

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

SKRIPSI



Oleh :

**ENDAH SRI MULYATI
K 100 050 060**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia. Infeksi disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur dan protozoa (Gibson, 1996).

Infeksi dapat disebabkan oleh bakteri. Contoh beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *S. aureus* dan *E. coli*. *Staphylococcus* merupakan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia dan paling sering. *Staphylococcus* dapat menyebabkan sepsis pada luka bedah, abses payudara pada ibu-ibu, mata lengket dan lesi-lesi kulit pada bayi (Gibson, 1996).

Escherichia coli merupakan flora normal di dalam intestin. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran kencing yang merupakan infeksi terbanyak (80%), gastroenteritis dan meningitis pada bayi, peritonitis, infeksi luka, kolesistitis, syok bakterimia karena masuknya organisme ke dalam darah dari uretra, kateterisasi atau sitoskopi atau dari daerah sepsis pada abdomen atau pelvis (Gibson, 1996).

Dewasa ini penggunaan antibiotik sangat banyak terutama dalam pengobatan yang berhubungan dengan infeksi. Walaupun telah banyak antibiotik ditemukan, kenyataan menunjukkan bahwa masalah penyakit terus berkelanjutan.

Hal tersebut terjadi akibat pergeseran pada bakteri penyebab penyakit dan perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Karena berkembangnya populasi bakteri yang resisten, maka antibiotik yang pernah efektif untuk mengobati penyakit-penyakit tertentu kehilangan nilai kemoterapeutiknya (Pelczar dan Chan, 1988).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman *Phyllanthus acidus* (L) Skeels yang lebih dikenal sebagai ceremai. Tanaman ceremai diduga mempunyai kandungan kimia yang aktivitasnya sebagai antibakteri. Salah satu kandungan yang terdapat dalam tanaman ini adalah polifenol (Hutapea, 1991). Kelompok-kelompok utama bahan kimia yang dapat memberikan aktivitas antimikroba salah satunya adalah fenol dan turunan persenyawaan dari fenol (Pelczar dan Chan, 1988).

Etil asetat adalah senyawa organik yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil, tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat sering digunakan sebagai pelarut karena etil asetat dapat menyari senyawa-senyawa yang dapat memberikan aktivitas antibakteri diantaranya flavonoid pilohidroksi dan fenol yang lain (Anonim, 2005). Telah diujikan bahwa ekstrak etil asetat daun ceremai mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dan mempunyai aktivitas antijamur terhadap *C. albicans* dengan zona hambatan 20 mm², 15 mm² dan 18 mm² (Jagessar dkk, 2008).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan pengujian dengan metode dilusi padat untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum dan

bioautografi untuk mengetahui kandungan kimia ekstrak etil asetat daun ceremai yang berpotensi sebagai antibakteri.

B. Perumusan Masalah

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

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan cara mengetahui Kadar Bunuh Minimumnya.
2. Mengetahui senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat daun ceremai yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dengan cara bioautografi.

D. Tinjauan Pustaka

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

a. Sistematika

Divisio	: Spermathophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Euphorbiales

Suku : Euphorbiaceae
 Marga : Phyllanthus
 Jenis : *Phyllanthus acidus* (L) Skeels (Hutapea, 1991)

b. Nama daerah

Sumatera :ceremai (Aceh), crème (Gayo), cerme (Batak), camin-
 camin (Minangkabau).
 Jawa : cerme (Sunda), crème (Jawa), careme (Madura)
 Bali : carmen (Bali)
 Nusa Tenggara : saruma (Bima), cerme (Sasak)
 Sulawesi : caramele (Makasar), tili (Gorontalo), cara mele (Bugis)
 Maluku : ceremin (Ternate)

(Hutapea, 1991).

c. Morfologi

Ceremai merupakan pohon, tinggi ± 3 m. Batang tegak, bulat, berkayu, mudah patah, kasar, percabangan monopodial, dan berwarna coklat tua. Daun berupa daun majemuk, lonjong, berseling, panjang 5-6 cm, lebar 2-3 cm, tepi rata, ujung runcing, pangkal tumpul, pertulangan menyirip, halus, tangkai silindris, panjang ± 2 cm, dan berwarna hijau tua. Buah berbentuk bulat, permukaannya berlekuk, dan berwarna kuning keputih-putihan. Biji berbentuk bulat pipih dan berwarna coklat muda. Akarnya berupa akar tunggang dan berwarna coklat muda (Hutapea, 1991).

d. Kandungan kimia

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

e. Kegunaan

Daun *Phyllanthus acidus* berkhasiat untuk urus-urus dan obat mual, akarnya untuk obat asma dan daun muda untuk sariawan (Hutapea, 1991).

2. Bakteri

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas dan uniseluler. Sel berisi massa sitoplasma. Sel bakteri berbentuk bulat, batang dan 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, 1988).

Nama bakteri berasal dari kata *bacterion* yang berarti tongkat batang, berbiak dan membelah diri. Berdasarkan morfologinya, bakteri dapat dibagi atas tiga golongan yaitu :

- a. Golongan basil
- b. Golongan kokus dan
- c. Golongan spiral (Anonim, 1991)

Pada umumnya bakteri tumbuh pada batas suhu ekstrim (0-90°C). 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 *cosmopolitan*, karena dapat ditemukan pada tanah maupun permukaan bumi, atmosfer dan lingkungan sehari-hari (Anonim, 1991)

Bakteri dan mikroorganisme lain menyesuaikan diri dengan lingkungan, termasuk manusia dan binatang, dimana bakteri secara normal bertempat tinggal dan hidup. Dalam bekerja, bakteri meningkatkan kemampuan untuk bertahan dan meningkatkan kemungkinan penyebaran. Dengan menghasilkan infeksi asimtomatik atau penyakit ringan, dan tanpa menyebabkan kematian inang, mikroorganisme yang secara normal hidup dalam tubuh manusia kemungkinan menyebar dari satu orang ke orang lain (Jawetz *et al.*, 2001).

a) *Escherichia coli*

Klasifikasi dari *Escherichia coli* adalah sebagai berikut

Divisio	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Salle, 1961).

Escherichia coli ini ditemukan oleh Escherich tahun 1885. Bakteri ini berbentuk batang, Gram negatif, fakultatif aerob, tumbuh baik pada media

sederhana. *Escherichia coli* dapat melakukan fermentasi laktosa dan fermentasi glukosa, serta menghasilkan gas (Gupte, 1990).

Escherichia coli tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium mikrobiologi, pada media yang dipergunakan untuk isolasi kuman enterik, sebagian besar strain *Escherichia coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *Escherichia coli* bersifat mikroaerofilik. Beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta (Karsinah, 1994).

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

Escherichia coli merupakan flora normal di dalam usus manusia dan akan menimbulkan penyakit bila masuk ke dalam organ atau jaringan lain. *Escherichia coli* dapat menimbulkan pneumonia, endocarditis, infeksi pada luka-luka dan abses pada berbagai organ (Entjang, 2003).

b) *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Divisio	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacterials
Famili	: Micrococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

Staphylococcus aureus adalah sel berbentuk bulat dengan diameter antara 0,8-1,0 μm tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur, tidak bergerak, tidak membentuk spora, dan merupakan bakteri Gram positif. *Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37⁰C, tapi paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar (20⁰C). Koloni pada pembenihan padat membentuk bulat halus menonjol berkilau-kilau, membentuk berbagai pigmen *Staphylococcus aureus* berwarna kuning emas (Jawetz, *et al.*, 1991).

Staphylococcus aureus bersifat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menimbulkan gas. Bakteri tersebut dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan karena kemampuannya menghasilkan banyak zat ekstraselular (Karsinah, 1994). Zat ekstraselular tersebut adalah :

a). Eksotoksin

Suatu campuran termolabil yang dapat disaring dan dimatikan bagi binatang pada penyuntikan, menyebabkan nekrosis pada kulit dan mengandung beberapa hemolisin yang dapat larut dan dipisahkan dengan elektroforesis (Jawetz, *et al.*, 1982).

b). Leukosidin

Suatu zat yang dapat larut dan mematikan sel darah putih dari berbagai spesies binatang yang kontak dengannya (Jawetz, *et al.*, 1982).

c) Enterotoksin

Suatu zat yang dapat larut yang dihasilkan oleh strain tertentu, merupakan penyebab penting keracunan makanan (Jawetz, *et al.*, 1982).

d) Koagulase

Staphylococcus aureus mampu menghasilkan koagulase, yaitu suatu enzim yang dapat menggumpalkan plasma atau serat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat pada serum. Faktor koagulase reaktif serum beraksi dengan koagulase untuk menghasilkan *entorase* dan aktivitas pembekuan dengan cara yang sama seperti pengaktifan protrombin menjadi trombin. Koagulase dapat mengendapkan fibrin pada permukaan *Staphylococcus aureus* (Jawetz, *et al.*, 1982).

e) Enzim lain

Zat lain yang dihasilkan adalah hialuronidase adalah faktor penyebar *staphylokinase* yang mengakibatkan fibrinolisis tetapi bekerja lebih lambat daripada streptokinase, lipase dan betalaktamase, toksin eksfoliatif yang menyebabkan sindroma lepuh kulit. Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ini terutama menimbulkan penyakit pada manusia. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. Infeksinya dapat berupa furunkel yang ringan pada kulit sampai berupa suatu piemia yang fatal. Kecuali impetigo, umumnya kuman ini menimbulkan penyakit yang bersifat sporadik bukan epidemik (Jawetz, *et al.*, 1982).

3. Metode Penyarian

Ekstraksi atau 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 jika permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Metode dasar penyarian adalah maserasi, perkolasi, dan soxhletasi. Pemilihan terhadap ketiga metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

a. Maserasi

Maserasi merupakan proses penyarian yang sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus. Simplisia ini direndam dalam penyari sampai meresap dan melemahkan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut, 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 (Ansel, 1989).

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 suatu kantong ekstralasi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu. Wadah gelas yang di dalamnya terdapat kantong yang berisi simplisia tadi diletakkan di antara labu suling dan suatu pendingin alir balik dengan dihubungkan melalui pipet. Labu tersebut berisi bahan pelarut yang menguap dan jika diberi pemanasan, pelarut tersebut 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 wadah gelas dan ke dalam labu, dengan demikian zat yang tersari terkumpul ke dalam labu tersebut (Voight, 1995).

4. Penyari

Cairan penyari yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989). Cara penyarian harus dapat mencapai seluruh serbuk dan secara terus-menerus mendesak larutan yang memiliki konsentrasi lebih tinggi untuk keluar. Cairan penyari yang baik harus memiliki kriteria murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah terbakar, selektif hanya

mampu menarik zat berkhasiat yang dikendaki dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Anonim, 1986).

5. 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. Berdasarkan sifat toksisitas selektif. Ada bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (bakterisida). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisid bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy dan Gan, 1995).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

- 1) Merusak dinding sel yaitu dengan menghambat pembentukan dan mengubahnya setelah selesai terbentuk.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) Menghambat kerja enzim dengan mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dengan mengakibatkan terganggunya metabolisme sel.
- 5) 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 (Pelczar dan Chan, 1988).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengamatan potensi antibakteri dari suatu zat dapat dilakukan dengan metode, yaitu:

a. Metode dilusi

Pada metode dilusi ini ada 2 macam, yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Pada prinsipnya metode ini dilakukan dengan mengencerkan zat yang akan diuji menjadi beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi ditambah suspensi kuman dalam media, sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi zat uji dicampur dengan media agar, lalu ditanami kuman. Hasil yang didapat dari metode ini adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Anonim, 2000).

b. Metode difusi

Cakram kertas saring, cawan yang berliang renik atau silinder tidak beralat, yang mengandung zat uji dalam jumlah tertentu ditempatkan dalam pembenihan padat yang telah ditanami dengan biakan tebal organisme yang diperiksa. Setelah pengeraman, hasil yang diperoleh adalah :

- a) *Radical zone*, yaitu daerah di sekitar zat uji dimana sama sekali tidak diketemukan adanya pertumbuhan bakteri.
- b) *Irradical zone*, yaitu suatu daerah di sekitar zat uji yang pertumbuhan bakteri dihambat oleh zat uji tersebut (Jawetz *et al.*, 2001).

7. Media

Pembiakan adalah proses memperbanyak mikroorganisme pada suatu media, yaitu suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrien/zat makanan yang dipakai untuk menambahkan mikroorganisme. Sebelum mikroorganisme ditambahkan pertama harus dipahami kebutuhan dasarnya, kemudian dicari suatu media yang memberikan hasil yang terbaik. Susunan dan kadar nutrien dalam suatu media 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).

Kultur adalah pertumbuhan dari mikroorganisme. Mikroorganisme akan tumbuh dalam media yang terdiri dari zat-zat yang merangsang pertumbuhan mikroorganisme yang diduga sebagai penyebab atau menghambat

mikroorganisme yang tidak diinginkan yang mungkin akan mengkontaminasi spesimen (Gibson, 1996).

Untuk menghambat media suatu mikroba, titik tolaknya harus dari medium dasar mineral yaitu suatu medium yang mengandung unsur-unsur yang dapat diberikan dalam bentuk senyawa anorganik. Medium dasar ini selanjutnya dapat ditambah dengan senyawa-senyawa lain jika diperlukan misalnya sumber karbon, sumber energi, sumber nitrogen, faktor pertumbuhan dan faktor lingkungan yang lain (misal pH) (Anonim, 1991).

Media dapat berbentuk padat atau cair. Penambahan 1% agar-agar akan menyebabkan cairan berbentuk seperti jel yang mempunyai permukaan yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Media agar biasanya ditempatkan didalam cawan petri. Bahan yang berisi mikroorganisme yang diduga digoreskan di atas permukaan media dan kemudian cawan diinkubasikan pada temperatur yang sesuai (Gibson, 1996).

Medium dengan susunan tertentu yang dihadapkan pada faktor lingkungan tertentu (pH, temperatur, cahaya) dan penggunaan inokulum tepat menjadi dasar dari kultur diperkaya untuk mikroba tertentu. Meskipun persyaratan nutrien mikroba amat beraneka ragam, namun sebagai makhluk hidup mikroba mempunyai kebutuhan dasar yang sama, yaitu meliputi air, karbon, energi, mineral dan faktor pertumbuhan (Anonim, 1991).

Supaya mikroba dapat tumbuh dengan baik dalam suatu media perlu dipenuhi syarat sebagai berikut:

- 1) Media harus megandung semua nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroba.
- 2) Media harus mempunyai tegangan osmose permukaan dan pH yang sesuai.
- 3) Media tidak mengandung zat-zat penghambat.
- 4) Media harus steril.

(Anonim,1991).

8. Pewarnaan Bakteri

Untuk mempelajari morfologi, struktur, sifat-sifat bakteri untuk membantu identifikasinya bakteri perlu diwarnai.

Jenis- jenis pewarnaan kuman yang dikenal adalah :

1) Pewarnaan negatif (*back grown staining*)

Suspensi kuman dibuat dalam zat warna negrosin atau tinta bak dan disebar-ratakan dengan gelas alas lain (sediaan hapus). Disini kuman tidak diwarnai dan tampak sebagai benda-benda terang dengan latar belakang hitam. Pewarnaan ini dipakai untuk kuman yang sukar diwarnai, misalkan *Spirochaeta* (Treponema, Leptospira dan Borrelia).

2) Pewarnaan sederhana

Pewarnaan ini hanya menggunakan satu macam zat warna. Misalkan biru metilen, air fukhsin atau ungu kristal selama 1-2 menit. Zat warna aniline mudah diserap oleh kuman.

3) Pewarnaan differensial

Pewarnaan diferensial menggunakan lebih dari satu macam zat warna, terdiri atas :

- a. Pewarnaan Gram yang ditemukan oleh Christian Gram pada tahun 1884 untuk membedakan kuman-kuman yang bersifat Gram positif dan Gram negatif.
 - b. Pewarnaan tahan asam (*acid-fast staining*), misalnya pewarnaan Ziehl Neelsen dan Kinyoun-Gabbet untuk membedakan kuman-kuman yang tahan asam dari yang tidak tahan asam.
- 4) Pewarnaan khusus

Pewarnaan ini dipakai untuk mewarnai bagian-bagian sel kuman atau kuman tertentu yang sulit diwarnai dengan pewarnaan biasa, misalnya pewarnaan Gray untuk mewarnai flagel, pewarnaan Klein untuk mewarnai spora dan pewarnaan Becker-Krantz untuk mewarnai Spirochaeta (Assani, 1994).

9. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan senyawa menggunakan fase diam berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada lempeng kaca, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa bercak atau pita dan pemisahan terjadi selama perambatan (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi. Untuk campuran yang tidak diketahui lapisan pemisah dan sistem larutan pengembang harus dipilih dengan tepat karena keduanya bekerjasama untuk mencapai pemisahan (Stahl, 1985).

Adapun kerugian KLT yaitu kurang tepat, kurang teliti, dan sukar dalam penyimpanan. Metode KLT ini sangat cocok untuk analisis di laboratorium

farmasi karena hanya memerlukan investasi kecil untuk perlengkapan, menggunakan waktu singkat untuk menyelesaikan analisis (15-60 menit) dan memerlukan jumlah cuplikan yang sangat sedikit (kira-kira 0,1 g) (Stahl, 1985).

Hasil KLT ditentukan oleh fase diam (penyerap), fase gerak (pelarut), dan teknik kerja. Teknik kerja meliputi atmosfer bejana, jenis pengembangan dan kondisi awal keberhasilan metode ini ditentukan oleh fase diam, fase gerak, bejana pemisah, cuplikan, cara dan jumlah penotolan, pembuatan cuplikan, dan deteksi senyawa yang dipisahkan (Harborne, 1987).

Fase diam berupa serbuk halus, dalam KLT bahan penyerap yang umum adalah silika gel, alumunium oksida, selulosa dan turunannya serta poliamida. Silika gel paling banyak digunakan dan dipakai untuk campuran senyawa lipofil maupun senyawa hidrofil (Stahl, 1985).

Pemilihan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung pada pelarut 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:

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi}}{\text{jarak pengembangan}} = \frac{dR}{100} = \frac{hR_f}{100}$$

(Mulya dan Suharman, 1995)

10. Bioautografi

Bioautografi adalah suatu metode untuk melokalisir aktivitas antibakteri pada kromatogram. Metode ini didasarkan pada efek biologis dari senyawa antibakteri (Betina, 1972). Bioautografi merupakan 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).

Dalam prakteknya, kromatogram diletakkan pada permukaan media agar di dalam petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang sensitif untuk antibiotik yang akan dipelajari. Setelah diinkubasi selama 15-20 jam pada temperatur kira-kira 37⁰C akan tampak zona yang jernih pada lapisan media agar yang antibiotiknya berdifusi ke lapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan lapisan media agar yang ditumbuhi mikroorganisme akan tampak buram (Zweigh dan Whitaker, 1971).

Beberapa prosedur yang dikemukakan diatas dan banyak lagi prosedur yang lain, hampir semuanya didasarkan pada teknik difusi-agar, yaitu dengan memindahkan senyawa antibakteri dari lapisan kromatografi ke lempeng agar perbenihan melalui proses difusi. Prosedur ini memiliki beberapa kekurangan, terutama yang disebabkan oleh perbedaan difusi senyawa dari kromatogram

ke lempeng agar perbenihan, sehingga diupayakan suatu penyederhanaan prosedur melalui pendeteksian secara langsung pada lapisan kromatografik. Tujuan utamanya adalah menghilangkan langkah difusi (Hamburger dan Cordell, 1987).

Prinsip pengujian sebagai berikut : suspensi mikroorganisme dalam kaldu yang sesuai didispersikan pada lempeng hasil KLT. Lempeng KLT diinkubasikan pada kelembaban udara yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri. Zone inhibisi kemudian ditampakkan oleh aktivitas dehidrogenase dari pereaksi pendeteksian seperti garam tetrazolium. Bakteri yang aktif bermetabolisme merubah garam tetrazolium menjadi formazan berwarna. Sedangkan senyawa antibakteri tampak sebagai bercak yang jernih terhadap latar belakang berwarna (Hamburger dan Cordell, 1987).

E. Landasan Teori

Tanaman ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) telah diteliti Jagessar dkk (2008) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode *stokes disc diffusion*, *well diffusion*, *streak plate*, dan dilusi cair. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak heksana, kloroform, etil asetat, dan etanol. Berdasarkan penelitian tersebut aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat mempunyai zona hambatan terhadap pertumbuhan bakteri yaitu 20 mm² terhadap *E. coli*, 15 mm² terhadap *S. aureus* dan 18 mm² terhadap *C. albicans* dengan metode difusi (Jagessar *et al.*, 2008). Selanjutnya ekstrak atil asetat diuji dengan dilusi padat untuk mencari KBM. Etil

asetat dapat menyari senyawa-senyawa yang dapat memberikan aktivitas antibakteri di antaranya flavonoid polihidroksi dan fenol yang lain (Anonim, 2005).

F. Hipotesis

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