

Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Dan Daun Sirih (*Piper Betle L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*

NANIK SULISTYANI¹, RIEZKYNANTA FABRILLACLAUDY^{2*}

¹Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

²Program Studi Farmasi S1, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

*Penulis korespondensi, e-mail: riezkyanta1800023178@webmail.uad.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang: Jerawat merupakan kondisi kulit bermasalah yang dapat berefek pada psikologi manusia karena dapat merubah penampilan. Salah satu penyebab timbulnya jerawat yaitu adanya bakteri *Staphylococcus aureus*. Daun kelor (*Moringa oleifera*) dan daun sirih (*Piper betle L.*) memiliki potensi sebagai antibakteri karena kandungan senyawa bioaktif flavonoid, alkaloid, saponin dan fenolik. Penggunaan kombinasi bahan antibakteri berpotensi menghasilkan efek terapi yang sinergis

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun kelor (EDK) dan ekstrak daun sirih (EDS) serta potensi sinergisme terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Metode: Ekstraksi sampel daun dilakukan dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi. Aktivitas antibakteri EDK, EDS dan kombinasi EDK-EDS ditetapkan dengan metode mikrodilusi *checkerboard*. Konsentrasi EDK dan EDS untuk uji aktivitas antibakteri adalah 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; dan 10 mg/mL. Efek sinergisme ditetapkan berdasarkan nilai FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*).

Hasil: Nilai KHM (kadar hambat minimal) EDK terhadap *S. aureus* adalah 10mg/mL, sedangkan EDS 5 mg/mL. KHM kombinasi EDK-EDS terjadi pada campuran EDK 1,25 mg/mL dan EDS 0,615 mg/mL. Nilai KBM (kadar bunuh minimal) EDK maupun EDS adalah 10 mg/mL. Nilai KBM ditunjukkan pada kombinasi ekstrak yaitu campuran EDK 1,25 mg/mL dan EDS 0,615 mg/mL. Nilai FICI kombinasi EDK-EDS adalah 0,25, sehingga aktivitas antibakteri kombinasi EDK-EDS tergolong kategori sinergis.

Kesimpulan: Ekstrak EDK dan EDS memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Kombinasi kedua ekstrak menghasilkan efek antibakteri yang sinergis.

Kata Kunci: Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*); ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*); *Staphylococcus aureus*; sinergis

PENDAHULUAN

Permasalahan kulit yang sering terjadi pada kaum remaja yaitu jerawat, kulit berjerawat menyebabkan kondisi psikologis seseorang terganggu secara emosional. Berdasarkan penelitian bahwasanya respon psikologis perempuan memiliki tingkat respon psikologis lebih lemah daripada laki-laki (1)

Pemicu adanya jerawat berasal dari beberapa faktor yaitu hiperkeratinisasi folikel, hipersekresi sebum, proses inflamasi kronis pada kelenjar sebaceous dan kolonisasi bakteri. Beberapa bakteri yang dapat menimbulkan jerawat yaitu salah satunya *Staphylococcus aureus*, hal ini disebabkan terjadinya akumulasi neutrofil pada daerah lesi jerawat. Bakteri menghasilkan enzim lipase yang dapat memecah asam lemak bebas dari lipid kulit (2). Terapi pengobatan dengan antibiotik terbukti mempunyai efektifitas sebagai pengobatan jerawat, tetapi antibiotik memicu adanya resistensi sehingga menimbulkan resiko yang berbahaya. Berbagai macam obat herbal telah digunakan untuk pengobatan. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat merupakan warisan leluhur yang telah digunakan

sejak turun temurun dalam kurun waktu yang cukup lama. Masyarakat semakin sadar pentingnya memanfaatkan obat yang berasal dari alam. Obat yang berasal dari alam memiliki efek samping yang relatif lebih kecil (3).

Tanaman obat yang berdasarkan penelitian mempunyai efektifitas dalam mengobati jerawat yaitu daun kelor (*Moringa oleifera*) dan daun sirih (*Piper betle* L.). Daun kelor mempunyai zat khasiat kuersetin yang berkhasiat sebagai antibakteri serta senyawa aktif lainnya seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin yang digunakan untuk antibakteri dan antioksidan (4). Pada daun sirih (*Piper betle* L.) mengandung fenol dengan mekanisme sebagai agen antibakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri (5).

Interaksi kedua tanaman yang dikombinasikan menimbulkan efek yang bersifat sinergis, antagonis, aditif. Kombinasi dua tanaman dikatakan bersifat aditif jika efek timbul setelah pencampuran dari 2 zat aktif, efek sinergis terjadi ketika 2 zat aktif yang dicampurkan memiliki efek lebih besar dibandingkan masing-masing zat aktif, kemudian dikatakan efek antagonis ketika 2 zat aktif dicampurkan mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya efek dari masing-masing zat aktif tersebut dikarenakan adanya kompetisi diantara kedua zat aktif tersebut (6). Menurut Rahayu, 2013 Efek sinergis yaitu efek kombinasi yang diperoleh dengan zona hambat lebih luas dibandingkan dengan ekstrak tunggal (7).

Berdasarkan uraian diatas bahwa daun kelor (*Moringa oleifera*) dan daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki potensi sebagai antibakteri yang memungkinkan digunakan untuk terapi pengobatan jerawat dengan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri pada kedua tanaman tersebut jika dikombinasikan diharapkan memberikan efektivitas sinergis daun kelor (*Moringa oleifera*) dan daun sirih (*Piper betle* L.). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek antibakteri kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dan daun sirih (*Piper betle* L.) diduga memiliki efek antibakteri sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu alat gelas, lampu bunsen, *yellow tip*, *blue tip*, ose,, mikropipet, tabung reaksi, inkubator, autoklaf, oven, BSC, microplate, timbangan analitik, kompor listrik, blender, corong, pipet volume, botol semprot, *vacum rotary evaporator*, cawan petri, ayakan, maserator. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu daun kelor (*Moringa oleifera*), daun sirih (*Piper betle* L.), aquades, etanol 96%, *Natrium Clorida* (NaCl) 0.9%, Standar *Mc. Farland*, media cair BHI, media cair BHI DS, media padat *Mueller Hinton Agar* (MHA).

Prosedur Penelitian

1. Uji identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman daun kelor dan daun sirih dilakukan di Laboratorium MiPa Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Pembuatan simplisia

Tahapan pembuatan simplisia yaitu dilakukan pengumpulan simplisia daun kelor dan daun sirih. Kemudian dilakukan sortasi basah yang merupakan proses seleksi bagian tanaman yang

akan digunakan dari pengotor. Setelah itu simplisia ditimbang dan dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya perajangan dan pengeringan pada simplisia dengan cara dianginkan pada suhu kamar dan terlindung dari paparan cahaya matahari. Tahap berikutnya dilakukan sortasi kering yaitu proses menyeleksi pengotor yang masih terikut, kemudian simplisia disimpan (8).

3. Pembuatan ekstrak

Daun kelor dan daun sirih yang sudah dikeringkan kemudian diblender hingga terbentuk serbuk dilanjutkan dengan proses pengayakan menggunakan mesh 60 hingga diperoleh serbuk yang halus dan homogen (3). Tahap ekstraksi dilakukan dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 (9).

Serbuk simplisia dimasukkan kedalam *maserator* kemudian direndam dengan larutan etanol 96%, setelah itu ditutup menggunakan *aluminium foil* dan dibiarkan selama 5 hari dengan dilakukan pengecekan sesekali diaduk. Setelah sampel simplisia direndam selama 5 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring (filtrat 1) dan (residu 1). Residu 1 kemudian ditambah dengan pelarut etanol 96% lalu ditutup dengan *aluminium foil* dan dibiarkan selama 2 hari dengan dilakukan pengecekan sesekali diaduk. Setelah direndam selama 2 hari maka diperoleh (filtrat 2) dan (residu 2).

Filtrat 1 dan filtrat 2 digabung menjadi satu, setelah itu dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* yang kemudian didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan selanjutnya diuapkan di dalam waterbath yang bertujuan untuk menguapkan seluruh pelarut etanol. Ekstrak yang diperoleh ditimbang menggunakan timbangan analitik dan disimpan kedalam wadah tertutup sebelum dilakukan pengujian (3).

4. Pemeriksaan karakteristik ekstrak

a. Organoleptis

Uji organoleptik pada ekstrak daun kelor dan daun sirih menggunakan panca indra dengan mengamati terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (10).

b. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Perhitungan dilakukan dengan cara membandingkan bobot ekstrak yang diperoleh dengan bobot simplisia sehingga didapatkan nilai persentase rendemen (9)

c. Kadar air

Penetapan kadar air pada pengujian ini menggunakan metode gravimetri dengan prosedur timbangseksama 10 gram ekstrak dimasukkan kedalam wadah yang sudah ditara. Keringkan pada suhu 105 °C selama 5 jam dan ditimbang. Syarat keberterimaan yaitu jumlah kadar air kurang dari 10% (11).

d. Kandungan kimia ekstrak

Pemeriksaan kandungan kimia dilakukan terhadap senyawa flavonoid, saponin, alkaloid dan fenolik dengan menggunakan uji tabung. Uji deteksi alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 g ekstrak ditambah 1 mL HCl 2N dan 9 mL air kemudian dipanaskan 15 menit lalu didinginkan dan disaring. Masing-masing larutan diteteskan pada kaca arloji ditambah dengan reagen Mayer akan terbentuk endapan berwarna coklat. Uji flavonoid dengan cara sebanyak 0,5 g ekstrak ditambah 2-3 tetes etanol lalu ditambah serbuk Mg dan HCl 5 M diteteskan secukupnya hingga terjadi perubahan warna endapan merah. Uji saponin dengan cara sebanyak 0,5 g ekstrak ditambah 10 mL air panas kemudian dikocok selama 10 detik hingga terbentuk buih setinggi 1-10 cm selama 10 menit dan jika ditambah 1 tetes HCl 2 N maka buih tidak hilang (12). Uji fenolik dengan cara sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah 10 mL air kemudian ditetesi dengan FeCl₃. Hasil positif menunjukkan

terbentuknya warna hijau kehitaman (13). Uji steroid/terpenoid dengan cara sebanyak 1 mL larutan ekstrak ditambah pereaksi Liberman-Burchard. Hasil positif menunjukkan endapan hijau (mengandung steroid) atau terbentuk endapan merah (mengandung triterpenoid) (14).

5. Uji aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian disterilisasi dengan oven pada suhu 170 °C selama 2 jam. Media yang akan digunakan disterilkan kedalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit (15).

b. Penyiapan media serta bakteri uji

1) Pembuatan media BHI

Sebanyak 37 gram media BHI ditimbang dan dilarutkan dalam 1 liter akuades dalam tabung Erlenmeyer kemudian dihomogenkan. Media disterilkan ke dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (16). Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media yang digunakan untuk uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu media padat *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 120°C selama 15 menit.

2) Peremajaan dan Pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*

Satu koloni *Staphylococcus aureus* digoreskan secara aseptis menggunakan jarum ose steril pada media MHA kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (17). Satu koloni diambil menggunakan ose steril dari stok bakteri kemudian disuspensikan ke dalam 1 ml media BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diambil 100 µl dalam 1 ml BHI diinkubasi pada suhu 37°C selama 4-8 jam kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9%. Selanjutnya dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland (10^8 CFU/ml) sampai didapat konsentrasi atau kecurahan yang sama. Hasil pengenceran diencerkan kembali hingga konsentrasi 10^6 CFU/ml dengan media BHI DS yang bertujuan untuk mengetahui sterilitas dari cairan pelarut (18).

3) Uji antibakteri

a) Pembuatan stok larutan sampel

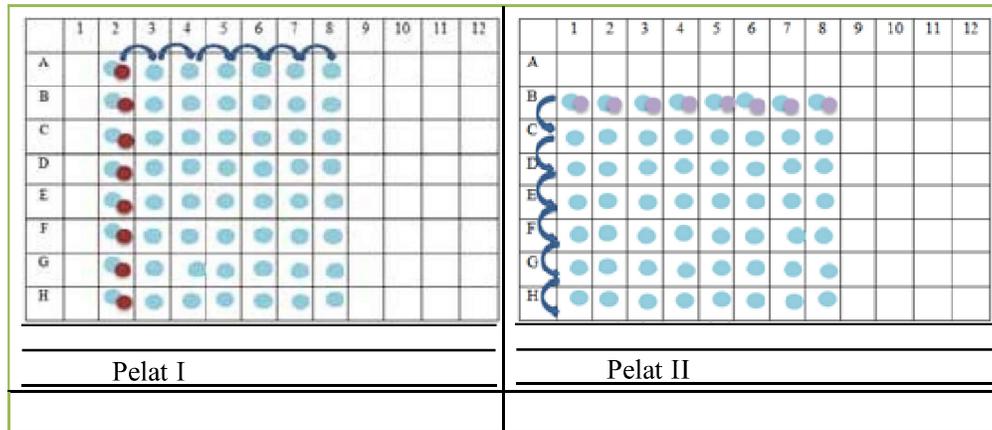
Larutan uji yang akan dibuat yaitu ekstrak daun kelor dan ekstrak daun sirih dengan konsentrasi akhir 0,3125 mg/mL; 0,625 mg/mL; 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL; 10 mg/mL dari larutan induk dengan konsentrasi 40 mg/mL.

b) Uji aktivitas kombinasi ekstrak dengan metode dilusi menggunakan alat *checkerboard*

Beberapa langkah yang dilakukan pada pengujian metode dilusi cair menggunakan alat *checkerboard* yaitu penyiapan sampel (sampel, kontrol (media, pelarut, suspensi bakteri)), penggabungan plat, penambahan suspensi bakteri, kemudian diinkubasi.

c) Penyiapan sampel pada alat *checkerboard*

Sampel dicampur dengan media BHI cair mengikuti alur pengenceran pada pelat I dan II



Keterangan :



Gambar 1. Alur pengenceran ekstrak dengan media pada pelat I dan II

- Kolom A2 pelat I diisi 100 μ l EDK + media cair BHI 100 μ l
 - Kolom B2-H2 pelat I diisi 50 μ l EDK + 50 μ l media cair BHI
 - Kolom A3-A8 diisi 100 μ l media cair BHI arah vertikal
 - Kolom B3-H3 diisi 50 μ l media cair BHI arah vertikal
 - Pengenceran bertingkat dilakukan secara horizontal hingga kolom 8. Sebanyak 100 μ L larutan sampel kolom A2 dipindahkan ke kolom A3 dihomogenkan, kemudian sebanyak 100 μ l larutan kolom A3 dipindahkan ke kolom A4 dan dilakukan cara seterusnya pada kolom berikutnya secara berurutan sampai kolom A8 (semakin ke kanan maka konsentrasi semakin kecil). Pada baris B sampai H dilakukan perlakuan yang sama dengan cara sebanyak 50 μ l larutan sampel kolom B2-H2 dipindahkan ke kolom B3-H3, kemudian dipindahkan ke kolom B4-H4 dan dilakukan cara seterusnya pada kolom berikutnya secara berurutan sampai kolom B8-H8.
 - Baris B1 pelat II diisi 100 μ l EDS + 100 μ l media cair BHI
 - Baris B2 pelat II diisi 50 μ l EDS + 50 μ l media cair BHI
 - Baris B1-H8 diisi 100 μ l media cair BHI arah vertikal.
 - Dilakukan pengenceran bertingkat secara vertikal hingga H8. Sebanyak 100 μ l larutan sampel kolom B1 dipindahkan ke kolom C1 dan dihomogenkan, kemudian sebanyak 100 μ l larutan kolom D1 dipindahkan ke kolom E1 dan dilakukan cara seterusnya pada kolom berikutnya secara berurutan sampai kolom H1. Pola yang sama diterapkan pada kolom-kolom berikutnya yaitu kolom H2 hingga H8 (semakin kebawah maka konsentrasinya semakin kecil).
- d) Campuran pada pelat II dimasukkan ke pelat I sesuai dengan posisi kolom masing-masing. Pada pelat I baris A2-A8 hanya berisi EDK dan kolom BI-HI pada pelat I hanya berisi EDS.
- e) Kolom 9 diisi dengan 100 μ l suspensi bakteri + 100 μ l pelarut aquades sebagai

kontrol pelarut.

- f) Kolom 10 diisi dengan 90 μ l media cair BHI + 10 μ l suspensi bakteri sebagai kontrol suspensi bakteri.
- g) Kolom 11 diisi dengan 200 μ l media BHI tanpa penambahan suspensi bakteri sebagai kontrol media.
- h) Sebanyak 100 μ l suspensi bakteri 10^6 CFU/ml ditambah ke semua lubang pelat kecuali kolom 11, sehingga volume akhir setiap lubang 200 μ l.
- i) Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian diamati pertumbuhan mikroba untuk menentukan KHM EDK, EDS dan kombinasi EDK-EDS.
- j) Kolom atau baris yang menunjukkan adanya KHM kombinasi EDK-EDS ditetapkan KBM-nya dengan menanam kultur pada media MHA dengan teknik cawan gores. Uji ini juga dilakukan terhadap EDK dan EDS.

Analisis Data

1. Penentuan KHM dengan cara melihat secara visual pada media cair BHI yang konsentrasi paling kecil yang tidak ditumbuhi oleh bakteri dengan ditandai tidak terlihat keruh. Terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan larutan terlihat jernih setelah dibandingkan dengan kontrol suspensi bakteri.
2. Penentuan KBM dengan cara mengamati pertumbuhan bakteri pada media agar yang telah diinokulasi dari larutan uji pada checkerboard yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri. Hasil KBM ditetapkan dengan konsentrasi yang menunjukkan tidak terdapat pertumbuhan koloni.
3. Penentuan efek kombinasi EDK-EDS menggunakan nilai FICI dengan ketentuan bahwa kombinasi dinyatakan berefek sinergis jika didapatkan nilai FICI antara 0,0039-0,5, efek aditif jika bernilai 0,5-1,0, dan berefek antagonis jika didapatkan nilai $\geq 5,0$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi Tanaman

1. Daun Kelor

a. Uji Makroskopis

Pengujian makroskopik dinyatakan kebenarannya dengan cara membandingkan hasil pengamatan dengan literatur yaitu Farmakope Herbal Indonesia edisi kedua atau disingkat FHI II (2017). Hasil uji makroskopik daun kelor dirangkum dalam tabel I.

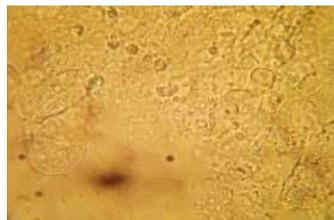
Tabel I. Uji makroskopis daun kelor

Parameter	FHI	Hasil Pengamatan	Kesesuaian hasil dengan FHI
Bentuk	Daun berbentuk bulat telur sampai memanjang, pangkal helaian daun runcing, tepi rata, ujung tumpul, tulang daun menyirip, ibu tulang daun menonjol kepermukaan bawah.	Bentuk daun bulat memanjang, pangkal helaian daun runcing, tepi rata, ujung tumpul, tulang daun menyirip.	Sesuai
Warna	Hijau, hijau kekuningan hingga hijau kecoklatan.	Hijau hingga hijau kekuningan.	Sesuai
Bau	Tidak berbau	Tidak berbau	Sesuai
Rasa	Tidak berasa	Tidak berasa	Sesuai
Diameter	Memanjang 1 cm	Memanjang ± 1 cm	Sesuai

b. Uji Mikroskopik

Pengujian mikroskopik dinyatakan kebenarannya dengan cara membandingkan hasil pengamatan dengan literatur yaitu Farmakope Herbal Indonesia edisi kedua (2017). Hasil uji mikroskopik daun kelor (tabel II) menunjukkan kesesuaian dengan FHI II.

Tabel II. Uji mikroskopis daun kelor

No.	Uraian	FHI (2017)	Hasil pengujian
1	Kristal kalsium oksalat bentuk roset		
2	Mesofil dengan sel-sel sekresi		

2. Daun Sirih

a. Uji Makroskopik

Pengujian makroskopik dinyatakan kebenarannya dengan cara membandingkan hasil pengamatan dengan literatur yaitu Farmakope Herbal Indonesia edisi kedua (2017). Hasil uji makroskopik daun sirih dirangkum dalam Tabel III.

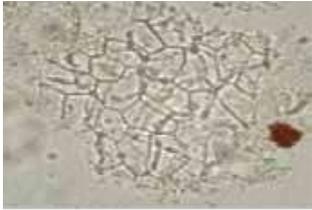
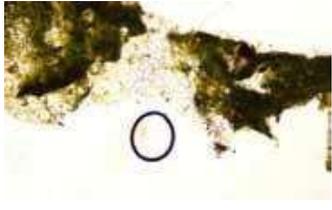
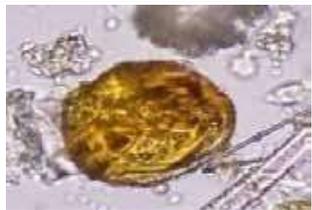
Tabel III. Uji makroskopis daun sirih

Parameter	FHI	Hasil Pengamatan	Kesesuaian hasil dengan FHI
Bentuk	Daun berbentuk bulat telur hingga lonjong, pangkal berbentuk jantung agak bulat, sedikit berlekuk, tepi daun rata menggulung, ujung runcing sampai meruncing, pertulangan daun melengkung, permukaan atas agak tenggelam, permukaan bawah menonjol, permukaan bawah terlihat bercak transparan dibawah sinar matahari, tangkai daun bulat.	Daun berbentuk seperti jantung, ujung daun runcing hingga meruncing, tulang daun melengkung, permukaan atas tenggelam sedangkan permukaan bawah menonjol serta terlihat bercak transparan, tangkai daun bulat.	Sesuai
Warna	Hijau kecoklatan hingga cokelat, permukaan bawah daun lebih muda dibandingkan permukaan atas.	Hijau hingga kecoklatan, warna permukaan bawah daun lebih muda dibandingkan dengan permukaan atas.	Sesuai
Bau	Bau khas	Bau khas	Sesuai
Rasa	Rasa pedas	Rasa pedas	Sesuai
Tekstur	Permukaan bawah kasar	Permukaan bawah kasar	Sesuai
Diameter	Memanjang 3 cm	Memanjang ±3 cm	Sesuai

b. Uji Mikroskopik

Pengujian mikroskopik dinyatakan kebenarannya dengan cara membandingkan hasil pengamatan dengan literatur yaitu Hasil uji mikroskopik daun sirih dirangkum dalam tabel IV.

Tabel IV. Uji mikroskopis daun sirih

No.	Uraian	FHI (2017)	Hasil pengujian
1	Epidermis atas		
2	Idioblas berupa sel minyak		

B. PEMERIKSAAN KARAKTERISTIK EKSTRAK

1. Organoleptis

Pengujian organoleptik dinyatakan kebenarannya dengan cara membandingkan hasil pengamatan berdasarkan literatur Farmakope Herbal Indonesia Edisi II. Hasil penelitian disajikan dalam tabel V.

Tabel V. Hasil pengamatan organoleptik ekstrak

Pemeriksaan	FHI Edisi II tahun 2017			Hasil pengamatan		
	Warna	Bau	Rasa	Warna	Bau	Rasa
Ekstrak daun kelor	Hijau kecoklatan	Bau khas	Rasa pahit	Hijau kecoklatan	Bau khas	Pahit
Ekstrak daun sirih	Hijau	Bau khas	Agak pahit dan pedas	Hijau agak coklat	Bau khas	Agak pahit dan pedas

2. Perhitungan rendemen ekstrak

Pada penelitian ini didapatkan data bobot dan rendemen hasil ekstraksi dapat dilihat pada tabel VI.

Tabel VI. Bobot rendemen hasil ekstraksi

Sampel	Bobot sampel kering (gram)	Bobot ekstrak kental (gram)	Rendemen (%) FHI Edisi II	Rendemen (%) Hasil pengamatan
Daun kelor	100,1	14,51	Tidak kurang 9,2%	14,50
Daun sirih	100,1	8,68	Tidak kurang 5,0%	8,67

Senyawa bioaktif yang terkandung dalam simplisia dapat diketahui dari perhitungan rendemen ekstrak. Semakin banyak rendemen ekstrak yang diperoleh maka senyawa bioaktif yang didapat semakin besar.

3. Penetapan kadar air

Pengujian kadar air dikatakan memenuhi syarat jika sesuai dengan literatur yang digunakan yaitu FHI Edisi II tahun 2017. Hasil pengujian diperoleh data pada Tabel VII.

Tabel VII. Hasil pengujian kadar air

Simplisia	Kadar air (%) (FHI Edisi II)	Kadar air pengujian (%)
Daun kelor	Tidak lebih dari 10%	9,7%
Daun sirih	Tidak lebih dari 10%	9,6%

C. UJI SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK

1. Uji tabung

a. Ekstrak daun kelor

Hasil uji tabung ekstrak daun kelor dilihat pada tabel VIII.

Tabel VIII. Hasil uji tabung pada ekstrak daun kelor

No	Nama pemeriksaan	Pereaksi uji	Hasil	Keterangan
1.	Alkaloid	HCL 2N+ reagen meyer	+	Endapan coklat
2.	Flavonoid	HCL 2N + serbuk Mg	+	Merah
3.	Saponin	HCL 2N	+	Terbentuk busa yang konstan
4.	Terpenoid	H ₂ SO ₄	+	Merah muda kecoklatan

Menurut penelitian Rivai (4), daun kelor mempunyai zat khasiat kuersetin yang berkhasiat sebagai antibakteri serta senyawa aktif lainnya seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin yang digunakan untuk antibakteri dan antioksidan. Pada sampel ekstrak daun kelor hasil uji tabung menunjukkan bahwa sampel ekstrak daun kelor yang digunakan mengandung beberapa metabolit sekunder didalamnya diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, saponin. Berdasarkan hasil uji tabung pada penelitian menunjukkan adanya kesamaan kandungan kimia yang terdapat pada daun kelor yang diuji pada pengujian yang sama.

b. Ekstrak daun sirih

Hasil uji tabung ekstrak daun kelor dilihat pada tabel IX.

Tabel IX. Hasil uji tabung pada ekstrak daun sirih

No	Nama pemeriksaan	Pereaksi uji	Hasil	Keterangan
1.	Flavonoid	HCl 2N + serbuk Mg	+	merah
2.	Saponin	HCl 2N	+	Terbentuk busa yang konstan
3.	Fenolik	FeCl ₃	+	Terbentuk endapan hijau kecoklatan

Menurut penelitian Kursia et al. (19), daun sirih hijau mengandung senyawa bakteri yang terdiri dari senyawa fenol golongan flavonoid. Pada sampel ekstrak daun sirih hijau hasil uji tabung menunjukkan bahwa sampel ekstrak daun sirih yang digunakan mengandung senyawa fenolik kelompok flavonoid. Berdasarkan hasil uji tabung pada penelitian menunjukkan adanya kesamaan kandungan kimia yang terdapat pada daun sirih yang diuji pada pengujian yang sama.

D. PENENTUAN NILAI KADAR HAMBAT MINIMUM (KHM) DAN KADAR BUNUH MINIMUM (KBM)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada pengujian dapat ditentukan tidak terdapatnya pertumbuhan bakteri atau kecurahan bakteri (tampak jernih) pada media cair setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (20). Pada kolom yang tampak jernih menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri sehingga bakteri tidak mampu berkembang biak menghasilkan koloni dalam jumlah besar. Untuk memastikan hasil yang diperoleh akurat, maka dilakukan penambahan MTT. MTT merupakan indikator untuk mendeteksi kerusakan sel bakteri *S.aureus* dengan hasil yang lebih cepat dan reliabel (21). Adanya perubahan warna kuning menjadi ungu setelah penambahan indikator MTT menunjukkan dalam kolom tersebut masih mampu tumbuh bakteri sehingga belum mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Sebaliknya, jika tidak terjadi perubahan warna kuning menjadi ungu menandakan pada konsentrasi tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri (22).

Hasil pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun sirih dapat dilihat pada gambar 2.

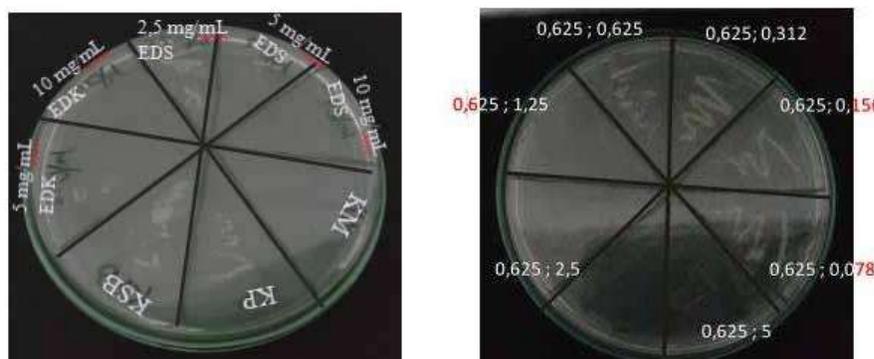


Gambar 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri. Tanda lingkaran hitam menunjukkan KHM ekstrak daun kelor, KHM ekstrak daun sirih dan KHM kombinasi

Berdasarkan hasil uji pada microplate diatas diperoleh hasil KHM tunggal kelor berada pada

kolom A2 (10 mg/ml), KHM tunggal sirih berada pada kolom C1 (5 mg/ml), KHM kombinasi ekstrak terjadi pada campuran konsentrasi akhir 0,625 mg/ml ekstrak daun sirih dan 1,25 mg/ml ekstrak daun kelor. Penetapan nilai KHM didapatkan berdasarkan gambar visual dari kolom yang tampak jernih pada masing-masing konsentrasi dan penambahan indikator MTT untuk mendeteksi secara akurat.

Pada pengujian Kadar Bunuh Minimum (KBM) dapat ditentukan pada konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri setelah dilakukan penggosresan pada media padat yang diinokulasi/ penanaman didalamnya (23). Berdasarkan hasil pengujian didapatkan nilai KBM (Gambar 2) dari ekstrak daun kelor adalah 10 mg/ml, ekstrak daun sirih 5 mg/ml, sedangkan kombinasi ekstrak dihasilkan oleh campuran ekstrak daun kelor 1,25 mg/mL dan ekstrak daun sirih 0,615 mg/mL. Hasil tersebut didapatkan berdasarkan pengamatan pada pertumbuhan bakteri hasil penggosresan di media padat MHA.



Gambar 2. Hasil pengujian KBM EDK dan EDS (gambar kiri) serta kombinasi EDK-EDS (gambar kanan)

E. ANALISIS FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION INDEX (FICI)

Analisis nilai FICI bertujuan untuk mengetahui efek kombinasi ekstrak yang ditunjukkan dengan efek sinergis, efek aditif, dan efek antagonis. Hasil analisis FICI didapatkan dari perhitungan sebagai berikut (24):

$$\begin{aligned}
 \text{FICI} &= \frac{\text{KHM EDK (Kombinasi)}}{\text{KHM EDK (Tunggal)}} + \frac{\text{KHM EDS (Kombinasi)}}{\text{KHM EDS (Tunggal)}} \\
 \text{FICI} &= \frac{1,25 \text{ mg/ml}}{10 \text{ mg/ml}} + \frac{0,625 \text{ mg/ml}}{5 \text{ mg/ml}} \\
 \text{FICI} &= 0,125 + 0,125 = 0,25 \text{ (sinergis)}
 \end{aligned}$$

Tabel XI. Hasil analisis FICI

Replikasi	KHM Tunggal kelor	KHM Tunggal sirih	KHM Kombinasi (EDK;EDS)	Nilai FICI	Interpretasi
Replikasi I	10 mg/ml	5 mg/ml	1,25 ; 0,625 mg/ml	0,25	Sinergis
Replikasi II	10 mg/ml	5 mg/ml	1,25 ; 0,625 mg/ml	0,25	Sinergis
Replikasi III	10 mg/ml	5 mg/ml	1,25 ; 0,625 mg/ml	0,25	Sinergis

Menurut Olajuyigbe et al. (25), Interpretasi nilai FICI yaitu berefek sinergis didapatkan nilai 0,0039-0,5, efek aditif jika bernilai 0,5-1,0, dan berefek antagonis jika didapatkan nilai 5,0. Berdasarkan hasil pengujian perhitungan didapatkan data efek kombinasi dari ekstrak daun kelor dan ekstrak daun sirih bersifat sinergis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Efek sinergis menunjukkan bahwa efek kombinasi dari dua tumbuhan yang dapat memberikan efek terapi yang saling membantu meningkatkan daya khasiatnya dibandingkan penggunaan tunggal (26). Efek sinergis menginterpretasi bahwa efek kombinasi dari ekstrak daun kelor dan ekstrak daun sirih memiliki efek daya hambat lebih besar dibandingkan penggunaan masing-masing tanaman dalam bentuk tunggal.

Pada daun kelor terdapat kandungan metabolit sekunder yang berperan sebagai antibakteri yaitu flavonoid. Berdasarkan bukti ilmiah lain bahwa flavonoid memiliki manfaat di bidang kesehatan yaitu anti-inflamasi, anti kanker, antiaging, imunomodulator, antidiabetes, antivirus, dan antibakteri. Aktivitas flavonoid sebagai antibakteri memiliki mekanisme mengganggu lipid bilayer dengan adanya induksi pada membrane bakteri kemudian menghambat proses pembentukan biofilm, sintesis sel envelope, sintesis asam nukleat, rantai transpor elektron, dan sintesis ATP (27).

Aktivitas daun sirih sebagai antibakteri disebabkan adanya fenol yang berperan sebagai toksin dalam protoplasma dengan mekanisme merusak dan menembus dinding kemudian mengendapkan protein sel bakteri. Mekanisme fenol sebagai antibakteri dalam membunuh mikroorganisme dengan cara mendenaturasi protein sel, adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein menyebabkan struktur protein rusak. Ikatan hidrogen menimbulkan pengaruh terhadap permeabilitas dinding sel dan membrane sitoplasma dikarenakan keduanya tersusun dari protein, terganggunya dinding sel serta membrane sitoplasma dapat mengakibatkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel sehingga menjadi lisis (5).

Berdasarkan penelitian ini menunjukkan hasil bahwa aktivitas kombinasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun sirih yaitu sinergis disebabkan adanya perbedaan mekanisme kerja dari metabolit sekunder sebagai antibakteri. Perbedaan metabolit sekunder yang bertindak dalam tanaman juga menimbulkan aksi mekanisme yang berbeda dalam menghambat bakteri, hal tersebut mengakibatkan efek sinergis dari kedua tanaman dikarenakan mekanisme yang saling mendukung sebagai antibakteri sehingga meningkatkan efektivitas dalam menghambat bakteri.

KESIMPULAN

Aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada ekstrak daun kelor menunjukkan nilai KHM 10mg/mL, ekstrak daun sirih 5 mg/mL, sedangkan kombinasi kedua ekstrak menunjukkan KHM pada campuran 1,25 mg/mL ekstrak daun kelor dan 0,615 mg/mL ekstrak daun sirih. Nilai

KBM ekstrak daun kelor 10 mg/mL, ekstrak daun sirih 10 mg/mL sedangkan kombinasi keduanya menunjukkan KBM pada campuran ekstrak daun kelor 1,25 mg/mL dan ekstrak daun sirih 0,615 mg/mL. Kombinasi kedua ekstrak memiliki efek menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara sinergis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan atas terselenggaranya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ph L, Fatkhul Mubin M, Mahmudah AR. Respons Emosi Dan Sosial Remaja Berjerawat. *J Keperawatan Jiwa*. 2016;4(2):132–6.
2. Hastuti NS, Taurhesia S, Wibowo AE. Aktivitas secara in vitro dan in vivo kombinasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* lam.) dan pegagan (*Centella asiatica* (L). Urb.) sebagai gel anti jerawat. *Intisari Sains Medis*. 2019;10(3):629–36.
3. Dima LLRH, Fatimawali, Lolo WA. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Pharmacon*. 2016;5(2):282–9.
4. Rivai ATO. Identifikasi senyawa yang terkandung pada ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*. 2020;6(1):37–46.
5. Noventi W, Carolia N. Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L .) sebagai Alternatif Terapi *Acne vulgaris* The Potential of Green Sirih Leaf (*Piper betle* L .) for Alternative Therapy *Acne vulgaris*. *Stud Pendidik Dr Fak Kedokt Univ Lampung*. 2016;Vol. 5(1):Hal. 140.
6. Suhendra AD, Asworowati RD, Ismawati T. Kombinasi Ekstrak Batang Serai Wangi dan Ekstrak Biji Pinang Muda dalam Bentuk Spray sebagai Bioinsektisida Alami terhadap Nyamuk *Aedes Aegypti*. *Akrab Juara* [Internet]. 2020;5(1):43–54. Available from: <http://www.akrabjuara.com/index.php/akrabjuara/article/view/919>
7. Lestari I, Hanum GR. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Medicra (Journal Med Lab Sci)*. 2019;2(2):43–7.
8. Jibalathuull FS, Fadraersada J, Rijai L. Aktivitas tabir surya ekstrak rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) secara in-vitro. *Proceeding 5 th Mulawarman Pharm Conf*. 2017;(April 2017):23–4.
9. Mulangsri DAK. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Muda dan Daun Tua Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *J Ilm Cendikia Eksakta*. 2018;(2528–5912):1–4.
10. Manarisip GE, Rotinsulu H, Fatimawali. Standardization Of Green Betel Leaf Extracts (*Piper betle* L .) and Antibacterial Test Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacon-progr Stud Farm*. 2020;9(November):533–41.
11. FHI. *Pharmacopoeias*. II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. 561 p.
12. Wulandari A, Farida Y, Taurhesia S. Perbandingan Aktivitas Ekstrak Daun Kelor Dan Teh Hijau Serta Kombinasi Sebagai Antibakteri Penyebab Jerawat. *J Fitofarmaka Indones*. 2020;7(2):23–9.

13. Mora E, Nst MR, Susanti E, Zasliadi A. Isolasi dan Uji BSLT Ekstrak Etil Asetat Daun Meranti Sabut (*Shorea ovalis* (Korth.)). *J Sains Farm Klin*. 2015;1(2):184.
14. Hasanah S, Wibowo MA, Idiawati N. Toksisitas *Lygodium Microphyllum*, *Premna serratifolia* L. dan *Vitex pinnata* asal Desa Kuala Mandor B. *J Kim Khatulistiwa*. 2015;4(4):101–5.
15. Rahmawati. Interaksi ekstrak daun lidah buaya (*Aloe vera* L.) dan daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap daya hambat *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *J Edubio Trop*. 2014;2(1):121–7.
16. Pajan SA, Waworuntu O, Leman MA. Potensi Antibakteri Air Perasan Bawang Putih (*Allium Sativum* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus*. *Pharmacon*. 2016;5(4):77–89.
17. Fauziah DW, Darmawan E. Uji Sinergisme Aktivitas Antibakteri Kombinasi Minyak Atsiri *Syzygium aromaticum* L. dan *Myristica fragrans* Houtt. Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 serta Profil Kimianya. *JPMS (Journal Pharm Med Sci)*. 2017;2(2):52–8.
18. Wardhani LK, Sulistyani N. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil kromatografi lapis tipis. *Pharmaciana*. 2012;2(1).
19. Kursia S, Lebang JS, Taebe B, Burhan A, Nursamsiar N. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Indones J Pharm Sci Technol [Internet]*. 2016;3(2):72–7. Available from: <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/article/view/8643>
20. Chikezie IO. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African J Microbiol Res*. 2017;11(23):977–80.
21. Seidl K, Zinkernagel AS. The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage. *J Microbiol Methods [Internet]*. 2013;92(3):307–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.018>
22. Muliani M, Nurhidayah N, Kurniawan K. Herbal mangrove sebagai sumber anti bakteri *Vibrio harveyi* penyebab penyakit pada udang windu *Penaeus monodon* Muliani#. *J Ris Akuakultur*. 2015;10(3):405.
23. Munfaati PN, Ratnasari E, Trimulyono G, Biologi J, Matematika F, Pengetahuan I, et al. Aktivitas senyawa antibakteri ekstrak herba meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *In Vitro*. *EjournalUnesaAcId [Internet]*. 2015;4(3):64–71. Available from: <https://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/article/view/10891>
24. A' lana L, Sari R, Apridamayanti P. Penentuan Nilai FICI Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* (L) Burm.f) dan Gentamisin Sulfat Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Tradit Med J [Internet]*. 2017;22 (3):175–81. Available from: <https://scholarhub.ui.ac.id/psr/vol4/iss3/3/%0Ahttp://psr.ui.ac.id/index.php/journal/article/view/3695>
25. Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Evaluation of Combination Effects of Ethanolic Extract of *Ziziphus mucronata* Willd . subsp . *mucronata* Willd . and Antibiotics against Clinically Important Bacteria. 2013;2013.
26. Halimatussa'diah F, Fitriani VY, Rijai L. Aktivitas antioksidan kombinasi daun cempedak (*Artocarpus champedan*) dan daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L). *J Trop Pharm*. 2014;2(5):248–51.
27. Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*. 2021;26(17):1–16.