengan sampel tidak keruh, sedangkan KBM adalah konsentrasi terendah atau terkecil dari sampel yang dapat membunuh bakteri dimana ditunjukkan dengan tidak ada pertumbuhan bakteri yang digores pada media selektif pada konsentrasi tersebut yang dapat dilihat pada Lampiran 10 dan 11. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 11. Hasil uji dilusi ekstrak tunggal daun sirih merah dan daun binahong (KBM)

Konsentrasi	Ekstrak daun sirih merah			Konsentrasi	Ekstrak daun binahong		
	I	II	III		I	II	III
Kontrol (-)	-	-	-	Kontrol (-)	-	-	-
25%	-	-	-	12,8%	-	-	-
12,5%	+	+	+	6,4%	+	+	+
6,25%	+	+	+	3,2%	+	+	+
3,125%	+	+	+	1,6%	+	+	+
1,563%	+	+	+	0,8%	+	+	+
0,782%	+	+	+	0,4%	+	+	+
0,391%	+	+	+	0,2%	+	+	+
0,196%	+	+	+	0,1%	+	+	+
0,098%	+	+	+	0,05%	+	+	+
0,049%	+	+	+	0,025%	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan:

+ : terdapat pertumbuhan bakteri pada media VJA

- : tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada media VJA

Tabel diatas menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) sebesar 25%, sedangkan ekstrak daun binahong sebesar 12,8% yang ditandai dengan media selektif *Vogel Jhonson Agar* tidak ditumbuhi koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) yang telah didapat selanjutnya digunakan untuk pengujian kombinasi ekstrak secara difusi.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak tunggal daun binahong pada penelitian dahulu yang dilakukan oleh Sulistyarsi & Pribadi (2018) mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 50%, sedangkan pada penelitian ini didapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 12,8%. Perbedaan nilai KBM disebabkan karena adanya perbedaan pelarut dalam proses ekstraksi dimana penelitian sebelumnya menggunakan pelarut etil asetat, sedangkan penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96%. Hal ini menyebabkan kandungan kimia pada ekstrak berbeda, dimana penelitian sebelumnya ekstrak daun binahong mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan polifenol sedangkan pada penelitian ini ekstrak daun binahong mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, dan tanin.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak tunggal daun sirih merah pada penelitian dahulu yang dilakukan oleh Juliantina *et al.* (2009) mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 25% yang sejalan dengan penelitian ini dimana didapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 25%.

4. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi



Gambar 12. Uji difusi kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dilakukan pada kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong. Kombinasi pada penelitian ini adalah (1:1); (1:2); dan (2:1) yang didapat dari Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) masing-masing ekstrak tunggal pada uji difusi. Kombinasi 1:1 yaitu kombinasi 25% EDSM dan 12,8% EDB, konsentrasi 1:2 yaitu kombinasi 25% EDSM dan 25,6% EDB, lalu kombinasi 2:1 adalah kombinasi 50% EDSM dan 12,8% EDB. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil uji difusi kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong

Pengujian	Diameter (mm)			Rata-rata \pm SD
	I	II	III	
Kontrol positif (Ampisilin)	39,83	38,94	38,20	38,99 \pm 0,82*
Kombinasi				
1:1	9,14	9,33	9,60	9,35 \pm 0,23*
1:2	16,35	16,37	16,77	16,49 \pm 0,23*
2:1	14,39	14,64	14,55	14,53 \pm 0,13*
Kontrol negatif (DMSO 10%)	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00*

Keterangan:

* : berbeda nyata dengan kontrol negatif

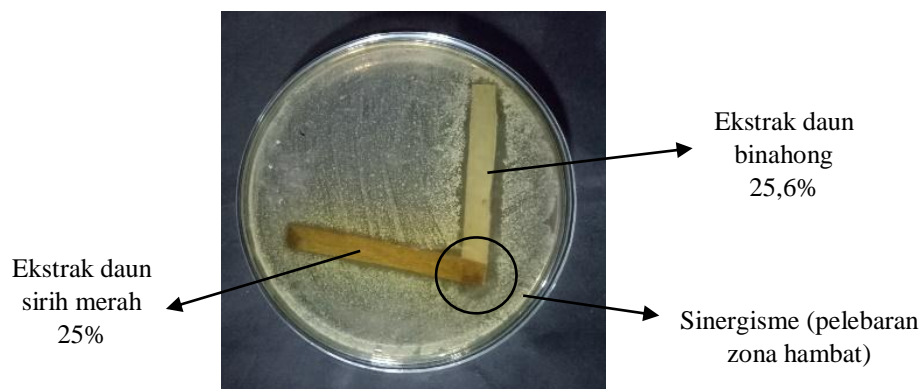
Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi didapatkan hasil bahwa kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong dengan perbandingan 1:2 memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan rata-rata diameter hambat sebesar 16,49 mm dibandingkan kombinasi dengan perbandingan 1:1 dan 2:1. Diameter daya hambat dalam pengujian metode difusi apabila kurang dari 5 mm dapat dikatakan mempunyai aktivitas lemah, sedangkan bila diameter daya hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter daya hambat sebesar 10-20 mm dikategorikan kuat, dan diameter daya hambat $>$ 20 mm dikategorikan sangat kuat (Greenwood 1995). Gambar hasil pengujian secara difusi dapat dilihat pada Lampiran 12.

Data statistik ANOVA menunjukkan bahwa diameter daya hambat ekstrak kombinasi daun sirih merah dan daun binahong terdistribusi normal dimana nilai signifikansi pada uji Kolmogorov Smirnov adalah $0,213 > 0,05$, kemudian dilanjutkan tes homogenitas dimana nilai signifikansi pada Levene test adalah $0,065 > 0,05$ sehingga data tersebut homogen. Hasil ANOVA menunjukkan nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ berarti terdapat perbedaan yang signifikan pada sampel diatas. Hasil ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan atau *Post Hoc* yaitu Tukey. Tabel *homogeneous subset* menunjukkan bahwa kombinasi dengan perbandingan 1:2 teraktif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan kombinasi dengan perbandingan 1:1 dan 2:1. Hasil pengujian statistik dapat dilihat pada Lampiran 17.

Hal ini dikarenakan ekstrak daun binahong dengan konsentrasi 12,8% sudah mampu membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan ekstrak daun sirih merah pada konsentrasi 25% mampu membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sehingga dengan konsentrasi dua kali dari KBM ekstrak daun binahong akan mempunyai diameter zona hambat yang baik dibandingkan kombinasi 1:1 dan 2:1.

Kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong memiliki kandungan senyawa dengan mekanisme penghambatan terhadap bakteri yang sama sehingga kombinasi dalam penelitian ini dapat meningkatkan aktivitas antibakteri dengan pola sinergis. Data kombinasi perbandingan yang teraktif kemudian dilanjutkan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode pita kertas untuk mengetahui pola interaksi yang terbentuk.

5. Pengujian aktivitas antibakteri metode pita kertas



Gambar 13. Pola interaksi kombinasi ekstrak daun sirih merah dan daun binahong

Pengujian metode pita dilakukan untuk mengetahui pola interaksi kombinasi aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih merah dan daun binahong. Pola kombinasi dilakukan pada kombinasi teraktif ekstrak daun sirih merah dan daun binahong yaitu 1:2. Pola interaksi kombinasi ekstrak daun sirih merah dan binahong pada penelitian ini adalah sinergis. Hasil pengujian dapat dilihat pada Gambar 13 dimana terlihat bahwa diameter hambat pada ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong pada sudut pertemuan pita kertas menunjukkan perubahan diameter hambat, sehingga penggunaan bersama antara ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun binahong meningkatkan aktivitas keduanya.