

**PENGARUH SUHU DAN LAMA PEMANASAN
TERHADAP KADAR TOTAL FENOLIK DAN
AKTIVITAS ANTIFUNGI DAUN SIRIH MERAH (*Piper
crocatum*) TERHADAP *Candida albicans***

**THE EFFECT OF TEMPERATURE AND DURATION
OF HEATING ON TOTAL PHENOLIC CONTENT AND
ANTIFUNGAL ACTIVITY RED BETLE LEAF (*Piper
crocatum*) AGAINST *Candida albicans***

NURDIAH KHAERAWATI

N111 16 017



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PENGARUH SUHU DAN LAMA PEMANASAN TERHADAP KADAR
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIFUNGI DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum*) TERHADAP *Candida albicans***

**THE EFFECT OF TEMPERATURE AND DURATION OF HEATING ON
TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY RED
BETLE LEAF (*Piper crocatum*) AGAINST *Candida albicans***

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**NURDIAH KHAERAWATI
N111 16 017**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

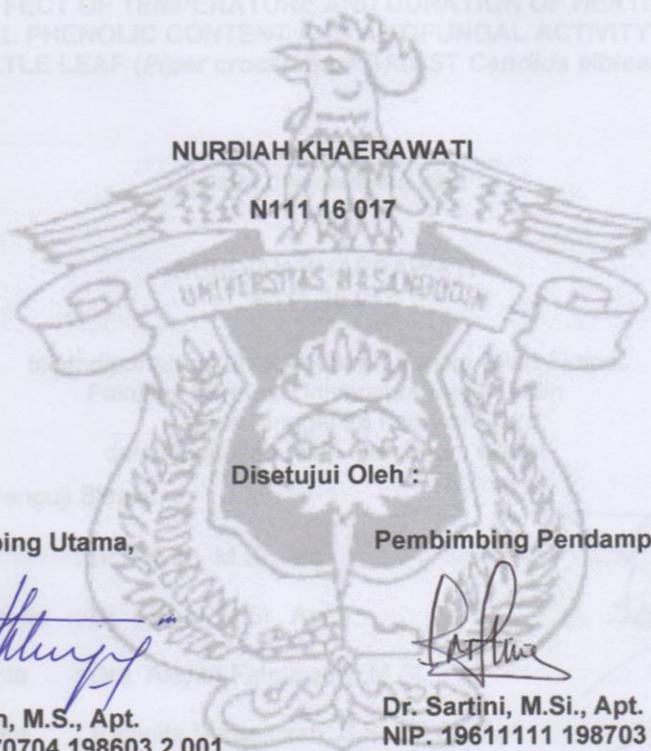
**PENGARUH SUHU DAN LAMA PEMANASAN TERHADAP KADAR
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIFUNGI DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum*) TERHADAP *Candida albicans***

PENGARUH SUHU DAN LAMA PEMANASAN TERHADAP KADAR
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIFUNGI DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum*) TERHADAP *Candida albicans*

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND DURATION OF HEATING ON
TOTAL PHENOLIC CONTENT AND FUNGAL ACTIVITY RED
BERLE LEAF (*Piper crocatum*) AGAINST *Candida albicans*

NURDIAH KHAERAWATI

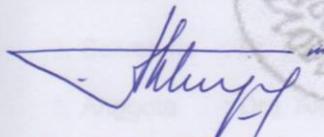
N111 16 017



Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



**Dr. Aliyah, M.S., Apt.
NIP. 19570704 198603 2 001**



**Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001**

Pada tanggal : 28 Februari 2020

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Subekti, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19750828 200112 1 002

PERNYATAAN SKRIPSI

**PENGARUH SUHU DAN LAMA PEMANASAN TERHADAP KADAR
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIFUNGI DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum*) TERHADAP *Candida albicans***

**THE EFFECT OF TEMPERATURE AND DURATION OF HEATING ON
TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY RED
BETLE LEAF (*Piper crocatum*) AGAINST *Candida albicans***

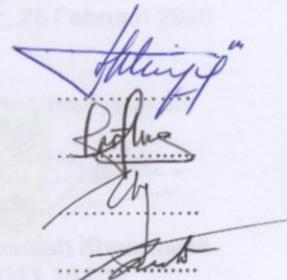
Disusun dan diajukan oleh :

**NURDIAH KHAERAWATI
N111 16 017**

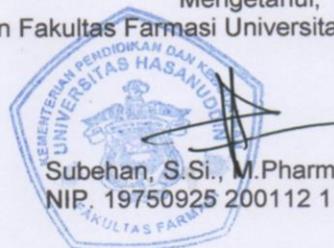
telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 28 Februari 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Dr. Aliyah, M.S., Apt.
2. Sekretaris : Dr. Sartini, M.Si., Apt.
3. Anggota : Dra. Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt.
4. Anggota : Rahmita Burhamzah, S.Si., M.Si., Apt.

28 Februari 2020


Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19750925 200112 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, 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 disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 28 Februari 2020



Saya menyatakan,

Muriah Khaerawati
N111 16 017

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji penulis panjatkan ke hadirat Allah swt., atas kesempatan, kesehatan, serta keselamatan yang senantiasa diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian serta tugas akhir skripsi yang berjudul “Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Kadar Total Fenolik dan Aktivitas Antifungi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap *Candida albicans*” telah selesai. Tidak lupa shalawat serta salam kepada junjungan Nabi besar Muhammad saw., yang menjadi suri tauladan bagi seluruh umat.

Perjuangan yang panjang untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi tidak lepas dari bantuan banyak pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih dengan penuh rasa hormat kepada:

1. Para pembimbing, yaitu Ibu Dr. Aliyah, M.S., Apt., selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Sartini, M.Si., Apt., selaku pembimbing pendamping serta selaku penasehat akademik yang senantiasa meluangkan waktunya dalam memberikan masukan, bimbingan dan saran dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
2. Para penguji, yaitu Ibu Dra. Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt., dan Ibu Rahmita Burhamzah, S.Si., M.Si., Apt., yang telah memberikan saran dan perbaikan kepada penulis.
3. Dekan, Wakil Dekan, dan para dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan, penelitian dan skripsi penulis.

Terkhusus penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Para Laboran di setiap laboratorium Fakultas Farmasi, terutama kepada ibu Haslia, kak Dewi, kak Abdi, dan kak Sumi, serta Korps Asisten Fitokimia yang senantiasa memberikan arahan, saran dan membantu dalam pelaksanaan penelitian.
2. Kepada kedua orang tua yang sangat peneliti hormati dan cintai, Bapak Irwan Piri, S.Sos dan Ibu Musriati, S.Pd dengan tulus memberi doa dan dukungan moral serta bantuan berupa material disetiap langkah dalam menjalani perkuliahan, penelitian dan penyelesaian penyusunan skripsi penulis. Semoga Allah senantiasa menjaga dan melindungi kita.
3. Saudara penulis Nurafifah Azzahra, Nur Arini Irwan, dan Muh. Fauzil Azhar, teman dekat penulis Muhammad Harmadi Syam serta sepupu penulis Monadillah Muchran, S.Si., M.Si., Apt terimakasih atas segala bantuan, dukungan, semangat, waktu dan tempat berbagi keluh kesah penulis.
4. Sahabat dekat penulis Asda, Isma, Fitrah, Dita, Andi Dinul Fitrah, Tri Dewi Astuti, Isna Lestari, Tifanny, Veronika, Nurdalia, Nurafni Ulfah dan teman-teman seperjuangan selama di Farmasi (NEOST16MINE) yang telah membantu dan memberikan semangat melaksanakan penelitian.
5. Para teman peneliti di laboratorium farmasetika dan mikrobiologi yang tidak sempat penulis sebutkan satu per satu, yang menemani

pengerjaan di laboratorium, berbagi keluh kesah penelitian dan berbagi alat ataupun bahan penelitian.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis menyadari masih ada beberapa kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu saran dan kritik dibutuhkan untuk kelengkapan penyusunan selanjutnya. Akhir kata dari penulis, semoga penelitian dan skripsi yang penulis lakukan bernilai ibadah dan bermanfaat.

Makassar, 28 Februari 2020

Nurdiah Khaerawati

ABSTRAK

Nurdiah Khaerawati. *Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Kadar Total Fenolik dan Aktivitas Antifungi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap *Candida albicans* (Dibimbing oleh Aliyah dan Sartini)*

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat obat, antara lain untuk mengobati kandidiasis. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar total fenolik dan aktivitas antifungi daun sirih merah yang dibuat dengan berbagai metode ekstraksi dengan suhu dan lama pemanasan yang beragam terhadap fungi *Candida albicans*. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode infus, dekok dan rebusan dengan menggunakan pelarut air. Hasil ekstraksi diliofilisasi menggunakan *freeze dryer*. Hasil penentuan kadar total fenolik diperoleh kadar tertinggi pada rebusan 15 menit sebesar 5,47%. Hasil uji aktivitas antifungi liofilisat daun sirih merah dengan metode mikrodilusi menghasilkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) >20 mg/mL, sedangkan metode difusi agar konsentrasi 10% semuanya tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Candida albicans*.

Kata Kunci : *Piper crocatum*, suhu, lama pemanasan, antifungi, total fenolik

ABSTRACT

Nurdiah Khaerawati. *The Effect of Temperature and Duration of Heating on Total Phenolic Content and Antifungal Activity Red Betle Leaf (*Piper crocatum*) Against *Candida albicans** (Supervised by Aliyah and Sartini)

Red betel leaf (*Piper crocatum*) is one of the plants that has medicinal properties, including to treat candidiasis. This research was conducted with the aim to find out the total phenolic content and antifungal activity of red betel leaf which was made by various extraction methods with varying temperature and heating duration of *Candida albicans*. The extraction process is carried out by infusion and decoction using water solvents. The results of the extraction were lyophilized using a freeze dryer. The results of the determination of total phenolic content obtained the highest levels in a 15 minute stew of 5,47%. The results of antifungal activity test of red betel leaf lyophilisate using microdilution method resulted in Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value >20 mg/mL, while the diffusion method so that the 10% concentration did not have inhibitory activity against *Candida albicans*.

Keywords : *Piper crocatum*, temperature, duration of heating, antifungal, total phenolic

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	i
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Deskripsi Tanaman Daun Sirih Merah	4
II.1.1 Klasifikasi Tanaman	4
II.1.2 Morfologi Tanaman	4
II.1.3 Kandungan Kimia dan Manfaat Tanaman	5
II.2 Metode Ekstraksi	5
II.3 Penguapan Pelarut	7
II.4 Pengeringan	7
II.5 Spektrofotometer UV-VIS	8

	halaman
II.6 Senyawa Fenolik	9
II.7 Uraian Mikroba Uji <i>Candida albicans</i>	10
II.8 Antifungi	11
II.9 Uji Aktivitas Antimikroba	12
II.9.1 Metode Difusi	12
II.9.2 Metode Dilusi	13
BAB III METODE PENELITIAN	14
III.1 Waktu dan Lokasi Penelitian	14
III.2 Alat dan Bahan	14
III.3 Definisi Operasional	15
III.4 Metode Penelitian	15
III.4.1 Penyiapan Sampel	15
III.4.2 Penyarian Sampel	15
III.4.3 Pembuatan Liofilisat	17
III.4.4 Analisis Total Fenolik	17
III.4.5 Uji Aktivitas Antifungi	19
III.5 Pengumpulan dan Analisis Data	22
III.6 Pembahasan	22
III.7 Kesimpulan	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
IV.1 Ekstraksi	23

	halaman
IV.2 Hasil Uji Penetapan Kadar Total Fenolik	23
IV.3 Hasil Uji Aktivitas Antifungi	24
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	28
V.1 Kesimpulan	28
V.2 Saran	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil perhitungan rendemen liofilisat daun sirih merah	23
2. Hasil perhitungan kadar total fenolik daun sirih merah	24
3. Hasil uji aktivitas antifungi liofilisat daun sirih merah terhadap <i>Candida albicans</i> dengan metode mikrodilusi	25
4. Hasil uji aktivitas antifungi liofilisat daun sirih merah terhadap <i>Candida albicans</i> dengan metode <i>paper disk</i>	25
5. Hasil uji aktivitas antifungi liofilisat daun sirih merah terhadap <i>Candida albicans</i> dengan metode pencadangan	25
6. Serapan asam galat	37
7. Serapan sampel	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>)	4
2. Kurva standar asam galat	37
3. Penimbangan sampel konsentrasi 10%	41
4. Hasil liofilisasi konsentrasi sampel 10%	41
5. Hasil pengamatan penentuan nilai KHM	41
6. Hasil pengamatan metode <i>paper disk</i> (rebusan 15' dan 30')	41
7. Hasil pengamatan metode <i>paper disk</i> (infus dan dekok)	41
8. Penimbangan sampel konsentrasi 30%	41
9. Hasil pengamatan metode pencadang konsentrasi sampel 30%	42
10. Penimbangan sampel konsentrasi 20%	42
11. Hasil liofilisasi konsentrasi sampel 20%	42
12. Hasil pengamatan metode pencadang konsentrasi sampel 20%	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja	33
2. Komposisi Bahan	34
3. Perhitungan % Rendemen	35
4. Perhitungan Kurva Baku	36
5. Perhitungan Kadar Total Fenolik	37
6. Dokumentasi Penelitian	41
7. Hasil Determinasi Tanaman	43

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Masyarakat pada umumnya terutama di Indonesia sejak dahulu telah mengenal tanaman yang mempunyai khasiat obat. Ramuan tanaman obat yang sering disebut herbal terbukti dalam mengobati berbagai penyakit. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat obat yaitu untuk mengobati kandidiasis yang disebabkan oleh jamur *Candida albicans* (Ulfa *et al.*, 2017 dan Gunawan *et al.*, 2015).

Daun sirih merah memiliki kandungan metabolit sekunder yakni flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan triterpenoid (Arambewela, 2005). Flavonoid yang terkandung berupa flavon, flavonol, flavonon, falvanonol, flavanol isoflavon, auron, katekin, antosianidin dan kalkon (Lister *et al.*, 2011). Selain itu, dalam sirih merah terdapat senyawa fenolik berupa kavikol, kavibetol asetat dan eugenol (Swapna *et al.*, 2011). Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenolik yang memiliki peran sebagai antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik dan antiinflamasi (Prayitno *et al.*, 2018).

Daun sirih merah mengandung minyak atsiri (betlephenol), sesquiterpen, pati, diatase, gula dan zat samak yang memiliki daya mematikan kuman, antioksidasi, dan antijamur, sehingga secara empiris berkhasiat mengurangi sekresi pada liang vagina dan keputihan akut.

Ekstrak daun sirih merah mampu mematikan jamur *C. albicans* penyebab keputihan akut, dan gatal-gatal pada alat kelamin (Wina *et al.*, 2015).

C. albicans adalah jamur golongan khamir yang paling umum ditemukan di rongga mulut, saluran pencernaan, saluran reproduksi dan kulit. Saat kondisi tubuh manusia menurun, maka *C. albicans* akan menyebabkan kandidiasis. Kandidiasis merupakan suatu penyakit yang banyak menginfeksi manusia dengan gejala bervariasi tergantung pada bagian tubuh yang terinfeksi (Alfiah *et al.*, 2015).

Berdasarkan penelitian Alamsyah *et al.* (2019), ekstrak etanol daun sirih merah memiliki efek antijamur terhadap *C. albicans* dengan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) yakni pada konsentrasi 5%, sedangkan menurut Pangesti *et al.* (2017) dalam Amanah *et al.* (2018), senyawa kavikol pada daun sirih merah dapat berinteraksi dengan dinding sel jamur, sehingga mengakibatkan terjadinya denaturasi protein dan meningkatkan permeabilitas sel jamur, akibatnya terjadi kebocoran pada dinding sel yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme yang lama kelamaan akan mengakibatkan kematian pada sel jamur tersebut.

Penelitian tentang ekstraksi daun sirih merah telah banyak dilakukan menggunakan pelarut organik dan metode ekstraksi tanpa pemanasan. Alfaribi *et al.* (2010) menggunakan pelarut etanol 70% sedangkan Reveny (2011) menggunakan pelarut etanol 80% untuk mengekstraksi. Menurut penelitian Prayitno *et al.* (2018) ekstrak etanol

70% memiliki kadar total fenol lebih besar dibandingkan ekstrak etanol 50% yang menandakan semakin tinggi konsentrasi etanol maka semakin tinggi pula kadar total fenol. Sehingga penelitian menggunakan pelarut air dan metode ekstraksi pemanasan ini dilakukan agar metode yang digunakan dapat diaplikasikan di masyarakat sesuai dengan standarisasi.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan agar dapat mengetahui pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap kadar total fenolik dan aktivitas antifungi daun sirih merah segar terhadap *Candida albicans*.

I.2 Rumusan Masalah

Suhu dan lama pemanasan berapakah dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang memiliki kadar total fenolik tertinggi dan aktivitas antifungi yang terbaik.

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui suhu dan lama pemanasan dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang memiliki kadar total fenolik tertinggi dan aktivitas antifungi yang terbaik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Deskripsi Tanaman Daun Sirih Merah

II.1.1 Klasifikasi tanaman



Gambar 1. Daun sirih merah (Hermiati *et al.*, 2013)

Klasifikasi tanaman daun sirih merah (*Piper crocatum*) yaitu sebagai berikut (Backer, 1963):

Kingdom	: Plantae
Filum	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliophyta
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: <i>Piper</i>
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav

II.1.2 Morfologi Tanaman

Sirih merah merupakan tanaman semak, batang bersulur dan beruas, dengan jarak buku antara 5 – 10 cm, dan pada setiap buku tumbuh bakal

akar. Daun bertangkai, berbentuk elips, bagian atas daun meruncing, tepi rata, mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya 9 – 12 cm dan lebar daunnya 4 – 5 cm. Daun bagian atas berwarna hijau tua, dengan daerah sekitar tulang daun keperakan, dan bagian bawah berwarna ungu. Daun berlendir, berasa pahit dengan bau hurang spesifik (Kohar *et al.*, 2016).

II.1.3 Kandungan Kimia dan Manfaat Tanaman

Senyawa yang terkandung dalam daun sirih merah adalah minyak atsiri, hidrosikavikol, kavibetol, allyprokatekol, karvakol, eugenol, p-cymene, tannin, terpen, dan fenil propada. Karvakol bersifat desinfektan dan antijamur, sehingga bias digunakan untuk obat antiseptik pada bau mulut dan keputihan (Mursito, 2004).

Pada pengobatan tradisional, sirih merah banyak dimanfaatkan sebagai antiseptik untuk mengeliminasi mikroorganisme terutama fungi *Candida albicans*, sebagai obat kumur, mencegah pembentukan plak gigi dan radang gusi, pengobatan hipertensi, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, mag, kanker payudara, nyeri sendi, penurun dan pengontrol kadar gula darah, serta gangguan jantung (Kohar *et al.*, 2016).

II.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian merupakan proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ada beberapa istilah yang banyak digunakan dalam ekstraksi, antara lain ekstraktan (yakni, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi), rafinat (yakni, larutan senyawa atau bahan yang akan diekstraksi), dan linarut (yakni,

senyawa atau zat yang diinginkan terlarut dalam rafinat). Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik, dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi. Pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari, mulai dari yang bersifat nonpolar hingga polar (Hanani, 2014).

Tujuan ekstraksi adalah menarik atau memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia. Pemilihan metode dilakukan dengan memerhatikan antara lain sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat yang tersedia. Struktur untuk setiap senyawa, suhu dan tekanan merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi (Hanani, 2014).

II.2.1 Infusa

Infusa adalah cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air, pada suhu 90 - 98° C selama 15 menit (dihitung setelah suhu 90° C tercapai). Bejana infusa tercelup dalam tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun (Hanani, 2014).

II.2.2 Dekok

Dekok adalah cara ekstraksi yang mirip dengan infusa, hanya saja waktu ekstraksinya lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air (Hanani, 2014).

II.3 Penguapan Pelarut

Penguapan hasil ekstraksi yang masih mengandung banyak pelarut, dimaksudkan untuk memperoleh ekstrak yang lebih pekat dengan tujuan agar konsentrasi senyawa lebih besar dan memudahkan penyimpanan. Penguapan dapat bersifat parsial sehingga diperoleh ekstrak cair dan kental. Pada proses pemekatan, suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi untuk mencegah peruraian senyawa dalam ekstrak. Penguapan sering dilakukan sebelum ekstrak diproses lebih lanjut, seperti pemisahan atau fraksinasi (Hanani, 2014).

Saat ini, penguapan banyak menggunakan penguap putar (*rotary evaporator*), dilakukan pada suhu rendah sekitar 40 - 50° C dan dibantu dengan alat vakum udara sehingga titik didih pelarut lebih rendah (Hanani, 2014).

Prinsip kerja alat *rotary evaporator* yakni didasarkan atas titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari pelarut tersebut terkumpul di atas, sehingga setelah pelarut diuapkan, maka akan diperoleh ekstrak kental (Moektiwardoyo, 2019).

II.4 Pengeringan

Pengeringan beku (*freeze drying*) adalah salah satu metode pengeringan yang mempunyai keunggulan dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan. Khususnya untuk produk-produk yang sensitif terhadap panas. Prinsip dasar pengeringan beku adalah proses menghilangkan

kandungan air dalam suatu bahan atau produk yang telah beku (es) tanpa melalui fase cair terlebih dahulu (Hiola, 2018).

Adapun keunggulan menggunakan metode peneringan beku yakni produk yang dihasilkan akan menjadi lebih stabil kualitasnya (tidak terjadi perubahan aroma, warna, dan unsur organoleptik lainnya), struktur bahan di dalam produk tetap stabil, dan daya rehidrasi produk meningkat (Hiola, 2018).

II.5 Spektrofotometer UV – VIS

Spektrofotometer UV–VIS merupakan gabungan antara prinsip spektrofotometer UV dan visible. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Larutan yang dianalisis diukur serapan sinar ultra violet atau sinar tampaknya. Konsentrasi larutan yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terapat dalam larutan tersebut (Sembiring *et al.*, 2019).

Spektrofotometri UV-VIS mengacu pada hukum Lambert-Beer. Apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut akan diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi akan dipancarkan. Sinar dari sumber cahaya akan dibagi menjadi dua berkas oleh cermin yang berputar pada bagian dalam spektrofotometer. Berkas pertama akan melewati kuvet berisi blanko, sementara berkas kedua akan melewati kuvet berisi sampel. Blanko dan sampel akan diperiksa secara bersamaan. Adanya blanko, berguna untuk

menstabilkan absorpsi akibat perubahan voltase dari sumber cahaya (Sembiring *et al.*, 2019).

Analisis secara kuantitatif menggunakan spektroskopi UV–VIS yakni menentukan konsentrasi senyawa menggunakan kurva baku. Dimana syarat untuk menentukan konsentrasi senyawa, yaitu harus memiliki senyawa standar. Senyawa standar adalah senyawa yang telah diketahui sifat-sifat fisika dan kimianya. Sifat-sifat fisika antara lain: indeks bias, titik didih, titik lebur, putaran optik sedangkan sifat-sifat kimia meliputi gugus fungsi, rumus molekul maupun struktur senyawa (Sastrohamidjojo, 2018).

II.6 Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik adalah senyawa aromatis dengan substituen gugus hidroksi, ada 2 bentuk senyawa fenolik yaitu monomer dan polimer. Pada tumbuhan, senyawa fenolik banyak terdapat dalam bentuk polifenol. Polifenol merupakan metabolit sekunder tanaman tertentu dan merupakan penyusun golongan fenil propanoid, kumarin, flavonoid, isoflavonoid, lignin, dan tannin (Rollando, 2019).

Tumbuhan mempunyai kemampuan untuk melakukan sintesis senyawa aromatik dari berbagai gugus fungsi seperti derivat fenol atau derivat oksigen lainnya. Aktivitas antifungi dari senyawa fenolik disebabkan karena adanya kandungan cincin fenolik. Mekanisme penghambatan senyawa fenolik terhadap fungi adalah penghambatan aktivitas enzim dengan cara oksidasi senyawa. Selain itu, tanin dan asam

salisilat merupakan senyawa polifenol yang diketahui memiliki aktivitas antifungi yang dapat diisolasi dari tanaman. Flavonoid juga merupakan senyawa fenolik hidroksilasi yang dapat disintesis dari tanaman yang dapat digunakan sebagai pengobatan infeksi mikroba (Arif *et al.*, 2011).

II.7 Uraian Mikroba Uji *Candida albicans*

Klasifikasi jamur *Candida albicans* adalah sebagai berikut (Tjampakasari, 2006):

Kingdom : Fungi
 Filum : Ascomicota Subfilum
 : Saccharomycotina Kelas :
 Saccharomycetes Ordo :
 Saccharomycetales Famili :
 Saccharomycetaceae Genus :
Candida
 Spesies : *Candida albicans*

Spesies *Candida* berbentuk oval, kecil dengan ukuran 2-6 μm , memiliki dinding tipis dan menyerupai khamir. Koloni *Candida* berwarna putih krim, permukaan rata, licin, dan mengkilap (Kauffman *et al.*, 2011). *Candida albicans* merupakan jamur bersifat diploid yang dapat tumbuh sebagai sel khamir maupun sel berfilamen dan menyebabkan infeksi oral dan genital (Harit *et al.*, 2013).

Candida albicans menimbulkan suatu keadaan yang disebut kandidiasis, yaitu penyakit pada selaput lender mulut, vagina, dan saluran

pencernaan. Infeksi yang lebih gawat dapat menyerang jantung, darah, dan otak. Organisme ini dapat hidup sebagai saprofit pada selaput-selaput lendir tersebut di atas (Pelczar, 1986).

II.8 Antifungi

Antifungi atau antijamur merupakan bagian dari antibiotik yang membunuh (fungisidal) atau memperlambat (fungistatik) pertumbuhan jamur. Adapun mekanisme kerja antifungi dapat dikelompokkan menjadi:

a. Gangguan pada membran sel

Gangguan ini terjadi karena adanya ergosterol dalam sel jamur, ini adalah komponen sterol yang sangat penting yang sangat mudah diserang oleh antibiotik turunan polien. Kompleks polien-ergosterol yang terjadi dapat membentuk suatu pori dan melalui pori tersebut konstituen esensial sel jamur seperti ion K, fosfat organik, asam karboksilat, asam amino dan ester fosfat bocor keluar hingga menyebabkan kematian sel jamur (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

b. Penghambatan biosintesis ergosterol dalam sel jamur

Mekanisme ini merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan imidazole karena mampu menimbulkan ketidakaturan membran sitoplasma jamur dengan cara mengubah permeabilitas membrane dan mengubah fungsi membran dalam proses pengangkutan senyawa-senyawa esensial yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolik sehingga

menghambat pertumbuhan atau menimbulkan kematian sel jamur (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

c. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein jamur

Mekansme ini merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan pirimidin. Efek antijamur terjadi karena senyawa turunan pirimidin mampu mengalami metabolisme dalam sel jamur menjadi suatu antimetabolit. Metabolik antagonis tersebut kemudian bergabung dengan asam ribonukleat dan kemudian menghambat sintesis asam nukleat dan protein jamur (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

d. Penghambatan mitosis jamur

Efek antijamur ini terjadi karena adanya senyawa antibiotik griseofulvin yang mampu mengikat protein mikrotubuli dalam sel, kemudian merusak struktur *spindle mitotic* dan menghentikan metafasa pembelahan sel jamur (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

II.9 Uji Aktivitas Antimikroba

II.9.1 Metode Difusi

Pengujian potensi antimikroba secara mikrobiologi dapat dilakukan salah satunya dengan metode difusi agar. Pada pengujian sensitivitas suatu antibiotika dengan difusi agar, berarti metode ini menggunakan media padat, yang pada permukaannya telah diinokulasikan mikroorganisme uji yang sensitif terhadap antibiotika secara merata. Difusi

merupakan proses perpindahan molekul secara acak dari satu posisi ke posisi lain. Pada difusi tersebut, yang perlu diperhatikan adalah dosis, kecepatan dan energi kinetik dari proses tersebut. Metode difusi dibedakan atas dua jenis yaitu difusi linier dan difusi radial (Djide dan Sartini, 2008).

II.9.2 Metode Dilusi

Metode yang paling umum digunakan untuk menentukan nilai KHM suatu antimikroba adalah metode dilusi agar dan dilusi cair. Metode dilusi agar dilakukan dengan memasukkan larutan mikroba secara langsung kedalam suatu media agar dalam plate yang berisi berbagai konsentrasi antimikroba. Setelah masa inkubasi, adanya koloni mikroba pada plate mengindikasikan pertumbuhan mikroorganisme. Sementara metode dilusi cair dilakukan dengan menggunakan media cair yang mengandung antimikroba dengan konsentrasi yang meningkat dua kali lipat, kemudian diinokulasikan sejumlah sel mikroba (Wiegand *et al.*, 2008).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan di Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Biofarmaka, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Penelitian Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar.

III.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah panci infus, timbangan analitik (Acis Model AD 6001[®]), kompor gas, *stopwatch*, *freeze dryer* (FreeZone[®]), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu[®]), autoklaf (All American model 25X-2[®]), oven (Memmert[®]), cawan petri (Normax[®]), jarum ose, *microplate well 48*, pipet mikro (FisherBrand[®]), tabung *eppendorf*, spoit, pencadang, *paper disk*, vial, BSC (Biobase[®]) dan alat-alat gelas (Pyrex[®]).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah, NaOH, reagen *Follin-ciocalteau*, baku standar asam galat, biakan *Candida albicans*, DMSO (Dimetil Sulfoksida) 10%, medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), medium *Potato Dextrose Broth* (PDB), suspensi nistatin, kain *flannel*, dan aquadest.

III.3 Definisi Operasional

Rebusan daun sirih merah adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara merebus daun sirih merah yang telah dipotong kecil-kecil dengan ukuran $\pm 1 - 1,5 \text{ cm}^2$ dengan air pada suhu 100° C atau telah mendidih selama 15 dan 30 menit.

III.4 Metode Penelitian

III.4.1 Penyiapan Sampel

Sampel berupa daun sirih merah yang dipetik pada pagi hari sekitar pukul 09:00 – 11:00 WITA di Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, lalu ditiriskan. Kemudian dilakukan sortasi dan dipilih daun yang layak. Selanjutnya sampel dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih $\pm 1 - 1,5 \text{ cm}^2$.

III.4.2 Penyarian Sampel

Sampel disari menggunakan metode infus, dekok dan rebusan, dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30% serta lama pemanasan masing-masing 15 dan 30 menit.

1. Pembuatan Infus Daun Sirih Merah

Infus daun sirih merah segar dengan konsentrasi 10% dibuat dengan cara: ditimbang daun sirih merah sebanyak 10 g, lalu dimasukkan ke dalam panci infus, kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL, diaduk hingga rata, lalu dipanaskan dengan api langsung masing-masing

selama 15 menit terhitung mulai saat suhu mencapai 90° C, kemudian didinginkan dan diserkai menggunakan kain *flannel*. Diukur volume akhir hasil rebusan, jika kurang, volume dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL. Konsentrasi sampel 20% dan 30% dibuat dengan cara yang sama pada pembuatan infus konsentrasi sampel 10% yakni ditimbang daun sirih merah sebanyak 20 g dan 30 g.

2. Pembuatan Dekok Daun Sirih Merah

Dekok daun sirih merah dibuat dengan konsentrasi dan cara yang sama dengan pembuatan infus, hanya waktu pemanasannya yang berbeda yaitu pada pembuatan dekok waktunya 30 menit terhitung mulai saat suhu mencapai 90° C.

3. Pembuatan Rebusan Daun Sirih Merah

Rebusan daun sirih merah segar dengan konsentrasi 10% dibuat dengan cara: ditimbang daun sirih merah sebanyak 10 g, lalu dimasukkan ke dalam panci, kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL, diaduk hingga rata, lalu dipanaskan dengan api kecil masing-masing selama 15 dan 30 menit terhitung mulai jika telah mencapai 100° C atau telah mendidih, kemudian didinginkan dan diserkai menggunakan kain *flannel*. Diukur volume akhir hasil rebusan, jika kurang, volume dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL. Konsentrasi sampel 20% dan 30% dibuat dengan cara yang sama pada pembuatan rebusan konsentrasi sampel 10% yakni ditimbang daun sirih merah sebanyak 20 g dan 30 g.

III.4.3 Pembuatan Liofilisat

Hasil serkaian dari daun sirih merah dimasukkan ke dalam cawan petri, lalu dibekukan menggunakan *freezer*, kemudian dimasukkan ke dalam alat *freeze dryer* hingga diperoleh liofilisat.

III.4.4 Analisis Total Fenolik

III.4.4.1 Pembuatan Reagen NaOH 1%

Ditimbang NaOH sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 100 mL.

III.4.4.2 Pembuatan Larutan Stok Asam Galat

Dibuat larutan stok asam galat konsentrasi 1000 ppm dengan cara ditimbang 10 mg asam galat, kemudian dilarutkan dengan air bebas CO₂ dalam labu tentukur 100 mL hingga tanda batas.

III.4.4.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Dipipet larutan stok sebanyak 0,08 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan 5 mL reagen *Folin-ciocalteau* dan didiamkan selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% dikocok hingga homogen. Ditambahkan air bebas CO₂ hingga 10 mL dan didiamkan selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400 – 800 nm.

III.4.4.4 Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Satu seri larutan asam galat dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dengan memipet masing-masing 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L dan 100 μ L larutan stok, lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dilakukan perlakuan yang sama seperti pada penentuan panjang gelombang maksimum. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum, dibuat kurva antara serapan terhadap konsentrasi asam galat (mg/L).

III.4.4.5 Penetapan Kadar Total Fenolik Liofilisat Daun Sirih Merah

Liofilisat daun sirih merah ditimbang saksama masing-masing sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 10 mL. Larutan liofilisat dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan reagen *Folin-ciocalteau* 5 mL dan didiamkan selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% dan dikocok hingga homogen. Ditambahkan air bebas CO₂ hingga 10 mL dan didiamkan selama 60 menit pada suhu ruang dan diukur serapan pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan juga pengukuran serapan larutan blanko. Kadar total fenolik dihitung dengan bantuan kurva baku. Dilakukan 3 kali pengulangan. Kadar fenolik yang diperoleh dihitung sebagai mg ekuivalen asam galat/g liofilisat (Anonim, 2013).

III.4.5 Uji Aktivitas Antifungi

III.4.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan cara sterilisasi yang sesuai dengan masing-masing alat dan bahan yang akan digunakan. Alat gelas yang tahan panas tinggi dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 180⁰ C selama 30 menit sebelumnya dibungkus dengan aluminium foil. Untuk medium dan aquadest disterilisasi dengan cara sterilisasi uap basah menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit.

III.4.5.2 Pembuatan Medium PDA dan PDB untuk Kultur *Candida albicans*

Ditimbang serbuk PDA sebanyak 3,9 g, dilarutkan dengan aquadest dalam labu Erlenmeyer, kemudian dicukupkan hingga 100 mL. Selanjutnya medium dipanaskan di atas tangas air hingga larut sempurna, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰ C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium PDB dibuat dengan cara yang sama pada pembuatan medium PDA yakni menimbang serbuk PDB sebanyak 2,4 g.

III.4.5.3 Penyiapan Fungi Uji

Fungi uji disiapkan dengan meremajakan *Candida albicans* dengan cara diambil 1 ose fungi uji *C. albicans*, kemudian diinokulasikan di atas permukaan medium PDA yang telah dipadatkan dalam tabung reaksi secara miring, kemudian diinkubasi pada suhu 25⁰ C selama 3 x 24 jam.

III.4.5.4 Pembuatan Suspensi Fungi

Disuspensikan koloni *C. albicans* yang telah diremajakan dalam air steril 9 mL. Kekeruhan yang didapat lalu disetarakan dengan standar larutan Mc Farland 0,5 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan $0,5 \times 10^8$ CFU/mL (Oonmetta-aree, *et al.*, 2005).

III.4.5.5 Uji Aktivitas Antifungi dengan Metode Mikrodilusi

Dilakukan uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan menggunakan metode mikrodilusi cair pada sumuran *microplate* 48 wells. Masing-masing liofilisat daun sirih merah dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 0,5 mL dan dicukupkan dengan aquadest. Selanjutnya dibuat pengenceran bertingkat liofilisat daun sirih merah dengan konsentrasi 20% (200 mg/mL), 10% (100 mg/mL), 5% (50 mg/mL), 2,5% (25 mg/mL). Dibuat konsentrasi 100 mg/mL dengan cara mengambil 0,5 mL dari larutan konsentrasi liofilisat 20% (200 mg/mL) dan dicukupkan dengan aquadest hingga 1 mL dalam tabung *ependorf*. Pembuatan konsentrasi selanjutnya dibuat dengan cara yang sama. Selanjutnya 50 μ L dari konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam sumuran *microplate*, lalu diencerkan dengan medium PDB sebanyak 400 μ L dan suspensi *Candida albicans* 50 μ L disetiap sumuran, kemudian dihomogenkan. Sehingga volume setiap sumuran menjadi 500 μ L dan konsentrasi liofilisat daun sirih merah menjadi 2% (20 mg/mL), 1% (10 mg/mL), 0,5% (5 mg/mL), dan 0,25% (2,5 mg/mL). Pada sumuran yang lain diisi dengan pengujian kontrol positif (suspensi *C. albicans* dan medium), kontrol negatif

(medium), dan kontrol blanko (tanpa sampel). Selanjutnya *well plate* diinkubasi pada suhu 25⁰ C selama 3 x 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan dengan melihat tingkat kekeruhan ada/tidaknya endapan yang terbentuk pada dasar *plate*. Sumuran yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan atau endapan pada dasar *plate* mengindikasikan tidak adanya pertumbuhan fungi dan pada konsentrasi terendah menunjukkan nilai KHM liofilisat daun sirih merah.

III.4.5.6 Uji Aktivitas Antifungi dengan Metode Difusi (*Paper Disk*)

Masing-masing liofilisat daun sirih merah dibuat larutan dengan konsentrasi 10% dengan menggunakan pelarut DMSO 10%. Selanjutnya dimasukkan medium PDA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri dan ditambahkan suspensi *Candida albicans* sebanyak 0,3 mL lalu dihomogenkan menggunakan *spraidler* dan didiamkan hingga memadat. Kertas cakram diletakkan di atas medium dan ditetesi larutan uji sebanyak 10 µL. Diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 25° C. Setelah itu, dilakukan pengamatan dengan melihat adanya zona bening yang terbentuk disekitar cakram, lalu diukur diameter zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Sebagai perbandingan kontrol positif digunakan cakram kosong yang ditetesi antifungi suspensi nistatin.

III.4.5.7 Uji Aktivitas Antifungi dengan Metode Difusi (*Pencadang*)

Masing-masing liofilisat daun sirih merah (konsentrasi sampel 20% dan 30%) dibuat dengan konsentrasi 10% (100 mg/mL) yang dilarutkan dengan aquadest, kemudian dibuat *base layer* dengan cara memasukkan

medium PDA sebanyak 10 mL ke dalam cawan petri, lalu didiamkan hingga memadat. Selanjutnya dibuat *sheet layer* dengan cara memasukkan medium PDA ke dalam botol sebanyak 10 mL yang ditambahkan dengan suspensi *Candida albicans* sebanyak 100 μ L dan dihomogenkan lalu dituang ke dalam cawan petri yang telah berisi medium PDA sebelumnya. Kemudian diletakkan pencadang pada permukaan medium dan diteteskan masing-masing larutan uji sampel sebanyak 200 μ L pada pencadang. Diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 25^o C. Setelah itu, dilakukan pengamatan dengan melihat adanya zona hambat yang terbentuk disekitar pencadang, lalu diukur diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

III.5 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penetapan kadar total fenolik dan hasil pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dikumpulkan dan dilakukan perhitungan dan pengolahan data berdasarkan hasil yang didapatkan.

III.6 Pembahasan

Dilakukan pembahasan berdasarkan analisis data.

III.7 Kesimpulan

Dilakukan penarikan kesimpulan berdasarkan hasil pembahasan.