

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN CEREMAI
(*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) TERHADAP *Staphylococcus aureus* dan
Escherichia coli DAN BIOAUTOGRAFINYA**

SKRIPSI



Oleh :

**ANTIK BUDIYANTI
K 100.050.058**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Infeksi merupakan salah satu penyebab penyakit yang sering terjadi di daerah beriklim tropis, seperti Indonesia. Hal ini ditunjang dengan keadaan udara yang lembab, berdebu serta temperatur yang hangat sehingga mikroba dapat tumbuh dengan subur. Infeksi dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur dan protozoa (Gibson, 1996).

Penyakit infeksi yang banyak diderita masyarakat diantaranya infeksi Enterobakteria, dari golongan *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*. Infeksi Enterobakteria dari golongan *Escherichia* yang sering terjadi, yaitu *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* secara alami hidup dalam saluran pencernaan. *E. coli* pada umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, dan saluran empedu, peritrium, saluran otak (Jawetz *et al.*, 1986).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan penyebab penting penyakit infeksi. Dalam keadaan normal *S. aureus* terdapat di dalam saluran pernafasan atas, kulit, saluran cerna dan vagina. *S. aureus* dapat menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses (Warsa, 1993).

Pada dewasa ini banyak bakteri penyebab infeksi telah resisten terhadap antibiotik. Hal ini disebabkan karena secara alamiah bakteri resisten terhadap antibiotik, penghentian antibiotik sebelum penyakit sembuh, dan pemberian dosis

di bawah dosis yang diberikan. Pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik memerlukan produk baru yang memiliki potensi tinggi. Penelitian zat yang berkhasiat sebagai antibakteri perlu dilakukan untuk menemukan produk antimikroba yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat (Widjajanti, 1999).

Salah satu dari tanaman obat yaitu ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang mengandung flavonoid, tanin dan saponin. Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Robinson, 1991).

Ekstrak heksana, kloroform, etil asetat, dan etanol daun ceremai (*P. acidus* (L.) Skeels) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* serta memiliki aktivitas antijamur pada *C. albicans* dengan metode *Stokes disc diffusion*, *the pour plate*, *well diffusion*, *streak plate*, dan dilusi cair (Jagessar dkk., 2008). Berdasarkan penelitian sebelumnya maka perlu dikembangkan untuk melanjutkan penelitian uji aktivitas antibakteri daun ceremai (*P. acidus* (L.) Skeels) dengan menggunakan metode dilusi padat dan untuk mengetahui senyawa kimia ekstrak etanol daun ceremai yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

B. Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) memiliki aktivitas antibakteri (Kadar Bunuh Minimum) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?
2. Senyawa kimia apa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* serta nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum).
2. Mengetahui senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels)

a. Klasifikasi dari tanaman ceremai sebagai berikut:

Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: Phyllanthus
Jenis	: <i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeels (Hutapea dkk., 1991)

b. Sinonim : *Cicca disticha* L. ; *C. nodiflora* Lamk. ; *Phyllanthus distichus* Muell. Arg. ; *P. cicca* Muell. Arg. ; *Averroa acida* L (Hutapea dkk., 1991)

c. Nama daerah

Sumatra	: ceremoi (Aceh), cerme (Gayo), cerme (Batak), camin-camin (Minangkabau)
Jawa	: cerme (Sunda), cerme (Jawa), careme (Madura)
Bali	: carmen (Bali)
Nusa Tenggara	: saruma (Bima), cerme (Sasaki)
Sulawesi	: caramele (Makasar), tili (Gorontalo), cara-mele (Bugis)
Maluku	: ceremin (Ternate) (Hutapea dkk., 1991).

d. Deskripsi

Pohon ceremai memiliki tinggi ± 10 m. Batangnya tegak, bulat, berkayu, mudah patah, kasar, dengan percabangan monopodial, warna batang coklat muda. Daunnya halus, tangkai silindris, majemuk, lonjong, berseling, panjang 5-6 cm, lebar pertulangan 2-3 cm, tepi daun rata, ujung runcing, pangkal tumpul, warna hijau muda. Bunga majemuk, bulat, diranting, tangkai silindris, panjang ± 1 cm, warna hijau muda, kelopak bentuk bintang, halus, mahkota merah muda. Buah ceremai bulat, dengan permukaan berlekuk, warna kuning keputih-putihan. Bijinya bulat pipih, coklat muda. Akarnya tunggang dengan warna coklat muda (Hutapea dkk., 1991).

e. Khasiat

Daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) berkhasiat untuk urus-urus dan obat mual. Akar ceremai digunakan untuk obat asma dan daun muda untuk obat sariawan (Hutapea dkk., 1991).

f. Kandungan kimia

Daun, kulit batang dan kayu ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan polifenol, di samping itu kayunya juga mengandung alkaloid (Hutapea dkk., 1991).

g. Ekologi dan penyebaran

Ceremai banyak ditanam orang di halaman, ladang, atau tempat lainnya sampai ketinggian sekitar 500 m dpl. Pohon kecil, tinggi ± 10 m, percabangan banyak. Kulit kayunya tebal, daun tunggal, bertangkai pendek, tersusun dalam

tangkai membentuk rangkaian seperti daun majemuk. Helaian daun bentuk bundar telur sampai jorong, ujung runcing. Pangkal tumpul sampai bundar, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan licin tidak berambut, panjang 2-7 cm, lebar 1,5-4 cm, warna hijau muda. Tangkai bila gugur akan menimbulkan bekas yang nyata. Bunga majemuk tandan, panjang 1,5 cm – 9 cm, keluar disepanjang cabang. Buahnya berupa buah batu, bentuk bulat pipih, berlekuk 6-8, panjang 1,25-1,5 cm, lebar 1,75-2,5 cm, warna kuning muda, rasanya asam (Dalimarta, 2002)

h. Sifat : Berbau khas aromatik, tidak berasa (Dalimarta, 2002).

2. Metode Penyarian

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik jika permulaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1988).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 2000). Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989).

Metode dasar penyarian ada beberapa yaitu maserasi, perkolasi dan soxhletasi. Pemilihan dalam metode penyarian tersebut sebaiknya disesuaikan dengan kepentingan untuk memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

a. Maserasi

Istilah *maceration* berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya "merendam". Maserasi yaitu proses penyarian dengan cara merendam simplisia dalam penyari sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut. Serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan pada wadah bejana bermulut besar, ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan serbuk simplisia. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15°- 20°C dalam waktu 3 hari sampai bahan-bahan yang larut akan melarut (Ansel, 1989).

Maserasi merupakan metode penyarian yang sangat sederhana dan paling banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus. Remaserasi merupakan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Anonim, 2000).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian serbuk simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai didapatkan ekstraksi yang sempurna (*exhaustive extraction*) dan dilakukan pada suhu ruangan. Tahapan dari perkolasi meliputi tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya

(penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Anonim, 2000).

c. Soxhletasi

Bahan yang akan disari berada dalam sebuah kantong ekstraksi (kertas, karton) di dalam alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu. Wadah gelas yang mengandung kantong diletakkan di antara labu suling dan suatu pendingin alir balik dan dihubungkan melalui pipet. Labu tersebut berisi bahan pelarut yang menguap dan jika diberi pemanasan akan menguap mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui pipa pipet, pelarut itu berkondensasi di dalamnya, menetes ke bahan yang disari larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimum secara otomatis ditarik ke dalam labu dengan demikian zat yang tersari tertimbun di dalam labu tersebut (Voight, 1995).

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan beberapa faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat dan diperbolehkan oleh peraturan (Anonim, 1986).

3. Bakteri

Bakteri merupakan organisme bersel tunggal yang berkembang biak dengan pembelahan menjadi dua sel. Bakteri dibagi menjadi kelas-kelas menurut bentuknya yaitu kokus (berbentuk bulat), basil (batang lurus), kokobasil (bentuk

antara kokus dan basil), vibrio (batang lempeng), dan spiroceta (spiral) (Gibson, 1996).

Berdasarkan sifat bakteri terhadap cat Gram, bakteri dapat digolongkan menjadi Gram positif dan Gram negatif, contoh dari Gram positif ialah *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, sedangkan bakteri Gram negatif contohnya yaitu *E. coli* dan *Shigella* sp (Salle, 1961).

4. *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Divisio	: Schizomycota
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Salle, 1961)

Staphylococcus aureus adalah salah satu contoh dari bakteri Gram positif, tumbuh dalam kelompok menyerupai buah anggur (Gibson, 1996). Sel *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat dengan diameter antara 0,8 -1,0 μm , tersusun dalam kelompok tidak teratur, tidak bergerak, tidak membentuk spora (Jawetz *et al.*, 1991).

S. aureus mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteriologi dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37° C, tapi paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar (20° C). Koloni *S.*

aureus pada pembenihan padat berbentuk bulat halus menonjol berkilau-kilauan, membentuk pigmen berwarna kuning emas (Jawetz *et al.*, 1991).

S. aureus bersifat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Bakteri tersebut dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan karena kemampuannya menghasilkan banyak zat ekstraseluler (Jawetz *et al.*, 1991).

5. *Escherichia coli*

E. coli adalah kuman oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak-anak dan *travelers diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain diluar usus (Karsinah dkk., 1994).

Klasifikasi dari *Escherichia coli* sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryotae
Divisio	: Protophyta
Sub divisi	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacterials
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Salle, 1991)

E. coli berbentuk batang gemuk berukuran 2,4 μm x 0,4 μm sampai 0,7 μm , termasuk Gram negatif tidak bersimpai, bergerak aktif dan tidak berspora. Bersifat aerob atau fakultatif aerob dan tumbuh pada pembenihan biasa. Suhu optimum pertumbuhannya yaitu 37° C. *E. coli* meragi laktosa, glukosa, sukrosa, maltosa dan manitol dengan asam dan gas. Pada uji indol dan uji merah metil menunjukkan hasil positif (+), sedangkan pada uji Proskauer dan uji sitrat menunjukkan hasil negatif (-). *E. coli* tidak menghidrolisis urea dan tidak membentuk H₂S (Gupte, 1990).

Dinding sel bakteri Gram negatif merupakan struktur yang berlapis-lapis dan sangat kompleks. Komponen khusus dinding sel merupakan selaput ganda fosfolipid ini diganti dengan molekul polisakarida. Bakteri *E. coli* pada umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, saluran empedu, peritonium dan saluran otak bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan, pada keadaan yang kurang baik seperti prematur, usia tua, terserang penyakit lain, setelah imunisasi, bakteri ini dapat mencapai saluran darah dan akan terjadi sepsis (Jawetz *et al.*, 1986).

E. coli dapat menyebabkan infeksi pada traktus urinarius juga dapat menyebabkan meningitis pada bayi prematur dan neonatal. Strain enteropatogenik *E. coli* sering menyebabkan diare akut pada anak-anak di bawah umur 2 tahun (Salle, 1961). *E. coli* tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium mikrobiologi. Pada media yang dipergunakan untuk isolasi kuman enterik, sebagian besar strain *E. coli* tumbuh sebagai koloni yang

meragi laktosa. *E. coli* bersifat mikroaerofilik. Beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe β (Anonim, 1996).

Penyakit-penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* adalah :

- 1). Diare
- 2). Infeksi saluran kemih mulai dari sistitis sampai pielonefritis
- 3). Pneumonia
- 4). Meningitis pada bayi baru lahir
- 5). Infeksi luka terutama luka di dalam abdomen (Anonim, 1994)

6. Mekanisme kerja antibakteri

Target antibakteri adalah sebagai berikut:

a. Dinding sel

Bakteri memiliki lapisan luar yang kaku, disebut dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran protoplasma di bawahnya (Jawetz *et al.*, 2001). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Antibiotik yang bekerja dengan mekanisme ini diantaranya adalah penisilin (Pelczar dan Chan, 1998).

b. Perubahan permeabilitas sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan

mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 1998).

Polimiksin bekerja dengan merusak struktur dinding sel, dan kemudian antibiotik tersebut dengan membran sel, sehingga menyebabkan disorientasi komponen-komponen lipoprotein serta mencegah berfungsinya membran sebagai perintang osmotik (Pelczar dan Chan, 1988).

c. Molekul protein dan asam nukleat

Hidup suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat sehingga sel tanpa dapat diperbaiki lagi. Salah satu antimikrobia kimiawi yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel adalah fenolat dan persenyawaan fenolat (Pelczar dan Chan, 1988).

d. Enzim

Setiap enzim dari beratus-ratus enzim berbeda-beda yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Penghambat ini banyak mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel. Sulfonamid merupakan zat kemoterapeutik sintesis yang bekerja dengan cara bersaing dengan PABA (asam *p*-aminobenzoat) di dalam reaksi, karena molekul PABA dan sulfonamid hampir sama, sehingga dapat menghalangi sintesis asam folat yang merupakan koenzim esensial yang berfungsi dalam sintesis purin dan pirimidin,

dengan demikian karena tidak adanya koenzim, maka aktivitas seluler yang normal akan terganggu (Pelczar dan Chan, 1988).

e. Asam nukleat dan protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 1998).

Tetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein dengan cara menghalangi terikatnya RNA (RNA transfer aminoasil) pada situs spesifik ribosom, selama pemanjangan rantai peptida (Pelczar dan Chan, 1988).

7. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian terhadap aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu :

a. Agar difusi

Media yang dipakai adalah agar *Mueller Hinton*. Pada metode difusi ini ada beberapa cara, yaitu:

1). Cara Kirby Bauer

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades hingga konsentrasi 10^8 CFU per ml dioleskan pada media agar hingga rata, kemudian kertas samir (*disk*) diletakkan di atasnya. Hasilnya dibaca:

a). *Radical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.

b). *Irradical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan (Lorian, 1980).

2). Cara Sumuran

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades hingga konsentrasi 10^8 CFU per ml dioleskan pada media agar hingga rata, kemudian media agar dibuat sumuran, ditetaskan ke dalam larutan antibakteri. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer (Lorian, 1980).

3). Cara *Pour Plate*

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan dengan akuades dan agar base, dituang pada media agar Mueller Hinton, *disk* diletakkan di atas media. Hasilnya dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri (Lorian, 1980).

b. Dilusi Cair/Dilusi Padat

Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. 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, kemudian ditanami bakteri. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan

disebut Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Anonim, 1994).

8. Pewarnaan Bakteri

Tujuan dari pewarnaan bakteri adalah untuk mempelajari morfologi, struktur, sifat-sifat bakteri serta identifikasinya. Jenis-jenis pewarnaan bakteri yang dikenal adalah :

- a. Pewarnaan negatif. Suspensi bakteri dibuat dalam zat warna negrosin/tinta bakteri sehingga tampak sebagai benda-benda terang dengan latar belakang gelap.
- b. Pewarnaan sederhana. Pewarnaan ini hanya menggunakan satu macam zat warna, misal biru metilen, air flukhsin, atau ungu kristal selama 1-2 menit (Assani, 1994)
- c. Pewarnaan diferensial. Pewarnaan diferensial menggunakan lebih dari satu macam zat warna terdiri atas : 1) Pewarnaan Gram yang ditemukan oleh Christian Gram pada tahun 1884 untuk membedakan bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif, 2) Pewarnaan tahan asam, misalnya pewarnaan Ziehl Neelsen dan Kinyoun-Gabbet untuk membedakan bakteri yang tahan asam dan yang tidak tahan asam.
- d. Pewarnaan khusus. Pewarnaan ini dipakai untuk mewarnai bagian-bagian sel bakteri atau bakteri tertentu yang sulit diwarnai dengan pewarnaan biasa, misalnya pewarnaan Gray untuk mewarnai flagel dan pewarnaan Klein untuk mewarnai spora.

9. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran makanan yang diperlukan untuk pertumbuhan, isolasi dan identifikasi suatu mikroorganisme. Untuk mendapatkan suatu lingkungan kehidupan yang cocok bagi pertumbuhan bakteri maka suatu media harus memenuhi syarat dalam hal:

a. Susunan makanan

Media yang digunakan untuk pertumbuhan harus mempunyai air, mineral, sumber karbon, sumber nitrogen, vitamin, dan gas (Anonim, 2007).

b. Tekanan osmose

Mengingat sifat-sifat bakteri juga sama seperti sifat-sifat sel yang lain terhadap tekanan osmose, maka dalam pertumbuhannya membutuhkan media yang isotonis (Anonim, 2007).

c. Derajat keasaman

Pada umumnya bakteri membutuhkan pH sekitar netral, namun ada bakteri tertentu yang membutuhkan pH yang sangat alkalis (Anonim, 2007).

d. Temperatur

Untuk mendapatkan pertumbuhan optimal, bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Umumnya untuk bakteri yang patogen membutuhkan temperatur sekitar 37° C, sesuai dengan temperatur tubuh. Namun ada bakteri patogen yang membutuhkan sekitar 42° C yaitu *Camphylobacter* (Anonim, 2007).

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Media yang tidak steril tidak dapat digunakan untuk melakukan pemeriksaan mikrobiologis, karena tidak dapat dibedakan dengan pasti apakah bakteri berasal dari material yang diperiksa atau hanya kontaminan. Untuk mendapatkan suatu media yang steril maka setiap tindakan serta alat-alat yang digunakan harus disterilkan dahulu dan dalam pengerjaannya haruslah aseptik (Anonim, 2007).

10. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa bercak atau pita (awal). Setelah pelat ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selain penambahan kapiler (pengembang), selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi (Stahl, 1985).

Di antara berbagai jenis kromatografi, kromatografi lapis tipis adalah yang paling cocok untuk analisis obat di laboratorium farmasi. Metode ini hanya memerlukan investasi yang kecil untuk perlengkapan, menggunakan waktu yang singkat untuk menyelesaikan analisis (15-60 menit) dan memerlukan jumlah cuplikan yang sedikit, kebutuhan ruangan minimum dan pelaksanaannya sederhana (Stahl, 1985).

Pemilihan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung pada solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase diam telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut (Sumarno, 2001).

Pada kromatogram kromatografi lapis tipis dikenal istilah atau pengertian faktor retardasi, (R_f) oleh tiap-tiap noda kromatogram yang didefinisikan sebagai:

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi komponen}}{\text{jarak migrasi fase mobil}} = \frac{dR}{dM} = \frac{hR_f}{100}$$

(Mulya dan Suharman, 1995)

10. Bioautografi

Metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antifungi dan antiviral disebut bioautografi (Djide, 2003). Bioautografi dapat juga digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang belum diketahui karena metode kimia atau fisika hanya terbatas untuk senyawa murni. Adapun deteksi kimia dengan warna spesifik digunakan sebagai pembanding hasil bioautografi sehingga kedua metode tersebut saling melengkapi (Djide, 2003).

Bioatografi dilakukan dengan meletakkan kromatogram senyawa yang diuji pada permukaan media agar di dalam petri yang telah ditumbuhi dengan bakteri dan dibiarkan kontak selama waktu tertentu. Setelah diinkubasi selama 15-24 jam pada temperatur kira-kira 37°C akan tampak zona yang jernih pada lapisan media agar yang antibakterinya berdifusi ke lapisan tersebut dan menghambat

pertumbuhan bakteri, sedangkan lapisan media agar yang ditumbuhi bakteri akan tampak buram (Zweig dan Whitaker, 1971).

E. Landasan Teori

Telah dilakukan penelitian uji aktivitas antijamur daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terhadap *C. albicans* serta memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, dan *S. aureus* dengan menggunakan metode *Stokes disc diffusion*, *well diffusion*, *streak plate* dan dilusi cair ekstrak heksana, kloroform, etil asetat dan etanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terbukti mempunyai daya antimikrobia dan antijamur, dimana ekstrak etanol > etil asetat > kloroform > heksana. Metode *disc diffusion* pada ekstrak etanol memiliki zona hambatan 22 mm² untuk *E. coli* dan *S. aureus* zona hambatannya 21 mm² dan 20 mm² untuk *C. albicans*. Ekstrak etanol daun ceremai dengan menggunakan metode dilusi cair memiliki nilai Kadar Hambat Minimum sebesar 0,18 mg/10 ml (Jagessar dkk., 2008).

F. Hipotesis

Ekstrak etanol daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.