

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH
MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) TERHADAP BAKTERI
Escherichia coli dan *Propionibacterium acnes* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI



Oleh :

DIKA IKHLASUL AMAL

1713206006

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

2022

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH
MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) TERHADAP BAKTERI
Escherichia coli dan *Propionibacterium acnes* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI



Oleh :

DIKA IKHLASUL AMAL

1713206006

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

2022

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH
MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) TERHADAP BAKTERI
Escherichia coli dan *Propionibacterium acnes* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Yang diajukan oleh :

DIKA IKHLASUL AMAL

1713206006

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



apt. Amalia Eka Putri, M.Farm
NIDN 0728129201



Yunita Diyah Safitri, S.Si., M.Si.
NIDN : 0717069302

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH
MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) TERHADAP BAKTERI
Escherichia coli dan *Propionibacterium acnes* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

DIKA IKHLASUL AMAL

1713206006

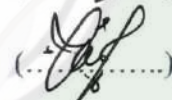
Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji
Skripsi Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa

Tanggal:

Ketua Penguji : apt. Amalia Eka Putri, M.Farm

()

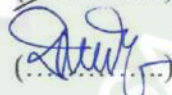
Anggota penguji :1. Yunita Diyah Safitri, S.Si.,M.Si.

()

2. apt. Choirul Huda, M.Farm

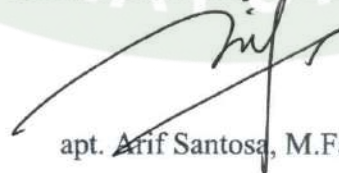
()

3. apt. Dara Pranidya T., M.Farm.

()

Mengetahui,

Ketua STIKes Karya Putra Bangsa



apt. Arif Santosa, M.Farm.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini 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 diterbitkan dalam daftar pustaka.

Tulungagung, September 2022

Dika Ikhlasul Amal



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur bagi kehadiran Allah subhanahu wa ta'ala yang telah melimpahkan kasih dan sayang-Nya kepada kita, sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi dengan tepat waktu, dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* secara *in vitro*”. Tujuan dari penyusunan skripsi ini guna memenuhi salah satu syarat untuk dapat memenuhi syarat mencapai gelar S1 Farmasi di STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.

Didalam pengerjaan skripsi ini telah melibatkan banyak pihak yang sangat membantu dalam banyak hal. Oleh sebab itu, disini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah mengabulkan semua doa serta hajat saya.
2. Bapak apt. Arif Santoso, M. Farm selaku Ketua STIKes Karya Putra Bangsa.
3. apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm selaku Kaprodi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.
4. Ibu apt. Amalia Eka Putri, M.Farm. selaku pembimbing pertama saya yang membimbing saya dengan sabar.
5. Ibu Yunita Dyah Safitri, S.Si, M.Si. selaku pembimbing kedua saya yang dengan sabar membimbing saya.
6. Bu Pristi (Laboran Mikro) dan Bu Retno (Laboran Kimia yang senantiasa menjadi laboran saat praktikum.
7. Kedua orang tua yang telah membiayai perkuliahan serta senantiasa memberi semangat dan dukungan di kala lelah dari awal sampai akhir pendidikan..
8. Seluruh dosen STIKes Karya Putra Bangsa yang telah mendidik saya dari awal masuk sampai mengantar kelulusan saya.
9. Teman-teman seperjuangan program studi S1 Farmasi angkatan 2018 yang selalu bersama, baik suka maupun duka dan telah membantu memberikan masukan hingga skripsi ini dapat terselesaikan.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan dorongan dalam penyelesaian skripsi ini.

Meskipun telah berusaha menyelesaikan skripsi ini sebaik mungkin, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih ada kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca guna menyempurnakan segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini berguna bagi para pembaca dan pihak-pihak lain yang berkepentingan.

Tulungagung, September 2022

Penulis,

Dika Ikhlasul Amal

NIM : 1713206006

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum Ruiz & Pav*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan
Propionibacterium acnes SECARA *IN VITRO***

Dika Ikhlasul Amal

Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Jerawat merupakan masalah yang sering muncul pada remaja di Indonesia dengan persentase pada wanita sekitar 83-85% dan pada pria sekitar 95-100%. Bakteri yang terdapat pada pasien jerawat diantaranya adalah *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*. Bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* mudah resisten terhadap antibiotik dan banyaknya dampak negatif dari penggunaan antibiotik jangka panjang, maka diperlukan pengembangan agen antibakteri dengan memanfaatkan dari tanaman, salah satu tanaman yang dapat digunakan yaitu daun sirih merah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Sampel diekstraksi dengan maserasi menggunakan etanol 70%, lalu difraksinasi menggunakan pelarut *aquadestilata*, etil asetat, dan n-heksan. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah menggunakan metode pengujian *in vitro* yaitu difusi cakram dengan konsentrasi 5%. Analisa hasil dilakukan dengan *Kruskal-Wallis* dan *MannWhitney*. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*. Fraksi *aquadestilata* mempunyai aktivitas antibakteri yang teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan rata-rata zona hambat sebesar $9,66 \pm 1,75$ mm pada bakteri *Escherichia coli* dan $8,5 \pm 0,5$ pada bakteri *Propionibacterium acnes*.

Kata kunci: Antibakteri, Daun sirih merah, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, Fraksinasi

Antibacterial Activity Test Red betel leaf Fraction(Piper crocatum Ruiz & Pav) Escherichia coli and Propionibacterium acnes Bacteria In Vitro

Dika Ikhlasul Amal

S1 Pharmacy Study Program

ABSTRACT

Acne is a problem that often appears in teenagers in Indonesia with the percentage in women around 83-85% and in men around 95-100%. Bacteria found in acne patients include *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes*. *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes* easily resistant to antibiotics and the many negative effects of use long-term antibiotics, it is necessary to develop antibacterial agents with Utilizing plants, one of the plants that can be used is the leaves red betel. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of red betel leaf fraction against *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes*. The method used in this research is the experimental method. Samples were extracted by maceration using 70% ethanol, then fractionated using aquadestilata, ethyl acetate, and n-hexane as solvents. Activity test Antibacterial fraction of red betel leaf using in vitro testing method, namely disc diffusion with a concentration of 5%. Analysis of the results was carried out by KruskalWallis and Mann Whitney. The results of testing the antibacterial activity of the betel leaf fraction red indicates the presence of antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes*. The distilled water fraction has antibacterial activity the most active in inhibiting bacterial growth with an average zone inhibition of 9.66 ± 1.75 mm in *Escherichia coli* and 8.5 ± 0.5 in *Propionibacterium acnes* bacteria.

Keywords: Antibacterial, Red betel leaf, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, Fractionation

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
INTISARI	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Uraian Tanaman	5
2.1.1 Sirih Merah	5
2.1.2 Morfologi dan Klasifikasi	5
2.1.3 Khasiat.....	6
2.1.4 Kandungan Kimia	6
2.2 Simplisia	8
2.2.1 Pengertian Simplisia	8
2.2.2 Simplisia Nabati	8
2.2.3 Simplisia Hewani	8
2.2.4 Simplisia Mineral	8
2.2.5 Tahap Pembuatan Simplisia	8
2.3 Ekstraksi	10
2.3.1 Definisi Ekstraksi	10
2.3.2 Metode Ekstraksi.....	10
2.3.3 Metode Fraksinasi	12

2.3.4	Pelarut	12
2.4	Bakteri	14
2.4.1	Definsi Bakteri	14
2.4.2	Penggolongan Bakteri	14
2.5	<i>Escherichia coli</i>	15
2.5.1	Morfologi dan Klasifikasi	15
2.6	<i>Propionibacterium acnes</i>	16
2.6.1	Morfologi dan Klasifikasi	16
2.7	Antibakteri	17
2.7.1	Pengertian Antibakteri	17
2.7.2	Mekanisme Kerja Antibakteri	17
2.8	Uji Aktivitas Antibakteri	18
2.8.1	Metode Difusi	18
2.8.2	Metode Dilusi	19
2.9	Antibakteri Pembanding	20
2.10	Hipotesis	21
BAB III METODE PENELITIAN		
3.1	Bahan dan Alat	22
3.1.1	Bahan	22
3.1.2	Alat	22
3.2	Populasi Penelitian	22
3.3	Sampel Penelitian	22
3.4	Variabel Penelitian	22
3.4.1	Variabel Bebas	22
3.4.2	Variabel Kontrol	23
3.4.3	Variable Terikat	23
3.5	Cara Penelitian	23
3.5.1	Determinasi	23
3.5.2	Pembuatan Simplisia	23
3.5.3	Uji Kadar Air Serbuk Simplisia	24
3.5.4	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	24

3.5.5 Rendemen Ekstrak	25
3.5.6 Uji Bebas Etanol	25
3.5.7 Skrining Fitokimia	25
3.5.8 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak	26
3.5.9 Fraksinasi	27
3.5.10 Pembuatan Media	27
3.5.11 Pembuatan Larutan Kontrol	28
3.5.12 Pembuatan Larutan Uji	28
3.5.13 Peremajaan Bakteri	28
3.5.14 Identifikasi Bakteri <i>E. Coli</i> dan <i>P. Acnes</i>	29
3.5.15 Pembuatan Suspensi Bakteri	29
3.5.16 Uji Aktivitas Antibakteri	30
3.5.17 Pengukuran Zona Hambat	30
3.6 Analisis Data	30
3.6.1 Uji Normalitas Data	30
3.6.2 Uji Homogenitas	31
3.6.3 Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	31
3.6.4 Uji <i>Mann-Whitney</i>	32
3.7 Kerangka Penelitian	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Determinasi Tanaman	34
4.2 Uji Kadar Air Serbuk Simplisia	34
4.3 Ekstraksi Daun Sirih Merah	35
4.4 Uji Bebas Etanol	36
4.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Merah	37
4.6 Penetapan Kadar Flavonoid	39
4.7 Fraksinasi Daun Sirih Merah	40
4.8 Identifikasi Bakteri	41
4.9 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah	42
BAB V PENUTUP	
5.1 Simpulan	56

5.2	Saran.....	56
	DAFTAR PUSTAKA.....	57
	LAMPIRAN.....	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Daun sirih merah	5
Gambar 2. 2 <i>Escherichia coli</i>	15
Gambar 2. 3 <i>Propionibacterium acnes</i>	16
Gambar 3. 1 Skema Penelitian	33
Gambar 4. 1 Uji bebas etanol.	36
Gambar 4. 2 Uji Flavonoid.	38
Gambar 4. 3 Uji Saponin.	38
Gambar 4. 4 Uji Tanin.	39
Gambar 4. 5 Uji Pewarnaan Gram.....	42
Gambar 4. 6 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	44
Gambar 4. 7 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	49
Gambar 4. 8 Grafik Batang Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Propionibacterium acnes</i>	54

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kategori respon hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan diameter zona hambat	19
Tabel 4. 1 Hasil Uji Kadar Air Serbuk Simplisia Daun Sirih Merah	34
Tabel 4. 2 Hasil rendemen ekstrak daun sirih merah	35
Tabel 4. 3 Hasil Uji Bebas Etanol Daun Sirih Merah	36
Tabel 4. 4 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun sirih merah	37
Tabel 4. 5 Hasil uji kadar senyawa flavonoid ekstrak daun sirih merah	40
Tabel 4. 6 Hasil rendemen fraksi daun sirih merah	41
Tabel 4. 7 Hasil Uji Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	43
Tabel 4. 8 Hasil Uji Tukey Subset Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	44
Tabel 4. 9 Tabel Uji Kruskal-Wallis fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	47
Tabel 4. 10 Uji Mann Whitney fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	47
Tabel 4. 11 Hasil Uji Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	48
Tabel 4. 12 Hasil Uji Tukey Subset Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	49
Tabel 4. 13 Tabel Uji Kruskal-Wallis fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	52
Tabel 4. 14 Tabel Uji Man Whitney fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Daun Sirih Merah	67
Lampiran 2. Keterangan dan Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	68
Lampiran 3. Keterangan dan Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	69
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian	70
Lampiran 5. Perhitungan Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri	75
Lampiran 6. Pembuatan Larutan Uji	75
Lampiran 7. Perhitungan Hasil.....	75
Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	77
Lampiran 9. Hasil uji <i>man whiney</i> fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	78
Lampiran 10. Hasil analisis data fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	79
Lampiran 11. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	86
Lampiran 12. Hasil uji <i>man whiney</i> fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Proponibacterium acnes</i>	86
Lampiran 13. Hasil analisis data fraksi daun sirih merah terhadap bakteri <i>Proponibacterium acnes</i>	87
Lampiran 14. Alur kerja	94

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan yang paling utama di negara berkembang seperti di Indonesia (Wijayanti and Safitri, 2018). Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme seperti virus, jamur, dan bakteri. Salah satu infeksi yang sering terjadi di Indonesia adalah infeksi kulit dan jerawat (Solikhah *et al.*, 2018). Jerawat sering muncul pada wanita remaja berumur 14-17 tahun dengan presentase sekitar 83-85% dan pada pria remaja berumur 16-19 tahun dengan presentase sekitar 95-100% (Hendra and Resti, 2015). Jerawat yang sudah terinfeksi oleh bakteri memiliki bintik putih yang menandakan adanya nanah (Citra, 2021). Bakteri yang terdapat pada pasien jerawat meliputi: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus*, dan *Enterobacter* termasuk *Escherichia coli*. (Kumar *et al.*, 2016). *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang hidup sebagai flora normal pada manusia, namun dapat bersifat patogen sehingga menyebabkan infeksi (Juliantina *et al.*, 2018). Beberapa infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* adalah infeksi saluran kemih, infeksi saluran cerna, paru-paru, dan infeksi kulit (Yashinta, 2013). Bakteri *Escherichia coli* juga ditemukan pada jerawat pasien (Gibbon, 2013). Bakteri *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri gram positif yang berada di flora normal kulit yang ikut berperan dalam menginfeksi kulit terutama dalam pembentukan jerawat (Hafsari *et al.*, 2015).

Jerawat pada umumnya dapat ditangani dengan menggunakan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan ataupun membunuh bakteri tersebut (Suyasa and Mastra, 2020). Penggunaan obat-obat antibiotik yang tidak tepat, dapat menyebabkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik yang mempersulit proses pengobatan sehingga infeksi terus menyebar (Solikha *et al.*, 2018). Adanya resistensi antibiotik maka diperlukan pengembangan penelitian mengenai penemuan obat baru yang berasal dari bahan alam, untuk meminimilisir efek samping seperti yang dapat ditimbulkan dari penggunaan antibiotik atau zat aktif lain, termasuk antibiotik yang berasal dari tumbuhan (Sulvita, 2018).

Indonesia merupakan negara tropis dengan potensi tanaman yang secara turun temurun digunakan sebagai obat tradisional (Wijayanti and Safitri, 2018). Indonesia memiliki sumber alam hayati yang terdiri dari 2.848 spesies tumbuhan obat dengan 32.014 ramuan obat (Permenkes, 2017). Sekitar 30.000 jenis tumbuhan yang telah diidentifikasi dan 950 jenis diantaranya diketahui memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat, suplemen makanan, kosmetika, dan farmasi nutrisi (Rahmadani, 2015). Lebih kurang 180 jenis tumbuhan telah digunakan oleh industri di bidang obat tradisional (Rahmadani, 2015).

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut, yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat (Menkes, 2012). Salah satu faktor yang mendorong masyarakat menggunakan obat tradisional adalah faktor ekonomi masyarakat, dengan mahalnya harga obat sintesis maka masyarakat dengan ekonomi menengah kebawah lebih banyak yang memilih obat tradisional sebagai terapi penyembuhan (Sari, 2011). Selain murah dan mudah didapat obat tradisional yang berasal dari tumbuhan mempunyai efek samping yang relatif lebih rendah daripada obat-obatan kimia (Ilham, 2010). Masyarakat Indonesia sudah dari zaman dahulu menggunakan tumbuhan obat sebagai ramuan obat tradisional dengan upaya pemeliharaan kesehatan dan pencegahan penyakit (Permenkes, 2017). Salah satu penggunaan tumbuhan yang berkhasiat sebagai antibakteri adalah daun sirih merah (*Piper ornatum*) (Syafriana and Rusyita, 2017). Daun sirih merah mengandung senyawa kimia seperti flavonoid, tanin, dan minyak atsiri yang diduga berpotensi sebagai daya antimikroba (Beon and Batista, 2010).

Berdasar penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah dengan metode ekstraksi sokhletasi dan metode uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram, memberikan efek daya hambat pada bakteri *Propionibacterium acne*, dengan titik optimum zona hambat yang dihasilkan yaitu pada konsentrasi 25% dengan diameter zona hambat sebesar 10,90 mm (Syafriana and Rusyita, 2017). Penelitian lain ekstrak daun sirih merah secara maserasi terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan titik optimum diameter zona hambat 10,6

mm pada konsentrasi 15% (Astuti *et al.*, 2012). Penelitian daun sirih merah lain, dengan metode perasan air daun sirih merah pada bakteri *Escherichia coli*, titik optimum dihasilkan pada konsentrasi 40% dengan zona hambat 12,79 mm (Indriati *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti ingin melakukan uji terkait aktivitas antibakteri dengan metode fraksinasi karena dapat memisahkan komponen-komponen senyawa aktif dari ekstrak yang dihasilkan. Pelarut yang digunakan pada metode fraksi yaitu pelarut n-heksan, etil asetat, dan *aquadestilata* dari ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* secara *in vitro*, dengan antibiotik pembanding kloramfenikol. Kloramfenikol dipilih sebagai kontrol positif karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana aktivitas antibakteri fraksi *aquadestilata*, etil asetat, dan n-heksan ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*?
- 1.2.2 Fraksi manakah yang memiliki zona hambat paling kuat sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *aquadestilata*, etil asetat, dan n-heksan ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*.
- 1.3.2 Mengetahui fraksi mana yang memiliki zona hambat paling kuat sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.3.3 Bagi Peneliti

Memberikan pengetahuan kepada peneliti dalam bidang pengembangan obat tradisional dari tanaman sirih merah sebagai antibakteri

1.3.4 Bagi Instansi Kesehatan

Dapat menjadi bahan referensi untuk melakukan pengembangan obat-obatan yang berasal dari bahan alam.

1.3.5 Bagi Instansi Pendidikan

Memberikan data ilmiah kepada institusi tentang penelitian tanaman obat sehingga dapat dijadikan sebagai referensi untuk mahasiswa dalam pengembangan penelitian lebih lanjut.

1.3.6 Bagi Masyarakat

Dapat digunakan untuk memberikan informasi kepada masyarakat bahwa daun sirih merah dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Uraian Tanaman

2.1.1 Sirih Merah



Gambar 2. 1 Daun sirih merah

Tumbuhan sirih dikenal sebagai antiseptik sejak 600 SM. Sirih termasuk family *Piperaceae* yang merambat dan bersandar di batang pohon lain (Parfati and Windono, 2016). Salah satu jenis sirih adalah sirih merah. Sirih merah (*Piper ornatum*) merupakan jenis sirih yang merambat dan banyak tumbuh di daerah tropis khususnya Indonesia. Sirih jenis ini sebelumnya dikenal sebagai tanaman hias, kemudian berubah menjadi tanaman obat sejak diperkenalkan oleh produsen obat di Bulnyaherjo (Parfati and Windono, 2016).

2.1.2 Morfologi dan Klasifikasi

Tumbuhan merambat atau menjalar, panjangnya dapat mencapai sekitar 5 – 10 m, batang bulat, hijau merah keunguan, beruas dengan panjang ruas 3-8 cm. Daun tunggal, kaku, bentuk daun menjantung lonjong, permukaan helaian daun bagian atas rata - agak cembung, mengkilat, permukaan helaian daun bagian bawah mencekung dengan pertulangan daun yang menonjol, panjang daun 6,1 - 14,6 cm, lebar daun 4 - 9,4 cm, warna dasar daun hijau pada kedua permukaannya, bagian atas hijau dengan garis-garis merah jambu kemerahan, permukaan bagian bawah hijau merah tua keunguan. Tangkai daun hijau merah keunguan, panjang 2,1 - 6,2 cm, pangkal tangkai daun pada helaian daun agak ketengah sekitar 0,7 – 1 cm dari

tepi daun bagian bawah. Karakter morfologi daun sirih merah dengan nama ilmiah *P.crocatum* adalah mempunyai bentuk daun yang cukup bervariasi antara daun muda (fase muda) dan daun pada cabang yang akan menghasilkan alat reproduksi (fase dewasa). Saat muda umumnya mempunyai bentuk daun menjantung-membulat telur dan pada fase dewasa (siap menghasilkan alat reproduksi) terjadi perubahan bentuk daun dari membulat telur – melonjong (Astuti and Munawaroh, 2011).

Klasifikasi tanamana sirih merah :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper ornatum</i> L. (Parfati and Windono, 2016)

2.1.3 Khasiat

Sirih merah adalah salah satu tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat sebagai obat alternatif. Sirih merah dapat dimanfaatkan untuk mengobati diabetes militus, hepatitis, batu ginjal, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, asam urat, hipertensi, jantung koroner, kanker rahim, kanker payudara, ambeien, TBC, obat sakit gigi, sariawan, bau badan, penyakit kelamin, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, maag, kelelahan, nyeri sendi, memperhalus kulit, radang pada telinga, obat batuk, radang pada paru, radang pada tenggorok, radang pada gusi, radang pada payudara, hidung berdarah, dan batuk darah (Pratiwi and Suswati, 2012).

2.1.4 Kandungan Kimia

Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein *extraseluler* yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa fenol sementara senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Juliantina *et al.*, 2017). Flavonoid bekerja sebagai

antibakteri dengan beberapa mekanisme aksi, diantaranya menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi dari bakteri (Manik *et al.*, 2014). Pada pengujian fitokimia terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga dalam larutan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Moerfiah and Supomo, 2011).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut : toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa *adstringent* 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. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik. Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Juliantina *et al.*, 2017).

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang sangat mudah terdeteksi dengan kemampuannya saat membentuk busa. Bagian ikatan glikosida yang ditemukan didalam saponin menyebabkan senyawa ini bersifat polar (Baud *et al.*, 2014). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas atau kebocoran sel membran yang mengakibatkan dinding sel menjadi rusak, dan menurunkan tegangan permukaan dinding sel sehingga ketika terjadi interaksi dinding sel maka akan pecah dan membuat zat bakteri akan masuk ke dalam sel dengan mudah serta mengganggu metabolisme sampai akhirnya bakteri akan mati (Dwicahyani *et al.*, 2018). Selain itu senyawa saponin dapat menghambat sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan kerusakan pada komponen penyusun sel bakteri (Hasibuan, 2016).

2.2 Simplisa

2.2.1 Pengertian Simplisia

Simplisia atau herbal yaitu bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60 °C (Kementerian, 2011).

2.2.2 Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Yang dimaksud dengan eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya (Kementerian, 2011)

2.2.3 Simplisia Hewani

Simplisia hewani merupakan simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Contohnya adalah minyak ikan dan madu (Kementerian, 2011).

2.2.4 Simplisia Mineral

Simplisia mineral merupakan simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau yang telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni. Contohnya serbuk seng dan serbuk tembaga (Kementerian, 2011).

2.2.5 Tahap Pembuatan Simplisia

Menurut Damayanti (2012) Pada umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan seperti berikut :

2.2.5.1 Pengumpulan Bahan Baku

Daun yang dipilih yang telah membuka sempurna dan terletak di bagian cabang atau batang yang menerima sinar matahari sempurna. Menjaga tingkat kebersihan daun yang dipanen merupakan syarat mutlak yang harus dilakukan. Pemanenan sebaiknya dilakukan pada pagi atau sore hari. Penting untuk

memastikan tidak ada embun pada daun sebelum panen, terutama di pagi hari, agar daun tidak cepat membusuk selama proses transportasi.

2.2.5.2 Sortasi Basah

Sortasi basah adalah pemilihan hasil panen ketika tanaman masih segar (Damayanti, 2012). Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran- kotoran atau bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, akar yang telah rusak serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah yang mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi. Oleh karena itu pembersihan simplisia dan tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal.

2.2.5.3 Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada tumbuhan. Pencucian dilakukan sesingkat mungkin agar tidak menghilangkan zat berkhasiat dari tumbuhan tersebut.

2.2.5.4 Perajangan

Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajangan khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan.

2.2.5.5 Pengeringan

Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan dari proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan. Suhu yang terbaik pada pengeringan adalah tidak melebihi 60 °C. Terdapat dua cara pengeringan yaitu pengeringan alamiah (dengan sinar matahari langsung atau dengan diangin-anginkan) dan pengeringan buatan dengan menggunakan instrumen.

2.2.5.6 Sortasi Kering

Sortasi kering adalah pemilihan bahan setelah mengalami proses pengeringan. Pemilihan dilakukan terhadap bahan-bahan yang terlalu gosong atau bahan yang rusak. Sortasi setelah pengeringan merupakan tahap akhir pembuatan

simplisia. Tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan atau pengotor lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering .

2.2.5.7 Penyimpanan

Setelah tahap pengeringan dan sortasi kering selesai maka simplisia perlu ditempatkan dalam suatu wadah tersendiri agar tidak saling bercampur antara simplisia satu dengan lainnya. Untuk persyaratan wadah yang akan digunakan sebagai pembungkus simplisia adalah harus inert, artinya tidak bereaksi dengan bahan lain, tidak beracun, mampu melindungi bahan simplisia dari cemaran mikroba, kotoran, serangga, penguapan bahan aktif serta dari pengaruh cahaya, oksigen, dan uap air.

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sesuai kepolaritasannya sehingga terpisah dari bahannya, diketahuinya senyawa aktif yang terkandung pada simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut yang digunakan dan cara ekstraksi yang tepat (Mukhriani, 2014). Hasil dari ekstraksi disebut dengan ekstrak. Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Endarini, 2016).

2.3.2 Metode Ekstraksi

2.3.2.1 Ekstraksi Cara Dingin

Proses ekstraksi secara dingin pada prinsipnya tidak memerlukan pemanasan. Hal ini diperuntukkan untuk bahan alam yang mengandung komponen kimia yang tidak tahan pemanasan dan bahan alam yang mempunyai tekstur yang lunak. Berikut yang termasuk ekstraksi secara dingin :

2.3.2.1.1 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan melalui perendaman serbuk bahan dalam larutan pengeksrak. Metode ini digunakan untuk mengekstrak zat aktif yang mudah larut dalam cairan pengeksrak, tidak mengembang dalam pengeksrak, serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Putri, 2014). Lama maserasi memengaruhi kualitas ekstrak yang akan diteliti. Lama maserasi pada umumnya adalah 4-10 hari, maserasi akan lebih efektif jika dilakukan proses pengadukan secara berkala karena keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif, melalui usaha ini diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengeksrak (Pratiwi, 2010)

2.3.2.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Susanty, 2016).

2.3.2.2 Ekstraksi Cara Panas

2.3.2.2.1 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Anam *et al.*, 2014).

2.3.2.2.2 Sokhlet

Sokhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Hamad *et al.*, 2017).

2.3.2.2.3 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperature penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur 96-98°C selama waktu tertentu (Ulfah, 2016).

2.3.2.2.4 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Anam *et al.*, 2014).

2.3.3 Metode Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan atau suspensi yang mempunyai karakteristik berbeda. Fraksinasi dilakukan dengan metode cair-cair yang mana proses pemisahan didasarkan atas perbedaan distribusi komponen yang dipisahkan antara dua fase cair. Proses pemisahan tersebut dilakukan di dalam dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat terlarut dalam air maupun senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik. Fraksinasi dilakukan secara berkesinambungan dengan dimulai dari pelarut non polar, semi polar, dan pelarut polar. Akhir dari fraksinasi akan didapatkan fraksi yang mengandung senyawa yang secara berurutan dari senyawa non polar, semi polar, dan polar (Kandoliet *et al.*, 2016).

2.3.4 Pelarut

Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan suatu zat lain. Persyaratan pelarut yang baik untuk ekstraksi yaitu toksisitas dari pelarut yang rendah, mudah menguap pada suhu yang rendah, dapat mengekstraksi komponen senyawa dengan cepat, dapat mengawetkan dan tidak menyebabkan ekstrak terdisosiasi. Pemilihan pelarut juga akan tergantung pada senyawa yang diambil (Tiwari *et al.*, 2011). Pemilihan pelarut dipengaruhi oleh faktor jumlah senyawa yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman senyawa yang akan diekstraksi kemudahan dalam penanganan ekstrak untuk perlakuan berikutnya, potensial bahaya kesehatan dari pelarut (Tiwari *et al.*, 2011). Beberapa pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

2.3.4.1 *Aquadestilata*

Aquadestilata merupakan pelarut universal yang digunakan untuk mengekstraksi produk tumbuhan dengan aktivitas antimikroba. Air dapat melarutkan flavonoid yang tidak memiliki aktivitas signifikan terhadap antimikroba dan senyawa fenolat yang larut dalam air yang mempunyai aktivitas antioksidan (Tiwari *et al.*, 2011).

2.3.4.2 Etanol

Etanol (C_2H_5OH) memiliki nama lain yaitu etil alkohol, hidroksietana, alkohol murni, dan alkohol absolut. Etanol merupakan molekul yang sangat polar karena adanya gugus hidroksil (OH) dengan keelektronegatifan oksigen yang sangat tinggi yang menyebabkan terjadinya ikatan hidrogen dengan molekul lain, sehingga etanol dapat berikatan dengan molekul polar dan molekul ion. Gugus etil (C_2H_5) pada etanol bersifat non polar, sehingga etanol dapat berikatan juga dengan molekul non polar. Oleh karena itu, etanol dapat melarutkan baik senyawa polar maupun non polar. Etanol memiliki berat molekul 46,04 gr/mol, massa jenis 0,789 gr/cm³, titik didih 78,4 °C, viskositas pada 20 °C 1,200 cP, momen dipol sebesar 1,69 D (gas), konstanta dielektrik 24,3 pada 20 °C, dan tidak berwarna (Karimela *et al.*, 2017).

2.3.4.3 N-heksana

N-heksana adalah senyawa hidrokarbon alkana yang memiliki rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama n-heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$). N-heksana merupakan jenis pelarut nonpolar sehingga n-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa bersifat nonpolar dan volatil. N-heksana memiliki bau yang khas yang dapat menyebabkan pingsan apabila menghirupnya. Titik didih dari heksana pada tekanan 760 mmHg adalah sebesar 66-71 °C (Andhini, 2017).

2.3.4.4 Etil Asetat

Etil asetat merupakan larutan bening, tidak berwarna, berbau khas, zat berupa larutan polar yang volatil, dan toksisitas rendah. Etil asetat mempunyai rumus molekul $C_4H_8O_2$ (DepKes RI, 1979). Larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dengan etanol 95%, dan eter. Dalam pembuatan etil asetat biasanya dilakukan dengan proses esterifikasi. Etil asetat pelarut dengan karakteristik semi

polar. Etil asetat mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup baik dan terhindar dari sinar matahari. Senyawa yang larut dalam pelarut ini yaitu senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antrakuinon, dan xantan. (Andhini, 2017)

2.4 Bakteri

2.4.1 Definsi Bakteri

Bakteri adalah salah satu golongan organisme prokariotik (tidak memiliki selubung inti). Bakteri sebagai makhluk hidup tentu memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. Bentuk DNA bakteri adalah sirkuler. Pada DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas akson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Irianto, 2014).

Bakteri merupakan organisme yang paling banyak jumlahnya dan tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lainnya. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di gurun pasir, salju atau es, hingga lautan. Bakteri yang keberadaannya banyak sekali ini, memungkinkan untuk menjadi salah satu penyebab penyakit pada manusia (Radji, 2011).

2.4.2 Penggolongan Bakteri

Menurut klasifikasinya bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Pada pewarnaan gram, golongan bakteri gram positif akan memberikan warna ungu karena memiliki lapisan peptidoglikan setebal 20-80 nm sedangkan bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis yaitu 5-10 nm sehingga berwarna agak merah (Holderman *et al.* 2017).

2.5 *Escherichia coli*

2.5.1 Morfologi dan Klasifikasi



Gambar 2. 2 *Escherichia coli* (Brooks, 2013)

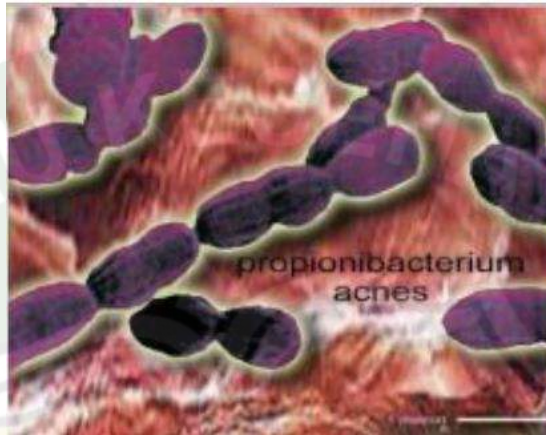
Escherichia coli berbentuk batang pendek (kokobasil), bersifat gram negatif, berukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm . Bakteri ini tidak membentuk spora, tidak tahan terhadap suasana asam, tidak sensitif terhadap panas, dan sebagian besar bergerak menggunakan flagel peritrikus (merata tersebar ke seluruh permukaan sel) namun ada pula yang nonmotil, dan beberapa strain mempunyai kapsul. Cara tumbuh bakteri ini adalah anaerob fakultatif atau umumnya bersifat kemoheterotof Nilai pH yang digunakan untuk pertumbuhannya adalah 7,0-7,5 dan suhu pertumbuhannya 10⁰C-40⁰C dengan suhu optimum 37⁰C (Maradona, 2013).

Menurut Adriana (2017) bakteri *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut :

<i>Domain</i>	: <i>Bacteria</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Proteobacteria</i>
<i>Class</i>	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
<i>Orde</i>	: <i>Enterobakteriales</i>
<i>Family</i>	: <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Eschericia</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Eschericia Coli</i>

2.6 *Propionibacterium acnes*

2.6.1 Morfologi dan Klasifikasi



Gambar 2. 3 *Propionibacterium acnes* (Saputra, 2019)

Propionibacterium acnes merupakan bakteri flora normal pada kulit, biasanya bakteri ini terdapat pada folikel sabasea. *Propionibacterium acnes* termasuk bakteri gram positif, pleomorfik, dan bersifat anaerob aerotoleran. *Propionibacterium acnes* memiliki lebar 0,5-0,8 μm dan panjang 3-4 μm , bakteri ini berbentuk batang dengan ujung meruncing atau kokoid (bulat) (Damayanti, 2014). *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri penyebab jerawat. Jerawat merupakan penyakit kulit yang dapat terjadi karena penyumbatan pada pilosebaceus dan peradangan pada kulit (Riawenni, 2017).

Menurut Damayanti (2014) bakteri *Propionibacterium acnes* diklasifikasikan sebagai berikut

Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Actinobacteria*
Class : *Actinomycetales*
Orde : *Propionibacterineae*
Family : *Propionibacteriaceae*
Genus : *Propionibacterium*
Spesies : *Propionibacterium acnes*.

2.7 Antibakteri

2.7.1 Pengertian Antibakteri

Antibakteri adalah obat pembasmi bakteri khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan ada yang bersifat membunuh bakteri. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Hasibuan, 2016). Bakteriostatik yaitu antibakteri yang hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bakterisidal adalah antibakteri yang dapat membunuh mikroorganisme (Rahmadani, 2015).

2.7.2 Mekanisme Kerja Antibakteri

2.7.2.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel

Membran sel bertindak sebagai penghalang selektif, memungkinkan beberapa zat terlarut untuk melewati dan tidak termasuk yang lain. Banyak senyawa secara aktif diangkut melalui membran menjadi terkonsentrasi di dalam sel (Brooks *et al.*, 2013).

2.7.2.2 Menghambat Sintesis Protein

Protein ada dalam keadaan tiga dimensi terlipat terutama oleh interaksi nonkovalen intramolekuler seperti ikatan ionik, hidrofobik, dan hidrogen atau kovalen hubungan disulfida. Keadaan ini disebut struktur tersier protein; itu mudah terganggu oleh sejumlah fisik (misalnya, panas) atau agen kimia (misalnya alkohol), menyebabkan protein tersebut menjadi tidak berfungsi. Gangguan struktur tersier protein disebut denaturasi protein (Brooks *et al.*, 2013).

2.7.2.3 Menghambat Fungsi DNA

Sejumlah agen fisik dan kimia bertindak dengan cara merusak DNA termasuk radiasi pengion, sinar ultraviolet, dan bahan kimia reaktif DNA. Di antara kategori terakhir adalah zat alkilasi dan senyawa lainnya yang bereaksi secara kovalen dengan pangkal purin dan pirimidin membentuk aduk DNA atau

interstrand cross-link. Lesi DNA yang diinduksi radiasi dan diinduksi secara kimia membunuh sel terutama dengan mengganggu replikasi DNA (Brooks *et al.*,2013).

2.7.2.4 Menghambat *Tetrahydrofolic Acid*

Tetrahydrofolic acid (THF) adalah *co-enzyme* dalam sintesis dasar purin dan timidin yang merupakan penyusun DNA dan RNA dan diperlukan untuk pertumbuhan sel dan replikasi. Kurangnya THF menyebabkan penghambatan proliferasi sel. Pembentukan THF dari *dihydrofolate* (DHF) dikatalisis oleh enzim *dihydrofolate reduktase*. Antibiotik golongan ini contohnya adalah trimetropim, sulfonamid dan kotrimoksazol (Brooks *et al.*,2013).

2.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan untuk mengetahui aktivitas suatu bakteri terhadap antibakteri secara *in vitro*. Pengujian ini dapat dilakukan dengan dua metode yakni metode penyebaran (*Diffusion method*) dengan menggunakan cakram kertas dan metode pengenceran (*Dillution method*). Macam-macam metode uji aktivitas antibakteri antara lain: metode pengenceran, difusi agar, metode dilusi (Hasibuan, 2016).

2.8.1 Metode Difusi

2.8.1.1 Metode *disk diffusion*

Prinsip metode *disk diffusion* (tes Kirby & Baur) adalah mengukur zona hambatan pertumbuhan bakteri yang terjadi akibat difusi zat yang bersifat antibakteri di dalam media padat melalui pencadang. Daerah hambatan pertumbuhan bakteri adalah daerah jernih disekitar cakram. Luas daerah hambatan berbanding lurus dengan aktivitas antibakterinya maka semakin luas daerah hambatnya (Suryaku, 2017). Metode ini dilakukan dengan menanamkan bakteri pada media agar padat tertentu kemudian diletakkan pada *disk* yang sudah mengandung obat kemudian dilihat hasilnya. Diameter zona bening disekitar diukur sebagai kekuatan inhibisi obat melawan bakteri yang diuji (Hasibuan, 2016).

Tabel 2. 1 Kategori respon hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan diameter zona hambat (Hasibuan, 2016)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan
≥ 21 mm	Sangat Kuat
11-20mm	Kuat
6-10mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

2.8.1.2 Metode *E-test*

Metode *E-test* digunakan untuk mengestimasi Kadar Hambat Minimum (KHM), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antibakteri untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antibakteri dari kadar terendah sampai tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme sebelumnya. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan yang menunjukkan kadar agen antibakteri yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar (Sariadji and Sembiring, 2019).

2.8.1.3 *Ditch-plate technique*.

Pada metode ini sampel uji berupa agen antibakteri yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan bakteri uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antibakteri tersebut (Sariadji and Sembiring, 2019).

2.8.1.4 *Cup-plate technique*

Metode ini serupa dengan *disk diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antibakteri yang akan diuji (Sariadji and Sembiring, 2019).

2.8.2 Metode Dilusi

2.8.2.1 Metode dilusi cair / *broth dilution test (serial diution)*

Prinsip metode dilusi (pengenceran) adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-

masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC). Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun senyawa antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai Kadar Bunuh Minimal (KBM) atau *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC) (Pratiwi, 2019). Konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh 99,9 % pertumbuhan bakteri dikenal sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Damayanti, 2014).

2.8.2.2 Metode dilusi padat (*solid dilution test*)

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antibakteri yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Damayanti, 2014).

2.9 Antibakteri Pemanding

Antibiotik yang digunakan adalah Kloramfenikol. Kloramfenikol merupakan suatu golongan antibiotika dengan spektrum kerja yang luas. Antibiotik ini berkhasiat sebagai bakteriostatik terhadap hampir semua bakteri Gram positif dan sejumlah bakteri Gram negatif (Tjay, 2015). Mekanisme kerja kloramfenikol sebagai antibakteri yaitu mengubah proses denaturasi protein dan asam nukleat pada bakteri sehingga dapat merusak sel bakteri (Ganiswara, 2012). Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena kloramfenikol memiliki mekanisme kerja yang sama dengan senyawa yang terkandung dalam daun sirih merah yaitu senyawa flavonoid. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu menghambat sintesis asam nukleat yang menyebabkan penghambatan pembentukan DNA dan RNA serta merusak membran sel bakteri (Rijayanti *et al.*, 2014)

Karakteristik kloramfenikol menurut Farmakope Indonesia edisi kelima halaman 684-685 adalah sebagai berikut (Kementerian Kesehatan RI, 2014):

Rumus Kimia : $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Nama umum : Kloramfenikol

Nama lain : *Chloramphenicol, Chloramphenicolum*

Nama Kimia : *D-treo-(-)-2,2-Dikloro-N-[β -hidroksi- α -(hidroksimetil)-p nitrofenetil]asetamida*

BM : 323,13

Suhu lebur : antara 149°C dan 153°C

pH : antara 4,5 dan 7,5

Pemerian : Hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan, larutan praktis netral terhadap lakmus P, dan stabil dalam larutan netral atau larutan agak asam.

Kelarutan : Sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, dalam propilen glikol, dalam aseton, dan dalam etil asetat.

Persyaratan : Kapsul kloramfenikol mengandung kloramfenikol tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat dan disimpan ditempat sejuk dan kering.

2.10 Hipotesis

2.10.1 Fraksi *aquadestilata*, n-heksan, dan etil asetat daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium* dengan kategori sedang, dengan senya aktif flavonoid (FHI, 2017).

2.10.2 Fraksi daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium* dengan urutan zona hambat dari yang paling kuat yaitu fraksi *aquadestilata*, n-heksan, dan etil asetat.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah, bakteri uji *Escherichia coli* dan *Propioni bacterium acnesi*, etanol 70% (*onemed*), *aquadestilata*, n-heksan, etil asetat, kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), asam sulfat (H_2SO_4), HCl, $FeCl_3$, *Natrium Agar*, *Nutrient Borth*, NaCl, dan kloramfenikol 0.1%.

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu seperangkat alat gelas (*pyrex*), autoklaf (*gea*), cawan petri (*pyrex*), oven, *cutton bud steril* (*onemed*), pinset, mikropipet, tip, lampu spiritus, kapas steril, *hot plate*, lemari pendingin, inkubator, dan cakram kosong (*oxid*).

3.2 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun sirih merah sebanyak 1 kg yang diperoleh dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel kontrol. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi pelarut *aquadestilata*, etil asetat, dan n-heksan fraksi daun sirih merah.

3.4.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol atau terkendali adalah variabel yang dibuat konstan atau dikendalikan sehingga hubungan variabel terikat terhadap variabel bebas tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*.

3.4.3 Variable Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang menjadi akibat atau yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Escherichia coli*.

3.5 Cara Penelitian

3.5.1 Determinasi

Sampel tanaman daun sirih merah diidentifikasi di UPT Materia Medica Batu, Jawa Timur. Tujuan dari determinasi adalah untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian (Saputri and Susiani, 2018).

3.5.2 Pembuatan Simplisia

Tanaman sirih merah diambil daun yang sudah cukup tua minimal berusia 1 bulan dari tanaman yang sudah berusia minimal 4 bulan. Warna daun terlihat dengan warna merah hati yang cerah (Juliantina *et al.*, 2018). Pencucian dilakukan dengan air bersih yang berasal dari sumur atau air mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotoran lainnya yang melekat pada daun sirih merah. Pengeringan daun sirih merah dilakukan dengan cara diangin anginkan pada suhu ruang (Wahyuni *et al.*, 2014). Tahap berikutnya menghaluskan simplisia yang telah kering menggunakan blender sehingga memperoleh serbuk halus daun sirih merah. Selanjutnya yaitu proses pengayakan, pengayakan digunakan untuk memudahkan proses ekstraksi dimana semakin kecil ukuran serbuk, maka serbuk yang diperoleh akan semakin halus sehingga semakin besar luas permukaan serbuk yang akan mengalami kontak dengan pelarut sehingga pelarut akan semakin mudah menarik

senyawa aktif yang terkandung, begitu juga sebaliknya apabila semakin besar ukuran serbuk, sehingga permukaan yang mengalami kontak dengan pelarut akan semakin kecil jadi senyawa aktif di dalam sel yang tertarik akan sedikit (Ayu, 2021). Penyimpanan simplisia dalam wadah tertutup baik, menyimpan pada suhu kamar, pada tempat yang kering, dan terlindung dari sinar matahari (Ayu, 2021).

3.5.3 Uji Kadar Air Serbuk Simplisia

Uji kadar air serbuk simplisia dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 10 g serbuk daun sirih merah dengan wadah yang sudah ditara, kemudian simplisia dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam. Tujuan dari penetapan kadar air adalah untuk mengetahui batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam simplisia. Hal ini terkait dengan kemurnian dan adanya kontaminan dalam simplisia tersebut (Depkes RI, 2014).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\% \text{ (Depkes RI, 2014)}$$

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia daun sirih merah sebanyak 500 g. Perbandingan antara bahan dengan pelarut dalam maserasi yaitu 1 : 7,5 (Ramadhan *et al.*, 2019). Serbuk simplisia yang telah ditimbang kemudian dilakukan proses maserasi dengan cara memasukkan serbuk simplisia ke dalam botol maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml, selanjutnya dilakukan proses pengadukan sampai homogen. Rendaman disimpan dalam bejana maserasi pada ruangan yang terlindung dari sinar matahari secara langsung selama 5 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan selama 15 menit setiap hari. Filtrat kemudian disaring menggunakan kain saring rangkap dua, residu yang diperoleh selanjutnya diremaserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 3.750 ml. Remaserasi disimpan selama 5 hari dan diaduk selama 15 menit setiap harinya. Memisahkan kembali filtrat dengan kain rangkap dua dan melanjutkan penyaringan dengan kertas saring (Susanty, 2016). Filtrat hasil saringan digabungkan lalu melakukan penguapan menggunakan oven pada suhu 50°C untuk menghasilkan ekstrak.

Pemekatan menggunakan suhu 50°C karena suhu tersebut dapat mencegah terjadinya kerusakan senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid dan tanin (Susanty, 2016)

3.5.5 Rendemen Ekstrak

Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Rendemen ekstrak daun sirih merah dihitung dengan membandingkan bobot awal simplisia dengan bobot akhir yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan membuktikan bahwa nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Syamsul *et al.*, 2020).

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

3.5.6 Uji Bebas Etanol

Uji Bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa kontaminasi, selain itu etanol juga bersifat antibakteri, sehingga uji bebas etanol dapat mencegah terjadinya positif palsu pada uji antibakteri (Kurniawati, 2015). Uji bebas etanol ekstrak dilakukan dengan memasukkan sejumlah ekstrak kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) dan 1 ml asam sulfat pekat (H_2SO_4). Larutan yang tidak mengandung etanol atau bebas etanol maka akan terbentuk warna campuran dari larutan ekstrak dan larutan kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) yang ditambahkan asam sulfat (H_2SO_4), tetapi jika larutan mengandung etanol maka akan terbentuk warna biru (Ikhsanudin and Mardhiyah, 2017)

3.5.7 Skrining Fitokimia

3.5.7.1 Identifikasi Flavonoid

Ekstrak daun sirih merah diambil sebanyak 0,5 gr dicampur dengan 3 ml etanol 70%, lalu dikocok, dipanaskan dan dikocok lagi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh, kemudian ditambah Mg 0,1 g dan 5 tetes HCl pekat. Sampel positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah

(Nafisah *et al.*, 2014). Perubahan warna yang terjadi disebabkan dengan adanya reduksi dalam flavonoid oleh Mg dan HCl (Fajriaty *et al.*, 2018).

3.5.7.2 Identifikasi Tanin

Ekstrak daun sirih merah diambil 2 gr sampel dilarutkan dengan etanol 70% sampai terendam semua, kemudian diambil 1 ml larutan sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif mengandung tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Fajriaty *et al.*, 2018). Terbentuknya warna ini disebabkan karena setelah penambahan FeCl₃, tanin akan bereaksi dengan ion Fe³⁺ membentuk senyawa kompleks. (Afifah, 2020).

3.5.7.3 Identifikasi Saponin

Mengambil ekstrak daun sirih merah sebanyak 0,5 g, lalu mendidihkan dan mencampur dengan 10 ml *aquadestilata* dalam penangas air, mengocok filtrat dan mendinginkan selama 15 menit, hasil positif menunjukkan adanya senyawa saponin yaitu pada terbentuknya busa yang stabil (Fajriaty *et al.*, 2018). Terbentuk suatu busa karena adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain (Hartati *et al.*, 2019).

3.5.8 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper ornatum*) Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS

Uji kadar senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum*) dilakukan dengan cara pembuatan larutan standar flavonoid terlebih dahulu yang kemudian dilanjutkan preparasi sampel dan penentuan kadar (Rajendra, 2014). Tahapan pembuatan larutan standar yaitu dengan membuat larutan induk *quercetin* 100 ppm dengan cara 10 mg *quercetin* dilarutkan dengan *aquadestilata* sampai 100 ml yang kemudian membuat seri 20, 30, 40 dan 50 ppm, dengan cara memipet larutan sebanyak 0,2 : 0,3 : 0,4 dan 0,5 mL, dilarutkan dalam labu takar 10 mL (Rajendra, 2014). Tahap selanjutnya yaitu penentuan kadar flavonoid. Timbang ekstrak sebanyak 1 g kemudian larutkan dalam labu takar 100 mL menggunakan *aquadest* hingga batas. Larutan induk 100 ppm diambil sebanyak 0,5 mL ditambahkan 0,5 mL AlCl₃ 2% dan 2,5 mL aquades,

kemudian dimasukkan dalam kuvet. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 425nm yang kemudian dihitung menggunakan persamaan linier $y = a(x) + b$ (Rajendra, 2014).

3.5.9 Fraksinasi

Ditimbang ekstrak daun sirih merah sebanyak 5 gram, dilarutkan menggunakan 75 ml *aquadestilata*. Larutan sampel dimasukkan dalam corong pisah, ditambah dengan pelarut n-heksan 25 ml di ulang sebanyak 3 kali sebagai pelarut non-polar, kemudian digojog hingga tampak terjadi seperti pemisahan, masing-masing ditampung di beaker glass. Fraksi *aquadestilata* difraksinasi dengan etil asetat 25 ml di ulang sebanyak 3 kali sebagai pelarut semi polar. Fraksi yang diperoleh dipekatkan sampai didapat fraksi yang kental.

3.5.10 Pembuatan Media

3.5.10.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi dilakukan dalam wadah yang sesuai, seperti erlenmeyer dengan mulut ditutup kapas dan dibungkus aluminium foil. Sterilisasi dilakukan untuk menghilangkan jenis organisme hidup yang terdapat pada suatu benda (Handayani *et al.*, 2020).

3.5.10.2 Nutrien Agar (NA)

Ditimbang serbuk media agar NA sebanyak 0,2 gram. Dimasukan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan aquades sebanyak 10ml. Dipanaskan di atas api sampai serbuk agar benar-benar larut. Selanjutnya media agar disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media agar siap dituangkan pada cawan petri (Kabense *et al.*, 2019).

3.5.10.3 Nutrient Broth

Serbuk NB sebanyak 0,08 g dilarutkan dalam 10 ml *aquadestilata*, kemudian dipanaskan sampai mendidih sehingga semuanya larut. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 15 psi. Media NB digunakan untuk pembuatan suspensi (Mierza, 2020).

3.5.11 Pembuatan Larutan Kontrol

3.5.11.1 Larutan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pelarut pada masing-masing fraksi yaitu *aquadestilata*, n-heksana, dan etil asetat..

3.5.11.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat dari kapsul kloramfenikol 250 mg. Pembuatan dimulai dengan menimbang serbuk kloramfenikol sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 10 ml masing-masing pelarut fraksi sehingga didapatkan hasil 100 mg/ml. Dari larutan 100 mg/ml diambil 1 ml kemudian ditambahkan 10 ml masing-masing pelarut fraksi hingga didapatkan konsentrasi 10 mg/ml. Dari konsentrasi 10 mg/ml diambil 1 ml ditambahkan masing-masing pelarut fraksi hingga hingga 10 ml sehingga didapatkan larutan 1mg/ml (Sari *et al.*, 2020).

3.5.12 Pembuatan Larutan Uji

3.5.12.1 Pembuatan Larutan Uji Orientasi Ekstrak Daun Sirih Merah

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan ekstrak daun sirih merah dengan seri konsentrasi 1%, 3%, dan 5%. Ekstrak daun sirih merah diencerkan menggunakan pelarut etanol 70%. Konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 10 ml pelarut, konsentrasi 3% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,3 gram dilarutkan dalam 10 ml pelarut, dan konsentrasi 1% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml pelarut.

3.5.12.2 Pembuatan Larutan Uji Fraksi Daun Sirih Merah

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan fraksi daun sirih merah dengan seri konsentrasi 5%. Fraksi daun sirih merah diencerkan menggunakan fraksi n-heksan, etil asetat, dan aquadestilata dengan volume masing-masing 1 ml. Konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 0,05 gram dilarutkan dalam 1 ml pelarut.

3.5.13 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan tujuan untuk melakukan perawatan terhadap bakteri agar tetap dalam kondisi yang baik. Peremajaan bakteri dilakukan

menggunakan media agar miring NA, menanam bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* pada masing-masing media dengan cara menggoreskan menggunakan ose jarum. Media yang telah ditanami bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37-38° C selama 24 jam.

3.5.14 I Identifikasi Bakteri *E. Coli* dan *P. Acnes*

3.5.14.1 Uji Pewarnaan Gram

Preparat apus bakteri dibuat dengan cara, mencampurkan satu Ose biak bakteri dengan NaCl fisiologis yang telah ditetaskan pada gelas obyek, kemudian dibuat apus setipis mungkin, dikeringkan, dan difiksasi di atas lampu spiritus. Preparat apus ditetesi pewarna pertama dengan karbol Kristal violet selama 2 menit, dibilas dengan sedikit air mengalir, ditambah cairan *mordant* ditunggu selama 1 menit, kemudian preparat apus dilunturkan dengan alkohol 95% selama 1 menit. Selanjutnya alkohol dibuang, preparat dicuci dengan *aquadestilata* dan diberi safranin dan didiamkan selama 30 detik, preparat dibersihkan dengan *aquadestilata*, dikeringkan dan diamati morfologi sel, serta warnanya di bawah mikroskop (Dewi, 2013). Pada kelompok bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna ungu kristal dan tampak berwarna ungu, warna ungu disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama yaitu gentian violet. Sedangkan pada kelompok bakteri gram negatif akan terjadi kehilangan warna ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol, dan akan tampak berwarna merah (Nasirudin, 2018).

3.5.15 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri yaitu dengan mengambil biakan bakteri menggunakan ose steril, mensuspensikan pada tabung yang berisi 5 ml *Nutrient Broth* (NB) dan menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah menjadi suspensi, lalu diencerkan dengan larutan garam (NaCl 0,9%) steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan standar Mc. Farland 0,5 (biakan cair yang memiliki populasi 1×10^7 CFU/ml sampai 1×10^8 CFU/ml) (Kursia *et al.*, 2016).

3.5.16 Uji Aktivitas Antibakteri

3.5.16.1 Metode Difusi Cakram

Pada prosedur aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Pengujiannya dengan menyiapkan media yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Fraksi *aquadestilata*, n-heksan, dan etil asetat daun sirih merah dengan konsentrasi 5%. ditambahkan pada masing-masing kertas cakram steril dengan jumlah 20 μ L menggunakan mikro pipet. Kertas cakram steril yang sudah diresapi dengan fraksi daun sirih merah diletakkan pada permukaan media yang sudah ditanam bakteri dengan pinset steril dan ditekan perlahan kebawah untuk memastikan kontak antara kertas cakram dengan permukaan media. Kontrol positif digunakan adalah kloramfenikol 0.1% sedangkan pada kontrol negatif dengan menggunakan masing-masing pelarut fraksi. Cawan petri kemudian dilakukan proses inkubasi dengan waktu 24 jam pada suhu 37°C. Diamati dan diukur diameter zona hambatnya (Syafriana and Rusyita, 2017).

3.5.17 Pengukuran Zona Hambat

Pengukuran zona hambat yang terbentuk diukur diameternya menggunakan alat ukur yaitu mistar berskala dan diperoleh diameter (mm) daerah hambat pertumbuhan bakteri termasuk pada diameter kertas cakram. Dilakukan pengukuran dengan pengulangan 3 kali dari daerah yang berbeda untuk menunjukkan hasil yang akurat (Farida *et al.*, 2013)

3.6 Analisis Data

3.6.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas data merupakan uji yang digunakan untuk mengukur apakah data yang digunakan mempunyai distribusi yang normal, sehingga dapat digunakan dalam statistik parametrik. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* sebagai uji normalitas data.

Perumusan hipotesis :

H_0 : Data berdistribusi normal

H_1 : Data berdistribusi tidak normal

Pengambilan keputusan

- a. Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
- b. Jika $p \leq 0,05$; maka H_1 diterima.

3.6.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk menguji kesamaan (homogenitas) beberapa sampel, yakni seragam tidaknya variasi sampel – sampel yang diambil dari populasi yang sama (Ghazali, 2011). Pengujian homogenitas dilakukan dengan menggunakan *levene statistic*.

Perumusan hipotesis :

H_0 : data yang didapat memiliki variansi yang sama atau homogen.

H_1 : data yang didapat memiliki variansi yang tidak sama atau tidak homogen.

Pengambilan keputusan:

- a. Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
- b. Jika $p \leq 0,05$; maka H_1 diterima

3.6.3 Uji *Kruskal-Wallis*

Uji *Kruskal-Wallis* merupakan sebuah uji yang bertujuan untuk menentukan adanya perbedaan yang signifikan antara dua atau lebih kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* (Febrianasari, 2018). Perumusan hipotesis:

H_0 : Tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*.

H_1 : Ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*.

Pengambilan keputusan:

1. Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
2. Jika $p < 0,05$; maka H_1 diterima

3.6.4 Uji *Mann-Whitney*

Uji *Mann-Whitney* digunakan bertujuan untuk menguji signifikansi hipotesis antar dua sampel (Sriwidadi, 2011). Perumusan hipotesis:

H₀: tidak ada perbedaan bermakna

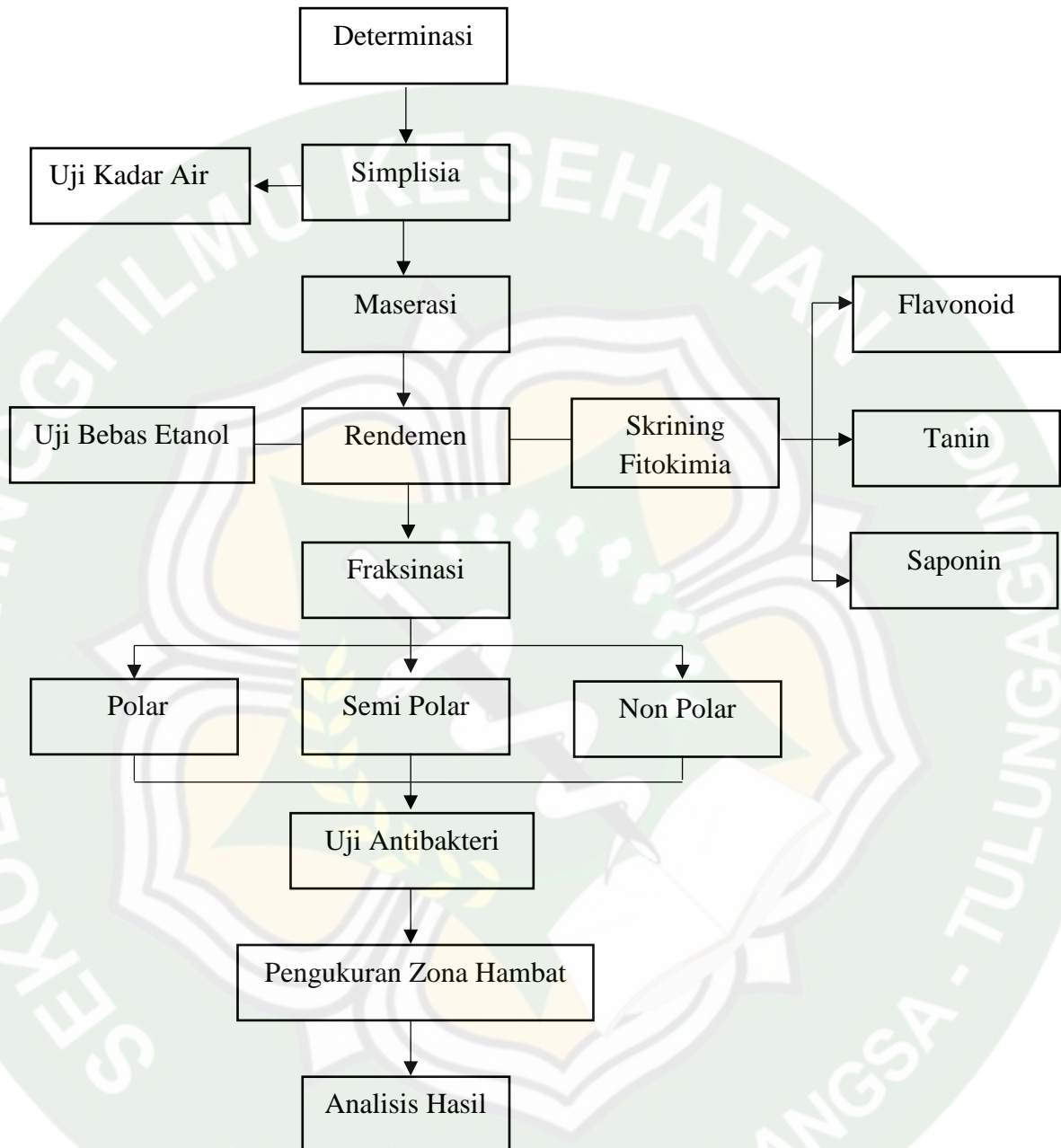
H₁: ada perbedaan bermakna

Pengambilan keputusan:

1. Jika $p > 0,05$; maka H₀ diterima.
2. Jika $p < 0,05$; maka H₁ diterima.



3.7 Kerangka Penelitian



Gambar 3. 1 Skema Penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian (Saputri and Susiani, 2018). Tanaman yang digunakan yaitu tanaman sirih merah yang telah diidentifikasi di UPT Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*), memiliki kunci determinasi sebagai berikut 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a-41b-42b-43b-54b-59b-61-62b-63a-64a, dan kesamaan morfologi daun yang dipakai dengan hasil determinasi yaitu daun tunggal, ujung meruncing, bulat panjang, pangkal bentuk jantung, tepi rata panjang 5-8cm, lebar 2-5cm, bertangkai permukaan halus, warna bagian bawahnya merah mengkilap. Hasil ini menunjukkan bahwa daun yang dipakai benar daun sirih merah. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Uji Kadar Air Serbuk Simplisia

Pengujian kadar air serbuk simplisia ialah suatu parameter untuk menentukan residu air setelah melalui proses pengeringan (Utami *et al.*, 2017). Suatu kadar air pada serbuk simplisia mempunyai persyaratan yaitu kurang dari 10% (Depkes RI, 2014).

Tabel 4. 1 Hasil Uji Kadar Air Serbuk Simplisia Daun Sirih Merah

Sampel	Bobot Awal	Bobot Akhir	Hasil
Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum Ruiz & Pav.</i>)	10 g	9,13 g	8,7%

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\% \text{ (Depkes RI, 2014)}$$

Hasil uji kadar air serbuk simplisia daun sirih merah sebesar 8,7% yang berarti <10%. Hasil ini menunjukkan bahwa simplisia yang telah digunakan sudah memenuhi persyaratan uji kadar air yang ditetapkan. Jika kadar air dalam simplisia

lebih dari 10% hal ini akan mempercepat pertumbuhan mikroorganisme sehingga terjadi pembusukan, dimana air merupakan salah satu media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme sehingga dapat mengakibatkan turunnya kualitas simplisia (Sugiarti and Setyawati, 2017).

4.3 Ekstraksi Daun Sirih Merah

Proses ekstraksi bertujuan untuk menarik semua zat aktif dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia (Susanty, 2016). Pada ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode dengan cara dingin yaitu metode maserasi dan dilanjutkan dengan remaserasi, tujuan dari teknik kombinasi ini untuk pengoptimalan penyarian senyawa metabolit sekunder yang ada pada simplisia daun sirih merah. Metode maserasi dipilih karena mempunyai prosedur dan alat yang sederhana dan tidak menggunakan pemanasan jadi bahan alamnya menjadi tidak terurai (Pratiwi, 2012).

Proses ekstraksi ini menggunakan pelarut etanol 70%, karena efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal karena mengandung komponen air yang lebih banyak dibandingkan etanol 96% (Ramadhan *et al.*, 2019). Kemudian dilakukan proses pemekatan dan perhitungan persentase rendemen untuk mengetahui perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan bahan yang diekstrak (Dwicahyani *et al.*, 2018). Hasil persentase rendemen ekstrak daun sirih merah dapat dilihat pada Tabel 4.2.

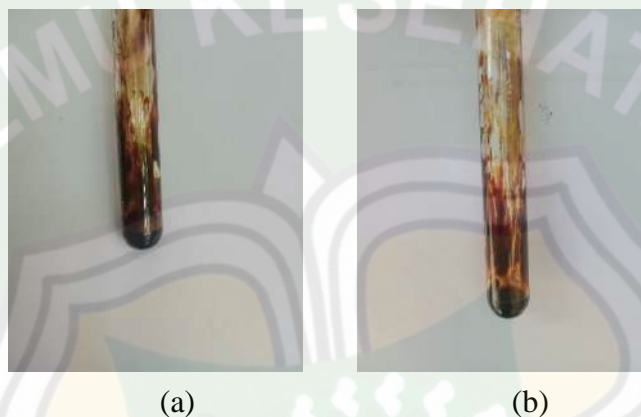
Tabel 4. 2 Hasil rendemen ekstrak daun sirih merah

Sampel	Bobot Simplisia	Bobot Ekstrak	Hasil
Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> <i>Ruiz & Pav.</i>)	500 g	83.5 g	16.7%

Berdasarkan Tabel 4.2 nilai rendemen ekstrak daun sirih merah pada penelitian ini sebesar 16.7%. Berdasarkan FHI (2017) nilai rendemen ekstrak daun sisrih merah tidak kurang dari 17%. Hasil ini menunjukkan bahwa rendemen ekstak pada penelitian ini tidak memenuhi standart, hal ini disebabkan karena *human error*, yaitu terjadi tumpah pada saat penyaringan.

4.4 Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak yang dihasilkan terbebas dari etanol, karena pelarut tersebut dapat membunuh bakteri sehingga dikhawatirkan mempengaruhi hasil aktivitas antibakterinya (Sumiati, 2014).



Gambar 4. 1 Uji bebas etanol. (a) Sebelum ; (b) Sesudah.

Tabel 4. 3 Hasil Uji Bebas Etanol Daun Sirih Merah

Sampel	Pereaksi	Perubahan Warna	Hasil
Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> <i>Ruiz & Pav.</i>)	Asam sulfat + Kalium dikromat	Tidak terbentuk warna jingga, hijau kebiruan	+

Keterangan: (+) bebas etanol dan (-) tidak bebas etanol

Hasil uji bebas etanol pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih meah sudah bebas dari etanol. Perlakuan uji bebas etanol dilakukan dengan menambahkan asam sulfat pekat ke dalam ekstrak dengan tujuan membuat kondisi menjadi asam dengan kalium dikromat yang awalnya berwarna jingga, setelah bereaksi, larutan yang mengandung etanol akan berubah menjadi warna hijau kebiruan dikarenakan ion dikromat yang berwarna jingga telah tereduksi menjadi ion kromium yang berwarna hijau (Ramadhan *et al.*, 2019). Dari hasil uji yang diperoleh bahwa tidak adanya perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan, tetapi ekstrak berwarna hitam kecoklatan sehingga dapat dinyatakan bahwa ekstrak daun sirih merah telah bebas dari etanol.

4.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sirih Merah

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam daun sampel, serta dapat menjadi perlakuan secara kualitatif (Indarto *et al.*, 2019). Hasil penelitian Syafriana and Rusyita, (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid. Terdapat tiga senyawa yang diidentifikasi pada penelitian ekstrak daun sirih merah ini yaitu flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun sirih merah dapat dilihat pada Tabel 4.4.

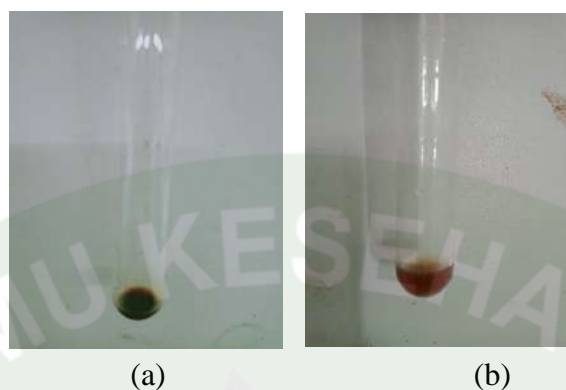
Tabel 4. 4 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun sirih merah

Golongan Senyawa	Pereaksi	Perubahan Warna	Hasil
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Merah kecoklatan	+
Saponin	Ekstrak + <i>Aquadestilata</i>	Busa stabil	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	Hitam kebiruan	+

Keterangan: (+) terdapat senyawa dan (-) tidak terdapat senyawa

4.5.1 Uji Flavonoid

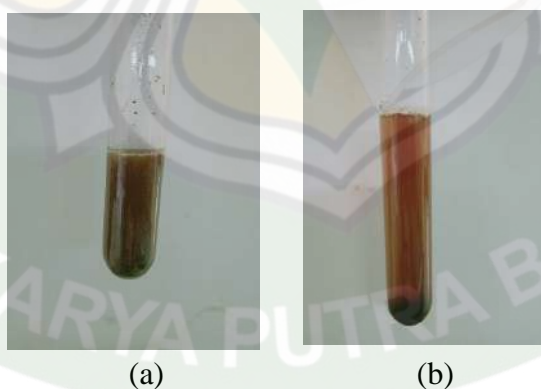
Uji flavonoid dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sirih merah. Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi *wilstater* yang dilakukan dengan menambahkan Mg dan HCl pekat pada sampel ekstrak daun sirih merah (Theodora *et al.*, 2019). Hasil positif adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, orange, dan jingga (Ikalinus *et al.*, 2015). Perubahan warna yang terjadi ini disebabkan dengan adanya reaksi reduksi dalam flavonoid oleh Mg yang dilakukan dalam suasana asam dengan penambahan HCl pekat (Mariana *et al.*, 2013). Hasil skrining fitokimia flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Uji Flavonoid. (a) Sebelum; (b) Sesudah.

4.5.2 Uji Saponin

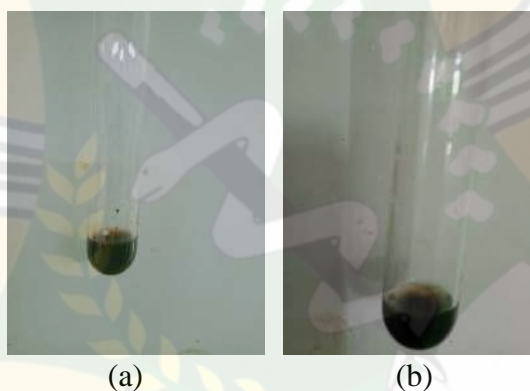
Uji saponin dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa saponin dalam ekstrak daun sirih merah. Uji fitokimia senyawa saponin dalam penelitian ini dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan air (1:1) kemudian dikocok selama 1 menit. Identifikasi saponin menunjukkan hasil positif apabila terbentuk busa dan bertahan selama 10 menit. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Astarina *et al.*, 2012). Hasil uji dalam penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa saponin dari ekstrak daun sirih merah memiliki nilai positif yang artinya dalam ekstrak daun sirih merah terkandung senyawa saponin.



Gambar 4. 3 Uji Saponin. (a) Sebelum; (b) Sesudah.

4.5.3 Uji Tanin

Uji tanin bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa tanin dalam ekstrak daun sirih merah. Hasil uji menunjukkan bahwa senyawa tanin dari ekstrak daun sirih merah memiliki nilai positif. Hasil identifikasi tanin positif dengan ditandai terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau. Uji fitokimia senyawa tanin dilakukan dengan menambahkan ekstrak daun sirih merah dengan larutan FeCl_3 . Uji fitokimia menggunakan FeCl_3 dapat menunjukkan adanya gugus fenol, apabila terdapat senyawa fenol, maka dimungkinkan juga terdapat tanin, karena tanin merupakan senyawa polifenol. Perubahan warna hitam kebiruan atau hijau terjadi akibat pembentukan senyawa kompleks antara tanin dengan FeCl_3 . Senyawa kompleks tersebut terbentuk karena terdapat ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom non logam (Sari, 2011).



Gambar 4. 4 Uji Tanin (a) Sebelum; (b) Sesudah.

4.6 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sirih Merah dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri UV-VIS merupakan alat yang digunakan mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom suatu zat kimia pada daerah UV-VIS (DepKes RI., 1995). Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer yaitu, dapat mendeteksi panjang gelombang dari sinar putih dengan menggunakan alat seperti prisma, greting atau celah optis sebagai pengurai warna-warna, pada panjang gelombang tertentu di fotometer filter (Gandjar I., 2007). Prinsip dari spektrofotometri UV-VIS adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh

molekul-molekul didalam larutan dimana panjang gelombang yang ditransmisi oleh larutan sebagian energi cahaya akan diabsorbansikan (Nurul A., 2016).

Hasil dari serapan yang diperoleh diplot, dimasukkan kedalam rumus persamaan kurva baku $y = ax - b$ dimana persamaan kurva baku senyawa *quercetin* yaitu $y = 0.0137x - 00764$. Nilai koefisien korelasi (r) merupakan nilai yang digunakan untuk mengetahui kuat, sedang atau lemahnya hubungan diantara variable yang diteliti. Dimana nilai koefisien korelasi dikatakan sangat kuat apabila nilai (r) mendekati 1. Larutan standar yang digunakan memiliki hubungan yang linier antara absorbansi dengan konsentrasi dengan hasil koefisien korelasi (r) sebesar 0.9962.

Tabel 4. 5 Hasil uji kadar senyawa flavonoid ekstrak daun sirih merah

Senyawa	Kadar (%)
Flavonoid	4.60%

Kadar flavonoid ekstrak daun sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini telah sesuai dengan standart kadar flavonoid total ekstrak daun sirih merah. Berdasarkan FHI (2017) kadar flavonoid total ekstrak daun sirih merah adalah tidak kurang dari 0.79%.

4.7 Fraksinasi Daun Sirih Merah

Proses fraksinasi daun sirih merah menggunakan metode partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan *aquadestilata*. Pelarut n-heksan sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar, dan *aquadestilata* sebagai pelarut polar, maka senyawa non polar akan terekstraksi pada pelarut n-heksana, senyawa semi polar akan terekstraksi pada pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi pada pelarut *aquadestilata*. Tujuan dilakukan proses fraksinasi ialah untuk memisahkan golongan senyawa berdasarkan perbedaan polaritasnya (Suryaku, 2017)

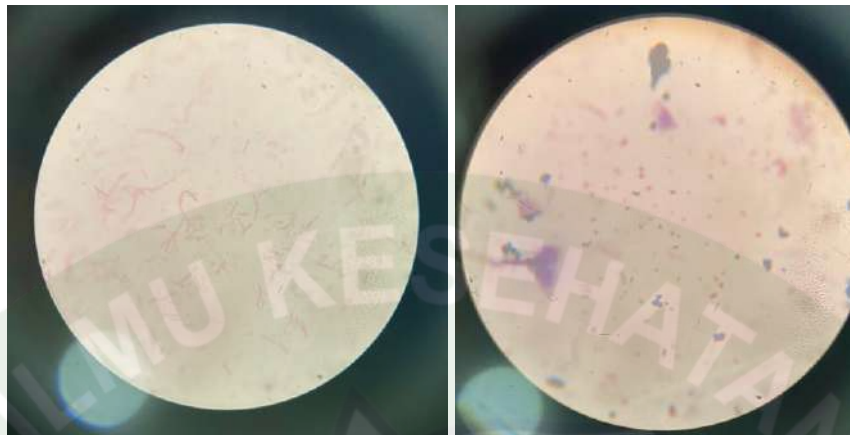
Tabel 4. 6 Hasil rendemen fraksi daun sirih merah

Sampel	Bobot Ekstrak	Bobot Fraksi	Hasil
Fraksi <i>Aquadestilata</i>	5 g	3.15 g	63%
Fraksi Etil Asetat	5 g	0.58 g	11.6%
Fraksi N-Heksan	5 g	0.52 g	10.4%

Hasil rendemen pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa rendemen dari masing-masing fraksi daun sirih merah yang diperoleh mempunyai nilai yang berbeda, hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan larutan penyari dari masing-masing pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi. Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam daun sirih merah lebih banyak mengandung senyawa polar sehingga senyawa tersebut terlarut dalam pelarut polar yaitu *aquadestilata* sebesar 63%, nilai rendemen fraksi etil asetat sebesar 11.6%, dan fraksi n-heksan daun sirih merah mempunyai nilai rendemen sebesar 10.4%. Hal ini diduga karena senyawa yang bersifat semi polar dan non polar jumlahnya lebih sedikit pada daun sirih merah dibandingkan senyawa polar.

4.8 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri bertujuan untuk mengetahui bakteri yang digunakan yaitu bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Klinik Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Identifikasi bakteri yang digunakan menggunakan metode uji pewarnaan Gram.



(a)

(b)

Gambar 4. 5 Uji Pewarnaan Gram

Keterangan : (a) Pewarnaan *Escherichia coli*

(b) Pewarnaan *Propionibacterium acnes*.

Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan untuk membedakan antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pada Gambar 4.3 (a) menghasilkan warna merah dan berbentuk batang, hal ini menunjukkan bahwa Gambar (a) merupakan bakteri gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada gambar 4.2 (b) menghasilkan warna ungu dan berbentuk batang, hal ini menunjukkan bahwa gambar (b) merupakan bakteri gram positif *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. Perbedaan warna antara bakteri Gram negatif dan Gram positif dikarenakan perbedaan ketebalan dinding peptidoglikan bakteri, bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan lebih tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Perbedaan ketebalan dinding ini mengakibatkan perbedaan kemampuan afinitas dengan pewarna Gram (Afrianti and Muhammad, 2017).

4.9 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah

Uji aktivitas antibakteri dengan sampel fraksi daun sirih merah. Fraksi yang digunakan yaitu fraksi *aquadestilata*, etil asetat, dan n-heksana. Konsentrasi fraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu konsentrasi 5% yang diperoleh dari hasil orientasi. Pembuatan larutan uji fraksi daun sirih merah dilakukan dengan cara mengencerkan fraksi daun sirih merah dengan masing-masing pelarut, agar fraksi

daun sirih merah dapat larut secara sempurna, hal ini sesuai dengan prinsip *like dissolve like* yang berarti suatu senyawa akan terlarut pada pelarut dengan sifat yang sama (Verdiana *et al.*, 2018).

Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah dilakukan pada dua bakteri yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 sebagai gram negatif dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 sebagai gram positif. Pengujian antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram digunakan karena pada metode ini proses pengerjaan mudah untuk dilakukan serta peralatan yang digunakan sederhana dan tidak memerlukan peralatan khusus (Rahmadani, 2015). Prinsip dari metode difusi cakram yaitu fraksi dari daun sirih merah yang terdapat pada kertas cakram akan berdifusi kedalam media yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, sehingga fraksi dari daun sirih merah akan menghambat pertumbuhan dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

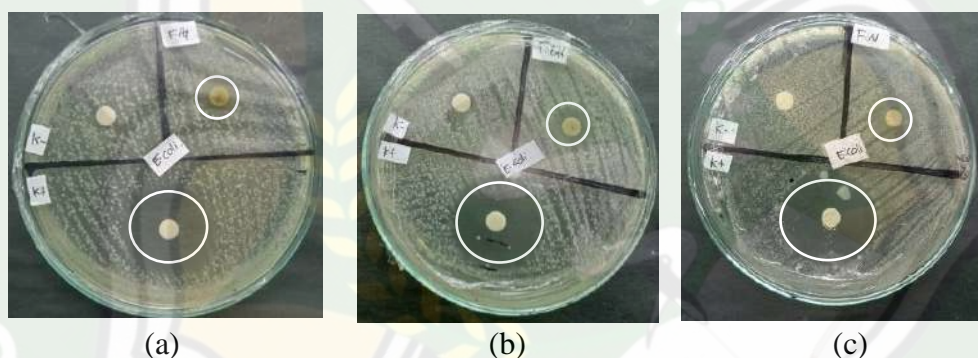
4.8.1 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Tabel 4. 7 Hasil Uji Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Sampel	Diameter Zona Hambat			Rata-Rata ± Standar Deviasi
	RI	RII	RIII	
Fraksi Aquadestilata 5%	11.5	9.5	8	9.66 ± 1.75
Fraksi N-Heksan 5%	15	13.5	0	9.5 ± 8.26
Fraksi Etil Asetat 5%	2	5	6	4.33 ± 2.08
Kontrol positif Aquadestilata	21.5	22	23	22.17 ± 0.76
Kontrol positif N-Heksan	24	25	25	24.67 ± 0.57
Kontrol positif Etil Asetat	28	29	28	28.33 ± 0.57
Kontrol negatif Aquadestilata	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif N-Heksan	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif Etil Asetat	8.5	8	8	8.16 ± 0.28

Tabel 4. 8 Hasil Uji Tukey Subset Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

		Zona Hambat				
		Fraksi	N	Subset for alpha = 0.05		
				1	2	3
Tukey HSD ^a	k- aquadestilata		3	0.00		
	k- n-heksan		3	0.00		
	fraksi etil asetat		3	4.33	4.33	
	k- etil asetat		3	8.16	8.16	
	fraksi n-heksan		3		9.50	
	fraksi aquadestilata		3		9.66	
	k+ aquadestilata		3			22.16
	k+ n-heksan		3			24.66
	k+ eti asetat		3			28.33
	Sig.				0.05	0.42



Gambar 4. 6 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Keterangan : a. fraksi *aquadestilata*
 b. fraksi etil asetat
 c. fraksi n-heksan

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu kloramfenikol dengan konsentrasi 0.1%. Penggunaan kontrol positif kloramfenikol pada penelitian ini dikarenakan kloramfenikol memiliki mekanisme yang sama dengan senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah yaitu senyawa flavonoid yang berkhasiat sebagai bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Ganiswara, 2012). Kloramfenikol memiliki mekanisme kerja yang mampu mengubah proses denaturasi protein dan asam nukleat pada bakteri sehingga

antibiotik ini dapat merusak sel bakteri (Ganiswara, 2012). Kontrol positif kloramfenikol, memberikan zona hambat dengan diameter rata-rata 22,17 mm dengan pelarut *aquadestilata*, 24.67 pada pelarut n-heksan, dan 28.33 pada pelarut etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa antibiotik kloramfenikol memberikan respon hambat pertumbuhan bakteri dengan kategori sangat kuat terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ratna (2016) yang mana dalam penelitian tersebut dikatakan bahwa kontrol positif kloramfenikol dengan konsentrasi 0,1% dapat menghasilkan zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* sebesar 25,3 mm yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Sehingga bakteri *Escherichia coli* bersifat sensitif terhadap kloramfenikol (Ratna *et al.*, 2016) Kontrol positif kloramfenikol pada pelarut *aquadestilata* memiliki zona hambat terkecil dibandingkan dengan pelarut n-heksan dan etil asetat, hal ini dipengaruhi oleh sifat kelarutan dari kloramfenikol, dimana kloramfenikol sukar larut pada *aquadestilata* (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu masing-masing pelarut fraksi daun sirih merah. Kontrol negatif *aquadestilata* dan n-heksana memiliki rata-rata sebesar 0 mm pada bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif berupa *aquadestilata* dan n-heksana tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, sehingga tidak mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri pada fraksi daun sirih merah. Sedangkan pada hasil zona hambat kontrol negatif etil asetat memiliki rata-rata sebesar 8,16 mm. Hal ini menunjukkan bahwa etil asetat memiliki aktivitas antibakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian Sinta (2021), dimana kontrol negatif etil asetat memiliki aktivitas antibakteri.

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah pada Tabel 4.7 menunjukkan bahwa fraksi daun sirih merah mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* yang memiliki zona hambat paling aktif adalah pada fraksi *aquadestilata* yang mempunyai nilai rata-rata sebesar rata 9,6 mm dengan kategori zona hambat sedang. Hal ini karena fraksi *aquadestilata* diduga mampu menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid

sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat yang menyebabkan penghambatan pembentukan DNA dan RNA serta merusak membran sel bakteri (Rijayanti *et al.*, 2014).

Fraksi n-heksana memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan fraksi etil asetat hal ini diduga karena fraksi n-heksana mampu menarik senyawa-senyawa bersifat non-polar dalam daun sirih merah seperti saponin. Mekanisme kerja senyawa saponin dalam menghambat bakteri yaitu dengan merusak permeabilitas dinding sel sehingga dapat menimbulkan kematian sel (Amalia *et al.*, 2016).

Fraksi etil asetat memiliki zona hambat dalam kategori lemah. Hal ini terjadi karena etil asetat bersifat mudah menguap sehingga tidak mampu bekerja secara optimum. Menurut Wijaya and Yuwono (2015) mengatakan bahwa proses penguapan dapat berpengaruh terhadap pelarut etil asetat. Apabila pada kontrol negatif etil asetat terjadi pembentukan zona hambat maka dilakukan pengurangan dengan diameter zona hambat yang terbentuk pada fraksi etil asetat (Pringgienies *et al.*, 2020)

Data hasil penelitian yang telah didapatkan selanjutnya di uji statistic menggunakan SPSS 26. Analisis hasil diawali dengan dilakukan uji normalitas data untuk memastikan data terdistribusi normal menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa terdapat data dengan nilai *p-value* signifikansi 0,000 ($< 0,05$), yang berarti data tidak terdistribusi normal. Hasil uji normalitas data dapat dilihat pada Lampiran 10. Data kemudian dilakukan uji homogenitas dan hasil uji homogenitas yaitu *p-value* signifikansi 0,000 ($< 0,05$), yang berarti data tidak homogen. Hasil uji homogenitas data dapat dilihat pada Lampiran 10. Data dari penelitian ini tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka data kemudian dilakukan uji *nonparametric* menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan hasil uji *Kruskal-Wallis* dapat dilihat pada Tabel 4.9

Tabel 4. 9 Tabel Uji Kruskal-Wallis fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Test Statistics ^{a,b}	
Kruskal-Wallis H	zona hambat 23.730
Df	8
Asymp. Sig.	0.003

Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa nilai *p-value* signifikansi 0,003 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli*, kemudian dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 4.10

Tabel 4. 10 Uji *Mann-Whitney* fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Uji <i>Man Whitney</i>		Sig
Fraksi Aquadestilata	Fraksi N-Heksan	0.513
	Fraksi Etil Asetat	0.05*
	K+ Aquadestilata	0.05*
	K- Aquadestilata	0.037*
K+ Aquadestilata	K- Aquadestilata	0.037*
Fraksi N-Heksan	Fraksi Aquadestilata	0.513
	Fraksi Etil Asetat	0.513
	K+ N-Heksan	0.046*
	K- N-Heksan	0.121
K+ N-Heksan	K- N-Heksan	0.034*
Fraksi Etil Asetat	Fraksi Aquadestilata	0.05*
	Fraksi N-Heksan	0.513
	K+ Etil Asetat	0.046*
	K- Etil Asetat	0.046*
K+ Etil Asetat	K- Etil Asetat	0.043*

Pada uji *Mann-Whitney* bertujuan untuk menguji signifikansi hipotesis antar dua sampel (Sriwidadi, 2011). Berdasarkan Tabel 4.10 menunjukkan bahwa hasil uji *Mann-Whitney* fraksi *aquadestilata* menunjukkan tidak adanya perbedaan

bermakna dengan fraksi n-heksan, hal ini dapat dibuktikan dengan nilai *p-value* signifikansi 0,51 ($> 0,05$), sedangkan pada fraksi *aquadestilata* menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan fraksi etil asetat yang dapat dibuktikan dengan nilai *p-value* signifikansi $< 0,05$, dan pada fraksi n-heksan tidak berbeda bermakna dengan fraksi etil asetat, hal ini dibuktikan dengan nilai *p-value* signifikansi 0,513 ($> 0,05$). Fraksi *aquadestilata* pada penelitian ini merupakan fraksi teraktif sebagai antibakteri, namun memiliki nilai *p-value* signifikansi 0.037 ($< 0,05$) dengan kontrol positif, hal ini menunjukkan bahwa fraksi *aquadestilata* berbeda bermakna dengan kontrol positif.

Berdasarkan tabel subset (Tabel 4.8) menunjukkan bahwa fraksi *aquadestilata*, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat berada dalam satu kolom yaitu berada pada kolom 2 artinya ketiga fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* namun masih berbeda bermakna dengan kontrol positif. Dilihat dari tabel subset dan hasil rata-rata zona hambat yang terbentuk fraksi *aquadestilata* memiliki aktivitas antibakteri paling besar dan mendekati kontrol positif yang digunakan. Pembentukan aktivitas antibakteri pada fraksi daun sirih merah dikarenakan terdapatnya aktivitas antibakteri yang terkandung di dalam fraksi daun sirih merah.

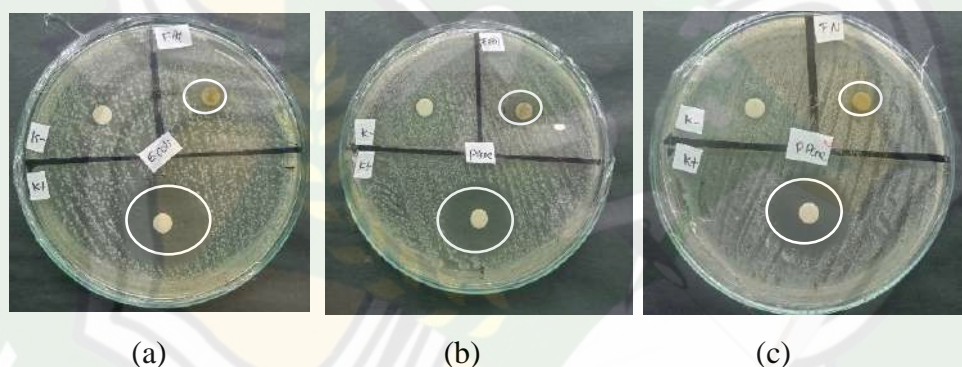
4.8.2 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Tabel 4. 11 Hasil Uji Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Sampel	Diameter Zona Hambat			Rata-Rata \pm Standar Deviasi
	RI	RII	RIII	
Fraksi Aquadestilata 5%	9	8.5	8	8.5 \pm 0.5
Fraksi N-Heksan 5%	8	9	7	8 \pm 1
Fraksi Etil Asetat 5%	3	7	7	5.66 \pm 2.30
Kontrol positif Aquadestilata	21	22	22	21.66 \pm 0.57
Kontrol positif N-Heksan	23	25	24	24 \pm 1
Kontrol positif Etil Asetat	27	28	27.5	27.5 \pm 0.5
Kontrol negatif Aquadestilata	0	0	0	0 \pm 0
Kontrol negatif N-Heksan	0	0	0	0 \pm 0
Kontrol negatif Etil Asetat	12	6	6	8 \pm 3.46

Tabel 4. 12 Hasil Uji Tukey Subset Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

		zona hambat				
Tukey HSD ^a	Fraksi	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
	k- aquadestilata	3	0.00			
	k- n-heksan	3	0.00			
	fraksi etil asetat	3		5.67		
	fraksi n-heksan	3		8.00		
	k- etil asetat	3		8.00		
	fraksi aquadestilata	3		8.50		
	k+ aquadestilata	3			21.67	
	k+ n-heksan	3			24.00	24.00
	k+ eti asetat	3				27.50
	Sig.		1.00	0.38	0.61	0.16



Gambar 4. 7 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Keterangan :a. fraksi *aquadestilata*
 b. fraksi etil asetat
 c. fraksi n-heksan

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu kloramfenikol dengan konsentrasi 0,1%. Penggunaan kontrol positif kloramfenikol pada penelitian ini dikarenakan kloramfenikol memiliki mekanisme yang sama dengan senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah yaitu senyawa flavonoid yang berkhasiat sebagai bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Ganiswara, 2012). Kloramfenikol memiliki mekanisme kerja yang mampu

mengubah proses denaturasi protein dan asam nukleat pada bakteri sehingga antibiotik ini dapat merusak sel bakteri (Ganiswara, 2012) Kontrol positif kloramfenikol, memberikan zona hambat dengan diameter rata-rata 21,66 mm pada pelarut *aquadestilata*, 24,00 mm pada pelarut n-heksan, dan 27,50 pada pelarut etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa antibiotik kloramfenikol memberikan respon hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dengan kategori sangat kuat. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Dewi (2020) yang mana dalam penelitian tersebut dikatakan bahwa kontrol positif kloramfenikol dengan konsentrasi 0,1% dapat menghasilkan zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 sebesar 28.50mm yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Sehingga bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 bersifat sensitif terhadap kloramfenikol (Dewi, 2020). Kontrol positif kloramfenikol pada pelarut *aquadestilata* memiliki zona hambat terkecil dibandingkan dengan pelarut n-heksan dan etil asetat, hal ini dipengaruhi oleh sifat kelarutan dari kloramfenikol, dimana kloramfenikol sukar larut pada *aquadestilata* (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu masing-masing pelarut fraksi daun sirih merah. Kontrol negatif n-heksana dan *aquadestilata* memiliki rata-rata sebesar 0 mm pada bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif berupa n-heksana dan *aquadestilata* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*, sehingga tidak mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri pada fraksi daun sirih merah. Sedangkan pada hasil zona hambat kontrol negatif etil asetat memiliki rata-rata sebesar 8,00 mm . Hal ini menunjukkan bahwa etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah pada Tabel 4.10 menunjukkan bahwa fraksi daun sirih merah mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah yang memiliki zona hambat paling aktif adalah pada fraksi *aquadestilata* yang ditunjukkan dengan rata-rata diameter zona hambat paling besar. Hal ini karena

fraksi *aquadestilata* diduga mampu menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat yang menyebabkan penghambatan pembentukan DNA dan RNA serta merusak membran sel bakteri (Rijayanti *et al.*, 2014).

Fraksi n-heksana memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan fraksi etil asetat hal ini diduga karena fraksi n-heksana mampu menarik senyawa-senyawa bersifat non-polar dalam daun sirih merah seperti saponin. Mekanisme kerja senyawa saponin dalam menghambat bakteri yaitu dengan merusak permeabilitas dinding sel sehingga dapat menimbulkan kematian sel (Amalia *et al.*, 2016).

Fraksi etil asetat memiliki zona hambat dalam kategori lemah. Hal ini terjadi karena etil asetat bersifat mudah menguap sehingga tidak mampu bekerja secara optimum. Menurut Wijaya and Yuwono (2015) mengatakan bahwa proses penguapan dapat berpengaruh terhadap pelarut etil asetat. Apabila pada kontrol negatif etil asetat terjadi pembentukan zona hambat maka dilakukan pengurangan dengan diameter zona hambat yang terbentuk pada fraksi etil asetat (Pringgenies *et al.*, 2020).

Data hasil penelitian yang telah didapatkan selanjutnya di uji statistic menggunakan SPSS 26. Analisis hasil diawali dengan dilakukan uji normalitas data untuk memastikan data terdistribusi normal menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa terdapat data dengan nilai *p-value* signifikansi 0,000 ($< 0,05$) pada fraksi etil asetat, yang berarti data tidak terdistribusi normal. Hasil uji normalitas data dapat dilihat pada Lampiran 12. Data kemudian dilakukan uji homogenitas dan hasil uji homogenitas yaitu *p-value* signifikansi 0,000 ($< 0,05$), yang berarti data tidak homogen. Hasil uji homogenitas data dapat dilihat pada Lampiran 12. Data dari penelitian ini tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka data kemudian dilakukan uji nonparametric menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan hasil uji *Kruskal-Wallis* dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Tabel 4. 13 Tabel Uji Kruskal-Wallis fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Test Statistics ^{a,b}	
Kruskal-Wallis H	zona hambat 24.456
Df	8
Asymp. Sig.	0.002

Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa nilai *p-value* signifikansi 0,002 (< 0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Propionibacterium acnes*, kemudian dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* fraksi daun sirih merah dapat dilihat pada tabel 4.14.

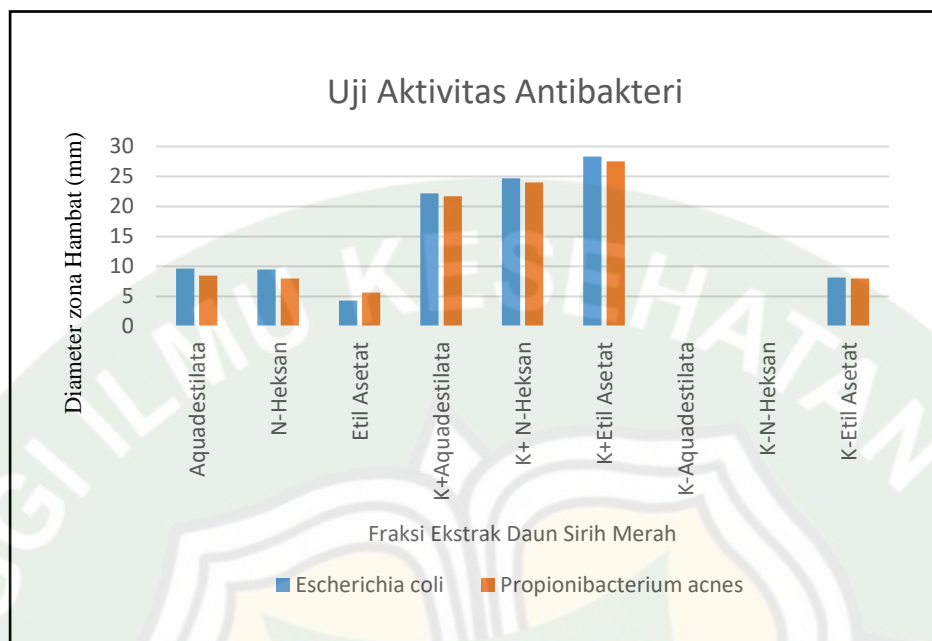
Tabel 4. 14 Tabel Uji Man Whitney fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

	Uji Man Whitney	Sig
Fraksi Aquadestilata	Fraksi N-Heksan	0.5
	Fraksi Etil Asetat	0.046*
	K+ Aquadestilata	0.037*
	K- Aquadestilata	0.037*
K+ Aquadestilata	K- Aquadestilata	0.034*
Fraksi N-Heksan	Fraksi Aquadestilata	0.5
	Fraksi Etil Asetat	0.105
	K+ N-Heksan	0.050*
	K- N-Heksan	0.037*
K+ N-Heksan	K- N-Heksan	0.037*
Fraksi Etil Asetat	Fraksi Aquadestilata	0.046*
	Fraksi N-Heksan	0.105
	K+ Etil Asetat	0.046*
	K- Etil Asetat	0.822
K+ Etil Asetat	K- Etil Asetat	0.046*

Pada uji *Mann-Whitney* bertujuan untuk menguji signifikansi hipotesis antar dua sampel (Sriwidadi, 2011). Berdasarkan Tabel 4.14 menunjukkan bahwa hasil uji *Mann-Whitney* fraksi *aquadestilata* menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna dengan fraksi *n-heksan*, hal ini dapat dibuktikan dengan nilai *p-value*

signifikansi 0,5 ($> 0,05$), sedangkan pada fraksi *aquadestilata* menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan fraksi etil asetat yang dapat dibuktikan dengan nilai *p-value* signifikansi 0.046 ($< 0,05$), dan pada fraksi n-heksan tidak berbeda bermakna dengan fraksi etil asetat, hal ini dibuktikan dengan nilai *p-value* signifikansi 0,105 ($> 0,05$). Fraksi *aquadestilata* pada penelitian ini merupakan fraksi teraktif sebagai antibakteri, namun memiliki nilai *p-value* signifikansi 0.037 ($< 0,05$) dengan kontrol positif, hal ini menunjukkan bahwa fraksi *aquadestilata* berbeda bermakna dengan kontrol positif.

Berdasarkan tabel subset (Tabel 4.12) menunjukkan bahwa fraksi *aquadestilata*, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat berada dalam satu kolom yaitu berada pada kolom 2 artinya ketiga fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* namun masih berbeda bermakna dengan kontrol positif. Dilihat dari tabel subset dan hasil rata-rata zona hambat yang terbentuk fraksi *aquadestilata* memiliki aktivitas antibakteri paling besar dan mendekati kontrol positif yang digunakan. Pembentukan aktivitas antibakteri pada fraksi daun sirih merah dikarenakan terdapatnya aktivitas antibakteri yang terkandung di dalam fraksi daun sirih merah seperti senyawa flavonoid, saponin, dan tanin yang dapat menghambat bakteri *Propionibacterium acnes*.



Gambar 4. 8 Grafik Batang Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes*.

Berdasarkan grafik fraksi *aquadestilata* dan fraksi N-heksan lebih sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dengan pada bakteri *Propionibacterium acnes*, sedangkan fraksi etil asetat lebih sensitif terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dibandingkan dengan pada bakteri *Escherichia coli*. Fraksi *aquadestilata*, fraksi N-heksan, dan fraksi etil asetat daun sirih merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Propionibacterium acnes* hal ini diduga karena fraksi daun sirih merah dapat menarik senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, dan tannin yang memiliki aktivitas antibakteri.

Mekanisme senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan mendenaturasi protein sel bakteri, merusak membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi bakteri dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri (Sapara *et al.*, 2016). Fenol dan protein membentuk ikatan hidrogen yang mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Dimana ikatan hydrogen akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma. Sehingga permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu akan terjadi

ketidakseimbangan dalam sel yang menyebabkan sel menjadi lisis (Rijayanti, 2014).

Mekanisme dari saponin sebagai senyawa antibakteri dengan menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin menjadi senyawa antibakteri karena zat aktif permukaannya sama dengan detergen, sehingga saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri serta merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel bakteri sangat mengganggu kelangsungan hidup dari bakteri tersebut. Saponin akan berpindah melalui membran luar dan dinding sel yang rentan lalu mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Ernawati and Sari, 2015).

Mekanisme kerja senyawa tanin sebagai antibakteri yaitu dengan cara menyebabkan sel bakteri menjadi lisis. Hal ini dikarenakan pada senyawa tanin mempunyai target dinding polipeptida dinding sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna, sehingga sel bakteri akan mati. Selain itu, tanin memiliki kemampuan untuk menginaktifkan enzim bakteri serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Sapara *et al.*, 2016).

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Berdasarkan data hasil penelitian serta pembahasan dalam penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi *aquadestilata*, n-heksana, dan etil asetat daun sirih merah mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 secara *in vitro* dengan kategori zona hambat sedang, dengan kadar flavonoid total ekstrak daun sirih merah 4.60%.
2. Fraksi daun sirih merah yang memiliki zona hambat paling luas yaitu fraksi *aquadestilata* 5% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 9,6 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan 8,5 pada *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan skrining senyawa fitokimia pada fraksi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bakteri lain yang dapat menyebabkan infeksi jerawat.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan bentuk sediaan yang berbeda untuk mengetahui keefektifan daun sirih merah sebagai bahan obat tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiningsih, W., Vifta, R. L., and Yuswantina, R. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Dan Ekstrak. *1*, 1–9.
- Adriana, R., 2017. Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* di Kawasan Wisata Pantai Tanjung Bayang dan Akkarena Kota Makassar. Skripsi.
- Afifah Rukmini. 2020. Skrining Fitokimia Familia Piperaceae. *Jurnal Biologi Dan Pembelajarannya (Jb&P)*, 7(1), 28–32.
- Afrianti, R. S., & Muhammad, H. G. 2017. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 4(2), 50.
- Anam, C., Agustini, T. W., and, Romadhon. 2014. Pengaruh Pelarut yang berbeda pada Ekstraksi Spirulina Platensis Serbuk sebagai Antioksidan dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal Pengolahan Dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 3 (4), 106–112.
- Andhini, N. F. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Air dari Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Universitas Setia Budi, Surakarta.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. 2012. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). 2009, 3100.
- Astuti, I. P., and Munawaroh, E. 2011. Karakteristik Morfologi Daun Sirih Merah: *Piper Crocatum* Ruitz & Pav Dan *Piper Porphyrophyllum* N.E.Br. Koleksi Kebun Raya Bogor. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*, 7A, 83–85.
- Astuti, O.R., Candrasari, A., Romas, M.A., and Hasbi, M. 2012. Uji daya antimikroba ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Candida albicans* ATCC 10231 secara *in vitro*. *Biomedika*, 4(1), 9–16.

- Ayu, N. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Rambutan (*Nephelium Lappaceum L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923 Secara *In Vitro*. In *Skripsi*. Stikes Karya Putra Bangsa.
- Baud, G. S., Sangi, M. S., and Koleangan, H. S. J. 2014. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Batang Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli L.*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Ilmiah Sain*, 14 (2), 107–112.
- Beon, A. S., and Batista, G. 2010. Identifikasi Komponen Fitokimia dalam Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Jurnal Kesehatan*.
- BPOM RI. 2014. Persyaratan Mutu Obat Tradisional, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Brooks, G.F., Carrol, K.C., Butel, J.C., Morse, S.A and Mietzner, T. 2013. *Medical Microbiology*. Mc-Graw Hill.
- Damayanti, A. 2012. Pengaruh Jenis Kemasan dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Jamu. Badan Litbang Kesehatan KEMENKES RI.
- Damayanti, M. 2014. Uji Efektivitas Larutan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes* Secara *In Vitro*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Dewi, N. P. 2020. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Awar-Awar (*Ficus septica Burm.f*) dengan Metode Spektrofotometer UV-VIS. *Acta Holist. Pharm*, 2 (1), 16–24.
- DwicaHyani, T., Sumardianto, and Rianingsih, L. 2018. Uji Bioaktivasi Ekstrak Teripang Keling *Holothuria atra* sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J. Peng. & Biotek. Hasil Pi*, 7 (1), 15–24.
- Endarini, L. H. 2016. *Farmakognosi dan Fitokimia* (Cetakan Pertama). Modul Bahan Ajar Cetak Farmasi.

- Ernawati, & Sari, K. 2015. Kandungan Senyawa Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea americana P.Mill*) terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Kajian Veteriner*, 3 (2), 203–211.
- Fajriaty I., I H.H. and Setyaningrum R. 2018. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri Burm. F.*). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*. 7(1), pp. 54–67
- Farida, J. 2013. Manfaat Sirih Merah Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*.
- Ganiswara, S.2012. Farmakologi dan Terapi (edisi IV). Universitas Indonesia.
- Ghazali I. 2011 .Aplikasi Analisis Multivariate Dengan Spss 6. Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.
- Hamad, A., Jumitera, S., Puspawiningtyas, E., and Hartanti, D. 2017. Aktivitas Antibakteri Infusa Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) pada Tahu dan Daging Ayam Segar. *Inovasi Teknik Kimia*, 2 (1), 1–8.
- Hartati, Syamsuddin, and Karim, H., 2019, Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Klika Kayu Jawa (*Lannea coromendelica*), *Jurnal Sainsmat*, 8 (2), 19–27.
- Hasibuan, S. A. 2016. Perbandingan Daya Hambat Ekstrak Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas Linn*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *In Vitro*. Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Hendra and Resti. 2015. *Treatment for acne vulgaris*. *J.majority*, 4(2), 87–95.
- Holderman, M. V., De Queljoe, E., and Rondonuwu, S. B. 2017. Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator di Salah Satu Pusat Perbelanjaan Di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.35799/jis.17.1.2017.14901>

- Huda, C., Putri, A. E., and Sari, D. W. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Dari Maserat *Zibethinus Folium* Terhadap *Escherichia Coli*. *Jurnal Sain Health*, 3 (1), 7–14.
- Ikalinus, R., Widyastuti, S., & Eka Setiasih, N. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 71–79.
- Ilham. 2010. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Larut Heksan dan tidak Larut Heksan Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) terhadap Beberapa Mikroba Patogen. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Indarto, I., Narulita, W., Anggoro, B. S., and Novitasari, A. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong Terhadap *Propionibacterium Acnes*. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 10(1), 67–78. <https://doi.org/10.24042/Biosfer.V10i1.4102>
- Indriati, Gustiana., Agustina., and., Widiana, R. 2012. Daya Hambat Sari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia colli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sainstek*, 4 (2), 141–144.
- Irianto, K. 2014. *Bakteriologi Medis, Mikologi Medis, dan Virologi Medis*. Alfabeta.
- Juliantina, F. R., Ayu Citra, D. M., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., and Tri Bowo, E. 2017. Manfaat Sirih Merah (*piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif.
- Juliantina Rachmawaty, F., Mahardika Akhmad, M., Hikmah Pranacipta, S., Nabila, Z., and Muhammad, A. 2018. Optimasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 18(1), 13–19. <https://doi.org/10.18196/mm.180109>
- K, Sariadji., and M, Sembiring. 2019. Uji Kepekaan Antibiotik pada *Corynebacterium diphtheriae*. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 8(2), 121–133.
- Kabense, R., Ginting, E. L., Wullur, S., Kawung, N. J., Losung, F., and Tombokan, J. L. 2019. Penapisan Bakteri Proteolitik yang Bersimbiosis Dengan Alga *Gracillaria Sp.* *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2),

421. <https://doi.org/10.35800/Jip.7.2.2019.24487>

- Kandoli, F., Abijulu, J., and Leman, M. 2016. Daya Hambat Ekstrak Daun Durian (*Durio zybethinus*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* secara In Vitro. *Pharmacon*, 5(1).
- Karimela, E. J., Ijong, F. G., and Dien, H. A. 2017. Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang di Isolasi dari Ikan Asap Pinekuhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(1), 188.
- Kumar, B., Pathak, R., Mary, P. B., Jha, D., Sardana, K., and Gautam, H. K. 2016. *New insights into acne pathogenesis: Exploring the role of acne-associated microbial populations. Dermatologica Sinica*, 34(2), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.12.004>
- Kursia, S., Lebang, J. S., Taebe, B., Burhan, A., Rahim, W. O. R., and Nursamsiar, 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sirih Hijau (*Piper Betle L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Epidermidis*, *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*, 3 (2), 72–77
- Laksono, T. A. 2019. Skrining Fitokimia dan Uji Sitotoksitas Ekstrak dan Fraksi *Epifit Liken Phycia Millegrana* terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7), *Skripsi*.
- Manik, D. F., Hertiani, T., and Anshory, H. 2014. Analisis korelasi antara kadar flavonoid dengan aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Khazanah*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.20885/khazanah.vol6.iss2.art1>
- Maradona, D. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Durian (*Durio zibethinus L.*), Daun Lengkek (*Dinocarpus longan Lour.*), Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. UIN Syarif Hidayatullah.
- Mariana, L., Andayani, Y., & Gunawan, R. 2013. Analisis Senyawa Flavonoid Hasil Fraksinasi Ekstrak Diklorometana Daun Keluwih. 6(2), 50–55.

- Masluhah, N. 2016. Rancang Bangun Otomatisasi Sistem Penentuan Kualitas Ikan Berdasarkan Berat Terukur (Bagian II). *Universitas Airlangga*.
- Mierza, V. 2020. Aktivitas Antibakteri Dan Mekanisme Kerja Komponen Kimia Umbi Rarugadong (*Dioscorea Pyrifolia Kunth.*) Terhadap Kebocoran Sel *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*.
- Moerfiah and Supomo, F. D. S. 2011. Pengaruh ekstrak daun sirih merah (*Piper cf. fragile Benth.*) terhadap bakteri penyebab sakit gigi. *Ekologia*, 11(1), 30–35.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, Vii(2),361.
- Nurhasnawati, H., Sukarmi And Handayani, F. 2017. Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium Malaccense L.*) *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3(1), Pp. 91–95
- Parfati, N and Windono, T. 2016. Sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) kajian pustaka. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 1(2), 106–115.
- Pratiwi, E. 2010. Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata (Burm.F.) Nees*). Institut Pertanian Bogor.
- Pratiwi, I. and Suswati, I. 2012. Efek Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum Ruiz & Pav*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pneumonia*. *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan Dan Kedokteran Keluarga*, 8(1), 1–5.
- Pratiwi, M. N. 2019. Aktivitas Antibakteri Fraksi Buah Jambu Wer (*Prunus persica (L.) Batsch*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Pringgenies, D., Setiyati, W. A., Wibowo, D. S., & Djunaedi, A. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Jeruju Acanthus ilicifolius* terhadap Bakteri *Multi Drug Resistant*. *Jurnal Kelautan Tropis*, 23(2), 145–156.

- Purwaningsih, D., and Wulandari, D. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Suruhan (*Peperomia Pellucida L . Kunth*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa Atcc* *Antimicrobial Activity Test Of Ethanolic Leaves Extract Of Suruhan (Peperomia Pellucida L. Kunth) Against Pseudomonas Aeruginosa Atcc* Pendahuluan Metode Penelitian. 5(1), 1–7.
- Putri, D. A. 2014. Pengaruh Metode Ekstraksi dan Konsentrasi terhadap Aktivitas Jahe Merah (*Zingiber officinale var rubrum*) sebagai Antibakteri *Escherichia coli*. Universitas Bengkulu.
- Radji, M. 2011. Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran. Buku Kedokteran EGC.
- Rajendra, V. D. and. (2014). Estimation of Total Phenol, Tannin, Alkaloid and Flavonoid in hibiscus tiliaceus Linn, Wood Extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4)
- Ramadhan, S., Iswari, R. S., Marianti, A., Ramadhan, S., Iswari, R. S., nd Marianti, A. (2019). Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav.*) terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar Glutation Peroksidase Tikus Jantan *Hiperglikemik*. 07(1), 1–10.
- Rahmadani, F. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Jakarta.
- Ratna, Y., Ardani, U., Fathiana, Z., & Rahmatillah, A. (2016). Daya Antibakteri Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale L.*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Sensitif dan Multiresisten. *Aga*, 14(1), 103–110.
- Riawenni, S.2017. Aktivitas Antibakteri Krim Antijerawat yang Mengandung Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) terhadap *Propionibacterium acnes*. Meiching.

- Rijayanti, R., Luliana, S., & Trianto, H. . (2014). *In vitro Antibacterial Activity test Of Ethanol Extracts Bacang mango (Mangifera foetida L.) Leaves Against Staphylococcus aureus*. Naskah Publikasi Universitas Tanjungpura, 1(1), 10–12.
- Sapara, T., Waworuntu, O., & Juliatri. (2016). Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens Balsamina L.*) terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas Gingivalis*. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5 (4), 10–17.
- Saputri, R., and Susiani, E. F., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah dan Biji Buah Kalangkala (*Litsea angulata*) Asal Kalimantan Selatan, *Borneo Journal of Pharmacy*, 1 (2), 81–84.
- Sari. 2011. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah IlmuKefarmasian*, 3(1), 01–07.
- Solikhah, A. M., Darmawati, S., and Prastiyanto, M. E. 2018. Analisis Profil Protein *Propionibacterium acnes Multidrug Resistance (MDR)* dengan *SDS-PAGE*, *Manuscript*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Sriwidadi, T. 2011. Penggunaan Uji Mann-Whitney pada Analisis Pengaruh Pelatihan Wiraniaga dalam Penjualan Produk Baru. *Binus Business Review*, 2 (2), 751–762.
- Sugiarti, L., & Setyawati, T. 2017. Karakteristik Mutu Simplisia Rimpang Jahe di PJ.Cap Klanceng Kudus. *Jurnal Keperawatan Dan Kesehatan*, 2 (5), 43– 95.
- Sulvita, N. 2018. Efektivitas Minyak Habbatussauda (Nigellasativa) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Jurnal Kesehatan*.
- Sumiati, E. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kloroform dan Ekstrak Etanol Biji Bidara Laut (*Strychnos ligustrina Bl*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Salmonella thypi*, Biogenesis. *Jurnal Ilmiah Biologi*, 2 (1), 1–10.
- Suryaku, N. I. 2017. Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksan, Etil Asetat dan Air dari Ekstrak Etanolik Daun Ungu (*Graptophyllum pictum (L.) Griff*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,. Universitas Setia Budi, Surakarta.

- Susanty, Fairus B. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea Mays L.*) (Susanty, Fairus Bachmid). 5, 87–93.
- Syafriana, V., and R. Rusyita. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) Terhadap Pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. *Sainstech Farma*, 10(2), 9–11.
- Syamsul, E. S., Anugerah, O. And Supriningrum, R., 2020, Penetapan Rendemen Ekstrak Daun Jambu Mawar (*Syzygium Jambos L . Alston*) Berdasarkan Variasi Konsentrasi Etanol Dengan Metode Maserasi, *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 2 (3), 147–157.
- Theodora, C., Gunawan, I., & Swantara, I. 2019. Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid pada Ekstrak Etil Asetat Daun Gedi (*Abelmoschus manihot L.*). *Jurnal Kimia*.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., K. G. and K. H. 2011. *Phytochemical Screening And Extraction: A Review*, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Ulfah, S. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum Linn*) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Jakarta.
- Utami, Y. P., Umar, A. H., Syahrini, R., & Kadullah, I. 2017. Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae Teijsm. & Binn.*). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 2 (1), 32–39.
- Wahyuni, R. 2014. Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin Dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Farmasi Higea*, 6(2).
- Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. 2018. Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(4), 213.

Wijaya, D. A., & Yuwono, S. S. 2015. Pengaruh Lama Pengukusan dan Konsentrasi Etil Asetat Terhadap Karakteristik Kopi Pada Proses dekafenasi Kopi Robusta. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(4).

Wijayanti, T. R. A., and Safitri, R. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi Linn*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Penyebab Infeksi Nifas. *Care: Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, 6 (3), 277–285.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Daun Sirih Merah



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
Jl. Lahor 87 Kota Batu
Jl. Raya 228 Kejayan Kabupaten Pasuruan
Jl. Kolonel Sugiono 457 – 459 Kota Malang
Email : materiamedicabatu@jatimprov.go.id



Nomor : 074/ 218/ 102.20-A/ 2022
Sifat : Biasa
Perihal : Determinasi Tanaman Sirih Merah

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : DIKA IKHLASUL AMAL
NIM : 1713206006
Fakultas : FARMASI, STIKES KARYA PUTRA BANGSA

1. Perihal determinasi tanaman sirih merah

Kingdom : Plantae
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Angiospermae/ Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae/ Magnoliopsida (Berkeping dua)
Bangsa : Piperales
Suku : Piperaceae
Marga : Piper
Jenis : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a-41b-42b-43b-54b-59b-61-62b-63a-64a: Piperaceae-1: Piper.

2. Morfologi : Habitus: Perdu, merambat. Batang: Berkayu, bulat, berbuku-buku, beralur, hijau.
Daun: Tunggal, ujung meruncing, bulat panjang, pangkal bentuk jantung, tepi rata, panjang 5-8 cm, lebar 2-5 cm, bertangkai, permukaan halus, pertulangan menyirip, warna bagian bawahnya merah mengkilap. Akar: Tunggang, bulat, coklat kekuningan.

3. Bagian yang digunakan : Daun.

4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

- Van Steenis, CCGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 17 Maret 2022

KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU

ACHMAD MABRUR, SKM, M.Kes.

PÉMBINA

NIP. 19680203 199203 1 004

Lampiran 2. Keterangan dan Hasil Uji Biokimia Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

DIREKTORAT JENDERAL PELAYANAN KESEHATAN
BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA

Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya - 60286
Telepon Pelayanan : (031) 5020306, TU : (031) 5021451, Faksimili : (031) 5020388
Website : bbksurabaya.id; Surat elektronik : bbksub@yahoo.co.id



Surabaya, 22 April 2022

Berikut ini lampiran surat keterangan strain bakteri yang dibeli oleh :

Nama : Mita Uly Andini
Institusi : STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung
Tanggal permintaan : 04 April 2022
Keperluan : Penelitian skripsi dengan judul, "Uji Aktivitas Ekstrak Kombinasi Daun Kelor (*Moringa oleifera*, L.) dan Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*."

Keterangan jenis strain

Bakteri : *Escherichia coli*
ATCC : ATCC 25922
Passage : #4

Hasil Uji Biokimia bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 :

NO	JENIS UJI	HASIL	
1	Pengecatan Gram	Gram negatif batang	
2	KIA	Lereng	Acid
		Dasar	Acid
		Gas	Positif
		H ₂ S	Negatif
3	Glukose	Positif, Gas Positif	
4	Laktose	Positif, Gas Positif	
5	Maltose	Positif, Gas Positif	
6	Mannose	Positif, Gas Positif	
7	Sukrose	Negatif	
8	Indol	Positif	
9	Methyl Red	Positif	
10	Voges Proskauer	Negatif	
11	Simon sitrat	Negatif	
12	Urease	Negatif	
13	Motility	Positif	
14	Lysin Decarboxilase	Positif	

Manajer Teknis

dr. Titiek S, M.Ked Klin, Sp.MK
NIP. 198207262010122002



Management System
ISO 9001:2015
www.tkv.com
ID 8102092007



Lampiran 3. Keterangan dan Hasil Uji Biokimia Bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
DIREKTORAT JENDERAL PELAYANAN KESEHATAN
 BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA

Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya - 60286
 Telepon Pelayanan : (031) 5020306, TU : (031) 5021451; Faksimili : (031) 5020388
 Website : bbik.surabaya.id; Surat elektronik : bbiksub@yahoo.co.id



Surabaya, 22 April 2022

Berikut ini lampiran surat keterangan strain bakteri yang dibeli oleh :

Nama : Sri Wahyuningsih
 Institusi : STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung
 Tanggal permintaan : 06 April 2022
 Keperluan : Penelitian skripsi dengan judul, "Formulasi dan Efektivitas Krim Antijerawat dari Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dengan Emulgator Anionik terhadap Bakteri *Propionibacterium acne* secara *In vivo*."

Keterangan jenis strain

Bakteri : *Propionibacterium acnes*
 ATCC : ATCC 11827
 Passage : #7

Hasil Uji Biokimia bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 :

No	Jenis Uji	Hasil
1	Pengecatan Gram	Gram positif batang
2	Kebutuhan Oksigen	Anaerob
3	Katalase	Positif (+)
4	Reduksi Nitrat	Positif (+)
5	Indol	Positif (+)

Manajer Teknis

 dr. Titiek S, M.Ked Klin, Sp.MK
 NIP. 198207262010122002





Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak



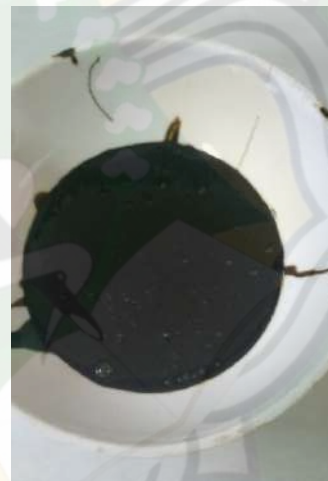
Penimbangan serbuk Simplisia



Maserasi Daun Sirih Merah



Penyaringan



Ekstrak DSM



Bebas Etanol

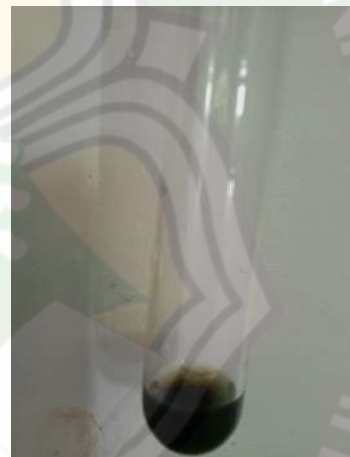
2. Skrining Fitokimia ekstrak DSM



Flavonid



Saponn



Tannin

3. Fraksinasi Ekstrak DSM



Fraksinasi *Aquadestilata*
dan N-heksan

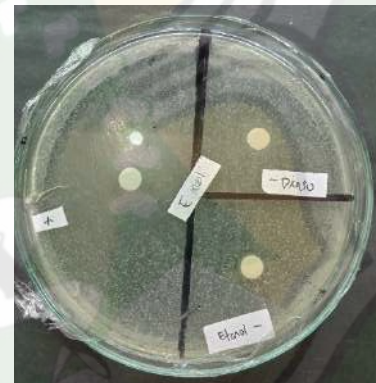
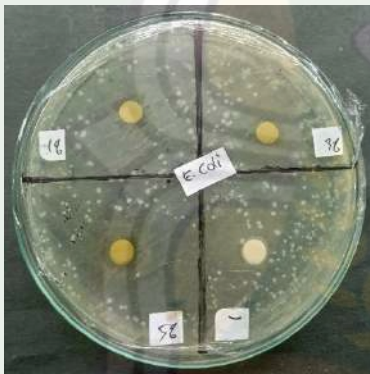


Fraksinasi *Aquadestilata*
dan Etil asetat

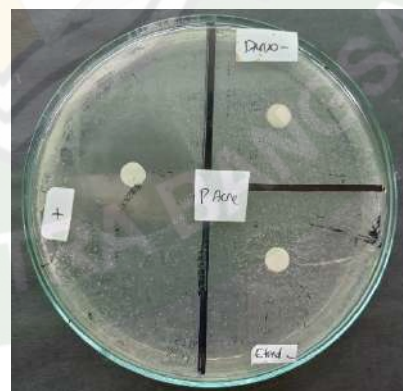
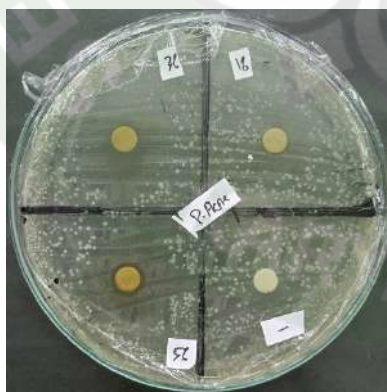
4. Peremajaan Bakteri



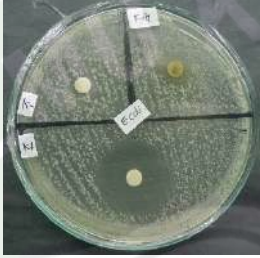
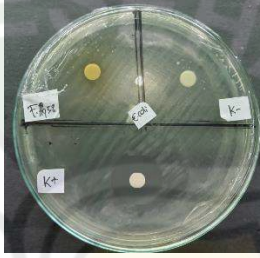
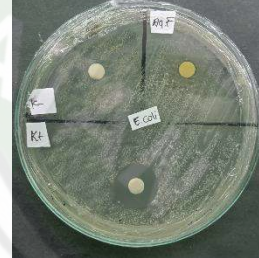


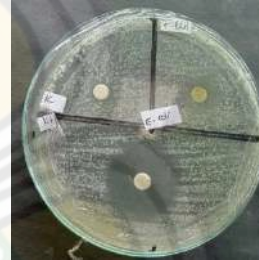
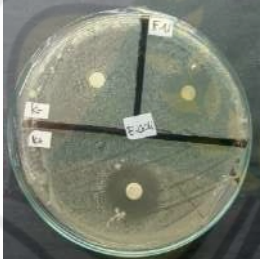
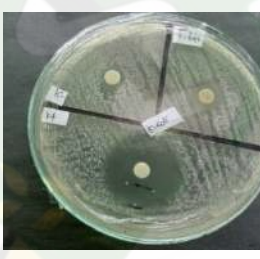
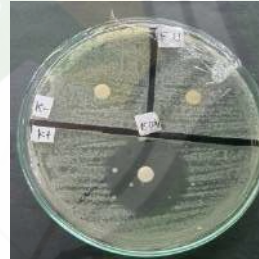
5. Uji aktivitas antibakteri orientasi ekstrak DSM terhadap bakteri *Escherichia coli*



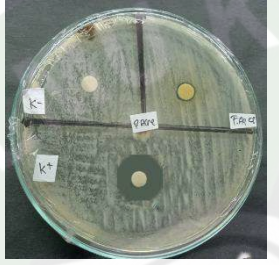
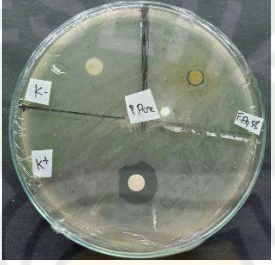
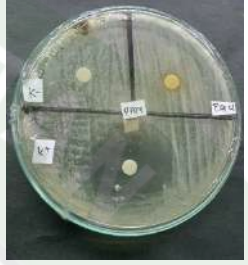
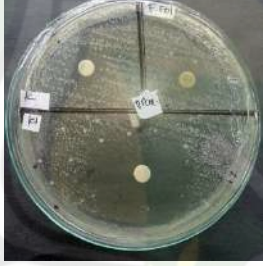
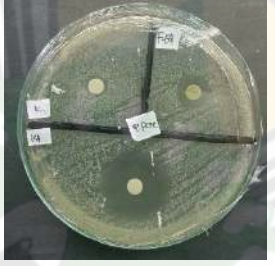

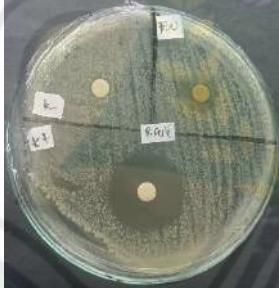
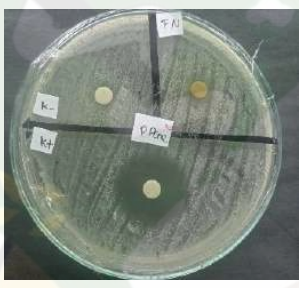
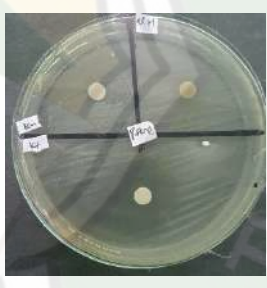
6. Uji aktivitas antibakteri orientasi ekstrak DSM terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*



7. Uji aktivitas antibakteri Fraksi DSM *aquadestilata*, n-heksan, dan etil asetat terhadap bakteri *Escherichia coli*

Fraksinasi	R1	R2	R3
	Escherichia coli		
Aquadestilata			
Etil Asetat			
N-Heksan			

8. Uji aktivitas antibakteri Fraksi DSM *aquadestilata*, n-heksan, dan etil asetat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

Fraksina si	R1	R2	R3
<i>Propionibacterium acnes</i>			
Aqdesti lata			
Etil Asetat			
N- Heksan			

Lampiran 5. Perhitungan Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

1. Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

$$\begin{aligned}\text{Gram} &= \frac{\text{Mr}}{1000} \times \text{volume} \\ &= \frac{8}{1000} \times 10 \text{ ml} \\ &= 0,08 \text{ g}\end{aligned}$$

2. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

$$\begin{aligned}\text{Gram} &= \frac{\text{Mr}}{1000} \times \text{volume} \\ &= \frac{20}{1000} \times 15 \text{ ml} \\ &= 0,2 \text{ g}\end{aligned}$$

Lampiran 6. Pembuatan Larutan Uji

$$\begin{aligned}1. \text{ Konsentrasi } 5\% &= \frac{5}{100} \times \text{volume} \\ &= \frac{5}{100} \times 10 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ g}\end{aligned}$$

Lampiran 7. Perhitungan Hasil

1. Uji kadar air

Sampel	Bobot Awal	Bobot Akhir	Hasil
Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> <i>Ruiz & Pav.</i>)	10 g	9,13 g	8,7%

$$\begin{aligned}\text{Rumus \% kadar air} &= \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\% \\ &= \frac{10 \text{ g} - 9,13 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 8,7\%\end{aligned}$$

2. Rendemen ekstrak

Sampel	Bobot Simplisia	Bobot Ekstrak	Hasil
Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> <i>Ruiz & Pav.</i>)	500 g	83.5 g	16.7%

$$\begin{aligned} \text{Rumus \% rendemen ekstrak} &= \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal serbuk simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{83.5 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 16.7\% \end{aligned}$$

3. Penetapan kadar flavonoid

$$\% = \frac{C_p \times \frac{A_u}{A_p} \times V \times f}{W} \times 100$$

C_p = Kadar larutan perbandingan

A_u = Serapan larutan uji

A_p = Serapan larutan perbandingan

V = volume larutan uji sebelum pengenceran

F = faktor pengenceran larutan uji

W = bobot bahan uji

$$\begin{aligned} \% &= \frac{0.02 \times \frac{0.189}{0.204} \times 100 \times 25}{1000} \times 100 \\ &= 4.6\% \end{aligned}$$

4. Rendemen Fraksi

Sampel	Bobot Ekstrak	Bobot Fraksi	Hasil
Fraksi <i>Aquadestilata</i>	5 g	3.15 g	63%
Fraksi Etil Asetat	5 g	0.58 g	11.6%
Fraksi n-Heksan	5 g	0.52 g	10.4%

$$\text{Rumus \% rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi } \textit{aquadestilata} &= \frac{3.15 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 63\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{0.58 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 11,6\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi n-heksan} &= \frac{0,52 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 10.4\% \end{aligned}$$

Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli*

Sampel	Diameter Zona Hambat			Rata-Rata ± Standar Deviasi
	RI	RII	RIII	
Fraksi Aquadestilata 5%	11.5	9.5	8	9.66 ± 1.75
Fraksi N-Heksan 5%	15	13.5	0	9.5 ± 8.26
Fraksi Etil Asetat 5%	2	5	6	4.33 ± 2.08
Kontrol positif Aquadestilata	21.5	22	23	22.17 ± 0.76
Kontrol positif N-Heksan	24	25	25	24.67 ± 0.57
Kontrol positif Etil Asetat	28	29	28	28.33 ± 0.57
Kontrol negatif Aquadestilata	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif N-Heksan	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif Etil Asetat	8.5	8	8	8.16 ± 0.28

Lampiran 9. Hasil uji man whiney fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli*

Uji Man Whitney		Sig
Fraksi Aquadestilata	Fraksi N-Heksan	0.513
	Fraksi Etil Asetat	0.05*
	K+ Aquadestilata	0.05*
	K- Aquadestilata	0.037*
K+ Aquadestilata	K- Aquadestilata	0.037*
Fraksi N-Heksan	Fraksi Aquadestilata	0.513
	Fraksi Etil Asetat	0.513
	K+ N-Heksan	0.046*
	K- N-Heksan	0.121
K+ N-Heksan	K- N-Heksan	0.034*
Fraksi Etil Asetat	Fraksi Aquadestilata	0.05*
	Fraksi N-Heksan	0.513
	K+ Etil Asetat	0.046*
	K- Etil Asetat	0.046*
K+ Etil Asetat	K- Etil Asetat	0.043*

Lampiran 10. Hasil analisis data fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Escherichia coli*

1. Table input data

The screenshot shows the IBM SPSS Statistics Data Editor interface. The data table has two columns: 'fraksi' and 'Zona_hambat'. The 'fraksi' column contains values from 1.00 to 9.00, and the 'Zona_hambat' column contains values from 8.00 to 8.50. The rows are numbered 3 to 25.

Case	fraksi	Zona_hambat
3	1.00	8.00
4	2.00	15.00
5	2.00	15.50
6	2.00	.00
7	3.00	2.00
8	3.00	5.00
9	3.00	6.00
10	4.00	21.50
11	4.00	22.00
12	4.00	23.00
13	5.00	24.00
14	5.00	25.00
15	5.00	25.00
16	6.00	28.00
17	6.00	28.00
18	6.00	28.00
19	7.00	.00
20	7.00	.00
21	7.00	.00
22	8.00	.00
23	8.00	.00
24	8.00	.00
25	9.00	8.50

2. Tabel uji normalitas

Tests of Normality E.coli							
Fraksi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
fraksi aquadestilata	0.204	3	.	0.993	3	0.843	
fraksi n-heksan	0.353	3	.	0.824	3	0.174	
fraksi etil asetat	0.292	3	.	0.923	3	0.463	
zona hambat							
k+ aquadestilata	0.253	3	.	0.964	3	0.637	
k+ n-heksan	0.385	3	.	0.75	3	0	
k+ eti asetat	0.385	3	.	0.75	3	0	
k- etil asetat	0.385	3	.	0.75	3	0	

Analisis:

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Data berdistribusi normal.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Data berdistribusi tidak normal

Kesimpulan: Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil ada yang memiliki signifikansi 0,000 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data penelitian ini berdistribusi tidak normal.

3. Tabel uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances E.coli			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.939	8	18	0

Analisis:

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Data homogen.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Data tidak homogen

Kesimpulan: Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Levena statistic* didapatkan hasil signifikansi 0,000 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data penelitian ini tidak homogen.

4. Tabel uji *Kruskal-Wallis*

Ranks			
	Fraksi	N	Mean Rank
zona hambat	fraksi aquadestilata	3	14.33
	fraksi n-heksan	3	13.00
	fraksi etil asetat	3	9.00
	k+ aquadestilata	3	20.00
	k+ n-heksan	3	23.00
	k+ eti asetat	3	26.00
	k- aquadestilata	3	4.00
	k- n-heksan	3	4.00
	k- etil asetat	3	12.67
	Total		27

Test Statistics^{a,b}	
Kruskal-Wallis H	zona hambat 23.730
Df	8
Asymp. Sig.	0.003

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kesimpulan : Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil signifikansi 0,003 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

5. Tabel uji *Mann-Whitney*

a. Fraksi *aquadestilata* dan fraksi n-heksan

		Ranks		
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi <i>aquadestilata</i>	3	3.00	9.00
	fraksi n-heksan	3	4.00	12.00
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-0.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b

b. Fraksi *aquadestilata* dan fraksi etil asetat

		Ranks		
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi <i>aquadestilata</i>	3	5.00	15.00
	fraksi etil asetat	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

c. Fraksi *aqudestilata* dan k+ *aquadesstilata*

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi aquadestilata	3	2.00	6.00
	k+ aquadestilata	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

d. Fraksi *aqudestilata* dan k- *aquadestilata*

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi aquadestilata	3	5.00	15.00
	k- aquadestilata	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

e. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat

Ranks				
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi n-heksan	3	4.00	12.00
hambat	fraksi etil asetat	3	3.00	9.00
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-0.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b

f. Fraksi n-heksan dan k+ n-heksan

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi n-heksan	3	2.00	6.00
hambat	k+ n-heksan	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

g. Fraksi n-heksan dan k- n-heksan

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi n-heksan	3	4.50	13.50
	k- n-heksan	3	2.50	7.50
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	7.500
Z	-1.549
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.121
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

h. Fraksi etil asetat dan k+ etil asetat

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi etil asetat	3	2.00	6.00
	k+ eti asetat	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

i. Fraksi etil asetat dan k- etil asetat

		Ranks		
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi etil asetat	3	2.00	6.00
	k- etil asetat	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

Lampiran 11. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

Sampel	Diameter Zona Hambat			Rata-Rata ± Standar Deviasi
	RI	RII	RIII	
Fraksi Aquadestilata 5%	9	8.5	8	8.5 ± 0.5
Fraksi N-Heksan 5%	8	9	7	8 ± 1
Fraksi Etil Asetat 5%	3	7	7	5.66 ± 2.30
Kontrol positif Aquadestilata	21	22	22	21.66 ± 0.57
Kontrol positif N-Heksan	23	25	24	24 ± 1
Kontrol positif Etil Asetat	27	28	27.5	27.5 ± 0.5
Kontrol negatif Aquadestilata	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif N-Heksan	0	0	0	0 ± 0
Kontrol negatif Etil Asetat	12	6	6	8 ± 3.46

Lampiran 12. Hasil uji man whiney fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

Uji Man Whitney		Sig
Fraksi Aquadestilata	Fraksi N-Heksan	0.5
	Fraksi Etil Asetat	0.046*
	K+ Aquadestilata	0.037*
	K- Aquadestilata	0.037*
K+ Aquadestilata	K- Aquadestilata	0.034*
Fraksi N-Heksan	Fraksi Aquadestilata	0.5
	Fraksi Etil Asetat	0.105
	K+ N-Heksan	0.050*
	K- N-Heksan	0.037*
K+ N-Heksan	K- N-Heksan	0.037*
Fraksi Etil Asetat	Fraksi Aquadestilata	0.046*
	Fraksi N-Heksan	0.105
	K+ Etil Asetat	0.046*
	K- Etil Asetat	0.822
K+ Etil Asetat	K- Etil Asetat	0.046*

Lampiran 13. Hasil analisis data fraksi daun sirih merah terhadap bakteri *Proponibacterium acnes*

1. Tabel input data

	fraksi	zona_hambat	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09	V10	V11	V12	V13	V14	V15
1	1.00	9.00															
2	1.00	8.50															
3	1.00	8.00															
4	2.00	8.00															
5	2.00	9.00															
6	2.00	7.00															
7	3.00	3.00															
8	3.00	7.00															
9	3.00	7.00															
10	4.00	21.00															
11	4.00	22.00															
12	4.00	22.00															
13	6.00	23.00															
14	6.00	25.00															
15	6.00	24.00															
16	6.00	27.00															
17	6.00	28.00															
18	6.00	27.50															
19	7.00	.00															
20	7.00	.00															
21	7.00	.00															
22	8.00	.00															
23	8.00	.00															

2. Tabel uji normalitas

Tests of Normality P.acnes

	Fraksi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zona hambat	fraksi aquadestilata	0.175	3	.	1.000	3	1.000
	fraksi n-heksan	0.175	3	.	1.000	3	1.000
	fraksi etil asetat	0.385	3	.	0.750	3	0.000
	k+ aquadestilata	0.385	3	.	0.750	3	0.000
	k+ n-heksan	0.175	3	.	1.000	3	1.000
	k+ eti asetat	0.175	3	.	1.000	3	1.000
	k- aquadestilata		3	.		3	
	k- n-heksan		3	.		3	
	k- etil asetat	0.385	3	.	0.750	3	0.000

Analisis:

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Data berdistribusi normal.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Data berdistribusi tidak normal

Kesimpulan: Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil ada yang memiliki signifikansi 0,000 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data penelitian ini berdistribusi tidak normal.

3. Table uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances P.acne			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.613	8	18	0

Analisis:

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Data homogen.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Data tidak homogen

Kesimpulan: Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Levena statistic* didapatkan hasil signifikansi 0,000 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data penelitian ini tidak homogen.

4. Table uji *Kruskal-Wallis*

Ranks			
		N	Mean Rank
zona hambat	Fraksi		
	fraksi aquadestilata	3	15.00
	fraksi n-heksan	3	13.67
	fraksi etil asetat	3	9.67
	k+ aquadestilata	3	20.00
	k+ n-heksan	3	23.00
	k+ eti asetat	3	26.00
	k- aquadestilata	3	3.50
	k- n-heksan	3	3.50
	k- etil asetat	3	11.67
	Total	27	

Test Statistics ^{a,b}	
	zona hambat
Kruskal-Wallis H	24.456
Df	8
Asymp. Sig.	0.002

a. Jika $p\text{-value} > 0,05$: Tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

b. Jika $p\text{-value} < 0,05$: Ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Kesimpulan : Berdasarkan analisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil signifikansi 0,002 ($< 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

5. Tabel uji *Mann-Whitney*

a. Fraksi *aquadestilata* dan fraksi n-heksan

		Ranks		
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi aquadestilata	3	3.00	9.00
hambat	fraksi n-heksan	3	4.00	12.00
	Total	6		

Test Statistics ^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.647
Asymp. Sig. (2-tailed)	.500
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b

b. Fraksi *aquadestilata* dan fraksi etil asetat

Ranks				
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi aquadestilata	3	5.00	15.00
	fraksi etil asetat	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

c. Fraksi *aquadestilata* dan k+ aquadestilata

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona hambat	fraksi aquadestilata	3	2.00	6.00
	k+ aquadestilata	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

d. Fraksi *aqudestilata* dan k- *aqudestilata*

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi <i>aqudestilata</i>	3	5.00	15.00
hambat	k- <i>aqudestilata</i>	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

e. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat

Ranks				
	Fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi n-heksan	3	4.67	14.00
hambat	fraksi etil asetat	3	2.33	7.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.623
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.105
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

f. Fraksi n-heksan dan k+ n-heksan

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi n-heksan	3	2.00	6.00
hambat	k+ n-heksan	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

g. Fraksi n-heksan dan k- n-heksan

Ranks				
	fraksi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi n- heksan	3	5.00	15.00
hambat	k- n-heksan	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

h. Fraksi etil asetat dan k+ etil asetat

Ranks					
	fraksi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi	etil	3	2.00	6.00
hambat	asetat	k+ eti asetat	3	5.00	15.00
	Total		6		

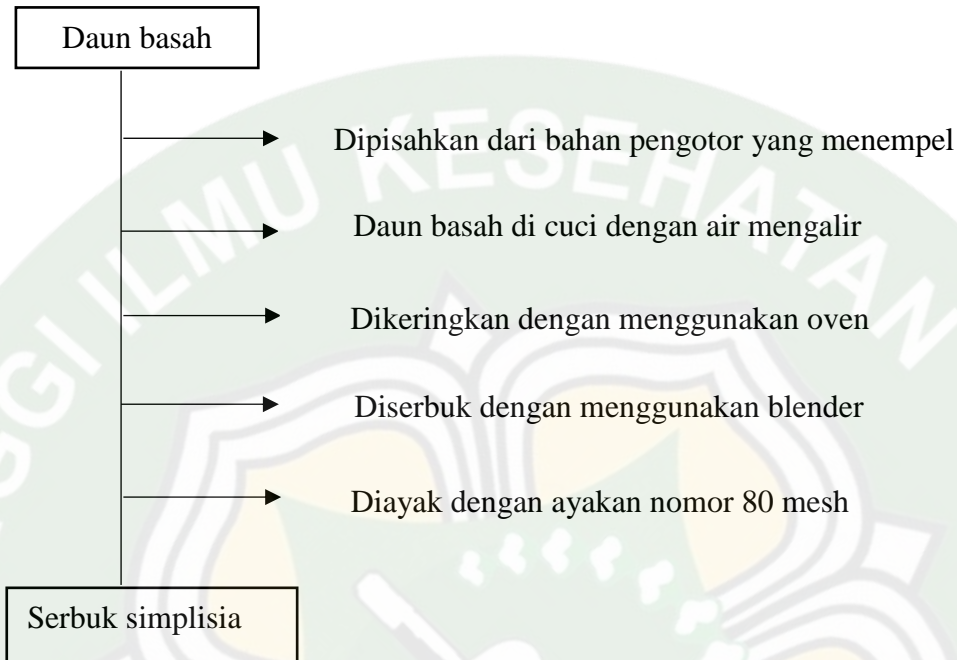
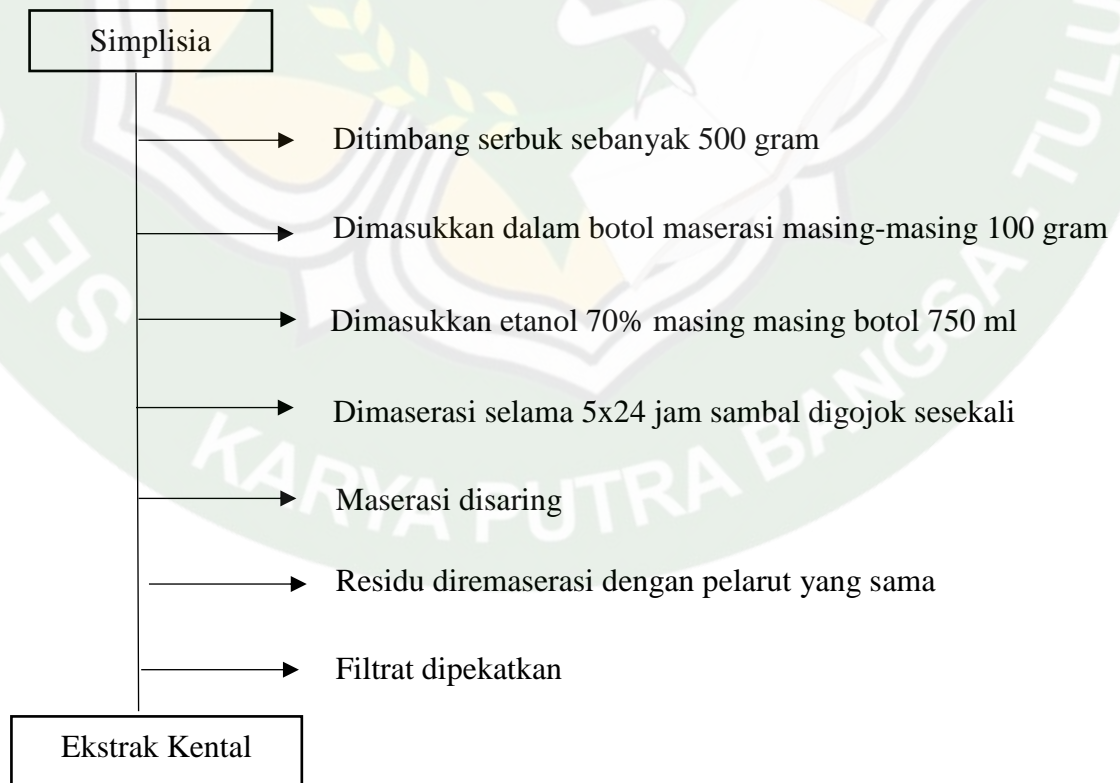
Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	0.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

i. Fraksi etil asetat dan k- etil asetat

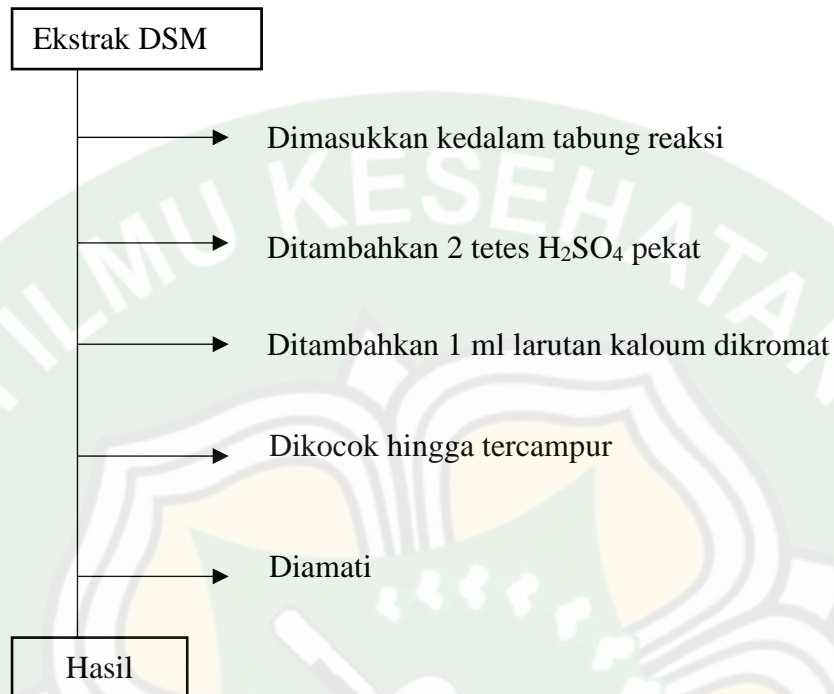
Ranks					
	Fraksi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona	fraksi	etil asetat	3	3.33	10.00
hambat	k-	etil asetat	3	3.67	11.00
	Total		6		

Test Statistics^a	
	zona hambat
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.225
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.822
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

Lampiran 14. Alur kerja

1. Pembuatan simplisia**2. Pembuatan ekstrak dengan menggunakan metode maserasi**

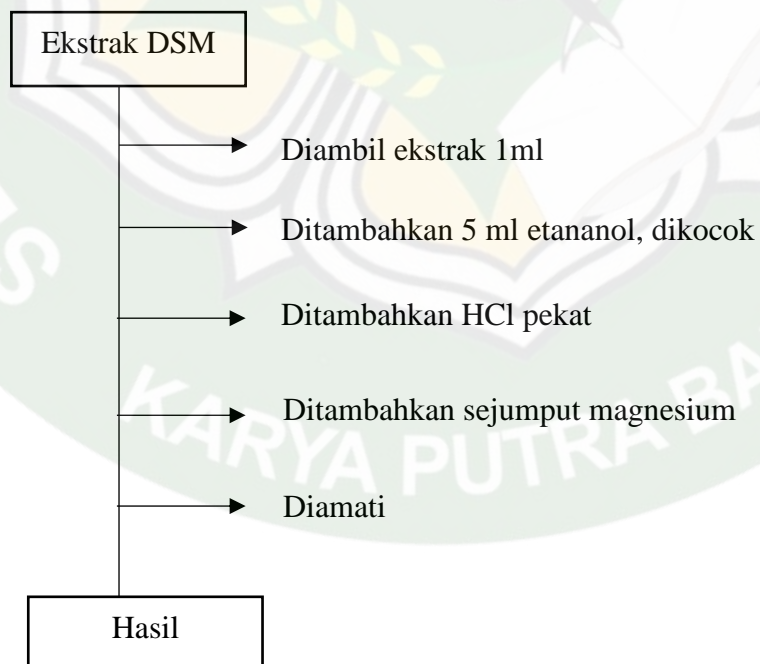
3. Uji bebas etanol



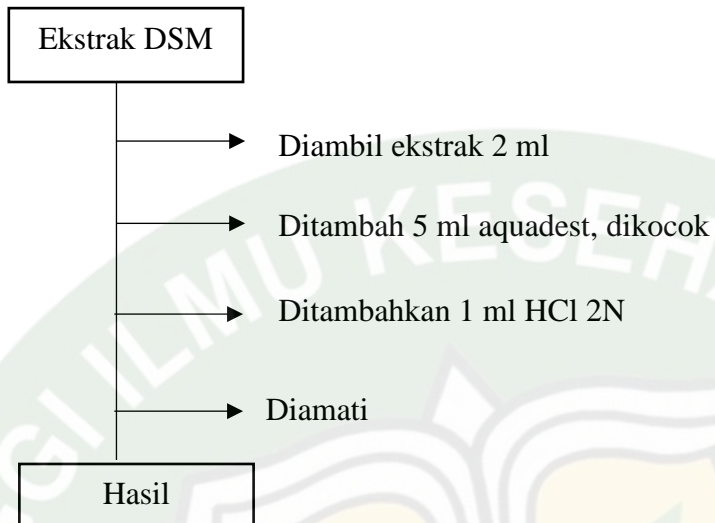
*keterangan : tidak adanya perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan menunjukkan bahwa ekstrak bebas etanol.

4. Skrining fitokimia

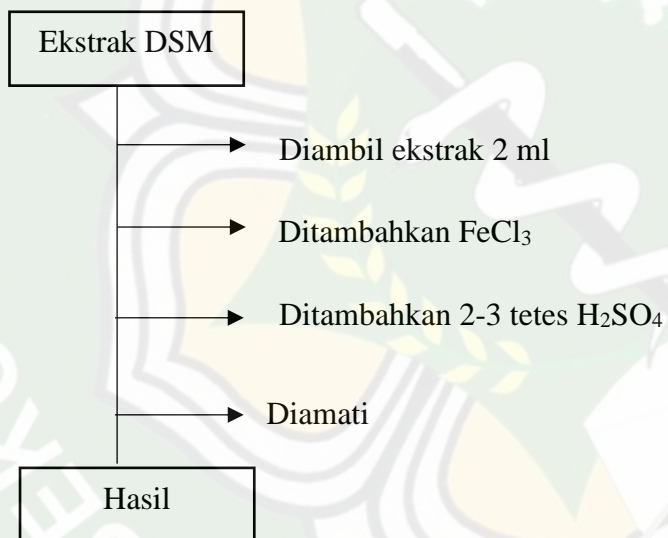
a. Flavonoid



*Keterangan : positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah

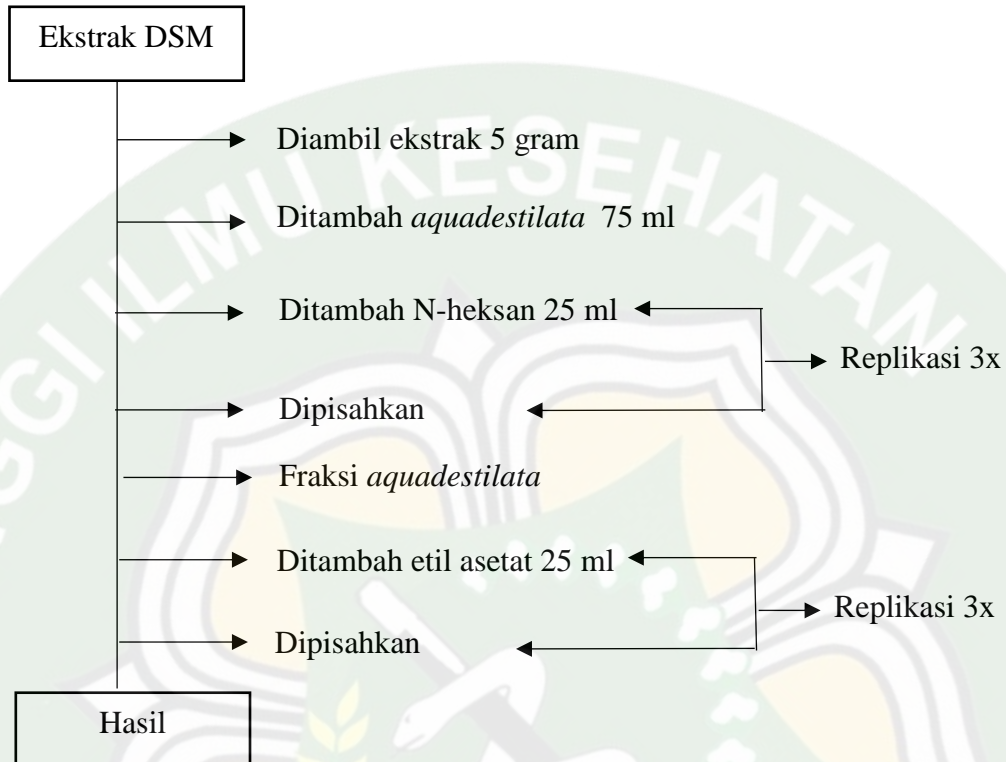
b. Saponin

*keterangan : positif saponin dengan terbentuknya busa stabil

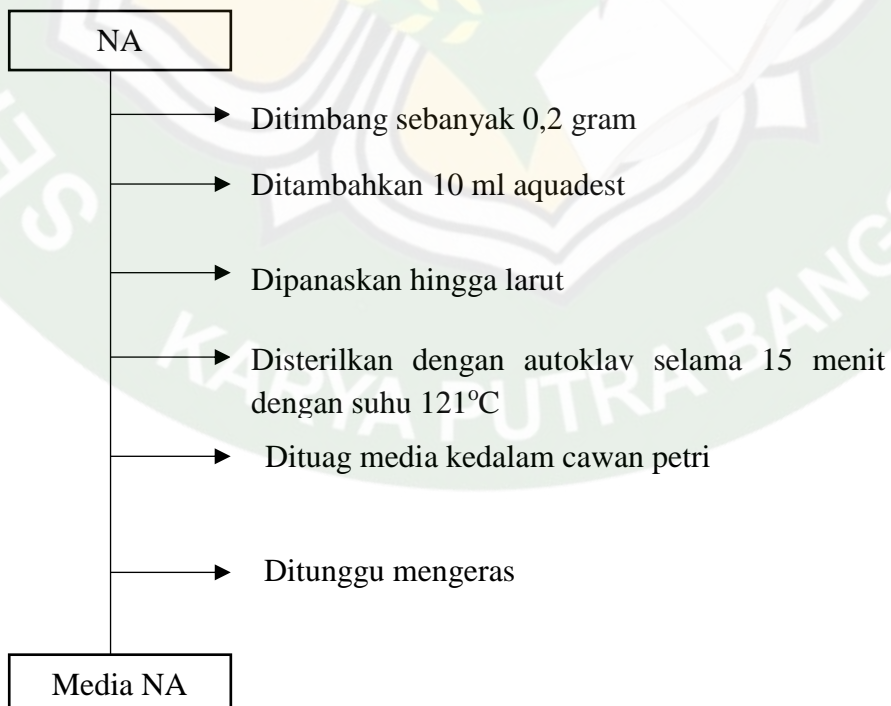
c. Tanin

*keterangan : positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya larutan kuning kecoklatan

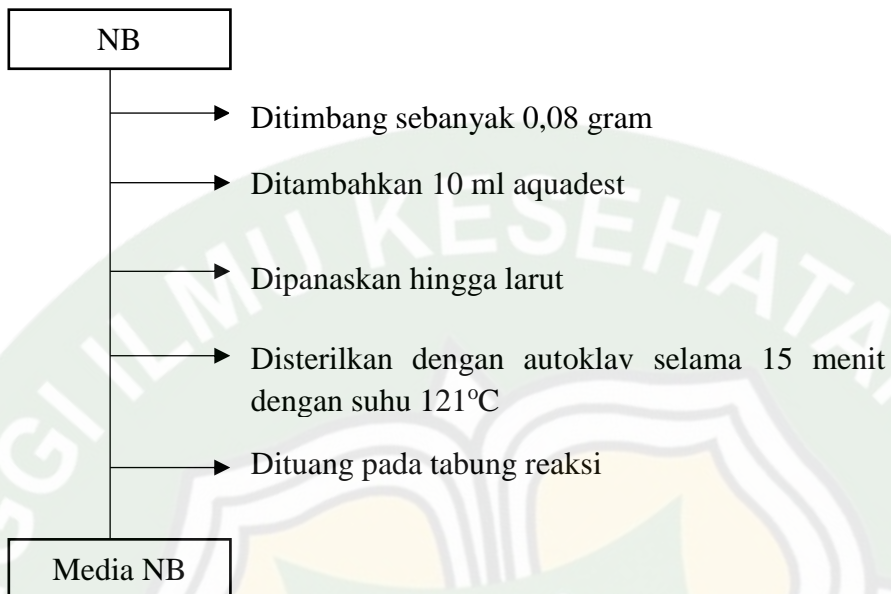
5. Pembuatan fraksi DSM



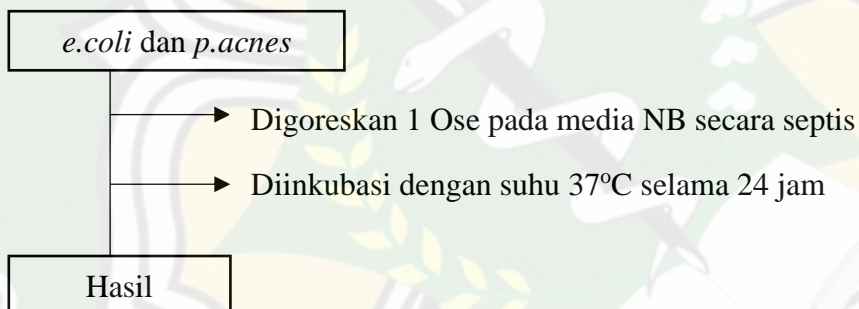
6. Pembuatan media pertumbuhan bakteri



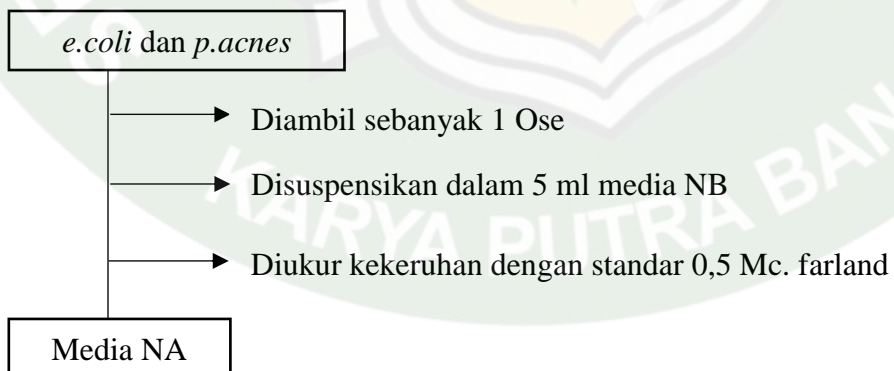
7. Pembuatan media NB



8. Peremajaan bakteri



9. Pembuatan suspense bakteri



10. Uji aktivitas antibakteri fraksi DSM

