

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN SIRIH (*PIPER BETLE L*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *STREPTOCOCCUS MUTANS* SECARA *IN VITRO*

¹Willia Novita

¹Program Studi Kesehatan Masyarakat FKIK Universitas Jambi

Email: wilianovitaer@yahoo.co.id

Abstract

One of natural ingredient that is often used as a medicinal plant is betel leaf (*Piper betle L*). *Streptococcus mutans* is a gram-positive bacteria and normal flora of the oral cavity. Dental caries is a disease that is localized dental hard tissue damage that occurs due to the interaction between the host (teeth), bacteria, substrate (diet), and time. The purpose of this study was to determine the effectiveness of antibacterial fraction of betel leaf (*Piper betle L*) against *Streptococcus mutans* bacterial growth in vitro. This research includes laboratory experimental study in vitro. The samples were bacterium *Streptococcus mutans*. Fraction of betel leaf samples were divided in 6 concentration, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml with a comparison of ciprofloxacin. Analyze data using homogeneity test using Levene test/Smirnov Kolmogorof, T test, Anova and post hoc, all analyzes using SPSS. The results of this study showed that the active fraction is N-hexane. N-hexane fraction had a MIC value of 1,25 mg/ml against *Streptococcus mutans* bacteria. Class of active compounds are contained phenol. Based on the results of statistical tests ciprofloxacin was more effective when compared with N-hexane fraction of the bacteria *Streptococcus mutans* with p value < 0.05

Keywords : *Streptococcus mutans*, betel leaf (*Piper betle L*), experimental studies, in vitro.

Abstrak

Salah satu bahan alam yang sering digunakan sebagai tanaman obat adalah daun sirih (*Piper betle L*). *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif dan merupakan flora normal rongga mulut. Karies gigi merupakan penyakit gigi terlokalisir yang merusak jaringan keras gigi yang terjadi karena adanya interaksi antara *host* (gigi), bakteri, substrat (*diet*), dan waktu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas antibakteri fraksi daun sirih (*Piper betle L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*. Sampel penelitian adalah bakteri *Streptococcus mutans*. Sampel fraksi daun sirih dibagi menjadi 6 konsentrasi yaitu 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml dengan perbandingan siprofloksasin. Analisa data menggunakan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene/Smirnov Kolmogorof, Uji T, Anova dan *Post hoc*, semua analisa menggunakan program SPSS. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi yang aktif adalah N-heksan. Fraksi N-heksan memiliki nilai KHM 1,25 mg/ml terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Golongan senyawa aktif yang terkandung adalah fenol. Berdasarkan hasil uji statistik siprofloksasin masih lebih efektif bila dibandingkan dengan fraksi N-heksan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan p value < 0,05.

Kata Kunci : *Streptococcus mutans*, daun sirih (*Piper betle L*), penelitian eksperimen, in vitro.

PENDAHULUAN

Kesehatan gigi dan mulut merupakan faktor yang sangat penting untuk diperhatikan. Bila kesehatan gigi dan mulut diabaikan bisa menimbulkan masalah baik pada gigi dan mulut itu sendiri maupun kesehatan tubuh secara umum. Salah satu bentuk kerusakan gigi adalah karies gigi. Karies gigi atau gigi berlubang merupakan penyakit gigi terlokalisir yang merusak jaringan keras gigi yang terjadi karena adanya interaksi dari beberapa faktor, yaitu *host* (gigi), bakteri, substrat (*diet*), dan waktu. Karies disebabkan karena terabaikannya kebersihan rongga mulut sehingga terjadi penumpukan plak. Plak adalah lapisan tipis yang melekat erat dipermukaan gigi serta mengandung kumpulan bakteri (Beighton, 2007).

Penyakit ini tersebar di seluruh dunia dan berdampak menimbulkan gangguan pada tubuh, seperti gangguan fungsi pengunyahan, penyerapan makanan, dan pencernaan. Selain itu juga dapat bermanifestasi menjadi penyakit sistemik karena gigi yang berlubang dapat menjadi sumber infeksi. Bakteri yang berperan penting dalam pembentukan plak adalah bakteri yang mampu membentuk polisakarida ekstraseluler, yaitu bakteri dari genus *Streptococcus*. Proses karies ditandai dengan terjadinya demineralisasi pada jaringan keras gigi, diikuti dengan kerusakan bahan organiknya. Koloni *Streptococcus mutans* memfermentasi sukrosa menjadi asam. Asam yang dihasilkan dapat mempercepat pemasakan plak yang berakibat pada turunnya pH permukaan gigi. Apabila pH tersebut terus turun hingga

angka kritis (5,2-5,5), maka email gigi akan larut dan timbulah karies gigi. Hal ini akan menyebabkan terjadinya invasi bakteri dan kerusakan jaringan pulpa serta penyebaran ke jaringan periapikal dan menimbulkan rasa sakit atau nyeri (Marsh, 2005).

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil, dan anaerob fakultatif yang dapat memetabolisme karbohidrat (Fani dkk., 2007). *Streptococcus mutans* pertama kali diisolasi dari plak gigi oleh Clark pada tahun 1924. Clark menyatakan bahwa bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri utama penyebab terjadinya karies (McCracken & Cawson, 1983).

Tumbuhan obat merupakan sumber bahan obat tradisional yang banyak digunakan secara turun-temurun. Pemanfaatan bahan alam dapat dipilih sebagai salah satu alternatif pencegahan karies gigi. Bahan alam dimanfaatkan karena sejak dahulu masyarakat sudah mempercayai bahan-bahan alam yang mampu menyembuhkan berbagai macam penyakit. Selain itu, bahan alami herbal menjadi pilihan alternatif karena mudah didapat, harga relatif murah, dan jarang menimbulkan efek samping dibandingkan obat-obatan yang dibuat dari bahan sintetis (Fauzi, 2008).

Daun sirih merupakan tumbuhan obat tradisional disekitar kita. Masyarakat Indonesia sendiri telah mengenal daun sirih sebagai bahan untuk menginang dengan keyakinan bahwa daun sirih dapat menguatkan gigi, menyembuhkan luka-luka kecil di mulut, menghilangkan bau badan,

menghentikan perdarahan gusi, dan sebagai obat kumur (Yendriwati, 2008).

Jenis-jenis sirih yang ada di Indonesia antara lain sirih hijau, sirih merah, sirih hitam, sirih kuning, dan sirih perak (Reveny, 2011). Berbagai komponen utama dari daun sirih menunjukkan adanya efek antiseptik, bakterisidal, dan antioksidan. Kandungan kimianya bersifat antiseptik karena daun sirih mengandung minyak atsiri. Daya antibakteri minyak atsiri daun sirih disebabkan kandungan senyawa fenol dan turunannya yang dapat mendenaturasi protein sel bakteri. Heyne (1987) menyebutkan, komponen utama minyak atsiri terdiri dari fenol dan senyawa turunannya, salah satunya adalah kavikol yang memiliki daya bakterisida lima kali lebih kuat dibandingkan fenol (Hasim, 2003).

Di kawasan Asia Tenggara, *Piper betle* L merupakan salah satu tanaman yang telah dikaitkan dalam pengendalian karies, penyakit periodontal dan mengontrol halitosis. Beberapa bukti menunjukkan bahwa daun sirih memiliki kemampuan untuk meningkatkan imun tubuh seperti anti-kanker dan anti-bakteri. Berbagai komponen utama dari daun sirih juga menunjukkan adanya efek antiseptik, bakterisidal, dan antioksidan dalam daun sirih. Kandungan kimianya bersifat antiseptik karena daun sirih mengandung minyak atsiri. Daya antibakteri minyak atsiri daun sirih disebabkan kandungan senyawa fenol dan turunannya yang dapat mendenaturasi protein sel bakteri. Heyne (1987) menyebutkan, komponen utama minyak atsiri terdiri dari fenol dan senyawa turunannya, salah satunya adalah kavikol

yang memiliki daya bakterisida lima kali lebih kuat dibandingkan fenol (Hasim, 2003).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dalam bentuk *in vitro*. Pembuatan ekstrak dan fraksi dilakukan di Laboratorium Bersama FMIPA Universitas Sriwijaya Indralaya dan uji efektivitas antibakteri dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang.

Sampel penelitian menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang. Besar sampel penelitian ditentukan dengan menggunakan rumus Federer yaitu: $(t-1)(r-1) 15$

Pada penelitian ini kelompok perlakuan adalah konsentrasi pelarut dalam enam gradien konsentrasi. Untuk kontrol positif digunakan siprofloksasin (5 μ g) dan untuk kontrol negatif digunakan aquades.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, kapas lidi steril, lampu spiritus, labu erlenmeyer, pinset, pipet tetes, jarum ose, kertas cakram berdiameter 6 mm, kertas label, kertas saring, plat silica gel CF₂₅₄, penangas air, magnetic stirrer, shaker, soxhlet, inkubator, jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm, timbangan analitik, autoklaf, kromatografi cair vakum (KCV). Bahan yang digunakan adalah bakteri *Streptococcus mutans*, simplisia daun sirih (*Piper betle* L), metanol 96%, aquades, blood agar base, pelarut N-heksan, etilasetat, etanol, siprofloksasin 5 μ g, bakteri *Streptococcus mutans*, darah domba, pelarut dimetilsulfoksida (DMSO) dan H₂SO₄.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Daun Sirih (*Piper betle* L)

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Simplisia Daun Sirih (*Piper betle* L)

No	Berat Simplisia (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Persen Berat Ekstrak (%)
1	250	78,2	31,28

Dari tabel 1 dapat dilihat simplisia daun sirih (*Piper betle* L) sebanyak 250 gram setelah dilakukan ekstraksi maka diperoleh berat ekstrak sebanyak 78,2 gram (31,28 %). Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Streptococcus mutans* dan didapatkan hasil bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro* yang dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram sebesar 6 mm.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi cara dingin (maserasi) yaitu maserasi merupakan proses pengekstraksian sederhana dengan cara merendam simplisia daun sirih dengan pelarut metanol sebanyak 1000 ml selama 24 jam sehingga sampel menjadi lunak dan larut. Menurut Harborne (1987), metode maserasi digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari.

Proses yang terjadi selama ekstraksi adalah pemisahan senyawa-senyawa dalam simplisia keluar dari simplisia dan melarutnya kandungan senyawa kimia oleh pelarut keluar dari sel tanaman melalui proses difusi dengan 3 tahapan yaitu : penentrasi pelarut ke dalam sel tanaman sehingga terjadi pengembangan (*swelling*) sel tanaman.

Pada tahap kedua adalah proses disolusi yaitu melarutnya kandungan senyawa didalam pelarut, Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Tahap ketiga adalah difusi dari senyawa tanaman, keluar dari sel tanaman (simplisia), larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh pelarut dengan konsentrasi rendah

B. Fraksinasi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L)

Berdasarkan hasil fraksinasi cair-cair ekstrak daun sirih didapatkan berat fraksi yang dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 2. Hasil Fraksinasi Ekstrak Daun Sirih

No	Pelarut	Berat Fraksi (gram)	Persen berat (%)
1	N-heksan	17,5	23,33
2	Etil asetat	27,5	36,67
3	Metanol	30	40

Dari Tabel 2 dapat dilihat hasil fraksinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan pelarut metanol memiliki berat yang lebih besar yaitu 30 gram (40%) dibandingkan dengan berat etil asetat 27,5 gram (36,67%) dan N-heksan sebesar 17,5 gram (23,33%). Berat fraksi yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari pelarut yang digunakan, namun besar kecilnya kemampuan antibakteri suatu fraksi tidak dipengaruhi oleh berat fraksi. Fraksinasi cair-cair bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa kimia dalam campuran senyawa dengan menggunakan beberapa metode pemisahan. Fraksinasi dilakukan dengan bertahap, fraksinasi dapat dilakukan dengan memperhatikan kepolaran pelarut yang digunakan dengan metode cair-cair. Berat fraksi yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari pelarut yang digunakan, namun besar kecilnya kemampuan antibakteri suatu fraksi tidak dipengaruhi oleh berat fraksi. Metode fraksinasi ini melibatkan distribusi suatu zat terlarut (solut) di antara dua pelarut yang tidak bercampur. Solut akan terdistribusi dengan sendirinya ke dalam dua pelarut tersebut setelah dikocok dan dibiarkan terpisah. Pelarut yang

digunakan pada fraksinasi adalah pelarut N-heksan, etil asetat dan metanol. Pelarut-pelarut ini mempunyai kemampuan untuk menarik senyawa yang terdapat dalam

ekstrak secara berbeda-beda. N-heksan adalah pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar, etil asetat adalah pelarut semi polar akan melarutkan senyawa semi polar dan metanol adalah pelarut polar akan melarutkan senyawa polar. (Laksono, 2012).

C. Uji Sensitifitas Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* terlebih dahulu dilakukan uji sensitivitas dengan menggunakan kertas cakram yang mengandung Siprofloksasin. Uji sensitivitas bakteri merupakan suatu metode untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri terhadap zat antibakteri dan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri.

Tabel 3. Hasil Uji Sensitifitas *Streptococcus mutans* dengan Siprofloksasin

No	Antibiotik	Diameter Hambat (mm)
1	Siprofloksasin	20

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa siprofloksasin menghasilkan diameter hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* sebesar 20 mm.

Sensitivitas merupakan zona hambat yang terjadi pada antibiotik terhadap bakteri sedangkan resistensi merupakan zona hambat antibiotik yang tidak terjadi terhadap bakteri. Apabila tampak adanya zona hambatan pertumbuhan kuman disekeliling cakram antibiotika, maka kuman yang diperiksa sensitif terhadap antibiotika

tersebut (Capuccino, J.G & Sherman, N. 1992).

D. Uji Aktivitas Antibakteri fraksi Daun sirih (*Piper betle* L)

Uji aktivitas antibakteri dari fraksi N-heksan, etil asetat dan metanol air dilakukan dengan metode difusi agar untuk mengetahui dalam fraksi mana senyawa aktif berada. Konsentrasi fraksi yang digunakan adalah 10 mg/ml dengan pelarut dimetilsulfoksida.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-heksan, Etil asetat dan Metanol

No	Jenis Fraksi	Diameter Hambat (mm)
1	Fraksi N-heksan	16
2	Fraksi Etil asetat	9
3	Fraksi Metanol air	-

Dari tabel 4 dapat dilihat bahwa fraksi N-heksan mempunyai diameter zona hambatan terbesar terhadap *Streptococcus mutans* yaitu sebesar 16 mm, fraksi etilasetat 9 mm sedangkan fraksi methanol dan aquades tidak mempunyai diameter zona hambat. Berdasarkan hasil pengukuran diameter hambat menunjukkan bahwa fraksi N-heksan daun sirih (*Piper betle* L) memiliki daya hambat kuat terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Metode difusi cakram adalah metode yang paling sering digunakan dimana cara kerja difusi cakram yaitu antibakteri fraksi yang akan diuji diserapkan pada kertas cakram dan

ditempelkan pada media agar yang telah dihomogenkan dengan bakteri kemudian diinkubasi sampai terlihat zona hambat didaerah sekitar cakram. Penentuan kriteria ini berdasarkan Davis dan Stout (1971) yang menyebutkan bahwa kekuatan daya antibakteri yaitu 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan 5 mm atau kurang berarti lemah.

E. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Fraksi N-heksan daun sirih (*Piper betle* L)

Hasil uji aktifitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi N-heksan aktif terhadap *Streptococcus mutans*. Dalam penelitian ini penentuan konsentrasi hambat minimum berdasarkan penurunan konsentrasi yang dimulai dari 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml dengan 5 kali pengulangan. Tujuannya

untuk mengetahui jumlah terkecil zat aktif antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan organisme yang diuji. KHM dinyatakan sebagai konsentrasi terendah dari zat antibakteri fraksi N-heksan dari daun sirih (*Piper betle* L) yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Tabel 5. Rerata diameter hambat (mm) fraksi N-heksan terhadap *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi.

Konsentrasi (mg/ml)	N	Rerata \pm standar deviasi diameter hambat fraksi etil asetat
10	5	16,00 \pm 1,41
5	5	12,40 \pm 1,14
2,5	5	10,00 \pm 1,41
1,25	5	7,20 \pm 1,09
0,625	5	1,40 \pm 1,14
0,3125	5	0,60 \pm 0,54

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa fraksi N-heksan dengan konsentrasi 10 mg/ml mempunyai diameter hambat terbesar yaitu 16 mm terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Zona bening menunjukkan adanya diameter hambat pada masing-masing konsentrasi dimana diameter hambat dari masing-masing konsentrasi mengalami penurunan sesuai dengan penurunan nilai konsentrasi sehingga dapat diketahui bahwa besarnya konsentrasi dan diameter hambat memiliki hubungan yang berbanding lurus satu sama lain. Semakin besar diameter hambat maka semakin aktif zat uji tersebut sebagai antibakteri yang menunjukkan bahwa

semakin banyak bakteri yang dapat dihambat pada pertumbuhannya oleh zat uji.

Pada penelitian ini konsentrasi fraksi N-heksan yang masih menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* adalah 1,25 mg/ml dengan diameter hambat 7,20 mm, konsentrasi ini dinyatakan sebagai nilai KHM. Pada penelitian sebelumnya ekstrak daun sirih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro* (Pratiwi, 2008). Jika dilihat dari perbedaan konsentrasi tersebut, hal ini dapat menunjukkan bahwa proses fraksinasi lebih baik daya hambatnya dibandingkan dengan proses ekstraksi, konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur

pada proses fraksinasi lebih kecil dibandingkan konsentrasi yang digunakan pada proses ekstraksi.

Perbedaan besarnya zona hambat pada masing-masing konsentrasi dapat diakibatkan antara lain perbedaan besar kecilnya konsentrasi atau sedikitnya kandungan zat aktif antimikroba yang terkandung di dalam fraksi, kecepatan difusi bahan antimikroba ke dalam medium, kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan temperatur inkubasi, pH lingkungan, komponen media, waktu inkubasi, dan

aktivitas metabolik mikroorganisme (Salni, 2011).

Dari hasil pengukuran diameter hambat tersebut fraksi N-heksan memiliki daya hambat sedang hingga kuat terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Menurut Volk *et al.*, (1993) konsentrasi senyawa antibakteri yang terkandung dalam fraksi akan mempengaruhi aktivitas antibakteri. Untuk mengetahui perbandingan rata-rata diameter hambat fraksi N-heksan daun sirih (*Piper betle* L) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada table dibawah ini.

Tabel 6. Perbandingan efektifitas fraksi N-heksan terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Konsentrasi fraksi (mg/ml)	Konsentrasi fraksi (mg/ml)	<i>p value</i>
10	5	0.025
	2,5	0.001
	1,25	0.000
	0,625	0.000
	0,3125	0.000
5	2,5	0.099
	1,25	0.000
	0,625	0.000
	0,3125	0.000
2,5	1,25	0.052
	0,625	0.001
	0,3125	0.000
1,25	0,625	0.000
	0,3125	0.000
0,625	0,3125	0.242

Uji t $p=0,05$

Dari Tabel 6 dapat dilihat bahwa konsentrasi N-heksan yang paling efektif adalah konsentrasi 1,25 mg/ml. Setelah dilakukan uji t tidak berpasangan maka dilanjutkan dengan uji *oneway anova* berdasarkan uji tersebut didapatkan perbandingan diameter hambat fraksi N-

heksan menunjukkan ada perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan analisis *post hoc* untuk melihat perbedaan rata-rata diameter hamabat pada masing-masing konsentrasi dan dibandingkan dengan siprofloksasin.

Tabel Uji 7. Kesesuaian dosis antara fraksi N-heksan dan siprofloksasin terhadap bakteri

<i>Streptococcus mutans</i>		
Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi	<i>p value</i>
10	5	0.000
	2,5	0.000
	1,25	0.000
	0,625	0.000
	0,3125	0.000
	5*	0.021
5	2,5	0.021
	1,25	0.000
	0,625	0.000
	0,3125	0.000
	5*	0.000
2,5	1,25	0.004
	0,625	0.000
	0,3125	0.000
	5*	0.000
1,25	0,625	0.000
	0,3125	0.000
	5*	0.000
0,625	0,3125	0.926
	5*	0.000
0,3125	5*	0.000

Uji *Post hoc* $p=0,05$

Siprofloksasin*

Dari tabel 7 dapat disimpulkan bahwa siprofloksasin lebih efektif bila dibandingkan dengan fraksi N-heksan (p value < 0,05). Sehingga perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan efektivitas fraksi daun sirih, salah satunya dengan jalan isolasi senyawa aktif dari larutan uji. Isolasi senyawa akan menghasilkan senyawa yang lebih spesifik sehingga aktivitasnya akan lebih spesifik karena tidak ada lagi senyawa-senyawa lain yang bisa mengganggu aktivitas antibakteri larutan uji.

F. Uji bioautografi dan penentuan golongan senyawa

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi aktif daun sirih adalah fraksi N-heksan, selanjutnya dilakukan uji bioautografi. Uji bioautografi dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa dan harga Retordansi factor (Rf)

senyawa aktif antibakteri dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) plat silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan perbandingan eluen yang sesuai sebagai fase gerak dan H₂SO₄ 10% untuk penampak bercak yang memiliki aktivitas antijamur (Pratiwi, 2008). Pada cawan petri yang telah berisi biakan bakteri, bercak bahan bioaktif yang terbentuk setelah ada pemisahan diletakkan ke dalam cawan petri, dibiarkan menempel pada medium adar selama 1 jam supaya bahan bioaktif berdifusi ke dalam agar. Setelah kromatogram diangkat dari cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah 24 jam dilihat zona bening yang merupakan daerah aktif berada.

Tabel 8. Hasil Uji Bioautografi Dan Penentuan Golongan Senyawa Aktif Daun sirih (Piperbetle L)

Jenis fraksi	Eluen 8:2	Rf	Warna	Senyawa aktif
N-heksan	N-heksan:etil asetat	0,42	Kuning muda	Fenol

Terbentuknya zona bening pada uji bioautografi pada media uji menunjukkan hambatan pertumbuhan bakteri yang merupakan daerah senyawa aktif. Dari tabel 8, pada fraksi aktif N-heksan terdapat bercak kuning muda ini menunjukkan bahwa dalam fraksi N-heksan terdapat senyawa fenol dengan nilai Rf 0,42.

Senyawa fenol memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein pada membran sel. Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga

mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Dimana sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak (Singh, 2005). Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dan sel bakteri menjadi terganggu yang akan berakibat pada lolosnya makromolekul dan ion dari sel sehingga sel bakteri kehilangan bentuknya dan terjadilah lisis (Susanti, 2008)

Senyawa fenol sebagai antibakteri pada konsentrasi rendah adalah dengan merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran pada inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Aktivitas tersebut sangat efektif ketika bakteri pada tahap pembelahan dimana lapisan fosfolipid diselingi sel sedang dalam kondisi sangat tipis sehingga fenol dengan mudah merusak isi sel (Volk & Wheller, 1984)

Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan Nalina, dkk (2006) daun sirih mengandung minyak atsiri di mana komponen utamanya terdiri atas fenol dan senyawa turunannya seperti kavikol, kavibetol, karvakol, eugenol, dan allilpyrocatekol. Selain minyak atsiri, daun sirih juga mengandung karoten, tiamin, riboflavin, asam nikotinat, vitamin C, tanin, gula, pati, dan asam amino.

Minyak atsiri menghambat biosintesa protein dan asam nukleat, gangguan pada pembentukan protein dan asam nukleat akan menyebabkan kerusakan total pada sel. Menurut Siswandono dan Bambang, turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada konsentrasi tertentu terbentuk kompleks protein fenol ke dalam sel bakteri dan menyebabkan koagulasi protein membrane sehingga membrane sel bakteri menjadi lisis, selain itu dapat juga menyebabkan timbulnya kebocoran konstituen sel yang esensial sehingga sel bakteri mengalami kematian (Pratiwi, 2008). Mekanisme fenol sebagai agen anti bakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma,

merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Fenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktifkan enzim dan menyebabkan kebocoran sel (Hariana, 2007).

Bakteri gram positif memiliki dinding sel dengan peptidoglikan lebih banyak, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida. Ikatan peptidoglikan ini secara mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Senyawa fenol mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel (Dewi, 2010). Peptidoglikan merupakan lapisan esensial bagi keberlangsungan hidup bakteri pada lingkungan hipotonis. Kerusakan lapisan ini mengakibatkan kekakuan dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan kematian. Corn and Stumpf 1976 dalam Rahayu (2009) menyatakan bahwa dinding sel bakteri gram positif akan bermuatan negatif sebagai akibat dari ionisasi gugus fosfat dari polisakarida pada dinding struktur dinding selnya. Senyawa fenol pada pH rendah akan bermuatan positif, sehingga fenol tidak akan terionisasi. Perbedaan muatan ini menyebabkan terjadinya tarik menarik antara fenol dengan dinding sel, sehingga fenol secara keseluruhan akan lebih melekat atau melewati dinding sel bakteri gram positif.

KESIMPULAN

1. Terdapat perbedaan efektivitas antibakteri fraksi daun sirih (*Piper betle* L) dengan siprofloksasin terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

2. Fraksi daun sirih (*Piper betle* L) yang memiliki aktivitas tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* adalah fraksi N-heksan.
3. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dari fraksi aktif daun sirih (*Piper betle* L) adalah pada konsentrasi 1,25 mg/ml.
4. Golongan senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri *Streptococcus mutans* adalah fenol.
5. Siprofloksasin (5µg) masih lebih efektif bila dibandingkan dengan fraksi aktif daun sirih (*Piper betle* L) 1,25 mg/ml dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Saran

1. Penelitian mengenai isolasi senyawa aktif yang akan menghasilkan senyawa yang lebih efektif.
2. Sebaiknya dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai kesetaraan dosis antibakteri dengan konsentrasi dari fraksi daun sirih (*Piper betle* L).
3. Sebaiknya dilakukan pengujian lebih lanjut toksisitas fraksi dan senyawa murni daun sirih (*Piper betle* L) yang diperoleh terhadap hewan percobaan secara *in vivo* dan dilanjutkan dengan pengujian secara klinis.

Daftar Pustaka

1. Ajizah A., 2004. *Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava* L. Bioscientiae, Vol. 1, No. 1 : 31-8.
2. Andarwulan, N., C.H. Wijaya, dan D. T. Cahyono. 1996. *Aktivitas Antioksidan Daun Sirih (Piper betle L.)* Buletin teknologi dan industri pangan, Fakultas Tehnologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
3. Backer, C.A., Bakhuzien van den Brink, Jr, R, C. 1963. *Flora of Java*. Vol I. Wolters-Noordhoff N.V Gronigen, Netherlands.
4. Beighton, D.B. 2007. Dental caries and pulpitis. In: Ireland R, eds. *Dental hygiene and therapy*. Oxford: Blackwell Munksgaard, : 76, 83, 86-90.
5. Brooks GF, Butel JS dan Morse SA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Alih bahasa: Mudihardi E, Kuntaman, Wasito EB, et al. Edisi Pertama. Jakarta: Salemba Medika: 301-8, 317-26.
6. Carranza FA. 2006. *Clinical Periodontology*. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, Inc. 9. p. 24.
7. Cawson, R.A dan Odell. 2002. *Essential of Oral Pathology an Oral Medicine*. 7th Spain : Churchill Livingstone.
8. Caludio MP, Joyce PM, Paula NR, Alberto MJ, Roberto FML, Gluseppe AR. 2003. *Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis a double blind study*. *Pesqui Odontol Bras*: 17(4); 316-7.
9. Cowan, M. M., 1999. *Plant Products as Antimicrobial Agents, Clinical Microbiology Reviews*.

10. Da Silva DD, Goncalo CS, De Sousa MLR, Wada RS. 2004. *Aggregation of plaque disclosing agent in a dentifrice*. J Appl Oral Sci; 12(2): 154–8.
11. Davis & Stout. (1971). *Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay*. Journal Of Microbiology. Vol 22 No 4.
12. Dharma, AR .2001. *Tanaman Obat Tradisional Indonesia*. Balai Pustaka.Jakarta
13. Edberg, S.C. 1986. *Tes Kerentanan Antimikroba In vitro*. Terjemahan oleh: Andrianto, P. EGC, Jakarta.
14. Fani MM, Kohanteb J, Dayagghi M. 2007. *Inhibitory activity of garlic (Allium sativum) extract on multidrug-resistant Streptococcus mutans*. J Indian soc Pedod Prevent Dent: 164.
15. Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia. hal. 107-108.
16. Farnsworth, N.R. 1996. *Biological and Phytochemical Screening of Plants*. Journal of Pharmaceutical Sciences vol 55 number 3.
17. Fathilah, A.R. *Piper betle l and psidium guajava l in oral health maintenance*. Journal Of Medical Plants Research. 2011: 5(2), p 156-63.
18. Fauzi, Ahmad Dodi. 2008. *Panduan lengkap manfaat tanaman obat*. Edsa Mahkota. Jakarta.
19. Featherstone JDB.2006. *Caries prevention and reversal based on the caries balance*. Pediatric Dentistry; 28 (2)
20. Forrest J O. 1995. *Pencegahan Penyakit Mulut*. Jakarta : Hipokrates:p.38 – 70.
21. Gunawan, I.W.A. ,2009. *Potensi Buah Pare (Momordica charantia) Sebagai Antibakteri Salmonella Typhimurium*.Universitas Mahasaraswati, Denpasar
22. Gupta, 1990, *Mikrobiologi Dasar edisi III*, diterjemahkam oleh Julius, E.S., Binarupa Aksara, Jakarta.
23. Gurenlian, J. A. R. 2007. *The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health: J of Dent. Hyg.* 4 – 5.
24. Haake SK, Meyer DH, Paula M, Fives-Taylor, Schenkein H.2000. *Periodontal disease*. In: Lamont RJ, Lantz MS, Burne RA, LeBlanc DJ. *Oral microbiology and immunology*. Washington DC:ASM Press:253-94.
25. Hamid, Fahmi M. 2008. *Dental Plaque*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jawa timur.
26. Harbone, J.B. 1994. *Pytochemical Methode : Aguide to modern teqniques of plant analysis*. chapman and Hall. New York.
27. Hariana, A. H. 2007. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta : Penebar Swadaya.
28. Hasim. 2003. *Daun Sirih sebagai Antibakteri dalam Pasta Gigi*. <http://www.kompas.com> [diakses 2 Februari 2012].
29. Hermawan A, Eliyani H, Tyasningsih W. *Pengaruh ekstrak daun sirih (Piper betle L) terhadap pertumbuhan Staphylococcus aureus dan Eschericia coli dengan metode difusi disk*. Artikel Ilmiah. Surabaya: Universitas Airlangga, 2007: 2.
30. Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid II. Cetakan I. Yayasan Sarana Wana Jaya Jakarta: 622-627.
31. Indrawati, R. Retno.1999. *Prevalensi Serotipe Streptococcus mutans yang Dominan pada Anak-Anak TK di Surabaya*.Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi Edisi Khusus FORIL VI. Hal: 11-15.
32. Ira W. 2011.*Sukses agribisnis minyak atsiri*. Yogyakarta
33. Irmasari, A.2002. *Perbandingan Daya Antibakteri Antara Gerusan Daun Sirih Hitam, Sirih Jawa Dengan Oksitetrasiklin Terhadap Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. *Skripsi*

34. Jawetz. Melnick. Adelberg. (2008). Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23. Jakarta : EGC.
35. Kartasapoetra,G. 2004. Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat,
36. Rineka cipta.Jakarta.25-26
37. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2007. The Bacterial Flora of Humans. <http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html>. (diakses 5 agustus 2013).
38. Kidd E A M, Bechal S J. 2003. Dasar – Dasar Karies Penyakit dan Penanggulangannya (Alih bahasa : Narlan Sumawinata dan Saffida Faruk). Jakarta : EGC. p . 2 – 4 : 76.
39. Klaus H, Rateitschak E M, Wolf H F, Hassel T M. 1989. Color Atlas of Dental Medicine Periodontology. New York : Thieme Medical Publisher, Inc. p.11 – 32.
40. Koesmiati, S. 1966. Daun sirih (*Piperbetle* Linn) sebagai desinfektan. *Skripsi*. Departemen Farmasi. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 65 hal.
41. Lay,B.W.1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*.PT.Raja Grafindo Persada. Jakata.
42. Laksono Bags Darahony, 2012. *Fraksinasi ekstrak halmida sp dengan menggunakan pelarut metanola dan heksan*, Universitas Padjajaran.
43. Madigan M.T., dkk. 2006. Biology Of Microorganism. 11th Edition. New Jersey. Pearson Prentice Hall.
44. Manson, J. D., Eley, B. M. 1993. Buku Ajar Periodonti. Jakarta : Hipokrates. p .22- 26 : 44 – 53.
45. Mapanggara, Surijana, dkk. 2005. *Pengaruh konsentrasi dan lama pemberian chlorhexidine terhadap daya hambat pertumbuhan streptococcus sanguis*. M.I. Kedokteran gigi 61:118
46. Marsh P.D., 2005. Dental Plaque: Biological Significance Of A Biofilm And Community Life-Style. Blackwell Munksgaard. Halaman 12.
47. Masduki, I. 1996, Efek Antibakteri Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) terhadap S. Aureus dan E. coli, *Cermin Dunia Kedokteran*, 109, 21-4 Educational and Professional Publishing Ltd; 2009: 15.
48. McCracken AW, Cawson RA. *Clinical and oral microbiology*. London: Hemisphere Publishing Corporation, 1983: 475.
49. Megananda, H.P., Herijulianti, E., Nurjanah, N. 2009. *Ilmu Pencegahan Penyakit Jaringan Keras dan Jaringan Pendukung Gigi*. Bandung : JKG Poltekkes Depkes. p. 57– 80 : 111 – 114.
50. Moeljanto RD, Mulyono. Khasiat dan manfaat daun sirih obat mujarab dari masa ke masa. Jakarta: Agromedia Pustaka, 2003, p 9.
51. Moerfiah, Fira DSS.2011. *Pengaruh ekstrak daun sirih merah (piper cf. fragile benth) terhadap bakteri penyebab sakit gigi*. Ekologia: 11, p 30-5.
52. Mursito, B. 2002. Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Malaria. PT. Penebar Swadaya, Jakarta
53. Naini, Amiyatu. 2006. Pengaruh ekstrak daun jambu biji (*psidium guajava* linn). Terhadap pertumbuhan streptococcus mutans. Indonesian Journal of Dentistry;12(2):95-98.
54. Nalina T, Sarah P, Nick ZHA.2003. *The Crude aqueous extract of pippier betle I and its antibacterial effect towards Streptococcus mutans*. Am J Biochem & Biotech: 3(7), p 105.
55. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology 10th ed. Philadelphia: W.B Saunders Company. 2006, p 46-63, 356-60, 362-4.
56. Nugraha, A. W. 2010. *Streptococcus mutans Si Plak Dimana – mana*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi USD.
57. Nurmala ST. *Dampak karies gigi dan penyakit periodontal terhadap kualitas hidup* Available from <http://library.usu.ac.id.html> Diakses 6 Desember 2012.

58. Oswald, T.T 1981 Tumbuhan Obat. Penerbit Bahratara Karya Aksara. Jakarta.
59. Oxoid Agents & Main Distribution,1998. *The Oxoid Manual*. Eight Edition. Oxoid Limited Wade Road. Hampshire. England.
60. Pelczar. M.J.dan E.C.S.Chan.2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. UI Press. Jakarta.
61. Picman, and Towers. 1990. Antibacterial Activity of Sesquiterpene Lactones. J. Nat Prod.
62. Piddock, Laura. 1990. *Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria*. Journal of Applied Bacteriology. 68: 307-18
63. Pintauli, Sondang, Taizo Hamada. 2008. *Menuju Gigi dan Mulut Sehat Pencegahan dan Pemeliharaan*.Medan: USU Press
64. Pocock , S. J. 2008. Clinical Trials A Practical Approach. England : Jhon Wiley & Sons Ltd. The Atrium, South Gate, Chichester, West Sussex.
65. Prahasanti, C. 2000. *Pengaruh Pasta Gigi yang Mengandung Ekstrak Daun Sirih terhadap Pertumbuhan Plak Gigi*.Majalah Kedokteran Gigivol.33 No.4.
66. Pratama, 2008, *Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (Salvadora Persica) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus Mutans Dan Staphylococcus Aureus Dengan Metode Difusi Agar*, ITS. Surabaya.
67. Pratiwi, R. 2008. *Perbedaan Daya Hambat Terhadap Streptococcus mutans dari Beberapa Pasta Gigi yang Mengandung Herbal*. Vol. 38 No. 2 April – Juni : Maj. Ked. Gigi: 64 - 67.
68. Rahayu. 2009. Budi Daya dan pengolahan Rosela. Agromedia Pustaka, Jakarta.
69. Reveny J. *Daya antimikroba ekstrak dan fraksi daun sirih (piper betle linn.)*. Jurnal Ilmu Dasar. 2011: 12, p 6-12.
70. Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (terj.), ed. 4, h. 157-62, Penerbit ITB Press, Bandung.
71. Rostiana, O., S. M. Rosita, dan D. Sitepu. 1991. *Keanekaragaman genotipa sirih (Piper betle Linn) asal dan penyebaran*. Warta Tumbuhan Obat Indonesia I (1) : 16-18.
72. Salni dkk, 2011. *Isolasi Senyawa Antibakteri dari Daun Jengkol (Pithecolobium lobatum Benth) dan penentuan Nilai KHM-nya*. Jurusan Biologi FMIPA.Universitas Sriwijaya. Sumatera Selatan.Indonesia.
73. Samaranayake, Lakshman. 2009. Essential Microbiology for Dentistry. Philadelphia : Elsevier.
74. Sastroamidjojo, S. 1997. Obat Asli Indonesia, Dian Rakyat, Jakarta
75. Schlegel, H.G., 1994. *Mikrobiologi Umum*, Edisi keenam, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
76. Scheld WM.2003.*Maintaining Fluoroquinolon Class Efficacy: Review of Influencing Factors*. *Emerging Infectious Disease*. Vol 9, No.1, January 2.
77. Setiabudy R. 1995.Antimikroba Lain. Dalam: Ganiswara SG. Farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Balai Penerbit FKUI, Jakarta: 682-5
78. Singh, I.P.bharate.2005.Anti HIV Natural Product. Journal Current Science.
79. Soediby, M. 1991. *Manfaat sirih dalam perawatan kesehatan dan kecantikan*. Warta Tumbuhan Obat Indonesia I (1) : 11-12.
80. Sudiro TM, Karuniawati A,2004. editor. *Hasil Uji Resistensi Bakteri terhadap Berbagai Antibiotika di Laboratorium Klinik Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*.
81. Suprastiwi E. 2010. *Efek Antimikroba Polifenol dari Teh Hijau Jepang Terhadap Streptococcus mutans*. Dep.1. Konsevasi Gigi FKG UI.

82. Susanti. 2008. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas Terhadap *Escherichia coli*. Jurnal Universitas Airlangga.
83. Syukur, C. dan Hernani. 1999. Budidaya Tanaman Obat Tradisional. PT.Penebar Swadaya, Jakarta.
84. The Human Health Impact of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter*. FDA
85. Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja. 2007. Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Edisi Keenam. Jakarta: Elex Media Komputindo.
86. Tortora, G.J. 2002, *Microbiology an Introduction*, Addison Wesley Longman Inc., San Fransisco, USA
87. Volk, W.A dan Wheller. 1993. Mikrobiologi Dasar, Edisi kelima, Jilid I, Penerbit Erlangga, Jakarta.
88. Waluyo. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah. Malang.
89. Widarto, A. 1990. *Pengaruh Mirryak Atsirih Daun Sirih (Piper betle L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli dan Staphylococcus aureus*. S, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
90. Wijayakusuma, H. M. H., S. Dalimartha dan A.S Wirian. 1992. Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia Jilid I. Pustaka Kartini. Jakarta.
91. Willett, N. P., White, R. R., Rosen, S. 1991. *Essential Dental Microbiology*. Connecticut : Appleton & Lange A Publishing Division of Prentice Hall.p. 326 – 334 : 337 – 338 : 346.
92. Yendriwati H. 2008. *Efek antibakteri sediaan daun sirih (piper betle l), obat kumur minyak essensial dan povidone iodine 1% terhadap streptococcus mutans*. Dentika Dental Jurnal: 13(2), p 145-8.
93. Yunita DPS. *Efek baking soda pasta gigi terhadap foetor ex ore*. Jurnal Kesehatan Masyarakat. 2011: 6(2), p 3