

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

**SKRIPSI**



Oleh :

**NOVI DIANASARI  
K 100050008**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2009**

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Infeksi merupakan penyebab utama penyakit di dunia terutama di daerah tropis seperti Indonesia karena keadaan udara yang berdebu, temperatur yang hangat, dan lembab sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Keadaan tersebut ditunjang dengan kemudahan transportasi dan keadaan sanitasi yang buruk lebih memudahkan penyakit infeksi semakin berkembang (Wattimena dkk., 1991).

Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri. Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *S. aureus* merupakan penyebab infeksi pada manusia yang paling sering. *S. aureus* dapat menyebabkan sepsis pada luka bedah, abses payudara pada ibu-ibu, mata lengket, dan lesi kulit pada bayi (Gibson, 1996).

Selain itu, penyakit infeksi yang banyak dihadapi adalah diare. Dehidrasi akibat diare merupakan salah satu penyebab kematian. Bakteri penyebab diare meliputi *Shigella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, dan *Campylobacter* (Tjay dan Rahardja, 2007). Penyakit yang disebabkan oleh *S. dysenteriae* adalah disentri basiler, yaitu suatu infeksi peradangan akut saluran pencernaan, dengan kondisi klinis meliputi diare, buang air besar berair yang disertai darah, lendir, dan nanah (Pelczar dan Chan, 1988).

Dalam rangka penanggulangan infeksi oleh mikroorganisme tersebut diperlukan obat-obat yang mempunyai daya kerja optimal dan efek samping kecil.

Dewasa ini, penggunaan antibiotik sangat banyak terutama dalam pengobatan yang berhubungan dengan infeksi. Kenyataan menunjukkan bahwa masalah penyakit infeksi terus berlanjut. Hal tersebut terjadi akibat resistensi bakteri terhadap antibiotik. Untuk itu perlu kiranya usaha pengembangan obat tradisional untuk menunjang peningkatan taraf kesehatan masyarakat.

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman secang (*C. sappan* L.). Secang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan diare, disentri, batuk darah pada TBC, muntah darah, sifilis, malaria, tetanus, pembengkakan (tumor), dan nyeri karena gangguan sirkulasi darah (Wijayakusuma dkk., 1992). Penduduk yang kurang mengetahui nilai khasiat obat dari tanaman ini hanya mengabaikannya saja, ternyata tanaman secang mempunyai kandungan kimia antara lain brazilin, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenil propana, steroid, dan terpenoid (Sudarsono dkk., 2002).

Penelitian Anis (1990) menunjukkan bahwa fraksi etanol kayu secang menunjukkan daya antibakteri lebih baik dibandingkan fraksi air kayu secang terhadap *Proteus vulgaris*, *Coliform*, dan *Diphtheroid*, sedangkan fraksi eter minyak tanah dan fraksi kloroform tidak memiliki daya antibakteri. Penelitian Kuswandi dkk. (2002) menunjukkan bahwa fraksi metanol kayu secang (*C. sappan* L.) dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan nilai KBM sebesar 1%. Hasil kromatografi lapis tipisnya menunjukkan adanya senyawa terpenoid, flavonoid, dan antrakinin.

Dari penelitian di atas, diketahui bahwa fraksi etanol dan fraksi metanol kayu secang (*C. sappan* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa

bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Maka dalam penelitian ini penyari yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol efektif menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dan dapat memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut (Voight, 1995). Etanol sebagai penyari yang bersifat universal, diharapkan dapat menyari senyawa polar maupun non polar dari kayu secang yang memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa yang tersari dalam fraksi etanol dan fraksi metanol kayu secang yang memiliki aktivitas antibakteri, dipastikan juga tersari dalam ekstrak etanol. Dengan mempertimbangkan beberapa hal tersebut, maka dapat diduga bahwa ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*. Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi karena cara pengerjaannya mudah, alat yang digunakan sederhana, dan cocok untuk bahan yang tidak tahan pemanasan (Anonim, 1986).

Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) terhadap *S. aureus* mewakili bakteri Gram positif dan *S. dysenteriae* yang mewakili bakteri Gram negatif. Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah dilusi padat karena memiliki keunggulan yaitu homogenitas antara media, bahan uji, dan media lebih baik, tidak dipengaruhi tebal tipis media, selain itu lebih praktis dan mudah, 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. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan menganalisis secara bioautografi pada lempeng KLT.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan di atas, maka peneliti merumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysentriae*, serta berapa Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya?
2. Senyawa kimia apakah yang terdapat dalam ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysentriae*?

## **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) terhadap *S. aureus* dan *S. dysentriae*, serta mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya.
2. Mengetahui senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysentriae* dengan metode bioautografi.

## **D. Tinjauan Pustaka**

### **1. Tanaman Secang (*Caesalpinia sappan* L.)**

#### a. Klasifikasi tanaman

Divisi : Magnoliophyta

Subdivisi : Angiospermae  
Kelas : Magnoliopsida  
Bangsa : Rosales  
Suku : Caesalpiniaceae  
Marga : Caesalpinia  
Jenis : *Caesalpinia sappan* L. (Iriawati, 2008).

b. Nama daerah

Tanaman secang tersebar di Indonesia, nama lainnya yaitu: cang (Bali), sepang (Sasak), kayu sena (Manado), naga, sapang (Makasar), kayu secang, soga jawa (Jawa), kayu secang (Madura), secang (Sunda), seupeung, sopang, cacang (Sumatra), sepang (Bugis), sawala, hinianga, sinyhiaga, singiang (Halmahera Utara), sepen (Halmahera Selatan), lacang (Minangkabau), sepel (Timor), hape (Sawu), hong (Alor) (Hariana, 2006).

c. Uraian tanaman

Tanaman secang banyak tumbuh di tempat terbuka sampai ketinggian 1700 m dpl, seperti di daerah pegunungan yang berbatu tetapi tidak terlalu dingin. Secang tumbuh liar dan kadang ditanam sebagai tanaman pagar atau pembatas kebun (Tampubolon, 1981). Perdu atau pohon kecil, tinggi 5-10 m, batang dan percabangannya berduri tempel yang bentuknya bengkok dan letaknya tersebar, batang bulat, warnanya hijau kecoklatan. Daun majemuk menyirip ganda, panjang 25-40 cm, jumlah anak daun 10-20 pasang yang letaknya berhadapan. Anak daun bertangkai, bentuknya lonjong, pangkal romping, ujung bulat, tepi rata dan hampir sejajar, panjang 10-25 mm, lebar 3-11 mm, warnanya hijau. Bunganya

bunga majemuk berbentuk malai, keluar dari ujung tangkai dengan panjang 10-40 cm, mahkota bentuk tabung, warnanya kuning. Buahnya buah polong, panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm, ujung seperti paruh berisi 3-4 biji, bila masak warnanya hitam. Biji bulat memanjang, panjang 15-18 mm, lebar 8-11 mm, tebal 5-7 mm, warnanya kuning kecoklatan. Panen kayu dapat dilakukan mulai umur 1-2 tahun. Kayunya bila direbus memberi warna merah gading, dapat digunakan untuk pengecatan, memberi warna pada bahan anyaman, kue, minuman atau sebagai tinta. Perbanyakkan dengan biji atau stek batang (Utomo, 2008).

#### d. Kandungan kimia

Tanaman secang kaya akan kandungan kimia antara lain brazilin, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenil propana, dan terpenoid (Sudarsono dkk., 2002), selain itu juga mengandung asam galat, brasilein, *delta-a phellandrene*, *oscimene*, resin, dan resorsin (Hariana, 2006). Sementara daunnya mengandung minyak atsiri tidak kurang dari 0,20% yang beraroma enak dan tidak berwarna (Anonim, 2004).

#### e. Manfaat tanaman secang

Efek farmakologis tanaman secang antara lain penghenti pendarahan, pembersih darah, pengelat, penawar racun, dan obat antiseptik (Hariana, 2006). Kayu secang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan diare, disentri, batuk darah pada TBC, muntah darah, sifilis, malaria, tetanus, pembengkakan (tumor), dan nyeri karena gangguan sirkulasi darah (Wijayakusuma dkk., 1992). Berdasarkan penelitian sebelumnya, fraksi metanol kayu secang dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan nilai KBM sebesar 1%,

hasil kromatografi lapis tipisnya menunjukkan adanya senyawa terpenoid, flavonoid, dan antrakinon (Kuswandi dkk., 2002). Fraksi etanol kayu secang menunjukkan daya antibakteri lebih baik dibandingkan fraksi air kayu secang terhadap *Proteus vulgaris*, *Coliform*, dan *Diphtheroid*, sedangkan fraksi eter minyak tanah dan fraksi kloroform tidak memiliki daya antibakteri (Anis, 1990).

## **2. Metode Penyarian**

Penyarian adalah penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang telah dipilih sehingga zat yang diinginkan akan terlarut. Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, maserasi, perkolasi, dan penyarian berkesinambungan. Secara umum penyarian akan bertambah baik apabila permukaan simplisia yang bersentuhan semakin luas (Anonim, 1986).

Metode penyarian yang akan digunakan tergantung dari wujud dan kandungan bahan yang akan disari. Metode dasar penyarian adalah infundasi, maserasi, perkolasi dan sokletasi. Pemilihan metode penyarian disesuaikan dengan kepentingan untuk memperoleh kandungan kimia yang diinginkan (Harborne, 1996).

### **a. Maserasi**

Maserasi merupakan proses penyarian yang paling sederhana dan banyak digunakan. Teknik ini biasanya digunakan jika kandungan organik yang ada dalam bahan tumbuhan tersebut cukup tinggi dan telah diketahui jenis pelarut yang dapat melarutkan senyawa yang akan diisolasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam bahan-bahan tumbuhan yang telah dihaluskan dalam pelarut



terpilih. Disimpan dalam waktu tertentu dalam ruang yang gelap dan sesekali diaduk. Metode ini memiliki keuntungan yaitu cara pengerjaannya yang mudah, alat yang digunakan sederhana, cocok untuk bahan yang tidak tahan pemanasan namun pelarut yang digunakan cukup banyak (Anonim, 1986).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian serbuk simplisia dengan pelarut yang cocok dengan melewatkannya tetes demi tetes pada bahan yang diekstraksi. Alat untuk perkolasi dinamakan perkolator. Dengan cara penyarian ini mengalirnya penyari melalui kolom dari atas ke bawah menuju celah untuk keluar ditarik oleh gaya berat seberat cairan dalam kolom. Pelarut yang baru dan terus-menerus memungkinkan berlangsungnya satu maserasi bertingkat (Anonim, 1986).

c. Soxhletasi

Metode ini digunakan untuk mengekstraksi komponen kimia dari bahan tumbuhan dengan alat soxhlet. Soxhletasi merupakan prosedur yang biasa dilakukan untuk memperoleh komponen kimia dari simplisia kering (Harborne, 1996).

Bahan yang akan disari berada dalam sebuah kantong penyaring di dalam sebuah tabung. Tabung yang berisi kantong simplisia diletakkan diantara labu suling dan suatu pendingin balik yang dihubungkan melalui pipa pipet. Pelarut dalam labu diuapkan, uap akan naik melalui pipa samping mencapai pendingin balik, uap terkondensasi lalu turun ke tabung merendam dan

melarutkan zat aktif simplisia kemudian turun kembali ke labu. Proses ini berlangsung berulang-ulang sampai hampir zat tersari seluruhnya (Anonim, 1986)

Soxhletasi menguntungkan karena cairan penyari yang digunakan sedikit dan cocok untuk bahan yang tahan pemanasan. Cairan penyari yang digunakan murni sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak (Voight, 1995).

#### d. Infundasi

Infundasi atau infusa adalah proses penyarian yang digunakan untuk menyari zat aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Infundasi dilakukan dengan cara mencampur serbuk dengan air secukupnya dalam sebuah panci kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit yang dihitung mulai suhu di dalam panci mencapai 90°C sambil berkali-kali diaduk. Infusa diserkai sewaktu masih panas dengan menggunakan kain flanel. Penyarian cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur (Anonim, 1986).

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Anonim, 1979). Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang ada dalam simplisia terdapat dalam bentuk yang mempunyai kadar yang tinggi, dan hal ini memudahkan zat berkhasiat dapat diatur dosisnya (Anief, 2000).

### **3. Bakteri**

#### **a. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)**

Klasifikasi dari *S. aureus* adalah sebagai berikut:

Divisio : Protophyta  
Subdivisio : Schizomycetea  
Classis : Schizomycetes  
Ordo : Eubacteriales  
Familia : Micrococcaceae  
Genus : Staphylococcus  
Species : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

*Staphylococcus* berasal dari kata *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. *Staphylococcus* merupakan bakteri Gram positif, selnya berbentuk bulat dengan diameter 1  $\mu\text{m}$ . *Staphylococcus* bersifat patogen, tidak bergerak, dan memproduksi katalase (Jawetz *et al.*, 2005).

*Staphylococcus* tumbuh baik dalam perbenihan kaldu pada suhu 37°C. Batas suhu pertumbuhan *Staphylococcus* ialah 15°C dan 40°C, sedangkan suhu pertumbuhan optimumnya ialah 35°C. *Staphylococcus* bersifat anaerob fakultatif, dapat tumbuh dalam udara yang mengandung hidrogen, dan pH optimum untuk pertumbuhannya ialah 7,4 (Sujudi, 1994).

*S. aureus* merupakan bakteri patogen yang bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, dapat membentuk koagulase, mencairkan gelatin, serta mampu membentuk pigmen kuning emas. *S. aureus* dapat memfermentasi manitol dan dapat menghemolisis sel darah merah (Warsa, 1994).

*S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Antigen ini merupakan kompleks peptidoglikan asam teikhoat yang dapat menghambat fagositosis, dan bagian ini yang diserang bakteriofaga. *S. aureus*

bersifat lisogenik karena mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies yang sama (Warsa, 1994).

*S. aureus* dapat menyebabkan penyakit karena kemampuannya melakukan pembelahan dan menyebar luas ke dalam jaringan. *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi baik pada manusia maupun hewan. *S. aureus* ditemukan sebagai bakteri flora normal pada kulit dan selaput lendir manusia. Setiap jaringan tubuh yang terinfeksi oleh *S. aureus*, menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas yaitu peradangan dan pembentukan abses (Warsa, 1994).

Penyakit yang disebabkan oleh *S. aureus* antara lain pneumonia, meningitis, endokarditis, dan infeksi kulit. Beberapa antibiotik yang dapat digunakan untuk menghambat *S. aureus* antara lain ampisilin, penisilin, tetrasiklin, kloksasilin, sefalosporin, vankomisin, dan metisilin (Jawetz *et al.*, 2005).

**b. *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*)**

Klasifikasi dari *S. dysenteriae* adalah sebagai berikut:

Divisio : Monomychota

Subdivisio : Schizomycetea

Classis : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Familia : Enterobacteriaceae

Tribe : Escherichia

Genus : Shigella

Species : *Shigella dysenteriae* (Anonim, 1993).

*Shigella* merupakan bakteri Gram negatif, selnya berbentuk batang, dan tidak bergerak. Suhu pertumbuhan optimum 37°C dalam keadaan aerobik (Pelczar dan Chan, 1988). *Shigella species* merupakan kuman patogen usus yang telah lama dikenal sebagai agen penyebab penyakit disentri basiler. Berada dalam *tribe Escherichiae* karena sifat genetik yang saling berhubungan, tetapi dimasukkan dalam genus tersendiri yaitu genus *Shigella* karena gejala klinis yang disebabkan bersifat khas. Terdapat 4 spesies *Shigella* yaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, dan *Shigella sonnei* (Karsinah dkk., 1994).

Sifat koloni *S. dysenteriae* kecil dan halus. Semua spesies *Shigella* tidak memfermentasi laktosa, dengan pengecualian *S. sonnei*, yang memfermentasi laktosa secara lambat, pada media agar Mac Conkey koloni akan berubah menjadi berwarna merah muda sesudah lebih dari 18 jam (Gibson, 1996). *S. dysenteriae* membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang memproduksi gas (Jawetz *et al.*, 2005).

Daya invasi kuman menembus masuk ke dalam lapisan epitel permukaan mukosa usus di daerah ileum terminal dan kolon, pada lapisan epitel tersebut kuman memperbanyak diri. Sebagai reaksi tubuh terjadi reaksi peradangan diikuti dengan kematian sel dan mengelupasnya lapisan tersebut, terjadilah tukak (Karsinah dkk., 1994). Gejala klinik yang menyertainya adalah disentri basiler atau *Shigellosis* yaitu suatu infeksi peradangan akut saluran pencernaan, dengan

kondisi klinis meliputi diare, buang air besar berair yang disertai darah, lendir, dan nanah (Pelczar dan Chan, 1988). *S. dysenteriae* dapat menyebabkan 3 bentuk diare:

- 1). Disentri klasik dengan tinja yang konsisten lembek disertai darah, mucus, dan pus
- 2). *Watery diarrhea*
- 3). Kombinasi keduanya (Karsinah dkk., 1994).

Beberapa antibiotik dapat digunakan untuk pengobatan disentri basiler. Antibiotik ciprofloxacin, ampisilin, tetrasiklin, trimethoprim-sulfamethoxazole, dan kloramfenikol dapat menghambat isolat *Shigella* dan dapat menekan invasi disentri yang akut, serta memperpendek jangka waktu dan gejala penyakit disentri (Jawetz *et al.*, 2005).

#### **4. Antibakteri**

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.*, 2005). Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu:

- a. Germisid adalah bahan yang dipakai untuk membasmi mikroorganisme dengan mematikan sel-sel vegetatif, tetapi tidak selalu mematikan bentuk sporanya.
- b. Bakterisid adalah bahan yang dipakai untuk mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri.
- c. Bakteriostatik adalah suatu bahan yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri tanpa memamatkannya.

d. Antiseptik adalah suatu bahan yang menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas metabolisme, digunakan pada jaringan hidup.

e. Desinfektan adalah bahan yang dipakai untuk membasmi bakteri dan mikroorganisme patogen tapi belum tentu beserta spora, digunakan pada benda mati (Pelczar dan Chan, 1988).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai bakteristatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh bakteri, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswara dkk., 1995).

## **5. 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**

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/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 diletakkan kertas samir (*disk*) yang mengandung antibakteri di atasnya, diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca:

(a). Zona Radikal yaitu suatu daerah di sekitar *disk* di mana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.

(b). Zona Iradikal yaitu suatu daerah disekitar *disk* di mana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan.

## 2). Cara Sumuran

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada media agar 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/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 ditetaskan larutan antibakteri, diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer.

## 3). Cara *Pour Plate*

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada media agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah aquadest steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standart konsentrasi bakteri  $10^8$  CFU/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 sebentar sampai agar tersebut membeku, diletakkan disk diatas media dan dieramkan selama 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasilnya dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri.

b. Dilusi cair/ 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, kemudian 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 Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Anonim, 1993).

## **6. Media**

Media adalah kumpulan zat-zat anorganik maupun organik yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dengan cara tertentu dalam pemeriksaan laboratorium mikrobiologi. Penggunaan media ini sangat penting yaitu untuk isolasi, identifikasi maupun diferensiasi (Anonim, 1993).

Untuk berkembang biak, bakteri membutuhkan beberapa persyaratan. Jika hal ini tidak dilakukan, maka bakteri akan mati dan mengubah dirinya

menjadi spora (Gibson, 1996). Syarat-syarat media yang harus dipenuhi untuk mendapatkan suatu lingkungan yang cocok bagi pertumbuhan bakteri adalah:

- a. Susunan makanan. Dalam suatu media yang digunakan untuk pertumbuhan, haruslah ada air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin dan gas.
- b. Tekanan osmose. Dalam pertumbuhannya bakteri membutuhkan media yang isotonis, karena bila media tersebut hipotonis maka akan terjadi *plasmoptysis*, sedangkan bila media hipertonis maka akan terjadi *plasmolysis*.
- c. Derajat keasaman (pH). Pada umumnya bakteri membutuhkan pH sekitar netral, namun ada bakteri tertentu yang membutuhkan pH sangat alkalis, seperti vibrio, membutuhkan pH 8-10 untuk pertumbuhan yang optimal.
- d. Temperatur. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Umumnya untuk bakteri yang patogen membutuhkan temperatur sekitar 37°C sesuai dengan temperatur tubuh.
- 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).

## **7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisiko kimia, lapisan yang memisahkan terdiri dari bahan yang berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan sebagai bercak atau pita.

Setelah pelat diletakkan 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 atau dideteksi (Stahl, 1985).

Hasil KLT ditentukan oleh fase diam (penyerap), fase gerak (pelarut), dan teknik kerja. Teknik kerja meliputi atmosfer bejana dan jenis pengembangan. 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, 1996).

Fase diam yang digunakan dalam KLT adalah bahan penyerap. Besar kecil dan homogenitas penyerap sangat berpengaruh dalam proses pemisahan. Salah satu cara untuk menaikkan hasil pemisahan adalah menggunakan penyerap yang butirannya halus (Sastrohamidjoyo, 1991).

Fase gerak adalah medium angkut yang terdiri atas beberapa pelarut yang bermutu baik. Pelarut tunggal dapat menggerakkan bercak terlalu jauh, untuk mengatasi hal tersebut digunakan pelarut campuran (Stahl, 1985).

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf. Harga Rf dirumuskan sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak antara titik penotolan ke pusat bercak}}{\text{Jarak antara titik penotolan ke batas elusi}}$$

Angka Rf berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. Bilangan hRf adalah angka Rf dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100 (Stahl, 1985).

## **8. Bioautografi**

Bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi zat yang mempengaruhi kecepatan pertumbuhan organisme uji dalam campuran kompleks. Bidang utama bioautografi adalah untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antivirus yang ada di dalam ekstrak tumbuhan (Zweig dan Whittaker, 1971).

Dalam prakteknya, kromatogram diletakkan pada permukaan media agar di dalam petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme. Setelah zat dalam kromatogram berdifusi ke agar, lempeng diangkat dan agar diinkubasi. Setelah masa inkubasi berakhir, dapat diamati bercak yang menyebabkan hambatan pertumbuhan mikrobial uji, kemudian dicocokkan dengan hasil deteksi kromatogramnya dengan metode deteksi KLT yang sesuai. Dengan demikian dapat diperkirakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap daya antimikroba (Zweig dan Whittaker, 1971).

## **E. Keterangan Empiris**

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan bukti ilmiah aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang (*C. sappan* L.) terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*, dan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan menganalisis secara bioautografi pada lempeng KLT.