

Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Sirih (*Piper Betle* Linn.) dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

Reza Muchlas Fauziansyah*, Rio Risandiansyah **, Arif Yahya**

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

e-mail: rezamuchlas@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are the most causes of infectious diseases. Handling of infections has been using antibiotics that can cause resistance and disbiosis of intestinal microbiota. The use of adjuvants from herbs is needed to increase the effectiveness of antibacterials and prevent dibiosis, one of which uses betel leaves. Research on the combination of betel leaves with amoxicillin (AMX), cotrimoxazole (CTX), and chloramphenicol (CHL) needs to be done.

Method: Combined Zone of Inhibition (ZOI) Test using Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST) in Nutrient Agar. A single or a combination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is carried out by macrodilution. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is determined by the presence of a clear area formed on the petri dish. The nature of the interaction between MIC and MBC betel leaves and antibiotics was calculated using the Checkerboard assay.

Result: Betel leaf extract has a zone of inhibition on *S. aureus* greater than *E. coli* (32.66 ± 6.42 mm / 23.33 ± 4.16 mm). The MIC of betel leaf, AMX, CTX, and CHL against *S.aureus* were 0,0039mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, and 0,0078mg/ml as well as against *E.coli* were 0,03125mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml and 0,0009mg/ml. The MBC of betel leaf, AMX, CTX, and CHL against *S.aureus* were 0,0039mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml and also against *E.coli* were 0,03125mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, and 0,00097mg/ml. The combination of betel leaves with antibiotics increase the MIC and MBC against *S.aureus* and *E.coli*

Conclusion: The combination of betel leaves is antagonistic with AMX, CTX, and CHL against *S. aureus*. The combination of betel leaves is additive with CHL and is antagonistic with AMX and CTX against *E. coli*

Keywords: Betel leaf, Amoxicillin, Chloramphenicol, Cotrimoxazole, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan paling serius di dunia sampai awal abad ke-20 (1). Penyebab terbesar dari infeksi bakteri adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (2). Infeksi *S. aureus* diasosiasikan dengan beberapa kondisi patologi diantaranya adalah furunkel, akne vulgaris, pneumonia dan meningitis (3), sedangkan infeksi *E. coli* antara lain infeksi saluran kemih sebesar 90% dan peritonitis akut 50% (4).

Tatalaksana infeksi selama ini menggunakan antibiotik lini pertama antara lain amoxicillin (AMX), chloramphenicol (CHL), dan cotrimoxazole (CTX). Penggunaan antibiotik ini dalam jangka panjang dapat menimbulkan resistensi antibiotik (5,6) dan gangguan mikrobiota usus (7-9). Penggunaan adjuvan berupa herbal diperlukan untuk meningkatkan efektivitas antibiotik

Daun sirih (*Piper betle*) diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Hal ini disebabkan oleh adanya senyawa metabolit sekunder seperti tanin, flavonoid dan minyak atsiri (10). Ekstrak etilasetat daun sirih mengandung senyawa dominan hydroxy chavicol, chavibetol, dan eugenol (11) dapat membunuh

Staphylococcus epidermidis (12). Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun sirih mengandung hydroxy chavicol dan eugenol (13) dapat membunuh *E.coli* dan *S.aureus*. Penelitian di Bangladesh menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirih juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli*, *S.aureus*, dan *V.cholera*. Beberapa penelitian juga menggunakan daun sirih sebagai adjuvan antibiotik. Kombinasi ekstrak daun sirih dan antibiotik chloramphenicol bersifat sinergis terhadap *E.coli*, *S.aureus* (14), *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *E.coli extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) (15). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih berpotensi sebagai adjuvan antibiotik.

Interaksi herbal dan antibiotik sering menimbulkan efek yang berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan oleh mekanisme antibiotik yang berbeda – beda dalam membunuh bakteri. AMX berkerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri. CTX berkerja dengan cara menghambat sintesis asam folat dalam bakteri. CHL berkerja dengan cara menghambat sintesis protein dalam bakteri (16). Oleh sebab itu, penelitian lanjutan mengenai efek kombinasi daun sirih dengan AMX, CTX, dan CHL diperlukan.

Penelitian mengenai efek kombinasi daun sirih dari Indonesia dengan antibiotik AMX, CTX, dan CHL belum pernah diteliti. Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin mengetahui mengenai efek kombinasi daun sirih dengan antibiotik AMX, CTX, dan CHL terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

M E T O D E

Pembuatan Ekstraksi Herbal Daun Sirih

Herbal yang digunakan pada penelitian ini adalah Daun Sirih (*Piper Bettle* Linn) didapatkan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Herbal diekstraksi di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan cara herbal dihaluskan terlebih dahulu. Herbal ditimbang menggunakan timbangan digital dan didapatkan 10 gr selanjutnya dimaserasi menggunakan 500 ml pelarut metanol 96%. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer dan ditutup, kemudian dimasukkan kedalam *shaker* dengan kecepatan 50 rpm selama 24 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang didapat di tampung dalam tabung dan dikeringkan di oven.

Kultur Bakteri

Bakteri yang digunakan peneliti yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dari Laboratorium Terpadu Universitas Islam Malang yang diambil dari isolat klinis. Pembiakan bakteri diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Agar*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37°C selama ±18-24 jam.

Pembuatan Suspensi Bakteri Standar Mc Farland

Larutan standar Mc Farland yang telah tersedia diputar hingga homogen untuk membandingkan suspensi bakteri. Tabung diisi dengan NaCl 0,9% steril dan bakteri. Tabung disamakan larutannya hingga setara dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.

Uji Zona Inhibisi

Uji zona inhibisi menggunakan metode disk dengan melihat *clear zone* pada petri disk. Pembuatan zona ini diawali dengan pembuatan media dan bakteri. Petri disk dilakukan platting pada media hingga menjadi rata dan memadat. Kemudian pada media agar diberi sumur sekitar 6 mm dan dibagi menjadi beberapa kelompok. Kelompok pertama diberikan larutan ekstrak daun sirih + AMX. Pada kelompok kedua diberikan larutan herbal dan CHL serta kelompok ketiga diberikan ekstrak herbal dan CTR. Konsentrasi awal ekstrak herbal yang digunakan adalah 1 mg/ml. Setiap larutan dimasukkan dalam sumuran dengan volume total 20µL. Volume total terdiri dari 10µL ekstrak herbal dan 10 µL antibiotik. Media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam (17).

Penghitungan interaksi zona inhibisi menggunakan metode AZDAST menggunakan kombinasi dari herbal dosis tinggi (HDT), herbal dosis rendah (HDR), antibiotik dosis tinggi (ADT), dan antibiotik dosis rendah (ADR). Hasil didefinisikan sinergis apabila $(HDT)+(ADT) > 2(HDT)/2(ADT)$. Hasil didefinisikan *enhancement* apabila $(HDT)+(ADR) > 2(HDT)/2(ADT)$. Hasil didefinisikan antagonis apabila $(HDT)+(ADT) < (HDT)/(ADT)$. Hasil didefinisikan aditif apabila $(HDT)+(ADT) = 2(HDT)/2(ADT)$ (17).

Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

Untuk menentukan kadar hambat minimum ekstrak daun sirih dengan menggunakan metode mikrodilusi. Untuk variasi sampel menggunakan sampel yang sama yang digunakan dalam pengukuran zona inhibisi. Konsentrasi awal ekstrak herbal adalah 1mg/ml.

Pengukuran KHM Antibiotik tunggal menggunakan mikrodilusi dengan konsentrasi awal antibiotik adalah 0,5mg/ml. Volume antibiotik 100uL dicampurkan dengan *Nutrient Broth* yang berisi bakteri sebanyak 10^8 dengan volume 100uL. Volume total tiap well plat adalah 200uL. *Well plate* diinkubasi dalam suhu 37°C. Hasilnya dinilai dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Pengukuran KHM Kombinasi dilakukan dengan cara makrodilusi. KHM daun sirih yang didapatkan dari pengukuran KHM tunggal dicampurkan dalam antibiotik dengan berbagai konsentrasi. Hasil dilihat dengan cara mengamati adanya endapan dibawah tabung reaksi.

Hasil KHM akan dilakukan pengukuran FIC untuk mengetahui sifat kombinasi antara daun sirih dan antibiotik (18). Rumus Fractional Inhibitory Concentration (FIC) sebagai berikut :

$$\sum FIC = \frac{KHM\ kombinasi\ A}{KHM\ tunggal\ A} + \frac{KHM\ kombinasi\ B}{KHM\ tunggal\ B}$$

Hasil yang diperoleh apabila, sinergis = FIC indeks ≤ 0,5; Aditif = 0,5-4, Antagonis = >4.

Uji Kadar Bunuh Minimal (KBM)

Setelah menentukan kadar hambat minimum maka pada petridisk akan diberikan tanda persegi dengan ukuran 1,5cm x1,5cm. Pada masing-masing persegi akan diberikan 10µL dari 96-well plat KHM kombinasi. Petridisk diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Nilai KBM ditentukan pada kadar minimum bakteri tidak dapat tumbuh di petridisk. Hasil KBM akan dilakukan pengukuran FBC untuk

pengujian menggunakan non parametrik. Data dianggap signifikan apabila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Zona Inhibisi dari Daun Sirih dan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil dan analisa data zona inhibisi daun sirih terdapat dalam gambar 1 dan tabel 1.

Tabel 1. Diameter Zona Inhibisi Daun Sirih dan Beberapa Antibiotik terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Bakteri	Dilusi	Rata-Rata Diameter Zona Inhibisi (mm)			
		Pb	AMX	CHL	CTX
<i>E.coli</i>	1/2x	23,33±4,16	16,67±0,57	34,67±1,15	20,67±0,57
	1/4x	0	13,33±0,57	28,00±3,46	16,33±0,57
	1/8x	0	11,00±0	24,00±2	14,33±0,57
	1/16x	0	10,67±1,15	16,33±4,72	12,00±1
	1/32x	0	5,33±4,61	12,00±3,46	0
<i>S.aureus</i>	1/2x	32,67±6,42	21,67±1,52	32,67±1,15	25,00±3,00
	1/4x	20,67±1,15	19,33±1,52	29,33±1,15	19,33±1,52
	1/8x	14,67±1,15	16,67±1,52	24,00±2	15,67±2,08
	1/16x	0	14,00±2	19,67±0,57	12,00±1,00
	1/32x	0	10,33±2,08	15,67±1,52	0

Keterangan : Pb, Daun Sirih; AMX, Amoxicillin; CHL, Kloramfenikol; CTX, Kotrimoksazol

mengetahui sifat kombinasi antara daun sirih dan antibiotik(18). Penetapan Hasil KBM kombinasi menggunakan rumus *Fractional Bactericidal Concetration* (FBC) untuk mengetahui interaksinya.

$$\sum FBC = \frac{KBM \text{ kombinasi A}}{KBM \text{ tunggal A}} + \frac{KBM \text{ kombinasi B}}{KBM \text{ tunggal B}}$$

Hasil yang diperoleh apabila, sinergis = FBC indeks $\leq 0,5$; Aditif = 0,5-4, Antagonis = >4 . Analisa KBM dilakukan dengan ada tidaknya bakteri secara visual pada media *Nutrient Agar* di petri disk.

Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *t-test* untuk menilai apakah ada perbedaan yang bermakna antar kelompok. Apabila syarat parametrik tidak terpenuhi akan dilakukan

Berdasarkan hasil rerata pada tabel menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang digunakan semakin lebar zona inhibisinya. Hal ini terbukti pada *E.coli* dengan ZOI sebesar 23,33±4,16 dan untuk *S.aureus* dengan ZOI sebesar 32,67±6,42. Gambar zona inhibisi pada Daun sirih dapat dilihat pada gambar 1.

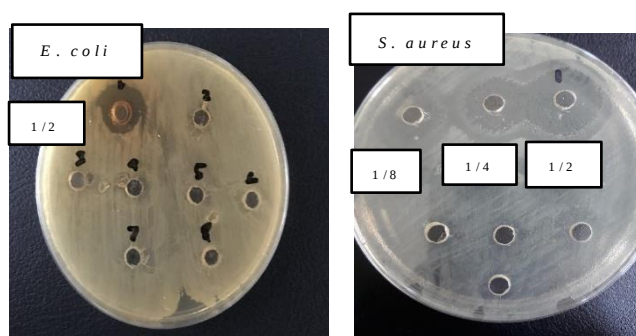
ZOI Kombinasi

Berdasarkan tabel 2 menunjukkan bahwa semakin besar dosis yang diguanakn semakin besar *clear zone* nya. CHL merupakan antibiotik yang bekerja paling kuat pada *E. coli* dan *S. aureus* dibandingkan dengan AMX dan CTX. Zona inhibisi yang terbentuk pada *E. coli* adalah 34,67±1,15 mm, sedangkan pada *S.aureus* zona inhibisi yang terbentuk sebesar 32,67±1,15 mm.

Tabel 2. Hasil dan Analisa Data Zona Inhibisi dari Kombinasi Daun Sirih dengan Beberapa Antibiotik terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Bakteri	Model Kombinasi	Dosis	Rerata	Dosis	Rerata	Dosis	Rerata
		Konsentrasi [Pb], [AM X]	AM X (mm) $\pm$ SD	Konsentrasi [Zz], [CHL]	CHL (mm) $\pm$ SD	Konsentrasi [Pb], [CTX]	CTX (mm) $\pm$ SD
<i>E.coli</i>	HB+, AB-	[1/2], [1/32]	6,33 $\pm$ 0,57	[1/2], [1/32]	6,66 $\pm$ 0,57	[1/2], [1/16]	6 $\pm$ 0
	HB-, AB+	[1/16], [1/8]	4,66 $\pm$ 0,57	[1/16], [1/16]	9,66 $\pm$ 0,57	[1/16], [1/4]	5 $\pm$ 0
	HB+, AB+	[1/2], [1/8]	7,66 $\pm$ 0,57	[1/2], [1/16]	9,33 $\pm$ 1,15	[1/2], [1/4]	7 $\pm$ 0
<i>S.aureus</i>	HB-, AB-	[1/16], [1/32]	3,66 $\pm$ 0,57	[1/16], [1/32]	3,33 $\pm$ 0,57	[1/16], [1/16]	3,66 $\pm$ 0,57
	HB+, AB-	[1/4], [1/16]	6 $\pm$ 1,73	[1/4], [1/32]	4 $\pm$ 1	[1/4], [1/16]	2 $\pm$ 0
	HB-, AB+	[1/32], [1/8]	0 $\pm$ 0	[1/32], [1/8]	7,66 $\pm$ 0,57	[1/32], [1/4]	4,33 $\pm$ 0,57
	HB+, AB+	[1/4], [1/8]	3,66 $\pm$ 4,6	[1/4], [1/8]	5,33 $\pm$ 0,57	[1/4], [1/4]	3,66 $\pm$ 0,57
	HB-, AB-	[1/32], [1/32]	0 $\pm$ 0	[1/32], [1/32]	2 $\pm$ 0	[1/32], [1/16]	2 $\pm$ 0

Keterangan : HB+, konsentrasi daun sirih dengan diameter zona inhibisi terbesar; Hb-, konsentrasi daun sirih dengan diameter zona inhibisi terendah; AB+, konsentrasi antibiotik dengan diameter terbesar; AB-, konsentrasi antibiotik dengan diameter terendah; [Pb], Konsentrasi *Piper betle*; [AM X], Amoksisilin; [CHL], Kloramfenikol; [CTX], Kotrimoksazol.



Gambar 1. Zona Inhibisi dari Daun Sirih terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Kadar Hambat Minimum dari Daun Sirih Tunggal dan Kombinasinya dengan Berbagai Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil dan analisa kadar hambat minimum daun sirih tunggal dan kombinasinya dengan berbagai antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli* terdapat tabel 3 dan tabel 4.

Berdasarkan tabel 3 menyebutkan bahwa KHM Pb, AM X, CHL dan CTX adalah 0,03125mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, dan 0,0009mg/ml terhadap *E.coli*. KHM Pb, AM X, CHL, dan CTX antara lain 0,0039mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, dan 0,0078mg/ml. Berdasarkan tabel 4 menyatakan bahwa kombinasi antibiotik dengan daun sirih menghasilkan KHM antibiotik AM X, CHL, CTX terhadap *E.coli* adalah 0,0156mg/ml, 0,0156mg/ml, dan 0,0039mg/ml. KHM kombinasi daun sirih dengan antibiotik AM X, CHL, CTX terhadap *S.aureus* adalah 0,0156mg/ml, 1/256, dan 0,0156mg/ml

Kadar Bunuh Minimum Daun Sirih Tunggal dan Kombinasinya dengan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil dan analisa kadar bunuh minimum daun sirih tunggal dan kombinasinya dengan berbagai antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli* terdapat tabel 3 dan tabel 5.

KBM Pb, AM X, CHL, dan CTX antara lain 0,0039mg/ml, 0,0078mg/ml, 0,0078mg/ml, dan 0,0078mg/ml (tabel 3). Efek KBM kombinasi ditunjukkan oleh tabel 5. KBM kombinasi daun sirih dengan antibiotik AM X, CHL, CTX terhadap *S.aureus* adalah 0,0156mg/ml, 0,0019mg/ml, dan 0,0156mg/ml. KBM kombinasinya terhadap *E.coli* yaitu AM X, CHL, CTX sebesar 0,0156mg/ml, 0,0156mg/ml, dan 0,0039mg/ml.

PEMBAHASAN

Zona Inhibisi, Kadar Hambat Minimum, dan Kadar Bunuh Minimum Daun Sirih Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Daun sirih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* dan *E.coli* (Tabel 1). Hasil tabel 1 menunjukkan bahwa diameter zona inhibisi daun sirih konsentrasi tertinggi terhadap *S.aureus* lebih besar dari pada *E.coli* yaitu 32,67 $\pm$ 6,42 mm. Penurunan konsentrasi daun sirih menjadi 1/4x menyebabkan zona inhibisi *E.coli* menjadi hilang. Hal ini diduga karena *E.coli* mengalami resistensi terhadap senyawa dalam daun sirih. Resistensi ini dapat diperoleh dari usus manusia ketika mengonsumsi herbal (19). Selain itu, *E.coli* memiliki dinding sel yang lebih kompleks dari pada *S.aureus*. Dinding sel *E.coli* terdiri atas lipoprotein, lipopolisakarida, dan membran periplasma sedangkan dinding sel *S.aureus* terdiri atas peptidoglikan dan asam teikoat(20).

Ekstrak metanol daun sirih mengandung senyawa dominan hyroxychavicol. Hydroxychavicol

membunuh bakteri dengan cara mestimulasi pembentukan superoksida dalam sel bakteri. Pembentukan superoksida dalam bakteri membuat kerusakan DNA sehingga terjadinya kematian bakteri (21).

Penelitian daun sirih terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa polyaniline dari daun sirih yang terenkapsulasi *silver nanoparticle* memiliki aktivitas antibakteri. Hal ini dibuktikan bahwa senyawa tersebut memiliki zona inhibisi terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dengan diameter 32,15 mm dan 21,95 mm (22). Selain itu, ekstrak daun sirih diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *E.coli extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) (15), *Streptococcus gordonii* *Streptococcus mutans* (23), dan *Streptococcus intermedius* (24)

Kadar hambat minimum daun sirih terhadap *S.aureus* dan *E.coli* adalah 1/286 dan 1/32x (Tabel 3). Kadar hambat minimum merupakan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh nutrisi, oksigen, lingkungan, keasaman, dan zat mikronutrien (20). Penelitian oleh Valle DL, dkk tahun 2016 menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan metanol daun sirih memiliki MIC 156ug/ml dengan MRSA dan 312 ug/ml dengan *E.coli* ESBL (15). Penelitian lain oleh Sherma S, dkk tahun 2009 menunjukkan bahwa senyawa hydrochavical yang diisolasi dari ekstrak air daun sirih memiliki kadar hambat minimum terhadap *Streptococcus mutans* 250 ug/ml (25).

Daun sirih memiliki kadar bunuh minimum terhadap *S.aureus* dan *E.coli* yaitu 1/256x dan 1/32x (Tabel 3). Kombinasi daun sirih dengan antibiotik AMX, CHL, dan CTR bersifat antagonis terhadap *S.aureus* (Tabel 5). Selain itu, kombinasi daun sirih juga bersifat antagonis dengan antibiotik AMX dan CTR serta bersifat aditif dengan CHL (Tabel 5).

Zona Inhibisi, Kadar Hambat Minimum, dan Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Daun Sirih dan Amoksisilin Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Kombinasi daun sirih dengan AMX memiliki zoan inhibisi lebih kecil dari pada AMX tunggal (tabel 1, tabel 2). Berdasarkan pengukuran ASDAST daun sirih dan AMX memiliki sifat antagonis. Adanya sifat antagonis ini diduga dapat disebabkan oleh mekanisme daun sirih dalam membunuh bakteri. Daun sirih memiliki senyawa dominan hydrochovial yang membunuh bakteri melalui induksi ROS intrasel bakteri. Namun, pada ekstraksi metanol terdapat diduga senyawa lain yang dapat menghambat ikatan AMX pada dinding sel bakteri sehingga menghambat AMX dalam membunuh bakteri. Seperti pada penelitian sebelumnya, antibiotik golongan penisilin

bersifat antagonis dengan golongan penisilin dalam membunuh bakteri.

Kombinasi daun sirih dan AMX meningkatkan KHM AMX tunggal (tabel 3). Hal ini dapat disimpulkan bahwa dalam menghambat pertumbuhan bakteri diperlukan konsentrasi antibiotik yang lebih besar. Berdasarkan pengukuran FIC kedua senyawa ini bersifat antagonis (tabel 4). Sifat antagonis ini, selain dipengaruhi oleh mekanisme daun sirih dalam membunuh bakteri juga dapat dipengaruhi oleh pH pada media. Daun sirih dapat menetralkan keasaman yang ditimbulkan oleh AMX.

KBM kombinasi daun sirih dan AMX mengalami peningkatan daripada KHB AMX tunggal (tabel 5). Pengukuran FBC menunjukkan bahwa kombinasi ini memiliki sifat antagonis dalam membunuh bakteri. AMX adalah antibiotik yang bersifat bakteriosidal yang bekerja dengan cara membunuh bakteri. Kombinasi daun sirih menghambat efektivitas AMX dalam membunuh bakteri sehingga bakteri masih hidup.

Penelitian oleh Fitriana G, dkk 2018 menggunakan ekstrak metanol daun sirih menunjukkan hasil yang sama. Daun sirih menurunkan zona inhibisi AMX terhadap bakteri *S.aureus* (26).

Zona Inhibisi, Kadar Hambat Minimum, dan Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Daun Sirih dan Kloramfenikol Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Zona inhibisi daun sirih dengan CHL memiliki ukuran yang lebih kecil daripada zona inhibisi CHL tunggal (tabel 1, tabel 2). Pengukuran ASDAST kombinasi daun sirih dengan CHL menunjukkan sifat antagonis (tabel 2). Sifat antagonis ini dapat disebabkan oleh senyawa daun sirih yang menghambat kerja antibiotik CHL. CHL bekerja dengan cara berikatan dengan ribosom 50S sehingga terjadi penurunan sintesis protein (20). Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa CHL bekerja antagonis dengan golongan makrolide yang memiliki mekanisme sama dengan CHL.

Pemberian daun sirih pada antibiotik CHL meningkatkan KHM CHL tunggal (tabel 3). Hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian daun sirih menurunkan efektivitas CHL dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengukurannya FIC menunjukkan kedua senyawa ini bersifat antagonis terhadap *S.aureus* dan aditif terhadap *E.coli* (tabel 4). Sifat antagonis ini, selain dipengaruhi oleh mekanisme daun sirih dalam membunuh bakteri juga dipengaruhi oleh lingkungan pertumbuhan bakteri (20). Sifat aditif dapat disebabkan oleh mekanisme yang berbeda dalam membunuh bakteri.

Tabel 3 Kadar Hambat dan Kadar Bunuh Minimum Tunggal maupun Kombinasi Daun Sirih dengan Antibiotik

Bakteri	Dilusi	[Pb]	KHM Tunggal			KBM Kombinasi			[Pb]	KBM Tunggal			KBM Kombinasi		
			[AMN]	[CH]	[CIX]	[Pb & AMN]	[Pb & CH]	[Pb & CIX]		[AMN]	[CH]	[CIX]	[Pb & AMN]	[Pb & CH]	[Pb & CIX]
<i>E. coli</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/32	-●	-	-	-	-●1/8	-●1/8	-	-■	-	-	-	-■1/8	-■1/8	-
	1/64	+	-●	-●	-	+	+	-	+	-■	-■	-	+	+	-
	1/128	+	+	+	-	+	+	-●1/32	+	+	+	-	+	+	-■1/32
	1/256	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	1/512	+	+	+	-●	+	+	+	+	+	+	-■	+	+	+
	1/1024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/4096	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/8192	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saras	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-	-●1/8	-	-●1/8	-	-	-	-	-■1/8	-	-■1/8
	1/64	-	-●	-●	-●	+	-	+	-	-■	-■	-■	+	-	+
	1/128	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	1/256	-●	+	+	+	+	-●1/64	+	-■	+	+	+	+	-■1/64	+
	1/512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/1024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/4096	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/8192	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

KHM: Kadar Hambat Minimum, KBM: Kadar Bunuh Minimum, [Pb]: Konsentrasi *Piper batle*, [AMN]: Amoksisilin, [CH]: Koanferikid, [CIX]: Klindamisin, [Pb&AMN]: *Piper batle* kombinasi Amoksisilin, [Pb&CH]: *Piper batle* kombinasi Koanferikid, [Pb&CIX]: *Piper batle* kombinasi Klindamisin, 1/8: Konsentrasi herbal awal dalam kombinasi terhadap *E. coli*, 1/64: Konsentrasi herbal awal dalam kombinasi terhadap *Saras*, ●: Kadar Hambat Minimum yang dihasilkan, ■: Kadar Bunuh Minimum yang dihasilkan

Tabel 4. Hasil FIC Indeks Kadar Hambat Minimum Kombinasi Daun Sirih dengan Beberapa Antibiotik

Bakteri	Fractional Inhibitory Concentration			Sifat	Fractional Inhibitory Concentration			Sifat	Fractional Inhibitory Concentration			Sifat
	FICI (Pb)	FICI (AMX)	Σ FIC		FICI (Pb)	FICI (CHL)	Σ FIC		FICI (Pb)	FICI (CTX)	Σ FIC	
<i>E.coli</i>	8,0	2,0	10,0	Antagonis	1,0	0,25	1,25	Aditif	2,0	4,0	6,0	Antagonis
<i>S.aureus</i>	8,0	2,0	10,0	Antagonis	8,0	2,0	10,0	Antagonis	8,0	2,0	10,0	Antagonis

Keterangan :

FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Index*; Σ FIC, *Fractional Inhibitory Concentration Total*; Pb, *Piper betle*; AMX, Am oksisilin; CHL, Kloram fenikol; CTX, Kotrim oksazol; Aditif, Nilai FIC indeks 0,5-4; Antagonis, Nilai FIC indeks >4

Tabel 5. Hasil FBC Indeks Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Daun Sirih dengan Beberapa Antibiotik

Bakteri	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat
	FBCI (Pb)	FBCI (AMX)	Σ FBC		FBCI (Pb)	FBCI (CHL)	Σ FBC		FBCI (Pb)	FBCI (CTX)	Σ FBC	
<i>E.coli</i>	8,0	2,0	10,0	Antagonis	1,0	0,25	1,25	Aditif	2,0	4,0	6,0	Antagonis
<i>S.aureus</i>	8,0	2,0	10,0	Antagonis	8,0	2,0	10,0	Antagonis	8,0	2,0	10,0	Antagonis

Keterangan :

FBCI, *Fractional Bactericidal Concentration Index*; Σ FIC, *Fractional Bactericidal Concentration Total*; Pb, *Piper betle*; AMX, Am oksisilin; CHL, Kloram fenikol; CTX, Kotrim oksazol; Aditif, Nilai FBC indeks 0,5-4; Antagonis, Nilai FBC indeks >4

KBM kombinasi daun sirih dan CHL mengalami peningkatan daripada KBM CHL tunggal membunuh *S.aureus* dan aditif terhadap *E.coli* (tabel 5). CHL adalah antibiotik yang bersifat bakteriostatik yang bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri (27). Hambatan pada pertumbuhan bakteri menyebabkan terjadinya pemanjangan fase lag pada bakteri (20).

Penelitian oleh Taukoora, dkk tahun 2016 menyebutkan bahwa ekstrak aseton daun sirih bersifat sinergis dengan CHL dalam membunuh *S.aureus* dan *P.aureginos*(14). Perbedaan hasil ini dapat disebabkan oleh perbedaan ekstraksi pada daun sirih sehingga menghasilkan senyawa yang berbeda.

Penelitian mengenai kombinasi CTX dengan daun sirih belum pernah dilakukan sebelumnya. Namun, penelitian lain kombinasi antara CTX dengan

(tabel 3). Pengukuran FBC menunjukkan bahwa kombinasi ini memiliki sifat antagonis dalam herbal *Curcuma domestica* menunjukkan bahwa terjadi penurunan efektivitas CTX dalam membunuh bakteri gram negatif yaitu *Salmonella typhimurium* (28).

Zona Inhibisi, Kadar Hambat Minimum, dan Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Daun Sirih dan Kotrim oksazol Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Pemberian daun sirih pada antibiotik CTX menurunkan diameter zona inhibisi CTX (tabel 1, tabel 2). Kombinasi kedua senyawa ini memiliki sifat antagonis berdasarkan pengukuran ASDAST. Hasil interaksi antagonis ini dapat disebabkan oleh perbedaan mekanisme antara daun sirih dan CTX. Daun sirih menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak DNA bakteri. Sedangkan CTX

membunuh bakteri dengan cara menghambat sintesis asam folat dalam bakteri. Hambatan pada sintesis asam folat menurunkan jumlah DNA bakteri yang akan dibentuk sehingga daun sirih tidak dapat merusak DNA bakteri.

Kombinasi daun sirih dan CTX lebih tinggi dari pada KHM CTX tunggal (tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa daun sirih menurunkan efektivitas CTX dalam menghambat bakteri *S.aureus* dan *E.coli*. Pengukuran FIC kedua senyawa ini menunjukkan bahwa kedua senyawa ini bersifat antagonis (tabel 4). Pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh pH, nutrisi, suhu, lingkungan, dan mineral(20). Daun sirih diduga mempengaruhi faktor-faktor pertumbuhan tersebut.

KBM kombinasi daun sirih dan CTX mengalami peningkatan daripada KBM CTX tunggal (tabel 5). Pengukuran FBC menunjukkan bahwa kombinasi ini memiliki sifat antagonis dalam membunuh bakteri. CTX adalah antibiotik yang bersifat bakteristatik yang bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri (29).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirih mempunyai daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dan kombinasi ekstrak daun sirih dengan antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol dan Cotrimoxazole tidak dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dibandingkan dengan aktivitas tunggalnya.

SARAN

Penelitian lanjutan menggunakan berbagai metode ekstraksi daun sirih yang dikombinasikan dengan chloramphenicol untuk membunuh berbagai bakteri. Hal ini digunakan untuk mencari kombinasi paling efektif daun sirih sebagai antibakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah memberikan bantuan secara finansial, laboratorium Biokimia FK UNISMA.

DAFTAR PUSTAKA

- Barreto ML, Glo M, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. 2006;192–5.
- Raho GB, Abouni B. Escherichia coli and Staphylococcus aureus most common source of infection. Form atex. 2015;1(1):637–48.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. CMR. 2015;28(3):603–61.
- Sumolang SAC, Porotu'o J, Soeliongan S. POLA BAKTERI PADA PENDERITA INFEKSI SALURAN KEMIH DI BLU RSUP PROF. dr. R. D. KANDOU MANADO 1. J e-Biomedik. 2013;1(1):597–601.
- Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. P&T. 2015;40(4):277–83.
- Fair RJ, Tor Y. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspect Medicin Chem. 2014;1(1):25–64.
- Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances Increased Susceptibility to Infections. Front Microbiol. 2016;6(January):1–11.
- Vangay P, Ward T, Gerber JS, Knights D. Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease Pajau. Cell Host Microbe. 2017;17(5):553–64.
- Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Wagner B, Zinser E, et al. Cognitive Impairment by Antibiotic-Induced Gut Dysbiosis: Analysis of Gut Microbiota-Brain Communication. Brain Behav Immun. 2016;56:140–55.
- Pangesti RD, Cahyono E, Kusumo E. Indonesian Journal of Chemical Science Perbandingan Daya Antibakteri Ekstrak dan Minyak Piper betle L. terhadap Bakteri Streptococcus mutans. Indones J Chem Sci. 2017;6(3).
- Patel N, Mohan JSS. Isolation and characterization of potential bioactive compounds from Piper betle varieties Banarasi and Bengali leaf extract. Int J Herb Med. 2017;5(5):182–91.
- Kursia S, Lebang JS, Taebe B, Burhan A, W a OR. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (Piper betle L .) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis Antibacterial Activity Test of Ethylacetate Extract of Green Betel Leaf (Piper betle L .) towards Staphylococcus epidermidis Bact. IJPST. 2016;3(2):72–7.
- Syahidah A, Saad CR, Hassan MD, Rukayadi Y, Norazian MH, Kamarudin MS. Phytochemical Analysis, Identification and Quantification of Antibacterial Active Compounds in Betel Leaves, Piper betle Methanolic Extract. Pakistan J Biol Sci [Internet]. Science Alert; 2017;20(2):70–81. Diambil dari: <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2017.70.81>
- Taukoorah U, Lall N, Mahomoodally F. South

- African Journal of Botany Piper betle L . (betel quid) shows bacteriostatic , additive , and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics. South African J of Botany. South African Association of Botanists; 2016;105:133–40.
15. Valle DL, Cabrera EC, Puzon JJM . Antimicrobial Activities of Methanol , Ethanol and Supercritical CO₂ Extracts of Philippine Piper betle L . on Clinical Isolates of Gram Positive and Gram Negative Bacteria with Transferable Multiple Drug Resistance. PLoS One. 2016;1(1):1–14.
 16. Katzung BG, Masters SB, Trevor AB. Katzung - Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition (2012). 12 Edition. United States: M c Graw Hill LANGE; 2012.
 17. Ziaei-daroumkalaei N, Ameri M. MethodsX AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. MethodsX [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;3(232):43–52. Diambil dari: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2016.01.002>
 18. El-azizi M. Novel Microdilution Method to Assess Double and Triple Antibiotic Combination Therapy In Vitro. Hindawi Publ Corp. 2016;2016(1):1.
 19. Hartley CL, Richmond MH. Antibiotic resistance and survival of E coli in the alimentary tract. Br Med J. 1975;(OCTOBER):71–4.
 20. Tortora GJ, Frunke BL, Case CL. Microbiology: An Introduction. 10th ed. California: Benjamin & Cummings.; 2010. 165-170 hal.
 21. Singh D, Narayanamoorthy S, Majumdar AG, Gami U, Cherian S. Hydroxychavicol, a key ingredient of Piper betle induces bacterial cell death by DNA damage and inhibition of cell division. Free Radic Biol Med [Internet]. Elsevier B.V.; 2018;120(1):62–71. Diambil dari: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.021>
 22. Rashid MO, Islam S, Haque A, Rahman A. Antibacterial Activity of Polyaniline Coated Silver Nanoparticles Synthesized from Piper Betle Leaves Extract. Iran J Pharm Res. 2016;15(June 2014):591–7.
 23. Phumat P, Khongkhunthian S, Wanachantararak P. Potential of Piper betle extracts on inhibition of oral pathogens. Drug Discov Ther. 2017;11(6):307–15.
 24. Phumat P, Khongkhunthian S, Wanachantararak P, Okonogi S. Streptococcus mutans and Streptococcus intermedius. Drug Discov Ther. 2018;12(3):133–41.
 25. Sharma S, Khan IA, Ali I, Ali F, Kumar M, Kumar A, et al. Evaluation of the Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Hydroxychavicol for Its Potential Use as an Oral Care Agent. Antimicrob Agent Chemother. 2009;53(1):216–22.
 26. Fitriana GAV. Uji EFEK KOMBINASI ANTIBIOTIK AMOKSISILIN DENGAN EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH (Piper betle L.) TERHADAP PERTUMBUHAN Staphylococcus aureus. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. 2018.
 27. Rahal JJ, Simberkoff MS. Bactericidal and Bacteriostatic Action of Chloramphenicol Against Meningeal Pathogens. Antimicrob Agent Chemother. 1979;16(1):13–8.
 28. Rahayu SI, Nurdiana N, Santoso S. The Effect of Curcumin and Cotrimoxazole in Salmonella Typhimurium Infection In Vivo. 2013;2013:4–7.
 29. Bohni E. Bacteriostatic and Bactericidal Activity of Two Trimethoprim -Sulfonamide Combinations. Chemotherapy. 1976;22:262–73.