

Antibacterial Activity of Piper betle Linn Extract Against *Vibrio parahaemolyticus* Causes of Disease in Vaname Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

(Aktifitas Antibakteri Ekstrak Piper betle Linn terhadap *Vibrio parahaemolyticus* Penyebab Penyakit pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*))

Harlina Harlina^{1✉}, Azizah Ibrahim¹, Andi Hamdillah¹ dan Ilmiah Ilmiah¹

¹ Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Muslim Indonesia, 0930, Makassar, Indonesia

Email: harlina.harlina@umi.ac.id

Info Article :

Diterima : 19 Maret 2024

Disetujui : 19 Mei 2024

Dipublikasi : 23 Mei 2024

Article type :

☐	Review Article
☐	Common Serv. Article
☒	Research Article

Keyword :

Piper betle Linn, Aktivitas Antibakteri, *Vibrio parahaemolyticus*, *Litopenaeus vannamei*, MIC dan MBC.

Korespondensi :

Harlina Harlina

Universitas Muslim
Indonesia, Makassar,
Indonesia

Email:

harlina.harlina@umi.ac.id



Copyright©2024, Harlina Harlina, Azizah Ibrahim, Andi Hamdillah, Ilmiah Ilmiah

Abstract

Betel leaf (*Piper betle* L.) is a medicinal plant that has antibacterial properties. Betel leaves contain various chemical ingredients, including essential oils, phenols, terpenoids, tannins, polyphenols and steroids. This study aims to determine the inhibitory power of betel leaf extract (*Piper betle* L) on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* which causes disease in vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and determine the minimum concentration of betel leaf extract that can inhibit growth and the minimum concentration that can kill *V. parahaemolyticus* internally. *in vitro*. This research was carried out at the Integrated Biology Laboratory, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Indonesian Muslim University. A total of 500 g of betel leaf was extracted using the maceration method to produce 39.90 g of thick extract. Next, various concentrations of betel leaf extract were tested for their antibacterial effect on the growth of *V. parahaemolyticus* using the double layer method. The results of this research show that betel leaf extract is able to inhibit the growth of the bacteria *V. parahaemolyticus*. The minimum inhibitor concentration (MIC) value is at a concentration of 0.78 mg/mL and the maximum bactericidal concentration (MBC) at a concentration of 1.56 mg/mL, so it can be concluded that sirih leaf extract (*Piper betle* L) has the potential to be developed as an antibacterial for *V. parahaemolyticus*.

I. PENDAHULUAN

Udang vannamei merupakan salah satu komoditas andalan dibidang perikanan yang paling cepat berkembang yang memberikan kontribusi yang signifikan terhadap perekonomian dunia, dengan kebutuhan pasar di manca negara yang luas dan terus meningkat (Maulina et al., 2012). Budidaya udang merupakan

salah satu industri perikanan yang cukup besar. Nilai ekspor udang ke berbagai negara pada tahun 2015 bahkan mencapai 145.007,9 ton (Badan Pusat Statistik, 2017).

Salah satu penyakit yang menginfeksi udang vaname adalah bakteri *Vibrio parahaemolyticus* (Widowati, 2008). *V. parahaemolyticus* dapat menyebabkan lisisnya sel-

sel darah pada tubuh inang (Hatmanti, 2003), tubuh udang berubah menjadi merah dan dapat menyebabkan kematian. Penyakit yang disebabkan oleh *Vibrio* sp. disebut *vibriosis*. *Vibriosis* dapat menyebabkan kematian udang hingga 100% dalam waktu 1-2 hari (Feliatra et al., 2012). *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) atau sering dikenal dengan nama *Early Mortality Syndrome* (EMS). Penyakit EMS menyerang stadia post larva dan dapat menyebabkan kematian hingga 100% dalam 20-30 hari setelah dilakukan penebaran (De Schryver et al., 2014).

Salah satu alternatif pencegahan terhadap penyakit *vibriosis* adalah pemberian bakteri probiotik. Bakteri probiotik merupakan mikroba hidup yang dapat meningkatkan pemanfaatan nutrisi pakan, meningkatkan sistem imun, memperbaiki kualitas lingkungan hidup inang meningkatkan kelangsungan hidup udang, dan menekan populasi bakteri *Vibrio* sp. (Perschuere et al., 2000).

Tumbuhan daun sirih (*Piper betle*) merupakan salah satu tumbuhan obat yang banyak digunakan sebagai antibakteri. Daun sirih mengandung minyak atsiri sampai 4,2% (Kartasapoetra, 1992). Sheikh et al., (2012) menyatakan bahwa penggunaan ekstrak tumbuhan yang memiliki aktivitas antimikroba sangat membantu dalam penyembuhan.

Salah satu tanaman yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri adalah Sirih hijau (*Piper betle* L.). Daun sirih hijau digunakan

sebagai obat batuk, obat cacing, dan antiseptik luka. Daun sirih hijau mengandung berbagai macam kandungan kimia, antara lain minyak atsiri, terpenoid, tanin, polifenol serta steroid. Hasil penelitian (Suliantari, 2009) menunjukkan hasil ekstrak metanol daun sirih hijau dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kategori sedang. Berdasarkan uraian tersebut dibutuhkan suatu penelitian untuk mengetahui uji daya hambat ekstrak daun sirih (*P. betle*) terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus* penyebab penyakit pada udang vannamei (*L. vannamei*). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* penyebab penyakit pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan menentukan konsentrasi minimum ekstrak daun sirih yang dapat menghambat pertumbuhan dan konsentrasi minimum yang dapat mematikan *V. parahaemolyticus* secara in vitro

II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Maret 2023 di Laboratorium Biologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Muslim Indonesia (FPIK UMI)

2.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Alat yang digunakan selama penelitian.

No	Alat	Fungsi
1	Blender (Nanotes-1705)	Untuk menggiling atau melunakkan
2	Spatula	Mengambil bahan kimia padat
3	Gelas ukur	Mengukur volume larutan
4	Batang pengaduk	Pengaduk zat kimia baik larutan maupun padatan
5	Erlenmeyer (Iwaki Pyrex)	Untuk mencampur, mengukur dan menyimpan cairan
6	Autoklave (GEA YX-18 LDJ)	Untuk mensterilkan alat dan bahan
7	Cawan petri (Anumbra)	Wadah untuk membiakan sel serta
8	Tabung reaksi (Iwaki)	Mencampur, menampung dan memanaskan bahan-bahan kimia, media berbentuk cairan ataupun padat
9	Mikropipet (Dragon Lab 100-1000)	Memindahkan cairan dalam jumlah kecil
10	Corong gelas (Pyrex)	Untuk memindahkan larutan dari tempat yang satu ke tempat yang lain dan digunakan pula untuk proses penyaringan setelah diberi kertas saring pada bagian atas
12	Timbangan analitik (Acis AD-600i)	Untuk mengukur atau menghitung massa suatu zat yang berbentuk padat atau cair
13	Pinset (Onemed)	Untuk menjepit benda-benda berukuran kecil atau jaringan
14	Botol vial	Untuk menyimpan ekstrak

15	Paper disk (<i>Macherey- Nagel- 827 ATD</i>)	Sebagai tempat penampung zat antimikroba
16	Spoit	Untuk mengambil larutan dengan volume tertentu
17	Bunsen	Untuk memanaskan medium, mensterilkan jarum inokulasi dan alat alat yang terbuat dari platina
18	Laminar	Tempat steril untuk isolasi bakteri.
19	Oven	Untuk sterilisasi alat ataupun mengeringkan
20	Hot plate (SP46601-26)	Untuk memanaskan larutan
21	Inkubator (Falc)	Tempat inkubasi kultur mikroba
22	Kulkas	Untuk mendinginkan atau menyimpan sampel
23	Gelas beacer (Pyrex)	Sebagai wadah untuk menyimpan dan membuat larutan
24	Jarum ose	Untuk memindahkan atau menanam koloni suatu mikroba
25	Magnetik stirer	Untuk menghomogenkan suatu larutan
26	Rak tabung reaksi (Pyrex)	Tempat penyimpanan tabung reaksi agar posisi tabung tetap tegak
27	Kapas	Sebagai penutup pada tabung reaksi
28	Tissu	Untuk membersihkan wadah yang akan digunakan
29	Aluminium foil	Sebagai penutup yang digunakan pada wadah untuk menjaga agar lebih steril
30	Kertas saring	Untuk menyaring
31	Plastik wrap	Untuk membungkus media

Tabel 2. Bahan yang digunakan selama penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Daun sirih	Sebagai bahan penelitian
2	Metanol	Sebagai pelarut
3	Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Sebagai bahan uji
4	<i>Trypticase soy broth</i> (Pronadisa Cat.1216.00)	Sebagai media kultur cair bakteri
5	<i>Trypticase soy agar</i> (Difco™ 7005840)	Sebagai media kultur bakteri
6	<i>Thiosulfat citrate biesalt sucrose</i> (Oxoid CM0333)	Sebagai media kultur bakteri <i>Vibrio</i>
7	<i>Bacteriological grade</i> (Himedia GRM026 - 500g)	Sebagai media
8	NaCl (Cat.6404)	Sebagai campuran pembuatan media media
9	Akuades	Sebagai pelarut
10	Spirtus	Cairan pembakar

2.3. Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode kuantitatif melalui pendekatan deskriptif, dimana mendeskripsikan tentang potensi *Piper betle* sebagi antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus*.

2.4. Prosedur Penelitian

2.4.1. Tahap persiapan

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 20 menit, sedangkan media disterilkan dengan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfir.

b. Persiapan daun sirih

Daun sirih diperoleh dari tanaman milik warga di Kecamatan Herlang Kabupaten Bulukumba. Daun sirih yang sudah terkumpul selanjutnya dicuci dengan air bersih. kemudian dikeringanginkan hingga kering patah selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.

c. Ekstraksi daun sirih

Ekstraksi daun sirih dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Metode maserasi dilakukan dengan cara daun sirih yang telah berbentuk serbuk ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan metanol 96% sebagai pelarut hingga

terendam selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan larutannya dengan menggunakan kertas saring.

Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali atau sampai diperoleh filtrat yang kurang berwarna. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia akan larut dalam pelarut selama proses maserasi karena aktivitas dari pelarut tersebut.

2.4.2. Pembuatan Media

a. Media Tryptic Soy Agar (TSA) miring.

Cara membuat media TSA miring adalah menimbang media TSA sebanyak 2 gram, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades 50 mL kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan menggunakan magnet stirrer diatas hotplate. Selanjutnya media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL lalu ditutup menggunakan kapas dan plastik wrap, setelah itu disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit selanjutnya media TSA dimiringkan biarkan hingga membeku.

b. Media Tryptic Soy Agar (TSA)

TSA ditimbang sebanyak 4 gr, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest 100 mL, dipanaskan sambil diaduk dengan menggunakan magnet stirrer diatas hot plate. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoclave dengan suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah steril media TSA dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 15 mL, didinginkan sampai memadat lalu dibungkus menggunakan plastik wrap dan kertas.

c. Pembuatan media TSB

TSB ditimbang sebanyak 3 gram, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest 100 mL. Selanjutnya media dipanaskan dengan diatas hotplate, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 5 mL dengan menggunakan pipet, tabung ditutup menggunakan kapas dan plastik wrap. Tahap selanjutnya media disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit.

d. Pembuatan media soft agar

Media TSB ditimbang sebanyak 0,224 gram dan bacto agar 0,196 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu ditambah aquades sebanyak 28 mL, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil selanjutnya

dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer. Larutan media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 7 mL, tabung ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Media diamkan hingga dingin/ membeku, media siap digunakan.

2.4.3. Kultur Bakteri

Pembuatan stok kultur bakteri, dilakukan dengan cara satu koloni bakteri murni *V. parahaemolyticus* diambil dengan menggunakan jarum ose steril. Koloni bakteri tersebut kemudian ditanam pada media TSA agar miring dengan cara menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36 °C selama 18 - 24 jam.

Kultur bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan berdasarkan prosedur peremajaan bakteri. Isolat bakteri *V. parahaemolyticus* yang disimpan di dalam TSA miring, diambil secara aseptik menggunakan jarum ose lalu ditumbuhkan pada media TSB steril yang telah disiapkan. Kultur bakteri *V. parahaemolyticus* pada media TSB diinkubasi selama 24 jam pada suhu sekitar 30 °C. Bakteri hasil inkubasi tersebut siap digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

2.5. Tahap Penelitian

2.5.1. Uji Aktivitas Daya Hambat

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *double layer agar* (Isnansetyo & Kamei, 2003). Ekstrak metanol ditimbang sebanyak 50 mg dan dimasukkan dalam vial. Masing-masing ekstrak dilarutkan dengan metanol sebanyak 1 mL. Selanjutnya ekstrak tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vorteks sebelum dilakukan pengujian.

Ekstrak diteteskan sebanyak 20 μ L (dosis 1000 μ g) ke *paper disk* (diameter 6 mm) lalu dikeringanginkan dalam inkubator agar pelarutnya menguap. *Oxytetracyclin* (OTC) sebagai kontrol positif dan metanol sebagai kontrol negatif. Suspensi bakteri uji *V. parahaemolyticus* kepadatan 10^7 sel. diambil sebanyak 37 mL atau lalu dicampurkan ke dalam soft agar (TSB + 0,7 % agar). Soft agar yang telah diinokulasi bakteri dituang secara perlahan di atas medium TSA petri lalu di biarkan hingga memadat. *Paper disk* yang telah kering diletakkan di atas soft agar secara hati-hati. Pengamatan zona hambat dilakukan setelah masa inkubasi 24 jam dengan mengukur diameter zona

hambat yang terbentuk pada media soft agar di sekitar paper disc.

2.5.2. Uji Aktivitas MIC dan MBC

Uji MIC dilakukan dengan menggunakan metode *double layer* dengan konsentrasi bertingkat. Adapun tahapan pengujian MIC adalah ekstrak daun sirih diencerkan secara bertingkat dengan konsentrasi 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125, dan 0,390625 mg/mL. Selanjutnya ekstrak ditetaskan ke *paper disc* sebanyak 20 µL pada kertas cakram sesuai dengan konsentrasi perlakuan, lalu dikeringanginkan di dalam inkubator pada suhu 30°C.

Bakteri uji dengan kepadatan 10^7 sel/mL dimasukkan ke dalam media *double layer agar*. *Paper disk* yang telah kering diletakkan di atas media *double layer agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Dilakukan pengamatan terhadap zona hambat yang terbentuk dan diukur diameter yang terbentuk. Konsentrasi terendah fraksi aktif yang masih menunjukkan zona hambat merupakan nilai MIC.

Penentuan nilai MBC dilakukan dengan pengujian pada konsentrasi 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16 ditetesi masing-masing ke *paper disk*, lalu dikeringanginkan di dalam inkubator pada suhu 30°C. Bakteri uji dimasukkan ke dalam media *soft agar* kemudian dituang di atas media TSA cawan petri sehingga diperoleh media *double layer agar*. *Paper disk* yang telah kering diletakkan di atas media *double layer agar* dan diinkubasi selama 48 jam, dilakukan pengamatan dan mencatat zona hambat yang terbentuk.

2.6. Analisis Data

Data hasil pengamatan uji MIC dan uji MBC dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk Tabel dan Gambar. Apabila Nilai MIC < 1 mg/mL menunjukkan bahwa ekstrak tersebut potensial untuk dikembangkan (Aligiannis et al., 2001).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L)

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yang diawali dengan pembuatan ekstrak daun sirih. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun sirih (*Piper betle* L). Daun sirih secara umum telah dikenal masyarakat sebagai bahan obat tradisional. Seperti halnya dengan antibiotika, daun sirih juga mempunyai daya antibakteri (Sastroamidjojo, 1997) untuk itu dilakukan penelitian yang dimulai dari tahapan ekstraksi yang nantinya akan diuji kandungan antibakterinya.

Sampel ekstrak daun sirih diperoleh melalui proses maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan pelarut yang dapat mengikat senyawa polar maupun non polar sehingga sangat baik untuk digunakan mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada sampel (Cordell, 1981). Adapun hasil ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L) menggunakan pelarut metanol disajikan pada Tabel 3

.

Tabel 3. Hasil Ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L) menggunakan pelarut metanol 96%

Jenis ekstrak	Bobot simplisia (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Daun sirih	39,10	3,90	9,9%

Berdasarkan dari hasil ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L) dengan menggunakan pelarut metanol 96%. Berdasarkan hasil ekstraksi daun sirih menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol 96%, diperoleh bobot simplisia sebesar 39,10 g, ekstrak pekat sebanyak 3,90 g dengan persen rendemen sebesar 9,9%. Hasil penelitian Vifta, 2017, ekstrak metanol daun sirih hijau menghasilkan rendemen sebanyak 14,16%. Nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan hasil rendemen ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L) metode maserasi dengan pelarut metanol hanya sebesar 9,9%. Besar kecilnya nilai rendemen dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, dan lama waktu ekstraksi. Lamanya

waktu ekstraksi akan meningkatkan nilai rendemen karena kelarutan zat aktif akan berjalan perlahan sebanding kenaikan waktu akan tetapi saat mencapai waktu optimal jumlah komponen yang terambil dari sampel akan mengalami penurunan (Anggia et al., 2018; Wijaya et al., 2018).

Rata-rata nilai rendemen yang dihasilkan dengan pelarut metanol lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut yang lain seperti n-heksan, etanol dan etil asetat. Kemampuan metanol dalam mengikat senyawa polar dan non polar dapat mempengaruhi perbedaan hasil rendemen. Hal ini dikarenakan pelarut metanol dapat mengikat senyawa polar maupun non polar sehingga sangat

baik digunakan untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada sampel yang diuji (Cordell, 1981).

Senyawa yang terikat dalam proses ekstraksi terjadi karena pelarut menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan pelarut sehingga larutan yang terpekat akan didesak keluar (Purwanto, 2015). Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali hal ini bertujuan untuk memaksimalkan proses pengambilan senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada sampel daun dan untuk mendapatkan nilai yang akurat (Susanty & Bachmid, 2016).

3.2. Uji Daya Hambat ekstrak metanol daun sirih (*Piper betle* Linn)

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa bioaktif hasil ekstraksi daun sirih (*Piper betle* L) dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 96% dilakukan uji daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda menggunakan metode double layer agar. Kontrol negatif menggunakan metanol 96%, sedangkan kontrol positif menggunakan *oxytetracycline* (OTC) dengan konsentrasi 0,5 mg. Adapun hasil uji daya hambat daun sirih terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji daya hambat ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan *V. Parahaemolyticus*

No	Perlakuan	Diameter zona hambat (Ø, mm)
1	Daun Sirih	15
2	K (+)	18
3	K (-)	-

Keterangan: K (+) = Kontrol positif (*oxytetracycline*), K (-) = Kontrol negatif (metanol)

Berdasarkan hasil pengamatan uji daya hambat ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus* pada media double layer setelah masa inkubasi selama 24 jam ditemukan adanya zona hambat berupa zona bening di sekeliling paper disc pada perlakuan kontrol positif (K+) dan Perlakuan ekstrak daun sirih sedangkan pada perlakuan kontrol negatif (K-) tidak ditemukan adanya zona hambat. Terbentuknya zona hambat disebabkan karena adanya zat aktif yang terkandung didalam daun sirih yaitu flavonoid. Diameter zona hambat dari ekstrak pelarut metanol daun sirih mencapai 15 mm.

Zona hambat yang terbentuk dari ekstrak daun sirih menggunakan pelarut metanol 96% lebih rendah dibandingkan kontrol positif yang

hasilnya sebesar 18 mm. Nilai tersebut tergolong lemah. Hal ini sesuai dengan pendapat Greenwood (1995) bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan > 20 mm dikategorikan kuat, diameter yang dihasilkan 16-20 mm dikategorikan sedang, diameter yang dihasilkan 10-15 mm dikategorikan lemah.

Adanya perbedaan diameter zona hambat ini dapat disebabkan adanya perbedaan kandungan metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak. Hal ini sesuai dengan pendapat (Prescott et al., 2005) yang menyatakan bahwa ukuran dari zona hambat dipengaruhi oleh perbedaan besar kecilnya konsentrasi ekstrak. Faktor lain yang mempengaruhi perbedaan zona hambat yaitu temperatur inkubasi, waktu peletakan cakram dan jarak cakram antimikroba.



Gambar 3. Hasil pengujian daya hambat ekstrak metanol daun sirih terhadap pertumbuhan bakteri *parahaemolyticus* (Dokumentasi pribadi)

Beberapa hasil penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih mampu menghambat pertumbuhan beberapa patogen. Samirana et al., (2017) melaporkan bahwa ekstrak daun sirih dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*). Hasil penelitian Toar et al., (2013), uji daya hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* dari sediaan obat kumur bebas alkohol yang mengandung *cetylpyridinium chloride* lebih tinggi dibandingkan obat kumur bebas alkohol yang mengandung ekstrak daun sirih.

3.3. Uji Aktivitas *Minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal concentration* (MBC)

Untuk menentukan nilai konsentrasi terendah antimikroba yang masih menghambat pertumbuhan mikroorganisme (MIC) dan konsentrasi terendah yang mematikan mikroorganisme (MBC) ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus* dilakukan pengujian aktivitas antibakteri daun sirih dengan berbagai konsentrasi yang berbeda menggunakan metode double layer. Pengujian dilakukan secara aseptik dan terkontrol pada

semua perlakuan, baik pada proses pengenceran ekstrak, suspensi bakteri *V. parahaemolyticus*, penggunaan media uji serta suhu inkubasi yang sama untuk mengeliminir terjadinya kesalahan penentuan nilai MIC dan MBC. Hal ini sesuai dengan pendapat Christofilogiannis (2001) yang menyatakan bahwa, faktor-faktor yang bisa mempengaruhi keakuratan hasil akhir uji MIC dan MBC antara lain: agen antibakteri, suhu, jumlah inokulum bakteri dan media kultur. Apabila terjadi kesalahan dalam penggunaan media, suhu inkubasi tidak stabil dan terjadi kontaminasi, maka akan menimbulkan masalah, yaitu terjadi kesalahan pengamatan hasil akhir uji MIC dan MBC (Edward, 2001).

Uji aktivitas antibakteri MIC dan MBC ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus* menggunakan media *Trypticase Soy Agar* (TSA) dengan metode *double layer*, berdasarkan dari hasil pengujian sebelumnya bahwa bakteri dapat tumbuh pada media tersebut. Konsentrasi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) yang diuji adalah : 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, serta 0,39 mg/mL. Adapun hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih dengan konsentrasi berbeda disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian *minimum inhibitory concentration* (MIC) ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus*

No.	Konsentrasi MIC	Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>
1	50	+
2	25	+
3	12,5	+
4	6,25	+
5	3,125	+
6	1,5625	+
7	0,78125	-
8	0,390625	-

Keterangan : (+) Terbentuk zona hambat, (-) Tidak ada zona hambat

Berdasarkan dari hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih dengan konsentrasi berbeda bahwa MIC ekstrak daun sirih terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C ditemukan bahwa 1,5625 mg/mL merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang terkandung dalam ekstrak daun sirih yang menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*. Pada konsentrasi ini terlihat dari adanya zona tipis yang terbentuk di sekitar paper disc pada media TSA *double layer* setelah inkubasi 18-24 jam, yang menunjukkan bahwa adanya pertumbuhan *V.*

parahaemolyticus akan tetapi terhambat dengan adanya penambahan 1,5625 mg/mL ekstrak daun sirih pada paper disc.

Hasil penelitian sebelumnya nilai MIC ekstrak daun sirih yang diuji secara *in vitro* terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) mencapai 15,62 mg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa daya hambat daun sirih terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* membutuhkan konsentrasi 10 kali lipat jauh lebih besar dibanding dengan *V. parahaemolyticus* yang hanya membutuhkan konsentrasi 1,562 mg/mL.

Untuk menentukan nilai konsentrasi MBC dari ekstrak daun sirih terhadap *V. parahaemoliticus* pengujian dilanjutkan dengan masa inkubasi media sampai 48 jam pada suhu yang sama. Adapun hasil pengamatan uji

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ekstrak daun sirih dengan konsentrasi berbeda terhadap *V. parahaemoliticus* disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Pengujian *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) Ekstrak Daun Sirih terhadap pertumbuhan *V. parahaemolyticus*

No.	Konsentrasi MBC (mg/mL)	Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>
1	50	+
2	25	+
3	12,5	+
4	6,25	+
5	3,125	+
6	1,5625	-
7	0,78125	-
8	0,390625	-

Keterangan : (+) Terbentuk zona hambat, (-) Tidak ada zona hambat

Berdasarkan dari hasil pengamatan setelah inkubasi media selama 48 jam MBC adalah uji lanjutan MIC merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang mampu membunuh mikroorganisme yang ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) double layer. Berdasarkan hasil pengamatan uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ekstrak daun sirih dengan konsentrasi berbeda terhadap *V. parahaemoliticus* setelah inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, pada konsentrasi 3,125 mg/mL ekstrak daun sirih ditemukan adanya zona bening yang terbentuk disekitar paper disch, hal ini menunjukkan tidak adanya lagi pertumbuhan bakteri *V. parahaemoliticus* di sekitar *paper disch*, bakteri yang ada mengalami kematian akibat dari proses difusi zat aktif dari ekstrak daun sirih yang ditambahkan pada *paper disch*. Nilai MBC daun kemangi 3,125 merupakan konsentrasi terendah yang membunuh pertumbuhan *V. parahaemoliticus* hal ini ditandai dari adanya zona bening yang terbentuk pada media yang berarti bakteri disekitar *paper disch* mengalami

kematian. Hasil penelitian Hafizha Dara 2018 mencapai 500 mg/mL menunjukkan nilai MIC ekstrak daun sirih yang diuji secara *in vitro* terhadap bakteri *Methicillint Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) nilai MBC diperoleh dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA), (Saraswati, 2011).

IV. PENUTUP

Dari hasil penelitian uji daya hambat antibakteri ekstrak daun sirih (*Piper betle L*). terhadap bakteri *V. Parahaemoliticus* dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *V. parahaemoliticus* kategori kuat dengan daya hambat sebesar 15 mm. Nilai MIC dapat menghambat pertumbuhan *V. parahaemoliticus* pada konsentrasi 0,78 mg/mL dan MBC konsentrasi 1,56 mg/mL Dengan demikian ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) potensial untuk dikembangkan sebagai antibakteri *V. parahaemoliticus*.

REFERENSI

- Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Ag Food Chem*, 40, 4168–4170.
- Anggia, M., Mutiar, S., & Arziah, D. (2018). Teknologi Ekstraksi Bunga Kenanga (*Cananga Odorata L.*) dan Sereh Wangi (*Cymbopogon Nardus L.*) Sebagai Aroma Terapi Sabun Cair. *Jurnal Daur Lingkungan*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.33087/daurling.v1i1.2>
- Badan Pusat Statistik. (2017). *Ekspor Undang Menurut Negara Tujuan Utama 2000- 2015*.
- Cordell, A. . (1981). *Introdutcion to Alkaloids*. John Wiley And Sons Inc.
- De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial

- Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathogens*, 10(4), 10–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>
- Edward, B. (2001). Clinical Relevance of Minimum Inhibitory Concentration(MIC). *Aquaculture*, 19, 289–296.
- Feliatra, Zainuri, D., & Yoswaty. (2012). Pathogenitas Bakteri *Vibrio* sp. Terhadap Udang Windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Sungkai*, 2(1), 23–36.
- Greenwood, D. (1995). *Antibiotics Susceptibility (Sensitivity) Test, Antimicrobial and Chemotherapy*. Mc Graw Hill Company.
- Hatmanti, A. (2003). Penyakit Bakterial pada Budidaya Krustasea serta Cara Penanganannya. *J. Oseana*, 28(3), 1–10.
- Isnansetyo, A., & Kamei, Y. (2003). MC21-A, a Bactericidal Antibiotic Produced by a New Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30 T , against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 480–488. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.480-488.2003>
- Kartasapoetra, G. (1992). *Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat*. PT. Rineka Cipta.
- Maulina, I., Handaka, A. A., & Riyantini, I. (2012). Analisis Prospek Budidaya Tambak Udang di Kabupaten Garut. *Jurnal Akuatika*.
- Perschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotics Bacteria as Biocontrol Agents in Aquaculture. *App. Environ. Microbiol*, 64, 655–671.
- Prescott, L. ., Harley, J. ., & Klein, D. A. (2005). *Microbiology*, Ed Ke-6. Mc- Graw-Hill.
- Purwanto, S. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*, 2(2), 84–92.
- Samirana, P. O., Swastini, D. A., Ardinata, I. P. R., & Suarka, I. P. S. D. (2017). Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 23.
- Saraswati, D. (2011). Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih Terhadap Daya Hambat *Escherichia coli*. *Jurnal Health & Sport*, 3(2), 285–362.
- Sastroamidjojo, S. (1997). *Obat Asli Indonesia*. Dian Rakyat.
- Sheikh, M., Abdullah, R. M., Meghavanshi, M. K., & Irshad, M. (2012). Studies on Some Plant Extract for Their Antimicrobial Potential Against Certain Pathogenic Microorganisms. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 209–213.
- Suliantari. (2009). *Aktivitas Antibakteri dan Mekanisme Penghambatan Ekstrak Sirih Hijau (Piper betle Linn) Terhadap Bakteri Patogen Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Susanty, S., & Bachmid, F. (2016). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*, 5(2), 87. <https://doi.org/10.24853/konversi.5.2.87-92>
- Toar, A. I., Posangi, J., & Wowor, V. (2013). Daya hambat obat kumur Cetylpyridinium Chloride dan obat kumur daun sirih terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *JURNAL BIOMEDIK*, 5(1).
- Widowati, R. (2008). Keberadaan Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada Udang yang dijual di Rumah Makan Kawasan Pantai Pangandaran. *VIT VITALIS*, 1(1).
- Wijaya, H., Novitasari, & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambui Laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4(1), 79–83.