

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Daun Pandan

Pandan wangi (atau biasa disebut *pandan* saja) adalah jenis tumbuhan monokotil dari famili Pandanaceae yang memiliki daun beraroma wangi yang khas. Daunnya merupakan komponen penting dalam tradisi masakan Indonesia dan negara-negara Asia Tenggara lainnya. Beberapa varietas memiliki tepi daun yang bergerigi¹. Di beberapa daerah, tanaman ini dikenal dengan berbagai nama antara lain:

Pandan Rampe, Pandan Wangi (Jawa); Seuke Bangu, Pandan Jau, Pandan Bebau, Pandan Rempai (Sumatera); Pondang, Pondan, Ponda, Pondago (Sulawesi); Kelamoni, Haomoni, Kekermone, Ormon Foni, Pondak, Pondaki, Pudaka (Maluku); Pandan Arrum (Bali), Bonak (Nusa Tenggara).²

Pandan wangi merupakan tumbuhan berupa perdu dan rendah, tingginya sekitar dua meter. Batangnya menjalar, pada pangkal keluar berupa akar. Daun berwarna hijau kekuningan, diujung daun berduri kecil, kalau diremas daun ini berbau wangi. Tumbuhan ini mudah dijumpai di pekarangan atau tumbuh liar di tepi-tepi selokan yang teduh. Daun tunggal, duduk, dengan

¹ *Loc.cit*

² Weni, Ery. “Pengaruh Ekstrak Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius roxb.*) 6 mg/grb terhadap waktu Induksi tidur dan lama waktu tidur Mencit balb/c yang diinduksi thiopental 0,546 mg/20mgbb” Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. 2009

pangkal memeluk batang, tersusun berbaris tiga dalam garis spiral. Helai daun berbentuk pita, tipis, licin, ujung runcing, tepi rata, bertulang sejajar, panjang 40 - 80 cm, lebar 3 - 5 cm, berduri tempel pada ibu tulang daun permukaan bawah bagian ujung-ujungnya, warna hijau dan berbau wangi. Beberapa varietas memiliki tepi daun yang bergerigi.. Akarnya besar dan memiliki akar tunjang yang menopang tumbuhan ini bila telah cukup besar.

Pandan wangi di perkirakan berasal dari kepulauan di Lautan Pasifik, dengan penyebaran terbesar di Madagaskar dan Malesia. Untuk penyebarannya, Terdapat hampir di seluruh Indonesia, karena tumbuhan ini mudah tumbuh. Untuk keanekaragaman beberapa varietas daun memiliki sisi yang berduri. Tanaman pandan wangi mempunyai kerabat yang memiliki famili yang sama, contohnya untuk varietas *Pandanus*: *P. tectorius*, *P. bidur*, *P. furcatus*, *P. amaryllifolius*, *P. edulis*, *P. andamanensium*. *Freycinetia*: *F. funicularis*, *F. javanica*, *F. gaudidii*, *F. banksii*. *Sararanga*: *S. simosa*.³

Klasifikasi ilmiah tanaman pandan adalah sebagai berikut:

Kerajaan : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Liliopsida*
Ordo : *Pandanales*
Famili : *Pandanaceae*
Genus : *Pandanus*
Spesies : *P. amaryllifolius*

³ Marisya. 2012. *Morfologi Pandan Wangi*. Diakses pada <http://tentenmarisya.blogspot.com/2012/06/morfologi-pandan-wangi.html>. 04/01/14: 12.05



Gambar 2.1 Daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*)

Daun pandan merupakan daun yang sudah terkenal dari jaman dahulu, daun tersebut merupakan daun yang di gunakan oleh ibu rumah tangga untuk memasak sebagai penyedap makanan. Tapi di balik semua itu, ternyata daun pandan juga sangat baik atau sangat banyak manfaatnya di bidang kesehatan. Salah satu contoh penyakit yang dapat disembuhkan adalah:

1. Lemah Syahwat
2. Mengurangi gelisah
3. Rematik
4. Menumbuhkan, menghitamkan, dan mencegah uban rambut

Daun pandan merupakan salah satu tanaman yang mengeluarkan aroma yang wangi. Daun ini banyak sekali kegunaannya bagi kehidupan manusia khususnya ibu – ibu rumah tangga, di mana digunakan sebagai pewarna dan pengharum tambahan alami pada makanan. Namun daun pandan tidak hanya bermanfaat untuk makanan saja tetapi bisa dijadikan sebagai obat

alternatif untuk mengobati berbagai penyakit.⁴Kandungan kimia pandan wangi diantaranya alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, tannin, dan zat warna.⁵

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, bersifat optis aktif. Kebanyakan alkaloid berbentuk kristal dan hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar. Sebagian besar alkaloid berasa pahit. Beberapa pereaksi uji yang sering digunakan adalah Mayer, Bouchardat dan Dragendorf. Alkaloid dikaitkan dengan hambatan replikasi DNA bakteri yaitu dengan menghambat aktivasi enzim yang berperan pada proses pengrahan nukleotida pada pita DNA tunggal induk sebagai cetakannya. Adanya gangguan replikasi DNA menyebabkan gangguan pula pada pembelahan sel. Selain itu sintesa protein untuk metabolisme bakteri maupun untuk sintesa dinding sel akan terhambat.

2. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen (C_6) terikat pada

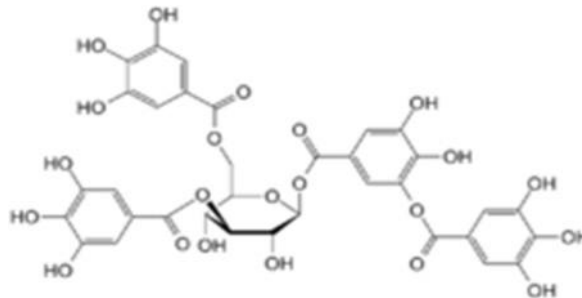
⁴Sajin. *Manfaat-daun-pandan* . <http://sajidinapotik.blogspot.com/2012/07/manfaat-daun-pandan.html>. diakses (10:40,24 maret 2013)

⁵Murhadi, dkk. *Aktivitas Antibakteri Daun Salam (Syzygium Polyanta) daun Pandan (Pandanus Amaryllifolius)*. 2007. Universitas Lampung. Bandar Lampung, hal.01

suatu rantai popan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $C_6 - C_3 - C_6$. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid mempunyai mekanisme membentuk kompleks dengan protein ekstraselular sehingga akan merusak membran sel bakteri.

3. Tanin

Tanin terdapat luas pada tumbuhan berpembuluh, dalam Angiospermae terdapat khusus di jaringan kayu. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer yang kuat dan tidak larut dalam air. Dalam industri, tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein. Tanin mempunyai mekanisme mempresipitasi protein bakteri sehingga terjadi inaktivasi enzim yang diproduksi bakteri dan menginaktivasi protein transport dinding sel bakteri sehingga merusak dinding sel bakteri.



Gambar 2.2. Asam Tanat, salah satu jenis tannin

4. Saponin

Saponin berfungsi sebagai antibakteri dan antimikroba. Hal ini didasarkan pada sifat sitotoksik dari saponin dan kemampuannya dalam mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma sehingga sel mikroba menjadi lisis.

5. Polifenol

Polifenol mempunyai aktivitas denaturasi protein yaitu berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak sehingga mengganggu fungsi fisiologis bakteri yang lambat laun akan menyebabkan kematian sel bakteri.⁶

Kandungan kimia tersebut menghambat pertumbuhan kanker, mikroba, sebagai antioksidan, menurunkan kolesterol darah, dan kadar glukosa darah, bersifat antibiotik, serta menimbulkan efek peningkatan kekebalan.

B. Bakteri

Spesies bakteri dapat dibedakan berdasarkan morfologi (bentuk), komposisi kimia (umumnya dideteksi dengan reaksi biokimia), kebutuhan

⁶ Noorhamdani,dkk.” Ekstrak Etanol daun Pandan wangi (*pandanus amaryllifolius roxb.*) sebagai antibakteri terhadap *pseudomonas aeruginosa* secara in vitro” Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. h. 7

nutrisi, aktivitas biokimia dan sumber energi (sinar matahari atau bahan kimia). Ada beberapa bentuk dasar bakteri, yaitu bulat (tunggal: *coccus*, jamak: *cocci*), batang atau silinder (tunggal: *bacillus*, jamak: *bacilli*), dan spiral yaitu berbentuk batang melengkung atau melingkar-lingkar.⁷

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, udara, air dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan atas bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram tetap mengikat warna cat pertama (Gram A) karena tahan terhadap alkohol dan tidak mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri akan berwarna ungu. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram warna cat yang pertama (Gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah.⁸

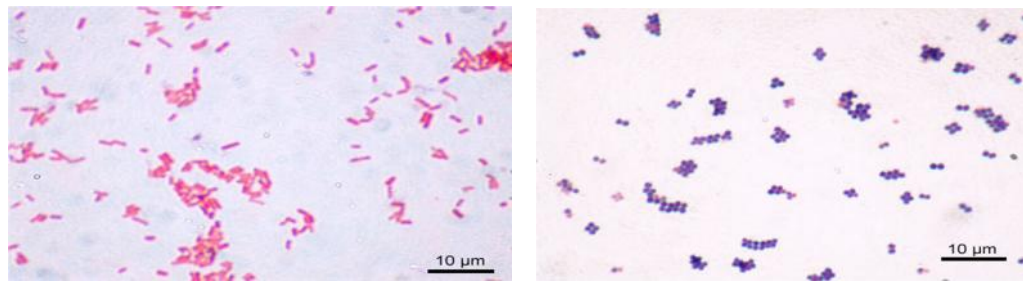
Tabel 2.1 Perbedaan Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif

Sifat	Bakteri gram positif	Bakteri gram negatif
Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah	Kandungan lipid tinggi
Dinding sel : Lapisan peptidoglikan Kadar lipid	Lebih tebal 1- 4 %	Lebih tipis 11-22%
Ketahanan terhadap penisilin	Lebih sensitif	Lebih tahan
Ketahanan terhadap perlakuan fisik	Lebih tahan	Kurang tahan
Kepekaan terhadap	Tidak peka	Peka

⁷Sylvia T. Partiwi, *Mikrobiologi Farmasi*, Erlangga: Jakarta, 2008, hal. 22

⁸Anonim, April 2012, *Struktur Sel Bakteri*, http://id.wikipedia.org/wiki/Struktur_sel_bakteri. (23:06, 23 Maret 2013)

streptomisin		
Kepekaan terhadap iodium	lebih peka	kurang peka
Penghambat warna basa	Lebih dihambat	Kurang dihambat
Sifat tahan basa	Ada yang tahan basa	Tidak ada yang tahan basa
Kebutuhan nutrient	Kompleks	Relatif sederhana
Resistensi terhadap tellurit	Lebih tahan	Lebih peka
Resistensi terhadap alkali (1% KOH)	Tidak larut	Larut
Toksin yang dibentuk	Eksotoksin	Endotoksin
Komponen utama	<i>Teichoic dan teichuronic acid</i> 50% berat kering dinding sel, 10% berat kering seluruh tubuh	Lipopolisakarida (LPS) ± 50% berat kering dinding sel
Komponen lain	Polisakarida	Lipoprotein ⁹



Gambar 2.3. Bakteri gram positif dan bakteri gram negatif

Berikut ini adalah karakteristik dari bakteri gram positif dan negatif.

Tabel 2.2. Karakteristik dari bakteri gram positif dan gram negatif

Karakteristik	Gram Positif	Gram Negatif
Dinding sel	Homogen & tebal (20-80 nm) serta sebagian besar tersusun dari peptidoglikan. Polisakarida lain & asam teikoat dapat ikut menyusun sel	Peptidoglikan (2-7 nm) di antara membran dalam dan luar (7-8 nm tebalnya), yang terdiri dari lipid, protein & lipopolisakarida
Bentuk sel	Bulat, batang atau filamen	Bulat, oval, batang lurus atau

⁹Putu Mitia, 2012. Perbedaan Bakteri positif dengan Bakteri Negatif. <http://sputumutia.blogspot.com/2012/11/perbedaan-bakteri-gram-positif-dan-gram.html> diakses (29 Mei 2013, 21:28)

		melingkar seperti tanda koma, heliks atau filamen; beberapa mempunyai selubung atau kapsul
Reproduksi	Pembelahan biner	Pembelahan biner, kadang-kadang pertunasan
Metabolisme	Kemoorganoheterotrof	Fototrof, kemolitoautotrof, atau kemoorganoheterotrof
Motilitas	Kebanyakan nonmotil, bila motil tipe flagelanya adalah petritrikus (<i>petritrichous</i>)	Motil atau nonmotil. Bentuk flagela dapat bervariasi-polar, lopotrikus (<i>lophtrichous</i>), petritrikus (<i>petritrichous</i>).
Anggota tubuh (apendase)	Biasanya tidak memiliki apendase	Dapat memiliki pili, fimbriae, tangkai
Endospora	Beberapa grup dapat membentuk endospora	Tidak dapat membentuk endospore ¹⁰

Penyakit infeksi masih merupakan penyebab kesakitan dan kematian yang tinggi di seluruh dunia, khususnya di negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Penyakit infeksi yang banyak diderita masyarakat diantaranya infeksi *Enterobacteria* terutama dari golongan bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*.

Pengobatan utama infeksi yang disebabkan oleh bakteri adalah antibiotik. Namun pada perkembangannya, penggunaan antibiotik secara tidak rasional telah menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotika, dan kedua bakteri tersebut termasuk di dalamnya.¹¹

Adapun penyakit-penyakit yang dapat ditimbulkan bakteri gram positif dan negatif adalah:

¹⁰Anonim, April 2012, *Gram-negatif*, <http://id.wikipedia.org/wiki/Gram-negatif>.(11:06,24 Maret 2013)

¹¹Dyah Wening Prawesti, *Uji Aktivitas Antibakteri Infusum Kunyit Putih (Curcuma zedoaria) Terhadap Escherichia coli Secara Invitro*, Fakultas Kedokteran

Tabel 2.3. Penyakit dari bakteri gram positif dan negatif

Gram	Genus	Penyakit
Gram positif	<i>Staphylococcus</i>	keracunan makanan, bronkitis
	<i>Streptococcus</i>	radang paru, karies gigi
	<i>Enterococcus</i>	enteritis
	<i>Listeria</i>	listeriosis
	<i>Bacillus</i>	anthrax
	<i>Clostridium</i>	tetanus
	<i>Mycobacterium</i>	difteri
	<i>Propionibacterium</i>	tuberkolosis
	<i>Mycoplasma</i>	jerawat, pneumonia
Gram negative	<i>Salmonella</i>	salmonellosis
	<i>Escherichia</i>	radang saluran cerna
	<i>Shigella</i>	disentri
	<i>Neisseria</i>	gonoroe
	<i>Bordetella</i>	batuk rejan
	<i>Legionella</i>	<i>legionnaires' disease</i>
	<i>Pseudomonas</i>	infeksi luka bakar
	<i>Vibrio</i>	kolera
	<i>Campylobacter</i>	gastroenteritis
	<i>Helicobacter</i>	tukak lambung
	<i>Haemophilus</i>	bronkitis
	<i>Treponema</i>	sifilis
	<i>Chlamydia</i>	pneumonia, urethritis, trakoma

1. Bakteri *Bacillus cereus*

Kingdom	: <u>Prokaryota</u>
Divisio	: <u>Firmicutes</u>
Class	: <u>Bacilli</u>
Ordo	: <u>Bacillales</u>
Family	: <u>Bacillaceae</u>
Genus	: <u><i>Bacillus</i></u>
Spesies	: <u><i>B. cereus</i></u>



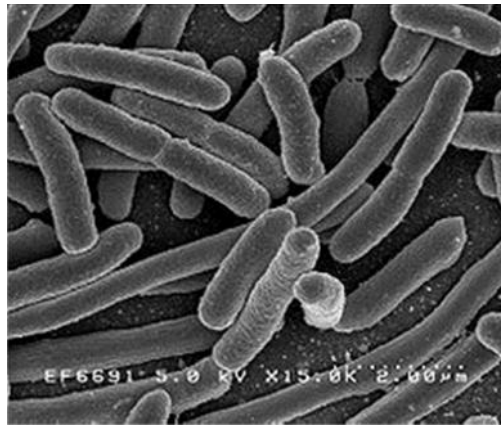
Gambar 2.4. Bakteri *Bacillus cereus*

Bacillus sp termasuk kedalam family Bacillaceae. Untuk bakteri *Bacillus cereus* sendiri merupakan bakteri gram positif, bersifat aerobik, dan mampu membentuk spora yang dapat ditemukan di tanah, pada sayuran maupun produk pangan. Spora dari jenis bakteri ini tahan terhadap panas dan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan dan mampu membentuk kecambah dalam larutan yang mengandung NaOH dan HCl.

Bakteri *Bacillus cereus* memiliki nilai waktu generasi dan konstanta laju pertumbuhan sebesar 18 menit dan $2,27 \text{ jam}^{-1}$ yang diidentifikasi pada lumpur hasil pengolahan limbah cat. Hasil penelitian uji kemampuan bakteri ini dapat menurunkan kadar ion sulfida dalam limbah cair setelah IPAL dengan metode turbidimetri dan gravimetri yaitu sebesar 39,39% dan 33,23%. *cereus* motil, berkemampuan untuk menghancurkan sel darah merah (*hemolytic*). Bakteri ini dapat menyebabkan keracunan makanan, ada dua tipe penyakit yang diakibatkannya, yaitu tipe emetik dan tipe diare. Tipe emetik

ditandai dengan mual dan muntah, muncul gejala setelah masa inkubasi sekitar 1-6 jam. Tipe diare ditandai dengan rasa sakit perut dan buang air besar, muncul gejala setelah masa inkubasi sekitar 6-24 jam.

2. Bakteri *Escherichia coli*



Gambar 2.5. Bakteri *Escherichia coli*

Domain	: <i>Bacteria</i>
Filum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>E.coli</i>

Escherichia coli, atau biasa disingkat *E. coli*, adalah salah satu jenis spesies utama bakteri gram negatif. Pada umumnya, bakteri yang ditemukan oleh Theodor Escherich ini dapat ditemukan dalam usus besar manusia. Kebanyakan *E. Coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa, seperti *E. Coli* tipe O157:H7, dapat mengakibatkan keracunan makanan yang serius pada

manusia. *E. Coli* yang tidak berbahaya dapat menguntungkan manusia dengan memproduksi vitamin K₂, atau dengan mencegah bakteri lain di dalam usus. *E. coli* banyak digunakan dalam teknologi rekayasa genetika. Biasa digunakan sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang diinginkan untuk dikembangkan. *E. coli* dipilih karena pertumbuhannya sangat cepat dan mudah dalam penanganannya.

Escherichia coli (*E. coli*) juga adalah anggota dari kelompok besar kuman bakteri yang menghuni saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas lainnya (mamalia, burung). Bayi yang baru lahir memiliki saluran pencernaan steril, yang dalam dua hari menjadi terjajah dengan *E. coli*. Lebih dari 700 serotif *E. coli* telah diidentifikasi, dan "H" "O" antigen di tubuh mereka dan flagela membedakan *E. coli* serotif, masing-masing. *E. coli* serotif yang bertanggung jawab untuk laporan berbagai wabah dilacak ke konsumsi makanan yang terkontaminasi dan minuman adalah mereka yang memproduksi toksin Shiga (STX), disebut demikian karena toksin itu hampir identik dengan yang dihasilkan oleh bakteri lain yang dikenal sebagai jenis *dysentaria Shigella* 1 (yang juga menyebabkan diare berdarah dan sindrom uremik hemolitik (HUS) di negara berkembang seperti Bangladesh), yang paling terkenal ialah yang memproduksi STX yaitu *E. coli* O157: H7. Toksin Shiga adalah salah satu racun yang paling kuat, sedangkan HUS adalah sindrom yang didefinisikan oleh trilogi anemia hemolitik

(penghancuran sel darah merah), trombositopenia (jumlah platelet rendah) dan gagal ginjal akut.¹²

C. Uji Aktivitas Antibakteri

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

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

1. Difusi Agar

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

1) Cara *Kirby Bauer*

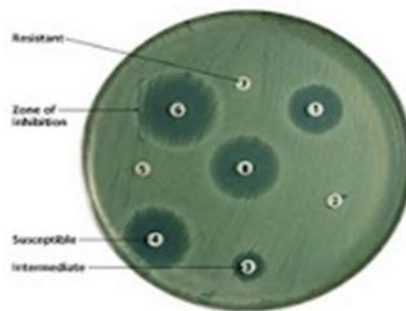
Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10 CFU per ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian

¹²Muhammad.Rahmadani.2011.*BahayaEscherichiacoli*.<http://muhammadrahmadani.blogspot.com>
(17:08, 24 Maret 2013)

diolahkan pada permukaan media agar hingga rata. Kemudian kertas samir (disk) yang mengandung antibakteri diletakkan di atasnya, diinkubasi pada 37° selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca:

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

b) Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri tetapi tidak dimatikan.



Gambar 2.6. Pengukuran zona bening cara Kirby Bauer

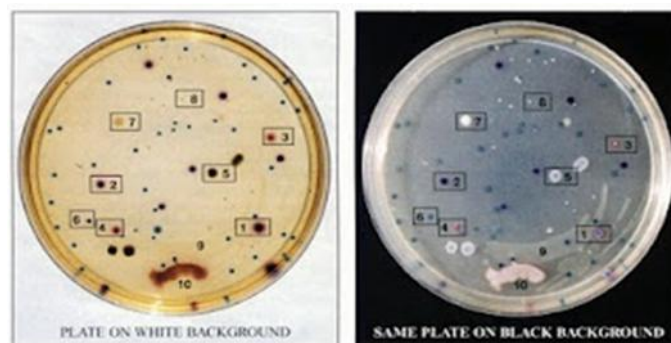
2) Cara Sumuran

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

media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu, ke dalam sumuran diteteskan larutan antibakteri kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti pada cara *Kirby Bauer*.

3) Cara *Pour Plate*

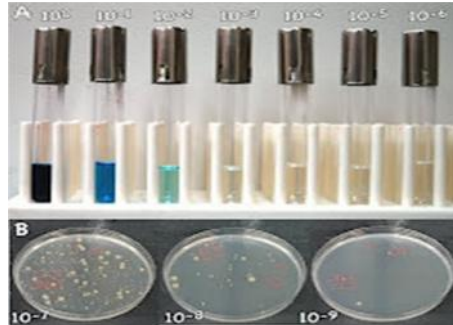
Beberapa koloni bakteri dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU per ml. Suspensi bakteri diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5 % yang mempunyai temperatur 50°C. Setelah suspensi bakteri tersebut homogen dituang ke dalam media agar *Mueller Hinton*, ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, disk diletakkan di atas media kemudian diinkubasi 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasil dibaca sesuai dengan standar masing-masing bakteri.¹³



Gambar 2.7. Pengukuran zona bening cara *Pour Plate*

¹³Fairus Zabadi. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri*. <http://fairuzabadi57.blogspot.com/2010/03/uji-aktivitas-antibakteri.html>. (14:08, 13 Maret 2013)

2. Dilusi Cair atau Dilusi Padat



Gambar 2.8. Cara Dilusi

Metode dilusi dibagi menjadi dua yaitu metode dilusi cair (*broth dilution*) dan metode dilusi padat (*solid dilution*). Pada metode dilusi digunakan untuk menentukan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal). Metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum, selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai Kadar Bunuh Minimal. Sedangkan metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (*solid*). Hasil zona bening yang terbentuk diklasifikasikan sesuai tabel di bawah ini.

Tabel 2.4. Klasifikasi Respon Hambatan

Diameter Zona Bening	Respon Hambat Pertumbuhan
10 mm	Tidak ada
11-15 mm	Lemah
16-20 mm	Sedang
> 20 mm	Kuat

Media broth diperkaya untuk tujuan umum, untuk isolasi dan pertumbuhan bermacam mikroorganisme, media ini untuk isolasi bakteri ini, mengandung kasein dan pepton kedelai yang menyediakan asam amino dan substansi nitrogen. Isolasi mikroba adalah memisahkan mikroba satu dengan mikroba lain yang berasal dari campuran berbagai mikroba. Mengisolasi mikroba dengan cara menumbuhkan (menanam) dalam medium padat. Hal ini karena dalam medium padat, sel-sel mikroba akan membentuk koloni yang tetap pada tempatnya. Sel mikroba yang tertangkap pada medium padat pada beberapa tempat yang terpisah, maka sel atau kumpulan sel mikroba yang hidup akan berkembang menjadi suatu koloni yang terpisah. Cara mengisolasi mikroba menggunakan medium cair dengan cara pengencaran. Kemudian kita tumbuhkan dalam media padat dan dibiarkan membentuk koloni. Selanjutnya sel-sel mikroba tersebut diisolasi dalam tabung-tabung reaksi atau cawan petri yang terpisah. Isolasi dapat dilakukan dengan cara penggoresan atau penaburan.

Beberapa langkah pada pekerjaan inokulasi dan isolasi mikroba adalah sebagai berikut:

a. Menyiapkan ruangan

Ruang tempat inokulasi harus bersih, dan bebas angin. Dinding ruang yang basah menyebabkan butir-butir debu menempel. Pada waktu mengadakan inokulasi, baik sekali bila meja tempat inokulasi didasari dengan kain basah. Pekerjaan inokulasi dapat dilakukan dalam tempat didalam suatu kotak kaca. Di laboratorium untuk membuat vaksin, serum dan lain sebagainya, udara yang masuk kedalam ruangan dilewatkan saringan yang disinari dengan sinar ultra-ungu.

b. Pemindahan dengan kawat inokulasi

Ujung kawat inokulasi sebaiknya dari platina atau dari nikrom, ujung kawat boleh lurus, boleh juga berupa kolongan yang berdiameter 1-3 mm. lebih dahulu ujung kawat ini dipijarkan, sedang sisanya sampai tangkai cukup dilewatkan nyala api saja. Setelah dingin kembali, ujung kawat itu disentuh suatu koloni. Mulut tabung tempat pembiaraan itu dipanasi juga setelah sumbatnya diambil. Setelah pengambilan inokulum (sampel bakteri) selesai, mulut tabung dipanasi lagi kemudian disumbat seperti semula. Ujung kawat yang membawa inokulum tersebut digesekkan pada medium baru atau pada suatu kaca benda, kalau tujuannya memangakan membuat suatu sediaan.

c. Pemindahan dengan pipet

Cara ini dilakukan misalnya pada penyelidikan air minum atau penyelidikan susu. Untuk itu diambil 1 ml contoh sampel untuk diencerkan dengan 99 ml air murni yang disterilkan. Dalam pengenceran ini tergantung dari keadaan air atau susu yang diselidiki. Kemudian diambil 1 ml dari enceran ini untuk dicampur adukkan dengan medium agar yang masih dalam keadaan cair. Lalu agar yang masih encer dituangkan dalam cawan petri. Setelah agar membeku, maka cawan petri yang berisi piaraan baru itu disimpan dalam tempat yang aman, misalnya dalam incubator. Penyimpanan cawan dilakukan secara terbalik, yakni permukaan medium menghadap kebawah. Hal ini untuk menghindari tetesnya air yang mungkin melekat pada dinding dalam tutup cawan. Piaraan yang diperoleh dengan jalan seperti diatas, dikenal dengan nama piaraan adukan. Dengan cara ini bakteri yang diinokulasi tadi dapat menyebar luas keseluruh medium. Bakteri yang aerob maupun anaerob dapat tumbuh disitu, dan banyak nya koloni dapat dihitung dengan mudah.¹⁴

D. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan, penarikan, atau pengeluaran suatu komponen campuran dari campurannya. Ekstraksi biasanya

¹⁴ Waluyo, Lud.2008.Teknik dan metode dasar dalam Mikrobiologi. Malang: Universitas Muhamadiyah Malang, hal. 178

menggunakan pelarut yang sesuai dengan komponen yang diinginkan, cairan dipisahkan dan kemudian diuapkan sampai pada kepekatan tertentu.¹⁵

1. Ekstraksi Pelarut

Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi suatu zat terlarut (solut) di antara dua fasa cair yang tidak saling bercampur. Ekstraksi pelarut digunakan untuk analisis makro maupun mikro dan juga untuk pekerjaan-pekerjaan preparatif di dalam laboratorium organik, anorganik, atau biokimia. Corong pemisah adalah alat yang paling sederhana untuk dapat digunakan selain alat ekstraksi *soxhlet* dan alat *counter current craig* (paling rumit).¹⁶

2. Hukum Distribusi

Nerst adalah pertama kali memberikan pernyataan yang jelas mengenai hukum distribusi ketika pada tahun 1891 ia mengemukakan bahwa suatu zat terlarut akan membagi dirinya antara dua cairan yang tak dapat campur sedemikian rupa sehingga angka banding konsentrasi pada keseimbangan adalah konstanta pada suatu temperatur tertentu.¹⁷

3. Jenis-Jenis Ekstraksi

a. Maserasi

¹⁵ Mulyono, *Op.cit*, hal. 107

¹⁶Rasmiwetti, dkk, *Buku Ajar Kimia Analitik*, Universitas Riau: Pekanbaru, 2006, hal. 21

¹⁷Underwood, *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*, Erlangga: Jakarta, 2002, hal. 457

Maserasi merupakan proses penyarian senyawa kimia secara sederhana dengan cara merendam simplisia atau tumbuhan pada suhu kamar dengan menggunakan pelarut yang sesuai sehingga bahan menjadi lunak dan larut. Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari, sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan komponen kimia yang terdapat dalam sampel. Maserasi dilakukan dalam botol yang berwarna gelap dan ditempatkan pada tempat yang terlindung cahaya. Ekstraksi dilakukan berulang-ulang kali sehingga sampel terekstraksi secara sempurna yang ditandai dengan pelarut pada sampel berwarna bening. Sampel yang direndam dengan pelarut tadi disaring dengan kertas saring untuk mendapat maseratnya. Maseratnya dibebaskan dari pelarut dengan menguapkan secara *in vacuo* dengan rotary evaporator.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah proses penyarian simplisia dengan jalan melewatkan pelarut yang sesuai secara lambat pada simplisia dalam suatu perkolator. Perkolasi bertujuan supaya zat berkhasiat tertarik seluruhnya dan biasanya dilakukan untuk zat berkhasiat yang tahan ataupun tidak tahan pemanasan.

c. Digestasi

Digestasi adalah proses penyarian yang sama seperti maserasi dengan menggunakan pemanasan pada suhu 30°C – 40°C. Cara ini dilakukan untuk simplisia yang pada suhu biasa tidak tersari dengan baik. Jika pelarut yang

dipakai mudah menguap pada suhu kamar dapat digunakan alat pendingin tegak, sehingga penguapan dapat dicegah.

d. Infusa

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit, kecuali dinyatakan lain, dilakukan dengan cara sebagai berikut : simplisia dengan derajat kehalusan tertentu dimasukkan kedalam panci dan ditambahkan air secukupnya, panaskan diatas penangas air selama 15 menit, dihitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk, serkai selagi panas melalui kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas sehingga diperoleh volume infus yang dikehendaki.

e. Dekokta

Dekokta adalah suatu proses penyarian yang hampir sama dengan infus, perbedaannya pada dekokta digunakan pemanasan selama 30 menit dihitung mulai suhu mencapai 90°C . Cara ini dapat dilakukan untuk simplisia yang mengandung bahan aktif yang tahan terhadap pemanasan.

f. Sokletasi

Sokletasi merupakan suatu cara pengekstraksian tumbuhan dengan memakai alat soklet. Pada cara ini pelarut dan simplisia ditempatkan secara terpisah. Sokletasi digunakan untuk simplisia dengan khasiat yang relatif stabil dan tahan terhadap pemanasan. Prinsip sokletasi adalah penyarian secara terus menerus sehingga penyarian lebih sempurna dengan memakai pelarut yang relatif sedikit. Jika penyarian telah selesai maka pelarutnya diuapkan dan

sisanya adalah zat yang tersari. Biasanya pelarut yang digunakan adalah pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah.¹⁸

4. Mekanisme Ekstraksi

Proses ekstraksi pelarut berlangsung tiga tahap, yaitu:

- a. Pembentukan kompleks tidak bermuatan yang merupakan golongan ekstraksi
- b. Distribusi dari kompleks yang terekstraksi
- c. Interaksinya yang mungkin dalam fase organik¹⁹

5. Teknik Ekstraksi

Teknik ekstraksi dapat dibedakan menjadi tiga cara, yaitu ekstraksi bertahap (*batch extraction* = ekstraksi sederhana), ekstraksi kontinyu (ekstraksi sampai habis), dan ekstraksi arah berlawanan (*counter current extraction*).

- a. Ekstraksi bertahap

Pelaksanaan ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan alat corong pemisah dan merupakan metode ekstraksi paling sederhana. Zat yang akan di ekstrak dilarutkan dalam air kemudian dimasukkan dalam corong pemisah. Pelarut pengekstrak (biasanya pelarut organik) ditambahkan kepada larutan air agar zat terlarut dapat di ekstrak ke dalam cairan pengekstrak. Campuran dalam corong pemisah tersebut harus di kocok berulang kali, dan setelah didiamkan beberapa saat, terbentuk dua lapisan.

¹⁸Admin. 2 Oktober 2011. *Metode Ekstraksi*. [http://www.scribd.com/doc/23648388/11/II-2-5Jenis- Jenis-Ekstraksi](http://www.scribd.com/doc/23648388/11/II-2-5Jenis-Jenis-Ekstraksi). (18:20, 13 Maret 2013)

¹⁹Khopkar, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, UI-Press: Jakarta, 2008, hal. 92

b. Ekstraksi kontinu (ekstraksi sampai habis-ekstraksi serba terus)

Ekstrak kontinu digunakan bila perbandingan distribusi relatif kecil sehingga untuk pemisahan yang kuantitatif diperlukan beberapa ekstraksi.²⁰

c. Ekstraksi dengan arah berlawanan menurut *craig*

Ekstraksi dengan cara “*counter current*” menurut *craig* ini merupakan salah satu dari berbagai cara untuk memisahkan dua zat atau lebih, apabila angka banding distribusi (D) dari zat-zat tersebut perbedaannya kecil sekali. Proses *counter current craig* ini merupakan fraksionasi secara bertahap dengan menggunakan peralatan khusus. Alat yang digunakan pada prinsipnya terdiri dari sejumlah besar (bisa 100 atau lebih) tabung-tabung pengestrak yang identik, berfungsi sebagai corong pemisah.

6. Ekstraksi Berulang Kali

Semakin besar jumlah zat yang akan terekstrak jika harga V_a/V_o diperkecil (memperbesar volum fasa organik) dan semakin efisien proses ekstraksi jika ekstraksi itu dilakukan berulang kali dengan jumlah volum fasa organik yang sama. Menghitung banyaknya zat tertinggal setelah jumlah kali ekstraksi sangat penting, yaitu untuk menghitung persen solut terekstrak, dan juga menentukan keefektifan pekerjaan ekstraksi yang dilakukan.

E. Pelarut Etanol

Pelarut Etanol merupakan suatu cairan mudah menguap yang biasa digunakan sebagai pelarut bagi kebanyakan senyawa organik. Etanol

²⁰*Ibid*, hal. 107

merupakan pelarut yang bersifat semi polar, yang artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Itu sebabnya etanol juga bisa bercampur dengan air. Kepolaran dari etanol disebabkan adanya gugus –OH yang bersifat polar, sementara gugus etil (CH₃CH₂-) merupakan gugus non polar. Dengan rantai karbon yang pendek menyebabkan etanol akan bersifat semi polar. Pelarut semi polar dapat menginduksi tingkat kepolaran molekul-molekul pelarut non polar. Ia bertindak sebagai perantara (intermediate solvent) untuk mencampurkan pelarut non polar dengan non polar. Etanol memiliki sifat selektivitas yang tinggi (pelarut selektif) terhadap reaksi dan sebagainya.

Pemilihan etanol sebagai pelarut menurut didasarkan beberapa pertimbangan diantaranya selektivitas, kelarutan, kerapatan, reaktivitas, dan titik didih. Etanol memiliki beberapa keunggulan sebagai pelarut yakni memiliki kemampuan melarutkan ekstrak yang besar, beda kerapatan yang signifikan sehingga mudah memisahkan zat yang akan dilarutkan. Etanol tidak bersifat racun, tidak eksplosif bila bercampur dengan udara, tidak korosif, dan mudah didapatkan.²¹

F. Antibiotika

Antibiotika adalah suatu substansi (zat-zat) kima yang diperoleh dari atau dibentuk dan dihasilkan oleh mikroorganisme, dan zat-zat itu dalam jumlah yang sedikitpun mempunyai daya penghambat kegiatan

²¹ Huhul. 2013. Sifat Etanol.
<http://id.answers.yahoo.com/question/index?qid=20121111022132AA5JbIC>. diakses (12:42, 1 Januari 2013)

mikroorganisme yang lain. Antibiotika tersebar dialam, dan memegang peranan penting dalam mengatur populasi mikroba dalam tanah, air, limbah, dan kompos. Antibiotika berbeda dalam susunan kimia dan cara kerjanya.

Antibiotika yang pertama dikenal adalah *penisilin*, suatu zat yang dihasilkan oleh jamur *penicillium*. Penisilin ditemukan oleh A. Fleming pada tahun 1929, namun baru tahun 1943 antibiotika ini banyak digunakan sebagai pembunuh bakteri.

Antibiotika ada yang mempunyai spektrum luas, artinya antibiotika yang efektif digunakan bagi banyak spesies bakteri, baik kokus, basil, maupun spiril, ada juga antibiotika berspektrum sempit, artinya hanya efektif digunakan untuk spesies tertentu.²²

1. Mekanisme Kerja Antibiotik

Antibiotik mengganggu bagian-bagian yang peka didalam sel, yaitu:

a. Antibiotik yang mempengaruhi Dinding Sel

Sel kuman dikelilingi oleh suatu struktur kaku yang disebut dinding sel, yang melindungi membran protoplasma dibawahnya dari trauma. Setiap zat yang mampu merusak dinding sel atau mencegah sintesisnya, menyebabkan terbentuknya sel-sel yang peka terhadap tekanan osmotik. Mekanisme kerja penisilin mengganggu pembentukan dinding sel terutama pada tahap terakhir. Penggunaan penisilin ini dapat menyebabkan terbentuknya sferoplas, yakni kuman-kuman tanpa dinding sel atau kuman

²² Waluyo, Lud.2008.Teknik dan metode dasar dalam Mikrobiologi. Malang: Universitas Muhamadiyah Malang. hal. 237

bentuk L. Contoh: penisilin, sefalosporin, basitrasin, sikloserin, ristosetin, vankomisin.²³

b. Antibiotik yang mengganggu fungsi membran sel

Membran sel memegang peranan vital dalam sel, yakni sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif, melakukan pengangkutan aktif, dan mengendalikan susunan dalam sel. Membran sel mempengaruhi konsentrasi metabolit dan bahan gizi di dalam sel dan merupakan tempat berlangsungnya pernafasan dan aktivitas biosintesis tertentu. Beberapa antibiotik diketahui mampu merusak atau memperlemah satu atau lebih dari fungsi-fungsi tersebut. Bila fungsi-fungsi tersebut terganggu, maka akan menyebabkan gangguan terhadap kehidupan sel. Hanya beberapa antibiotika jenis ini yang dipakai untuk klinik, karena kebanyakan darinya bersifat toksik bagi manusia. Contoh: polimiksin, kolistin, nistatin, amforterisin B.

c. Antibiotika yang menghambat sintesis protein

Contoh: aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, linkomisin, kanamisin, neomisin, netilmisin, tobramisin. Sintesis protein merupakan hasil akhir dari dua proses utama, yakni: transkripsi (sintesis asam ribonukleat) dan translasi (sintesis protein yang ARN-dependent).

²³ *ibid.*, hal. 239

Antibiotika yang mampu menghambat salah satu proses ini, akan menghambat salah satu proses ini akan menghambat sintesis protein. Tergolong di dalam antibiotika ini, dan mekanisme kerjanya adalah:

1. Aktinomisin, aktif terhadap banyak kuman-kuman Gram positif dan gram negatif
2. Rifampisin, mempunyai spektrum antibakteri yang luas dan terutama efektif terhadap kuman-kuman Gram positif dan mikrobakteria. Dalam klinik, rifampisin terutama efektif untuk pengobatan tuberculosis secara oral.
3. Steptomisin, bersifat bakterisida terhadap sejumlah besar kuman-kuman Gram negatif dan kuman Gram positif, dan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Tetrasiklin, mempunyai spectrum sangat luas, dan mencakup spektrum penisilin, streptomisin, dan kloramfenikol.
5. Kloramfenikol, bersifat bakteriostatik, aktif terhadap sejumlah kuman Gram positif dan Gram negatif, rickettsia, dan klamidia. Sekarang terutama dipakai untuk infeksi anaerobic, meningitis karena *Haemophilus influenza* dan infeksi karena *Salmonella typhi*.
6. Eritrimisin, tergolong antibiotik makrolida. Dapat bersifat bakteriostatik atau bakterisida. Merupakan obat pilihan terhadap *Mycoplasma* dan penyakit legioner. Zat ini juga bermanfaat untuk

infeksi stafilokokus, streptokokus, dan pneumokokus, terutama bagi penderita yang peka terhadap penisilin.

7. Klindamisin, penggunaannya terutama untuk infeksi-infeksi oleh kuman anaerob, seperti *Bacteroides fragilis*.

d. Antibiotika yang menghambat sintesis Asam Nukleat

Obat diatas merupakan penghambat efektif terhadap sintesis ADN. Sebenarnya, obat-obat demikian membentuk kompleks dengan ADN, melalui ikatan pada residu deoksiguanosin. Kompleks ADN- aktinomisin menghambat polymerase ARN yang tergantung pada ADN serta menahan pembentukan ARN-m. Aktinomisin menghambat replikasi virus ADN. Mitomisin menghasilkan hubungan silang yang kuat dari untaian komplementer ADN dan sebagai akibatnya menahan replikasi ADN. Aktinomisin dan mitomisin menghambat sel-sel kuman maupun sel binatang dan tidak cukup selektif untuk digunakan dalam khemoterapi antikuman. Rimfapisin menghambat pertumbuhan kuman melalui ikatan kuat pada polimerase ARN kuman yang tergantung ADN. Jadi dapat menghambat sintesis ARN kuman. Contoh: asam nalidiksat, novobiosin, pirimetamin, sulfonamide, trimetroprim.²⁴

2. Tetrasiklin

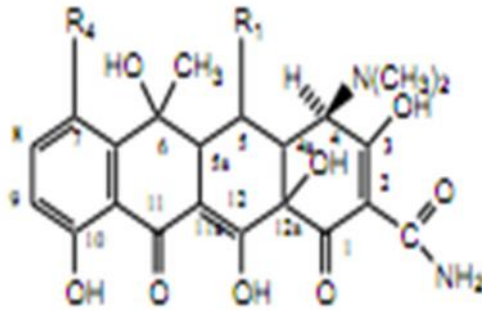
²⁴*ibid.*, hal. 241

Tetrasiklin adalah golongan antibiotik yang secara kimia berkerabat dekat Anggota yang pertama. Klortetrasiklin yang diisolasi dari *streptomyces aureo faciens* (*Actinomycete*). Kemudian ditemukan oksitetrasiklin dapat dibuat secara semisintetik dari klortetrasiklin, tetapi juga dapat diperoleh dari spesies *streptomyces* lainnya.

Tetrasiklin merupakan basa yang sukar larut dalam air, tetapi bentuk garam natrium atau garam HCl-nya mudah larut. Dalam keadaan kering, bentuk basa dan garam HCl tetrasiklin bersifat relatif stabil, tetapi dalam larutan kebanyakan tetrasiklin sangat stabil jadi cepat berkurang potensinya.

Dalam sel bakteri, tetrasiklin bekerja dengan menghambat biosintesis protein (translasi) pada ribosom. Proses translasi yang berlangsung di ribosom ini dapat digolongkan menjadi pengawalan pembentukan rantai (*initiation*), pemanjangan rantai (*elongation*), dan penutupan rantai (*termination*). Pada fase pemanjangan terjadi pemasukan asam amino satu persatu secara berurutan ke dalam rantai yang tengah tumbuh. Asam amino yang terikat pada transfer t-RNA yang sesuai (aminoasil-tRNA), mula-mula terikat pada tempat akseptor ribosom dan kemudian diralisasi pada rantai. Tetrasiklin bekerja secara bakteriostatik karena penimbunan aminoasil-tRNA pada tempat akseptor

dihambat. Namun, untuk ini sebenarnya diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi.²⁵



Gambar 2.9. Struktur kimia golongan tetrasiklin

²⁵ Sunanti, *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tunggal Bawang Putih (Allium Sativum Linn.) dan Rimpang Kunyit (Curcuma domestica Val.) terhadap Salmonella typhimurin*. Prodi Studi Biokimia Fakultas Matematika dan ilmu pengetahuan Alam.IPB. Bogor.2007. Hlm.05