

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ETANOL KAYU SECANG (*Caesalpinia
sappan* L.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* dan *Shigella
dysenteriae* SERTA BIOAUTOGRAFINYA**

SKRIPSI



Oleh :

**IKA NUR FAJARIAH
K100050006**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Infeksi merupakan penyebab utama penyakit di daerah tropis seperti Indonesia. Penyakit karena infeksi dapat ditularkan dari satu orang ke orang atau dari hewan ke manusia. Infeksi disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur, protozoa (Gibson, 1996).

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri masih banyak dijumpai di Indonesia, salah satunya adalah disentri. Disentri basilar adalah infeksi usus besar oleh bakteri patogen genus *Shigella*. *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) merupakan penyebab penyakit yang paling ganas dan menimbulkan epidemi hebat di daerah tropis dan subtropis (Soedarto, 1996). Infeksi *Shigella* sangat menular, untuk menimbulkan infeksi diperlukan dosis kurang dari 10^3 organisme (sedangkan untuk salmonela dan vibrio adalah 10^5 - 10^8 organisme) (Jawetz *et al.*, 2005).

Selain bakteri *Shigella dysenteriae* yang menyebabkan penyakit, *Staphylococcus aureus* juga merupakan bakteri patogen yang utama pada manusia. Hampir setiap orang pernah mengalami berbagai infeksi *S. aureus* selama hidupnya, dari keracunan makanan berat atau infeksi kulit yang kecil, sampai infeksi yang tidak bisa disembuhkan (Jawetz *et al.*, 2001). Infeksi *S. aureus* dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain melalui selaput mukosa yang bertemu dengan kulit. Bakteri ini dapat menyebabkan endokarditis, osteomielitis akut hematogen, meningitis, ataupun infeksi paru-paru (Jawetz *et al.*, 2005).

Infeksi dapat diobati dengan menggunakan antibiotik. Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi, dan bakteri tanah, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Penggunaan antibiotik secara besar-besaran untuk terapi dan profilaksis adalah faktor utama terjadinya resistensi (Tjay dkk., 2002).

Penyakit infeksi dapat juga diobati dengan menggunakan obat-obat tradisional. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Kegunaan tanaman ini dalam masyarakat antara lain untuk mengobati batuk berdarah, disentri, dan sebagai desinfektan. Kayu secang mengandung senyawa kimia salah satunya adalah brasilin (Soedibyo, 1998). Brasilin merupakan senyawa golongan fenolik kemungkinan membunuh bakteri dengan cara mengkoagulasi atau mendenaturasi protein protoplasma, atau menyebabkan sel lisis dengan cara mengubah struktur membran sel sehingga terjadi kebocoran isi sel (Siswandono dan Sukarjo, 1995).

Fraksi metanol kayu secang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada KBM (Kadar Bunuh Minimum) 1%. Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menunjukkan bahwa fraksi metanol kayu secang mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, dan antrakinon (Kuswandi, 2002). Fraksi etanol kayu secang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Proteus vulgaris*, *Coliform* dan *Diphtheroid*, sedangkan fraksi eter minyak tanah dan fraksi kloroform tidak memiliki daya antibakteri. (Anis, 1990). Pada fraksi metanol dan fraksi etanol tersebut mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri yang bersifat polar sedangkan untuk fraksi eter minyak tanah dan fraksi kloroform tidak mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi-

fraksi tersebut diperoleh dengan mengekstraksi simplisia dengan penyarian bertingkat sehingga penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan pelarut etanol 70% kemudian baru dilakukan fraksinasi dengan pelarut koroform dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat.

Ekstrak etanol mengandung senyawa yang bersifat polar maupun semi polar, sehingga masih bersifat ekstrak kasar oleh karena itu perlu dilakukan fraksinasi untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik berdasarkan tingkat kepolarannya. Untuk mengetahui senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, maka dalam penelitian ini digunakan metode bioautografi. Sedangkan metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri dan mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) digunakan metode dilusi padat karena memiliki keunggulan yaitu homogenitas antara media, bahan uji, dan media lebih baik, dan tidak dipengaruhi tebal tipis media, jika digunakan metode dilusi cair dikhawatirkan dapat mengganggu saat pengamatan karena kekeruhan yang terjadi bukan disebabkan oleh suspensi bakteri tetapi dari sampel yang berupa ekstrak. Bakteri yang digunakan untuk mengetahui potensi antibakteri dari kayu secang digunakan *S. aureus* mewakili bakteri Gram positif dan *S. dysenteriae* mewakili Gram negatif.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah fraksi etil asetat ekstrak etanol kayu secang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*, serta berapa Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya?
2. Senyawa kimia apakah yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol kayu secang yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol kayu secang terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*, serta mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya .
2. Mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae* dengan metode bioautografi.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.)

a. Klasifikasi

Divisi : Magnoliophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Rosales

Suku : Caesalpiniaceae

Marga : *Caesalpinia*

Jenis : *Caesalpinia sappan* L. (Iriawati, 2008).

b. Deskripsi

Morfologi dari tanaman secang adalah semak atau pohon kecil, tinggi sampai 10 m. Ranting-ranting berlenti sel dan berduri, bentuk duri bengkok, tersebar. Daun majemuk, panjang 25-40 cm, bersisip 9-15 cm, setiap sisip mempunyai 10-20 pasang anak daun yang berhadapan. Anak daun bertangkai, bentuk lonjong, pangkal hampir ramping, ujung bundar serta sisinya agak sejajar, panjang anak daun 10-25 mm, lebar 3-11 mm. Perbungaan berupa malai, terdapat diujung, panjang mulai 10-40 cm, panjang gagang bunga 15-20 cm, pinggir kelopak berambut, panjang kelopak yang terbawah lebih kurang 10 mm, lebar lebih kurang 4 mm, empat daun lainnya panjang lebih kurang 7 mm, lebar lebih kurang 4 mm, tajuk memencar berwarna kuning, helaian membulat bergaris tengah lebih kurang 10 mm, panjang benang sari lebih kurang 15 mm, panjang putik lebih kurang 18 mm. Polong berwarna hitam, panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm, berisi 3-4 biji, panjang biji 15-18 mm, lebar 8-11 mm, tebal 5-7 mm (Anonim, 1977).

c. Nama daerah

Pada setiap daerah kayu secang mempunyai nama yang berbeda-beda antara lain: cang (Bali), sepang (Sasak), kayu sema (Manado), naga, sapang (Makasar), kayu secang (Madura), secang (sunda) (Hariana, 2006).

d. Kegunaan

Kayu secang digunakan sebagai antidiare (Anonim,1997). Efek farmakologis tanaman secang antara lain penghenti pendarahan, pembersih darah,

pengelat, penawar racun dan obat antiseptik (Hariana, 2006). Berdasarkan penelitian sebelumnya, fraksi metanol kayu secang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* penyebab batuk darah (Kuswandi, 2002).

e. Kandungan kimia

Tanaman secang kaya akan kandungan kimia antara lain senyawa terpenoid, fenilpropana, alkaloid, steroid, saponin, dan fenolik antara lain flavonoid (Sudarsono, 2002). Ekstrak kental kayu secang mengandung minyak atsiri tidak kurang dari 0,2% (Arifin, 2007).

2. Metode Penyarian

a. Penyarian

Penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Ansel, 1989).

Secara umum proses penyarian dapat dibedakan menjadi empat yaitu infundasi, maserasi, perkolasi, dan sokhletasi (Anonim, 1986).

b. Larutan penyari

Kelarutan dan stabilitas bahan kandungan tumbuhan merupakan sifat yang penting untuk memperoleh sediaan obat yang tepat. Oleh karena banyak kandungan kimia tumbuhan yang larut dalam air atau etanol, maka air atau etanol menjadi acuan cairan pengekstraksi (Voight, 1995).

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria berikut ini:

- 1) Murah dan mudah diperoleh
- 2) Stabil secara fisika dan kimia
- 3) Bereaksi netral
- 4) Tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar
- 5) Selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki
- 6) Tidak mempengaruhi zat berkhasiat
- 7) Diperbolehkan oleh peraturan (Anonim, 1986).

c. Penyarian dengan maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Anonim, 2000).

d. Fraksinasi cair-cair

Fraksinasi cair-cair merupakan proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur.

$$K_D = \frac{C_2}{C_1}$$

K_D adalah koefisien distribusi atau koefisien partisi yang merupakan tetapan keseimbangan yang merupakan kelarutan relatif dari suatu senyawa terlarut dalam dua pelarut yang tidak bercampur. C_1 dan C_2 adalah kadar senyawa terlarut dalam pelarut 1 dan pelarut 2. Pelarut pertama yang sering digunakan adalah air sedangkan sebagai pelarut kedua adalah pelarut organik yang tidak bercampur dengan air. Dengan demikian ion anorganik atau senyawa organik polar sebagian besar akan terdapat dalam fasa air, sedangkan senyawa organik nonpolar sebagian besar terdapat dalam fasa organik. Hal ini yang disebut “*like dissolves like*” yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar, dan senyawa nonpolar mudah larut dalam senyawa nonpolar (Sudjadi, 1988).

3. Bakteri

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas dan uniseluler. Sel berisi massa sitoplasma dan inti yang tidak memiliki membran inti. Sel bakteri berbentuk bulat, batang atau spiral. Reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana yaitu proses aseksual. Di antara bakteri ada yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia dan hewan (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri mempunyai lapisan luar yang rigid, yaitu dinding sel berfungsi untuk mempertahankan bentuk mikroorganisme dan pelindung sel bakteri yang mempunyai tekanan osmotik internal yang tinggi. Trauma pada dinding sel (misalnya oleh lisozim) atau penghambatan pembentukannya, dapat menimbulkan lisis pada sel (Jawetz *et al.*, 1986).

Bentuk morfologi bakteri dapat dibagi dalam 4 kelompok yaitu:

- a. Kokus berbentuk bulat. Apabila tersusun berpasangan, dikenal sebagai diplokokus.
- b. Basil memiliki bentuk batang, tersusun secara tunggal atau dalam rantai.
- c. Vibrio adalah bakteri melengkung.
- d. Spirochaeta adalah bakteri yang sangat kecil, lentur dan berbentuk spiral (Gould dan Brooker, 2003).

Beberapa anggota dari bakteri dapat menimbulkan penyakit pada binatang maupun manusia, tumbuhan maupun mikroba lainnya. Bakteri mempunyai daerah penyebaran yang sangat luas. Secara umum, bakteri termasuk organisme yang bersifat kosmopolitan, karena dapat ditemukan pada tanah maupun permukaan bumi, atmosfer dan dalam lingkungan sehari-hari (Anonim, 1991).

Bakteri dibagi dalam golongan Gram positif dan Gram negatif berdasarkan reaksinya terhadap prosedur pewarnaan Gram. Prosedur ini dinamakan sesuai dengan nama seorang histologis, Hans Cristian Gram, yang mengembangkan metode perbedaan warna dalam usaha mewarnai bakteri pada jaringan yang terinfeksi. Pada bakteri Gram positif, kandungan utama dinding sel adalah peptidoglikan dan asam teikoat, sedangkan pada bakteri Gram negatif dinding sel meliputi peptidoglikan dan membran luar (Jawetz *et al.*, 2005).

4. *Staphylococcus aureus*

Sistematika *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes
Bangsa : Eubacteriales
Suku : Micrococcaceae
Marga : Staphylococcus
Jenis : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

Staphylococcus merupakan sel Gram positif berbentuk bola dengan diameter 1 μm yang tersusun dalam bentuk kluster yang tidak teratur seperti anggur. Kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai juga tampak dalam biakan cair (Jawetz *et al.*, 2005). Staphylococcus bersifat patogen, non motil, dan memproduksi katalase (Levinson, 2004).

Staphylococcus tumbuh baik dalam kaldu pada suhu 37°C. Batas-batas suhu pertumbuhannya ialah 15°C dan 40°C, sedangkan suhu pertumbuhan optimum ialah 35°C, kuman ini bersifat anaerob, fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan ialah 7,4 (Sujudi, 1994). Staphylococcus tahan pada kondisi kering, temperatur 50 °C selama 30 menit, dan natrium klorida 9% dan dihambat oleh heksaklorofen 3% (Jawetz *et al.*, 2005).

Staphylococcus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Antigen ini merupakan kompleks peptidoglikan asam teikhoat dan dapat menghambat fagositosis dan bagian ini yang diserang bakteriofaga. Staphylococcus bersifat lisogenik yaitu yang mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies sama (Warsa, 1994).

Staphylococcus dapat menyebabkan penyakit karena kemampuannya melakukan pembelahan dan menyebar luas kedalam jaringan dan melalui produksi beberapa bahan ekstraseluler, seperti katalase, koagulase, enzim lain, eksotoksin, lekosidin, toksin eksfoliatif, toksin sindroma syok toksin dan enterotoksin (Jawetz *et al.*, 2005). *S. aureus* merupakan kuman patogen yang bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulase, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas (Warsa, 1994). Staphylococcus biasanya memfermentasi manitol dan menghemolisis sel darah merah (Levinson, 2004). Staphylococcus dapat menyebabkan peradangan setempat, nekrosis, dan pembentukan abses. Pada penyebaran kebagian tubuh lain melewati pembuluh getah bening dan pembuluh darah (Warsa, 1994). Staphylococcus menyebabkan penyakit bisul, berbagai penyakit pyogenik, keracunan makanan, dan *toxic shock syndrome* (Levinson, 2004).

Obat yang digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* adalah penisilin G untuk infeksi yang ringan, pada infeksi yang berat atau yang resisten terhadap penisilin dapat diberikan metisilin. Penderita yang alergi terhadap penisilin, dapat diberikan sefalosporin, eritromisin, linkomisin atau klindamisin (Warsa, 1994).

5. *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*)

Klasifikasi *S. dysenteriae*:

Divisio : Monomychota

Subdivisio : Schizomycetea

Clasiss : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Tribe : Eschericeae
Genus : *Shigella*
Species : *Shigella dysenteriae* (Anonim, 1993).

Species *Shigella* adalah kuman patogen usus yang telah lama dikenal sebagai agen penyebab penyakit disentri basiler (Karsinah, 1993). *S. dysenteriae* berbentuk batang, ukuran 0,5–0,7 μm x 2–3 μm , pada pewarnaan Gram bersifat Gram negatif, tidak berflagel. Sifat pertumbuhan adalah aerob dan fakultatif anaerob, pH pertumbuhan 6,4–7,8, suhu pertumbuhan optimum 37°C (Anonim, 1993). Semua *Shigella* meragikan glukosa. Bakteri ini tidak meragikan laktosa kecuali *Shigella sonnei*. Ketidakmampuannya untuk meragikan laktosa membedakan bakteri–bakteri *Shigella* pada perbenihan diferensial. Bakteri ini membentuk asam dari karbohidrat, tetapi jarang menghasilkan gas. Bakteri ini dapat juga dibagi menjadi bakteri yang meragikan manitol dan yang tidak (Jawetz *et al.*, 2005).

Infeksi *Shigella sp* praktis selalu terbatas pada saluran cerna, invasi dalam darah sangat jarang. Proses patologik yang penting adalah invasi epitel selaput lendir, mikroabses dan dinding usus besar dan ileum terminal yang cenderung mengakibatkan nekrosis selaput lendir, ulserasi superfisial, pendarahan dan pembentukan “pseudomembran” pada daerah ulkus. Pseudomembran ini terdiri atas fibrin, leukosit sisa sel selaput mukosa yang nefrotik dan bakteri. Waktu

proses berkurang jaringan granulasi mengikis ulkus dan terbentuk jaringan parut (Budyanto, 2002).

S. dysenteriae dapat menyebabkan 3 bentuk diare:

- a. Disentri klasik dengan tinja yang konsisten lembek disertai darah, mukus dan pus
- b. *Watery diarrhea*
- c. Kombinasi antara disentri klasik dengan tinja yang konsisten lembek disertai darah, mukus, pus dengan *watery diarrhea*.

Masa inkubasi diare adalah 2–4 hari, atau bisa lebih lama sampai 1 minggu. Dosis infeksi pada orang sehat adalah 200 bakteri (Karsinah dkk., 1993).

Obat yang digunakan untuk mengobati disentri basiler adalah tetrasiklin 4 kali sehari 250 mg, kotrimoksazol 2 kali sehari 500 mg, semuanya selama 3-5 hari (Tjay dkk, 2002).

6. Antibakteri

Antibakteri ialah obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Suatu antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif, berarti obat antibakteri tersebut hanya berbahaya bagi bakteri, tetapi relatif tidak membahayakan bagi hospes (Pelczar dan Chan, 1988).

Mekanisme kerja antibakteri yaitu:

- a. Merusak dinding sel yaitu dengan menghambat pembentukan dan mengubahnya setelah selesai terbentuk. Contoh: penisilin.
- b. Mengganggu permeabilitas sel yaitu dengan merusak membran sel. Fungsi membran sel adalah mempertahankan bahan-bahan dalam sel serta mengatur

aliran keluar masuknya bahan lain. Adanya kerusakan pada membran ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Contoh: polimiksin.

- c. Merubah molekul protein dan asam nukleat yaitu dengan mendenaturasikan protein dan asam nukleat sehingga kerusakan sel tidak dapat diperbaiki lagi karena hidup suatu sel tergantung pada molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah. Contoh: fenolat dan persenyawaan fenolat.
- d. Menghambat kerja enzim dengan mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme sel. Contoh: sulfonamid.
- e. Menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Gangguan pada pembentukan atau fungsi-fungsi DNA, RNA dan protein dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel, karena zat-zat tersebut memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel. Contoh: tetrasiklin. (Pelczar dan Chan, 1988).

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja (spektrum kerja luas, spektrum kerja sempit), cara kerja (bakterisida atau bakteriostatik) dan ditentukan pula oleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta potensi hambatan pada KHM (Anonim, 1993).

Pengujian terhadap aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui obat-obat yang paling poten untuk kuman penyebab penyakit terutama penyakit kronis. Pengujian ini dapat dilakukan dengan cara yaitu:

- a. Agar Difusi

Media yang dipakai adalah Mueller Hinton. Metode difusi ini ada beberapa cara, yaitu:

1) Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU per ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Kemudian kertas samir (disk) yang mengandung antibakteri diletakkan di atasnya, diinkubasi pada 37° selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca:

- a) Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.
- b) Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri tetapi tidak dimatikan.

2) Cara Sumuran

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU per ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu, ke dalam sumuran ditetaskan

larutan antibakteri kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti pada cara Kirby Bauer.

3) Cara *Pour Plate*

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU per ml. Suspensi bakteri diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5 % yang mempunyai temperatur 50°C. Setelah suspensi kuman tersebut homogen dituang ke dalam media agar Mueller Hinton, ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, disk diletakkan di atas media kemudian diinkubasi 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasil dibaca sesuai dengan standar masing-masing bakteri.

b. Dilusi Cair atau Dilusi Padat

Pada prinsipnya antibakteri diencerkan sampai diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar lalu ditanami bakteri. Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan disebut Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Anonim, 1993).

8. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrien/zat makanan yang dipakai untuk menumbuhkan mikroorganisme. Sebelum mikroorganisme ditambahkan pertama harus dipahami kebutuhan dasarnya, kemudian dicari suatu media yang memberikan hasil terbaik. Susunan dan kadar nutrien dalam suatu media untuk mikroba harus seimbang agar pertumbuhan mikroba dapat sebaik mungkin. Hal ini perlu dikemukakan mengingat banyak senyawa-senyawa yang menjadi penghambat atau menjadi racun bagi mikroba kalau kadarnya terlalu tinggi (Anonim, 1991). Media yang digunakan untuk pembiakan harus mengandung cukup nutrien untuk pertumbuhan bakteri. Media pembiakan ada yang padat dan ada yang cair. Media padat umumnya media agar, terdapat dalam cawan petri atau dalam tabung reaksi (miring). Media cair disebut "*broth*" umumnya ditampung dalam tabung reaksi atau botol khusus (Tambayong, 2000).

Syarat-syarat yang harus dipenuhi oleh suatu media:

a. Susunan makanan

Dalam suatu media yang harus digunakan harus mengandung air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin dan gas.

b. Tekanan osmosis

Mengingat sifat bakteri juga sama seperti sifat-sifat sel yang lain terhadap tekanan osmose, maka bakteri untuk pertumbuhannya membutuhkan media yang isotonis. Bila media tersebut hipotonis maka akan terjadi *plasmoptysis*, sedangkan bila media tersebut hipertonis maka akan terjadi *plasmolysis*.

c. Derajat keasaman

Pada umumnya pH dari suatu media berada di sekitar daerah netral. Namun ada bakteri tertentu yang membutuhkan pH yang sangat alkalis untuk pertumbuhan yang optimum.

d. Untuk mendapatkan pertumbuhan optimum, bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Misalnya bakteri patogen membutuhkan temperatur 37°C sesuai temperatur badan.

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Tidak mungkin melakukan pemeriksaan mikrobiologi apabila media yang digunakan tidak steril. Untuk mendapatkan suatu media yang steril maka setiap tindakan serta alat-alat yang digunakan harus steril dan dikerjakan secara aseptik (Anonim, 1993).

9. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan dan uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesa, isolasi dari hewan percobaan, tanaman maupun mikroorganisme (Sastrohamidjojo, 2002).

a. Fase Diam

Fase diam adalah suatu lapisan yang dibuat dari bahan-bahan berbutir-butir halus yang ditempatkan pada lempengan. Sifat-sifat umum dari penyerap KLT adalah ukuran partikel dan homogenitasnya. Ukuran partikel yang biasa

digunakan adalah 1-25 mikron. Adapun macam-macam fase diam adalah silika gel, alumina, selulosa, resin, kieselguhr, magnesium silikat (Sastrohamidjojo, 2002).

b. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase ini bergerak di dalam fase diam karena adanya gaya kapiler. Macam-macam fase gerak antara lain heksana, toluen, eter, kloroform, aseton, etil asetat, asetonitril, etanol, metanol, air (Sastrohamidjojo, 2002).

Dalam KLT dilakukan tahapan pengembangan atau elusi (Sastrohamidjojo, 2002). Pengembangan ialah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut pengembang merambat naik dalam lapisan fase diam. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan R_f atau hR_f . Harga R_f antara 0-1. Berdasarkan parameter tersebut KLT dapat digunakan untuk perhitungan kualitatif dalam pengujian sampel (Sumarno, 2001).

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase gerak}}$$

(Mulja dan Suharman, 1995).

10. Uji Bioautografi

Bioautografi dibagi menjadi menjadi dua metode, yaitu:

a. Bioautografi langsung

Bioautografi langsung dilakukan dengan cara menyemprotkan *plate* KLT dengan suspensi bakteri atau dengan menyentuh *plate* KLT pada permukaan media agar. Setelah inkubasi selama waktu tertentu maka letak zat aktif antimikrobia ditandai dengan adanya zona jernih pada media yang telah ditumbuhi bakteri.

b. Bioautografi *overlay*

Bioautografi *overlay* dilakukan dengan cara menuangkan media agar bakteri di atas permukaan *plate* KLT, setelah media padat kemudian diinkubasi. Penampakan zona hambatan dilakukan dengan penyemprotan menggunakan larutan tetrazolium klorida, maka letak zat aktif antimikroba ditandai dengan adanya zona jernih dengan latar belakang ungu (Rehalison, 1994).

E. Keterangan Empiris

Dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh data ilmiah aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol kayu secang terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae* dan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan menganalisis secara bioautografi pada lempeng KLT.