

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

SKRIPSI



Oleh :

**AGITYA RESTI ERWIYANI
K 100 050 089**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan penyebab utama penyakit di dunia terutama di daerah tropis, seperti Indonesia karena keadaan yang berdebu dan temperatur yang hangat dan lembab sehingga mendukung mikroba untuk tumbuh subur (Gibson, 1996).

Ditemukannya jenis-jenis kuman baru, sifat yang baru dari kuman dan jenis infeksi merupakan bukti bahwa kuman mampu mengadaptasikan diri terhadap lingkungannya (Sujudi, 1994). Resistensi bakteri terhadap obat-obatan merupakan salah satu proses alamiah yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru (Pelczar dan Chan, 1988).

Penyakit infeksi pada manusia dan hewan dapat menurunkan kesehatan tubuh sehingga mengakibatkan penurunan produktivitas dan reproduktivitas bahkan kematian (Anonim, 2002). Telah banyak dilakukan penelitian yang menguji aktivitas tanaman obat sebagai antibakteri penyebab infeksi. Namun perlu penelitian lain untuk menemukan antibakteri baru yang dapat membunuh bakteri lebih efektif.

Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan penyakit di antaranya adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli* adalah bagian flora normal gastrointestinal manusia (Jawetz *et al.*, 2005). *Escherichia coli*

menyebabkan penyakit diare, terutama pada anak-anak di negara berkembang. Selain itu juga dapat menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi baru lahir serta infeksi luka dalam (Josodiwondo dkk., 1994). Penyakit lain yang ditimbulkan adalah sepsis yang terjadi setelah infeksi sistem saluran kencing (Jawetz *et al.*, 2005).

Infeksi *Staphylococcus 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).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah tanaman ceremai (*Phyllanthus acidus* (L) Skeels). Tanaman ceremai diketahui mengandung beberapa senyawa aktif, salah satunya mengandung polifenol yang aktivitasnya diduga sebagai antibakteri (Hutapea, 1991). Fenol dan derivatnya dapat berfungsi sebagai antibakteri karena mendenaturasi protein dan merusak membran sel (Jawetz *et al.*, 1996).

Pada penelitian sebelumnya ekstrak metanol buah ceremai mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode *disc diffusion* dengan zona hambatan 11 mm² untuk *Escherichia coli* dan zona hambatan *Staphylococcus aureus* sebesar 20 mm² (Melendez *et al.*, 2006). Hal ini mendasari dilakukan pengujian dengan menggunakan pelarut etanol dengan metode dilusi padat untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM), serta kandungan kimia ekstrak etanol buah ceremai yang berpotensi sebagai antibakteri dengan metode bioautografi.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak etanol buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?
2. Kandungan kimia apakah yang terdapat dalam ekstrak etanol buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang mempunyai aktivitas antibakteri?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
2. Untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) yang mempunyai aktivitas antibakteri.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Ceremai

- a. Klasifikasi tanaman ceremai

Sistematika tanaman ceremai diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi : Spermatophyta

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

b. Nama daerah

Nama daerah tanaman ceremai sebagai berikut :

Sumatera	: ceremai (Aceh), cerme (Gayo), cerme (Batak), camin-camin (Minangkabau)
Jawa	: cerme (Sunda), cerme (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

Ceremai merupakan pohon yang mempunyai tinggi ± 10 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, buah, kulit, batang, dan kayu *Phyllanthus acidus* mengandung polifenol, saponin, flavonoid, dan tanin, di samping itu kayunya juga mengandung alkaloid (Hutapea, 1991).

e. Khasiat ceremai

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

2. Metode Penyarian

Penyarian atau ekstraksi merupakan perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari (Anonim, 1986). Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan (Ansel, 1989).

Penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk dan perbedaan konsentrasi yang terdapat mulai dari pusat butir serbuk simplisia sampai ke permukaannya, maupun pada perbedaan konsentrasi yang terdapat lapisan batas, sehingga suatu titik akan dicapai oleh zat-zat yang tersari jika ada daya dorong yang cukup untuk melanjutkan perpindahan massa. Makin besar perbedaan konsentrasi, makin besar daya dorong tersebut hingga makin cepat penyarian (Anonim, 1986).

Faktor utama dalam memilih cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanan (Anonim, 2000). Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain yang cocok (Anonim, 1986).

Metode penyarian yang sering digunakan adalah :

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar (Anonim, 2000). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari, dimana cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan didesak keluar. Keuntungan cara penyarian ini adalah cara pengerjaannya dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (Anonim, 1986)

2. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi (Anonim, 1986). Tahap-tahap perkolasi adalah persiapan bahan mentah obat yang kering yaitu pembuatan serbuk dan pelembaban, pengisian perkolator, waktu maserasi, perkolasi dan pengumpulan perkolat, serta pengaturan kekentalan dari perkolat sesuai dengan yang diperlukan. Perkolasi memerlukan ketrampilan operator yang lebih banyak, biaya lebih mahal daripada maserasi, karena memerlukan peralatan yang khusus dan waktu yang lebih banyak diperlukan oleh operator (Ansel, 1989).

3. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Refluks dilakukan dengan cara panas. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Anonim, 2000).

4. Soxhletasi

Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Anonim, 2000).

3. Bakteri

Bakteri termasuk dalam golongan prokariota, dapat bereproduksi secara aseksual, yaitu melalui pembelahan, pembentukan tunas dan pembentukan lamena serta secara seksual (Assani, 1994). Bakteri mempunyai diameter 0,2 - 5 μm , asam nukleat berupa DNA dan RNA dan ribosom 70S, bereplikasi secara pembelahan biner dan hidup pada sel tuan rumah untuk pertumbuhannya (Levinson, 2004). Bakteri tidak mempunyai mitokondria atau kloroplast; sehingga enzim-enzim untuk transport elektron tidak bekerja di membran sel; tetapi pada lamellae yang berada di bawah membran sel. Dinding sel terdiri dari lapisan peptidoglikan (Assani, 1994). Beberapa bakteri mempunyai keistimewaan permukaan di luar dinding sel yaitu mempunyai kapsul, flagella dan pili (Levinson, 2004).

Faktor-faktor yang harus dikontrol selama pertumbuhan bakteri meliputi nutrisi, pH, temperatur, aerasi, konsentrasi garam, dan kekuatan ionik medium (Jawetz *et al.*, 2005). Bakteri menyimpan makanan cadangannya dalam bentuk granula sitoplasma. Granula ini bekerja sebagai sumber karbon, tetapi bila sumber protein berkurang, karbon dalam granula ini dapat dikonversi menjadi sumber nitrogen (Assani, 1994)

Morfologi bakteri dibagi dalam tiga bentuk utama yaitu kokus, batang, dan spiral (Assani, 1994). Perbedaan bentuk dari bakteri yang membedakan kekerasan dinding sel (Levinson, 2004). Bakteri dibagi atas bakteri yang positif Gram dan negatif Gram tergantung pada responsnya bila diwarnai dengan pewarnaan kuman menurut Gram (Assani, 1994).

Siklus pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase :

1. Fase Lag

Fase lag ini mewakili periode waktu dimana sel kehilangan metabolisme dan enzim sebagai akibat kondisi tidak menguntungkan yang dipertahankan sebelumnya, beradaptasi terhadap lingkungan baru, dan berakumulasi hingga kondisi yang membolehkan pertumbuhan dilanjutkan kembali (Jawetz *et al.*, 2005). Hal ini dapat terjadi selama beberapa menit sampai beberapa jam (Levinson, 2004).

2. Fase Log

Fase dimana pembelahan sel terjadi dengan cepat (Levinson, 2004). Material sel baru disintesis dengan kecepatan konstan, tetapi material baru mengkatalitik dirinya sendiri dan peningkatan massa terjadi secara eksponensial. Hal ini

berlanjut sampai nutrisi habis atau akumulasi hasil metabolik toksik dan menghambat pertumbuhan (Jawetz *et al.*, 2005).

3. Fase eksponensial

Fase ini terjadi ketika bakteri kehabisan nutrisi dan terdapat akumulasi produk toksik yang menyebabkan pertumbuhan menjadi lambat sampai sejumlah sel baru yang diproduksi seimbang dengan jumlah sel yang mati (Levinson, 2004).

4. Fase penurunan / kematian

Setelah periode waktu pada fase stasioner yang bervariasi pada tiap organisme dan kondisi kultur, kecepatan kematian meningkat sampai mencapai tingkat yang tetap. Setelah mayoritas sel mati, kecepatan kematian menurun sampai drastis, sehingga hanya sejumlah kecil sel yang hidup (Jawetz *et al.*, 2005).

Patogenesis infeksi bakteri meliputi permulaan awal dari infeksi hingga mekanisme timbulnya tanda dan gejala penyakit. Ciri-ciri bakteri patogen yaitu mampu untuk menularkan, melekat pada sel inang, menginvasi sel inang dan jaringan, mampu untuk meracuni, dan mampu untuk menghindari dari sistem kekebalan inang (Jawetz *et al.*, 2005).

Bakteri menyesuaikan diri dengan lingkungan, termasuk manusia dan binatang, dimana bakteri secara normal bertempat tinggal dan hidup. Dalam bekerja, bakteri meningkatkan kemampuannya untuk bertahan dan meningkatkan kemungkinan penyebaran. Jalan masuk bakteri patogen ke dalam tubuh adalah melalui membran mukus yang bertemu dengan kulit, pernafasan, gastrointestinal, genital dan saluran urin (Jawetz *et al.*, 2005).

4. *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* :

Kingdom	: Procaryotae
Division	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Eubacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Salle, 1961)

Escherichia coli berbentuk batang pendek (kokobasil), Gram negatif, ukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm , sebagian besar gerak positif, dan beberapa strain mempunyai kapsul. *E. coli* tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium mikrobiologi. *E. coli* bersifat mikroaerofilik (Karsinah dkk., 1994). *E. coli* bersifat aerob dan juga fakultatif anaerob serta dapat memfermentasi laktosa (Levinson, 2004). Beberapa strain *E. coli* menghasilkan hemolisis agar darah (Jawetz *et al.*, 2005).

E. coli merupakan kuman oportunistis (Karsinah dkk., 1994). *E. coli* banyak ditemukan dalam usus besar manusia, menyebar ke vagina dan uretra (Levinson, 2004). *E. coli* dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare terutama pada bayi dan anak-anak serta infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus (Karsinah dkk., 1994). Strain *E. coli* yang menyebabkan diare mempunyai pili sebagai media untuk melekat pada epitel intestin (Jawetz *et al.*, 2005).

Bakteri ini umumnya tidak menyebabkan penyakit bila telah mencapai jaringan di luar traktus intestinal seperti saluran kencing, paru-paru, saluran empedu, peritoneum, dan saluran otak (Jawetz *et al.*, 2005). *E. coli* menginvasi sel mukosa, menimbulkan kerusakan dan terlepasnya lapisan mukosa. Ciri khas diare yang disebabkan *E. coli* adalah tinja mengandung darah, mucus dan pus. *E. coli* menghasilkan substansi bersifat sitotoksik terhadap sel Vero dan Hela (Josodiwondo dkk., 1994).

E. coli merupakan bagian terbesar dari flora normal usus. Beberapa strain menghasilkan enterotoksin, karena sifat gen yang dibawa dalam plasmid (Jawetz *et al.*, 2005). Penyakit karena *E. coli* kebanyakan diderita oleh pasien yang menjalani rawat inap rumah sakit, ditularkan lewat urin, atau infeksi peritoneal serta pada orang yang melakukan perjalanan jauh (Levinson, 2004).

5. *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *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, nonmotil, 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 mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies sama (Warsa, 1994).

Staphylococcus dapat menyebabkan penyakit berkat kemampuannya melakukan pembelahan dan menyebar luas ke dalam jaringan dan melalui produksi beberapa bahan ekstraseluler, seperti katalase, koagulase, enzim lain, eksotoksin, lekosidin, toksin eksfoliatif, toksin sindroma syok toksik, dan enterotoksin (Jawetz *et al.*, 2005).

Staphylococcus 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* mempunyai ciri peradangan setempat, nekrosis, dan pembentukan abses. Pada penyebaran ke bagian tubuh lain melewati pembuluh getah bening dan pembuluh darah (Warsa, 1994). *Staphylococcus* menyebabkan penyakit bisul, berbagai infeksi *pyogenik*, keracunan makanan, dan *toxic shock syndrome* (Levinson, 2004).

6. Pewarnaan Bakteri

Untuk mempelajari morfologi, struktur, sifat-sifat kuman untuk membantu identifikasinya kuman perlu diwarnai. Agar memperoleh hasil pewarnaan yang baik diperhatikan faktor-faktor berikut : gelas alas bersih dan bebas lemak, umur biakan, kualitas zat warna, dan tebal tipisnya sediaan (Assani, 1994).

Prosedur pewarnaan ini terdiri dari 4 tahap sebagai berikut :

- a. Mula-mula olesan bakteri diwarnai dengan gentian violet atau kristal violet.
- b. Setelah 60 detik, zat warna gentian violet atau kristal violet tadi dibilas, kemudian olesan dituangi dengan larutan yodium.
- c. Setelah 60 detik, yodium dibilas selanjutnya gelas preparat dicuci dengan alkohol 95% selama 15-30 detik.
- d. Gelas preparat kemudian diwarnai dengan safranin selanjutnya dibiarkan selama 20 detik.

(Anonim, 1991)

Beberapa marga (genus) bakteri melepaskan zat warna dengan mudah apabila dicuci. Sedangkan pada bakteri lain, zat warna tetap bertahan walaupun dicuci dengan alkohol 95%. Bakteri yang tidak menahan zat warna dan tetap bertahan walaupun dicuci dengan alkohol 95% disebut Gram negatif, sedangkan yang dapat menahan zat warna disebut Gram positif. Bakteri Gram negatif tidak berwarna setelah dicuci dengan alkohol sehingga orang selalu memberikan warna lain sebelum olesan diamati di bawah mikroskop (Anonim, 1991).

7. Antibakteri

Antibakteri adalah salah satu senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.*, 2005). Aktivitas antibakteri diantaranya dipengaruhi oleh faktor potensi dari obat antibakteri dan faktor yang menyangkut sifat dan bakteri itu sendiri khususnya susunan kimia dinding sel bakteri tersebut (Setiabudy dan Gan, 1995).

Hal yang paling penting mengenai konsep antimikrobia adalah *selective toxicity*, yaitu selektif dalam menghambat pertumbuhan organisme tanpa merusak inang. Toksisitas selektif dicapai dengan memanfaatkan perbedaan metabolisme dan struktur dari mikroorganisme dan bentuk sel manusia yang cocok (Levinson, 2004).

Berdasarkan toksisitas selektif ada antibakteri yang bersifat bakteriostatik dan bakterisid (Setiabudy dan Gan, 1995). Bakterisid bersifat membunuh bakteri,

sedangkan bakteriostatik bersifat menghambat tetapi tidak membunuh bakteri (Levinson, 2004).

Mekanisme antimikroba tidak sepenuhnya dimengerti, namun mekanisme aksinya dapat dikelompokkan dalam 4 kelompok utama :

- a. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel
- b. Penghambatan terhadap fungsi membran sel
- c. Penghambatan terhadap sintesis protein (misalnya penghambatan translasi dan transkripsi material genetik)
- d. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat (Jawetz *et al.*, 2005)

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisid bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy dan Gan, 1995).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu :

- a. Metode Dilusi

Metode ini menggunakan antibakteri dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau agar. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Antibakteri dilarutkan dengan kadar yang dapat menghambat atau mematikan bakteri pada tahap akhir. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Uji kepekaan cara

dilusi cair menggunakan tabung reaksi ataupun *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antibakteri yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.*, 2005).

b. Metode Difusi

Pada metode difusi ini ada beberapa cara yang dapat digunakan, yaitu:

1. Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 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 kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Kertas samir (disk) yang mengandung antibakteri diletakkan di atasnya, diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam (Anonim, 1993).

Hasilnya dibaca :

- a. Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana sama sekali tidak terjadi pertumbuhan bakteri. Potensial antibakteri diukur dengan menggunakan diameter dari zona radikal.
- b. Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh bakteri, tetapi tidak dimatikan (Anonim, 1993).

2. Cara Sumuran

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 5-8 jam 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 kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran diteteskan larutan antibakteri, diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer (Anonim, 1993).

3. Cara *Pour Plate*

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam 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 suhu 50°C. Setelah suspensi kuman tersebut homogen, dituang pada media agar Mueller Hinton, ditunggu sampai agar tersebut membeku dan disk diletakkan di atas media dan dieramkan selama 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasil dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri (Anonim, 1993).

9. Media

Medium pertumbuhan yang baik harus mengandung seluruh nutrien yang dibutuhkan oleh organisme untuk perkembangannya, dan sejumlah faktor seperti

pH, temperatur, dan aerasi harus benar-benar dikontrol (Jawetz *et al.*, 2005). Nutrien yang diperlukan adalah hidrogen, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, faktor pertumbuhan seperti asam amino, purin, pirimidin, dan vitamin (Jawetz *et al.*, 2005).

Medium cair digunakan untuk membiarkan adanya persaingan dan seleksi optimal. Keuntungan dapat diperoleh dari *enrichment* alam, yaitu prosedur dimana medium disiapkan untuk menerima lingkungan alami mikroorganisme yang diinginkan, oleh karena itu mikroorganisme diseleksi (Jawetz *et al.*, 2005).

Medium diferensial digunakan untuk mencari tipe tertentu suatu organisme pada bahan alami. Medium diferensial adalah medium yang akan menyebabkan koloni organisme tipe tertentu memiliki tampilan berbeda. Sebagai contoh, koloni *E. coli* memiliki karakteristik warna yang berubah-ubah pada agar yang mengandung cat eosin dan metilen biru (EMB agar) (Jawetz *et al.*, 2005).

Syarat-syarat yang dipenuhi dalam pembuatan media adalah :

a. Susunan makanan

Media yang digunakan untuk pertumbuhan harus mengandung air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin, dan gas (Jawetz *et al.*, 2001).

b. Tekanan osmose

Sifat-sifat bakteri juga seperti sifat-sifat sel yang lain terhadap tekanan osmose. Maka bakteri untuk pertumbuhannya membutuhkan media yang isotonis (Jawetz *et al.*, 2001).

c. Derajat keasaman

Pada umumnya bakteri membutuhkan pH sekitar netral (Jawetz *et al.*, 2005).

d. Temperatur

Umumnya bakteri yang patogen membutuhkan temperatur sekitar 37°C sesuai dengan suhu tubuh (Jawetz *et al.*, 2001).

e. Sterilisasi

Sterilisasi media merupakan syarat yang sangat penting. Untuk mendapatkan suatu media yang steril maka setiap tindakan serta alat-alat yang digunakan harus disterilkan dahulu dan dalam pengerjaannya haruslah aseptik (Jawetz *et al.*, 2001).

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 larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (dideteksi) (Stahl, 1985). KLT dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam dan senyawa-senyawa organik sintetik (Adnan, 1997).

Fase diam yang umum digunakan dan banyak dipakai adalah *silica gel* yang dicampur dengan CaSO_4 untuk menambah daya lengket partikel *silica gel* pada pendukung (padat). Adsorban lain yang banyak dipakai adalah alumina,

kieselguhr, celite, serbuk selulosa, serbuk poliamide, kanji, dan sephadex (Mulja dan Suharman, 1995).

Fase gerak adalah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori, karena ada gaya kapiler yang digunakan hanyalah pelarut yang memiliki mutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multi komponen ini harus berupa suatu campuran sederhana yang terdiri atas maksimum tiga komponen (Stahl, 1985).

Pencarian jejak bercak dalam uji kualitatif yang dinamakan visualisasi untuk senyawa tak berwarna dapat digunakan :

- a. Sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm, cara ini khusus digunakan untuk senyawa yang berpendar atau lempeng yang telah diberi senyawa yang dapat berpendar sehingga senyawa yang diuji bila ada akan menutup pendaran, maka bercak menjadi gelap.
- b. Pereaksi kimia. Sebenarnya terdapat 207 jenis pereaksi kimia seperti yang telah dikatakan oleh Touchstone dan Dobbins (1985) yang dapat menghasilkan senyawa berwarna atau berfluoresensi (Sumarno, 2001).

Pada kromatografi lapis tipis dikenal istilah atau pengertian faktor retardasi (Rf) untuk tiap-tiap noda kromatogram didefinisikan sebagai :

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase mobil}} = \frac{d_M}{d_R} = \frac{hR_f}{100}$$

(Mulja dan Suharman, 1995)

11. Bioautografi

Bioautografi merupakan metode yang spesifik yang digunakan untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antiviral. Bioautografi dapat mendeteksi bercak atau komponen zat aktif sebagai antibakteri dan menentukan komponen zat aktif sebagai antibakteri (Djide, 2003).

Metode bioautografi merupakan metode alternatif untuk deteksi zat aktif karena cara kerja yang relatif mudah dan murah, dapat digunakan untuk mengetahui jumlah senyawa sekaligus dapat mengetahui aktivitas biologisnya, terutama aktivitas antibakteri, dan metode ini dapat digunakan untuk analisis antibiotik (Astuti, 2007).

Satu bagian *plate* KLT dipotong untuk pemantauan bercak sedang yang lain untuk bioautografi. *Plate* KLT yang telah dikembangkan dan sudah kering ditempelkan pada media padat yang berisi suspensi bakteri, dibiarkan pada suhu kamar selama 20-30 menit supaya bercak pada *plate* dapat berdifusi ke agar. Cawan petri diberi tanda batas awal dan batas akhir pengembangan (untuk menghitung Rf dari sampel/fraksi aktif). *Plate* diangkat dari media, lalu diinkubasi pada suhu 37°C, selama 18 jam atau lebih (Kurniati dkk., 2003).

E. Landasan Teori

Buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) telah diteliti Melendez dkk (2006) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan

metode *disc diffusion* dan pelarut metanol. Aktivitas antibakteri ekstrak metanol buah ceremai mempunyai zona hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* sebesar 11 mm² dan *Staphylococcus aureus* sebesar 20 mm² (Melendez *et al.*, 2006). Pada penelitian ini digunakan pelarut berbeda yaitu etanol yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri karena merupakan senyawa polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat non polar sampai polar. Metode yang digunakan adalah dilusi padat untuk mencari KBM kemudian dilanjutkan bioautografi untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

F. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah ekstrak etanol buah ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.