

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Beras Hitam

Beras hitam merupakan salah satu jenis beras di samping beras putih, beras cokelat, dan beras merah. Beras hitam digunakan sebagai bahan makanan alternatif karena mempunyai fungsi fisiologis yang bermanfaat bagi kesehatan dan pengobatan penyakit (Kristamtini *et al.* 2016).

1. Sistematika beras hitam (*Oryza sativa* L. Indica)

Kedudukan beras hitam dalam sistematika klasifikasi tanaman menurut Vaughan *et al* (2008) adalah :

- Kerajaan : Plantae
- Sub kingdom : Tracheobionta
- Super divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Sub Kelas : Commelinidae
- Ordo : Glumiflorae
- Famili : Poaceae (Glumiflorae)
- Sub famili : Oryzoideae
- Suku : Oryzeae
- Genus : *Oryza*
- Spesies : *Oryza sativa* L. Indica



Gambar 1. (a) Tanaman beras hitam, (b) Padi beras hitam, (c) Beras hitam pecah kulit, (d) Serbuk beras hitam

2. Nama lain

Tanaman beras hitam memiliki sebutan yang beragam, di provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dan Sleman dikenal dengan nama cempo ireng dan beras jlitheng. Penduduk di Solo mengenal beras ini dengan nama Beras Wulung, di Cibeusi, Jawa Barat lebih dikenal dengan beras gadog dan di Bantul dikenal sebagai beras melik (Kristamtini 2009). Perbedaan nama beras hitam tersebut diduga disebabkan oleh keragaman warna berasnya, dari hitam cerah sampai hitam pekat. Perbedaan warna beras hitam terjadi sebagai akibat adanya perbedaan kandungan antosianin (Kristamtini *et al.* 2016).

3. Deskripsi tanaman

Warna beras berbeda dikarenakan memiliki perbedaan warna kulit ari (aleuron) yang disebabkan oleh perbedaan kandungan pigmen antosianin pada lapisan aleuron. Beras hitam memiliki kandungan antosianin yang sangat tinggi sehingga menjadikan warna beras menjadi ungu kehitaman (El-Sayed *et al.* 2006).

4. Khasiat tanaman

Beras hitam memiliki banyak manfaat yaitu sebagai antioksidan (Tan *et al.* 2016), antiinflamasi (Hartati 2016), antidiabetes (Wardani 2010). Flavonoid merupakan antioksidan polifenol yang mampu memperkuat dinding sel darah merah dan mengatur permeabilitasnya, mengurangi kecenderungan thrombolisis dan menghambat oksidasi LDL (Dalimartha & Setiawan 2007). Selain itu terdapat senyawa fenolik yang terdapat pada kulit beras berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri untuk melindungi benih beras dari pengaruh luar, sehingga benih beras dapat tahan dalam waktu penyimpanan yang lama (Jeong *et al.* 1998).

5. Kandungan kimia

Beras hitam mengandung senyawa senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin (Sari & Ayuchecaria 2017). Ketiga senyawa tersebut diketahui memiliki mekanisme sebagai antibakteri. Selain itu beras hitam mengandung antosianin sianidin 3O-glukosida, peonidin 3-O-glukosida, malvidin 3-O-glukosida, pelagonidin 3O-glukosida dan delfinidin 3-O-glukosida. Antosianin yang dominan adalah sianidin 3-glukosida (95%) dan peonidin 3-O-glukosida (5%) (Hu *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2006; Yawadio *et al.* 2007; Suroso *et al.* 2005).

Komponen lain yang teridentifikasi masuk dalam golongan asam fenolik seperti asam ferulik, kafeat, dan protokatekuat. Total fenolik yang terkandung pada beras hitam sekitar 1,90–50,32 mg GAE/g (Walter & Marchesan 2011). Beberapa asam fenolik yang terkandung dalam beras berpigmen diantaranya berupa asam ferulat, asam kumarat, asam galat dan asam benzoat (Pang *et al.* 2018)

B. Simplisia

1. Definisi simplisia

Simplisia atau herbal adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan. Kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C. Simplisia dibagi menjadi tiga jenis, yang pertama simplisia segar adalah bahan alam segar yang belum dikeringkan, yang kedua simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Ketiga yaitu serbuk simplisia nabati bentuk serbuk dari simplisia nabati, dengan derajat kehalusan tertentu. Sesuai dengan derajat kehalusannya, dapat berupa serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus (Depkes 2008).

2. Pengeringan

Tujuan pengeringan simplisia untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga mencegah penurunan waktu penyimpanan atau simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktifnya berubah. Pengeringan dapat dilakukan dengan dua macam cara yaitu pengeringan secara alamiah dan pengeringan buatan. Pengeringan secara alamiah dilakukan dengan cara menjemur simplisia di bawah sinar matahari langsung dan sangat tergantung cuaca atau diangin-anginkan di udara terlindung dari sinar matahari langsung. Pengeringan secara buatan dilakukan menggunakan mesin pengeringan seperti pemanas (oven). Hal-hal yang perlu diperhatikan saat pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan (Sudewo 2009).

C. Ekstrak

1. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes 1995).

2. Metode ekstraksi

Salah satu metode yang digunakan untuk penemuan obat tradisional adalah metode ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu (Sarker *et al.* 2006). Ekstraksi serbuk kering jaringan tumbuhan dapat dilakukan secara maserasi, refluks, atau soxhletasi dengan menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda (Putra *et al.* 2014).

2.1. Maserasi. Maserasi merupakan metode yang sederhana, tetapi masih digunakan secara luas. Prosedurnya dilakukan dengan merendam bahan tanaman (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman. Setelah ekstraksi, residu bahan tanaman (maserat) harus dipisahkan dari pelarut. Kelemahan utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan berpotensi dapat hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut dalam temperatur kamar. Di lain pihak, dikarenakan ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas, pengadukan sekali ataupun secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan ekstraksi (Depkes 2000).

2.2. Perkolasi. Istilah perkolasi berasal dari kata 'percolare' yang artinya penetesan. Merupakan ekstraksi yang dilakukan penetesan cairan penyari dalam wadah silinder atau kerucut (perkolator), yang memiliki jalan masuk dan keluar. Bahan ekstraksi yang dimasukkan secara kontinyu dari atas mengalir lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar. Melalui pembaharuan terus-menerus bahan pelarut berlangsung sesuai suatu maserasi banyak tingkat. Jika pada maserasi sederhana suatu ekstraksi sempurna dari simplisia tidak terjadi, karena kesetimbangan konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan di sekelilingnya dapat diatur, maka pada perkolasi melalui pemasukan bahan pelarut yang ekstraksi total secara teoritis adalah mungkin berkaitan dengan perbedaan konsentrasi pada posisi yang baru, secara praktek diperoleh sampai 96% bahan yang terekstraksi. Sebelum perkolasi dilakukan, simplisia terlebih dahulu direndam menggunakan pelarut dan dibiarkan membengkak agar mempermudah pelarut masuk ke dalam sel. Pembengkakan ini juga dapat menyebabkan pecahnya wadah itu sendiri. Dalam pengisian simplisia tidak boleh terdapat ruang rongga. Hal ini akan mengganggu keteraturan cairan dan menyebabkan berkurangnya hasil ekstraksi, namun suatu pengisian yang kompak dapat menghambat aliran pelarut atau malah menghentikannya (Voight 1994). Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap perendaman antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan perkolat) sampai diperoleh ekstrak (Depkes 2000).

2.3. Refluks. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya dalam jangka waktu tertentu dimana pelarut akan terkondensasi menuju pendingin dan kembali ke labu. Ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas (Depkes 2000).

2.4. Soxhletasi. Soxhletasi adalah ekstraksi kontinyu menggunakan alat soxhlet dimana pelarut akan terkondensasi dari labu menuju pendingin, kemudian jatuh membasahi sampel dan mengisi bagian tengah alat soxhlet. Tabung sifon juga terisi dengan larutan ekstraksi dan ketika mencapai bagian atas tabung sifon,

larutan tersebut akan kembali ke dalam labu (Depkes 2000). Pada ekstraksi ini, bagian tanaman yang sudah digiling halus dimasukkan ke dalam kantong berpori (*thimble*) yang terbuat dari kertas saring yang kuat dan dimasukkan ke dalam alat soxhlet untuk dilakukan ekstraksi. Pelarut yang ada dalam labu akan dipanaskan dan uapnya akan mengembun pada kondensor. Embunan pelarut ini akan mengalir turun menuju kantong berpori yang berisi bagian tanaman yang akan diekstrak. Kontak antara embunan pelarut dan bagian tanaman ini menyebabkan bahan aktif terekstraksi. Ketika ketinggian cairan dalam tempat ekstraksi meningkat hingga mencapai puncak kapiler maka cairan dalam tempat ekstraksi akan tersedot mengalir ke labu selanjutnya. Proses ini akan berlangsung terus-menerus dan dijalankan sampai tetesan pelarut dari pipa kapiler tidak lagi meninggalkan residu ketika diuapkan. Keuntungan proses ini jika dibandingkan dengan proses lainnya yaitu dapat mengekstrak bahan aktif dengan lebih banyak walaupun menggunakan pelarut yang lebih sedikit (Endarini 2016).

3. Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam proses pemisahan ekstrak harus selektif yaitu pelarut yang digunakan mampu menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, diperbolehkan untuk peraturan. Beberapa faktor penting yang dapat dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut adalah mudah diperoleh dan murah, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral (Depkes 1986).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol karena bersifat universal dan selektif terhadap metabolit sekunder, selain itu pelarut etanol akan menyari senyawa aktif dalam ekstrak simplisia dengan nilai kapasitas antioksidan paling tinggi dibandingkan dengan pelarut heksana, etanol, dan air (Nur & Astawan 2011). Pelarut etanol mampu mengekstraksi senyawa fenol dan flavonoid lebih baik daripada pelarut heksana. Menurut Wypych (2001) pelarut polar seperti etanol dan etanol mampu mengekstrak senyawa fenol lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut etilasetat, heksana, dan air. Pelarut etanol dan etanol memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan dengan gugus fenol yang ada dan meningkatkan kelarutannya.

3.1. Air. Air merupakan pelarut polar yang stabil karena tidak mudah menguap, tidak beracun dan tidak mudah terbakar. Kekurangan pelarut ini dapat menurunkan kualitas mutu karena memungkinkan adanya pertumbuhan mikroba, menyebabkan reaksi enzimatik dan mempercepat reaksi hidrolisis. Air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan, mengingat air merupakan pelarut yang kurang selektif.

3.3. Etil asetat. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang mudah terbakar dan mudah menguap. Etil asetat larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dengan eter, etanol dan kloroform. Penggunaan pelarut etil asetat digunakan dalam ekstraksi flavonoid, alkaloid dan polifenol.

3.4. *n*-heksana. *n*-heksana merupakan pelarut non-polar yang merupakan hasil penyulingan minyak tanah dari suatu campuran hidrokarbon. *n*-Heksana bersifat mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, larut dalam alcohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa non-polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, alkaloid dan fenil propanoid dapat tersari oleh pelarut *n*-heksana.

D. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif maupun kuantitatif. Pemisahan senyawa campuran pada Kromatografi lapis tipis (KLT) didasarkan pada sifat polaritasnya. Kromatografi lapis tipis memiliki fase diam (padat atau cairan) dan fase gerak (cairan atau gas). Campuran dilarutkan dalam suatu cairan yang disebut fase gerak, yang membawanya melalui fase stasioner. Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen campuran. Berbagai konstituen campuran tersebut bergerak pada kecepatan yang berbeda, sehingga terjadi pemisahan. Perbedaan kecepatan merambat antara partikel-partikel zat dipengaruhi oleh kelarutan pelarut. Senyawa yang bersifat polar akan lebih mudah larut dan terbawa dalam pelarut polar, begitu pula sebaliknya. Pemisahan didasarkan pada partisi diferensial antara fase mobile dan stasioner.

Ada berbagai jenis kromatografi seperti kromatografi kolom, kromatografi kertas, dll. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik laboratorium yang

digunakan secara luas dan mirip dengan kromatografi kertas. Namun, menggunakan fase stasioner kertas, melibatkan fase diam dari lapisan tipis adsorben seperti silika gel, alumina, atau selulosa pada substrat inert yang datar. Fase diam tersebut memiliki keuntungan dari kecepatan berjalan lebih cepat dan pemisahan yang lebih baik. Senyawa individu dalam TLC ditandai oleh nilai Rf dan dinyatakan sebagai pecahan desimal. Rf dihitung dengan membagi jarak yang ditempuh senyawa dari posisi semula oleh jarak pelarut yang bergerak dari posisi semula (bagian depan pelarut). Adsorben yang berbeda akan memberikan nilai Rf yang berbeda untuk pelarut yang sama. Deteksi bercak dapat dilihat dengan bantuan UV 254 nm dan UV 366 nm atau menggunakan pereaksi khusus untuk senyawa tertentu. (Kumar *et al.* 2012).

E. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah kering, penggunaan sinar gelombang pendek seperti sinar-X, sinar α , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi. Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2008).

Sterilisasi pada alat dan bahan penelitian harus dilakukan terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi mikroba. Bahan-bahan yang terbuat dari kaca seperti tabung reaksi, beker glass dan cawan petri bisa disterilisasi menggunakan autoklav pada suhu 121°C selama 15 menit, atau bisa menggunakan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam. Peralatan seperti jarum ose disterilkan menggunakan pemijaran api. Sterilisasi inkas dapat menggunakan

formalin (Denyer *et al.* 2004). Lama waktu sterilisasi yang dibutuhkan bahan dipengaruhi oleh retensi mikroorganisme, dan enzim terhadap panas, kondisi pemanasan, pH bahan, ukuran wadah atau kemasan yang disterilkan serta keadaan fisik bahan (Machmud 2008).

F. Tinjauan *Staphylococcus aureus*

1. Sistematika bakteri

Kedudukan *Staphylococcus aureus* dalam sistematika klasifikasi bakteri menurut Garritty *et al* (2007) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2. Morfologi bakteri

Staphylococcus aureus merupakan kelompok bakteri Gram positif dengan susunan bakteri berbentuk bulat dengan diameter 0.71-1.2 μm . *Staphylococcus aureus* hidup dalam keadaan aerob atau mikro aerob pada suhu 37°C. *Staphylococcus aureus* tumbuh pada media padat seperti nutrient agar dengan koloni bergerombol menyerupai buah anggur berwarna keemasan atau putih mengkilap. dapat menyebabkan infeksi pada folikel rambut, bisul, luka dan abses (Gibson & Roberfroid 1995).

3. Patogenesis

Ciri khas infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah radang supuratif (bernanah) pada jaringan dan cenderung menyebabkan abses. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab terjadinya infeksi pada kulit, seperti bisul dan furunkulosis. Infeksi yang lebih serius mengarah pada pneumonia, mastitis, flebitis, meningitis dan infeksi saluran urin. Pneumonia yang disebabkan *Staphylococcus aureus* sering merupakan infeksi sekunder setelah

terpapar infeksi virus influenza. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab utama infeksi nosocomial akibat luka tindakan operasi dan pemakaian alat-alat perlengkapan perawatan di rumah sakit. Kontaminasi luka pasca bedah yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan komplikasi. (Radji 2011).

G. Antibiotik

1. Definisi antibiotik

Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat menghambat atau mematikan pertumbuhan mikroba dengan toksisitas yang relatif kecil bagi manusia (Tjay & Rahardja 2008).

2. Mekanisme kerja antibiotik

Mekanisme kerja antibiotik secara umum dibagi menjadi 5, yaitu: menghambat sintesis dinding sel, merusak struktur atau fungsi membran sel, menghambat sintesis protein, menghambat struktur dan fungsi asam nukleat dan memblokir jalur metabolisme utama (Talaro & Chess 2008; Madigan & Martinko 2006).

2.1. Menghambat sintesis dinding sel. Dinding sel pada bakteri berfungsi untuk mempertahankan bentuk pada bakteri, dan integritasnya sangat penting untuk kelangsungan hidup sel. Pada bakteri Gram positif dan Gram negatif, dinding sel terdiri dari lapisan peptidoglikan. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Peptidoglikan bertanggung jawab dalam menjaga tekanan osmotik pada lingkungan dan kondisi yang sulit. Peptidoglikan tersusun atas unit asam-N-asetilmuramat (MurNAc) dan asam-N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang dihubungkan oleh ikatan β -(1-4) (Bugg & Walsh 1992; Holtje 1998).

Biosintesis peptidoglikan dibagi menjadi 3 tahap, tahap pertama terjadi di sitoplasma dan mengarah pada sintesis prekursor terkait gula nukleotida UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide, (UDP-MurNAc-pentapeptide) dan UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). Tahap kedua berlangsung di membran sitoplasma dan terjadi sintesis prekursor lipid. Tahap ketiga berlangsung di sisi

luar membran sitoplasma, melibatkan polimerisasi unit disakarida-peptida yang baru disintesis dan terjadi penggabungan ke dalam peptidoglikan yang sedang tumbuh. Sintesis peptidoglikan dilakukan dengan bantuan aktivitas PBPs yang terdiri dari transglycosylase dan transpeptidases yang bertanggung jawab untuk pembentukan ikatan glikosidik dan peptida dari peptidoglikan (Dirk-Jan & Mariana 2005).

Antibiotik golongan glikopeptida mampu menghambat sintesis peptidoglikan dengan mengikat diri ke unit peptidoglikan dan memblokir aktivitas transglikosilase dan transpeptidase (Kahne *et al.* 2005). Penghambatan kedua enzim ini menyebabkan tidak terbentuknya peptidoglikan dikarenakan gagalnya penambahan disakarida pentapeptida untuk memperpanjang untaian glycan dari molekul peptidoglikan (Park & Uehara 2008).

2.2. Merusak struktur atau fungsi membran sel. Antibiotik yang merusak membran sel bakteri melibatkan aktivitas hidrolase murein (autolysins). Autolysins merupakan enzim bakteriolitik berperan dalam autolisis dan lisis (Vollmer *et al.* 2008). Penisilin menghambat biosintesis dinding sel bakteri yang pada akhirnya dapat membunuh mikroorganisme karena aktivasi enzim autolitik terus terbentuk dan menghancurkan lebih banyak peptidoglikan daripada yang dapat dibuat (Tomasz *et al.* 1970).

2.3. Menghambat sintesis protein. Protein bertanggung jawab sebagai penyusun struktural, proses metabolisme dan fisiologis, dan respon terhadap kondisi yang merugikan. Namun, jenis dan jumlah protein yang dihasilkan oleh bakteri pada waktu tertentu tergantung pada informasi yang terkandung dalam Deoxyribonucleic acid (DNA). Informasi DNA dapat berupa sekumpulan kode genetik yang disebut kodon. Pada sintesis protein, DNA mengalami replikasi menghasilkan Ribonucleic acid (RNA), khususnya messenger RNA (mRNA). Biomolekul ini bersama dengan Transfer RNA (tRNA) bergerak ke ribosom untuk proses sintesis protein dalam sel hidup. tRNA memfasilitasi penerjemahan urutan kodon ke urutan asam amino yang merupakan blok pembangun protein (Etebu 2013).

Terjemahan mRNA menjadi protein terjadi selama tiga fase berurutan (inisiasi, elongasi dan terminasi) yang melibatkan ribosom dan sejumlah faktor aksesori sitoplasma (Gualerzi *et al.* 2000). Ribosom terdiri dari RNA dan protein, dan umumnya disebut ribonucleoprotein. Komponen RNA yang disebut sebagai Ribosomal RNA (rRNA), dan terdiri dari dua subunit, satu subunit kecil (SSU) dan subunit besar lainnya (LSU) (Nissen *et al.* 2000). Bakteri memiliki gen 5S, 16S dan 23S pada rRNA mereka (Moore 2001). Gen 16S rRNA berada sebagai gen RNA tunggal di subunit kecil (SSU), sementara dua gen rRNA lainnya (23S dan 5S) terjadi pada subunit besar (LSU) dari ribosom bakteri (Lafontaine & Tollervey 2001).

Antibiotik golongan oxazolidinones menghambat sintesis protein dengan menghalangi fase inisiasi pada tahap translasi (Patel *et al.* 2001) sementara makrolida seperti lincosamide dan streptogramin menghambat penerjemahan mRNA pada fase elongasi (Vannuffel & Cocito 1996).

2.4. Menghambat struktur dan fungsi asam nukleat. Asam nukleat (nukleotida) merupakan salah satu molekul biokimia yang terdapat di dalam DNA dan RNA. Asam nukleat menyimpan informasi genetik yang diperlukan dalam sintesis protein baru. Gangguan sintesis asam nukleat menyebabkan terjadinya kegagalan ekspresi gen sehingga bertentangan dengan kelangsungan hidup sel bakteri. Penghambatan sintesis asam nukleat dapat berupa penghambatan replikasi dan transkripsi (Gale *et al.* 1981).

Antibiotik golongan kuinolon mengganggu fungsionalitas enzim helikase sehingga pembukaan untai ganda DNA pada tahap replikasi tidak terjadi (Chen *et al.* 1996). Antibiotik rifampisin bekerja menghambat sintesis mRNA melalui penghambatan RNA polimerase yang menyebabkan kematian sel pada proses transkripsi (Campbell *et al.* 2001).

2.5. Menghambat jalur metabolisme utama. Penghambatan terhadap jalur metabolisme utama terjadi dengan adanya substansi kompetitor berupa antimetabolit yang memiliki struktur mirip dengan substrat enzim metabolisme. Beberapa antibiotik seperti sulfonamid dan trimetoprim bekerja sebagai substrat palsu yang berkompetisi dengan substrat normal. Penipuan ini menyebabkan

penempelan antibiotik pada enzim bakteri daripada substrat normal. Struktur sulfonamida mirip seperti tetrahidrofolat yang diperlukan untuk sintesis asam folat dalam sel bakteri. Asam folat berfungsi dalam metabolisme asam nukleat dan asam amino. Sulfonilamid yang meniru substrat yang diperlukan untuk metabolisme asam folat menyebabkan terhambatnya produksi asam nukleat (DNA dan RNA) dan asam amino (Talaro & Chess 2008).

3. Ciprofloxasin

Ciprofloxasin merupakan antibiotik golongan quinolon. Mekanisme kerja dari ciprofloxasin dengan menghambat DNA-gyrase yang berperan dalam menurunkan tegangan permukaan sehingga pada saat proses replikasi, untai DNA dapat terbuka. Apabila enzim gyrase dihambat, maka akan menyebabkan terhambatnya proses replikasi DNA (Al-Omar 2005).

H. Media

Media terdiri dari suatu bahan atau campuran bahan yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba. Media yang digunakan harus mengandung semua nutrisi yang diperlukan mikroba, mempunyai tekanan osmosa dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba, tidak mengandung zat-zat penghambat dan harus berada dalam keadaan steril sebelum digunakan (Suryono 1995).

Berdasarkan sifat wujudnya, media dibagi dalam bentuk cair, semi padat dan padat. Media cair adalah media yang berbentuk cairan, media semi padat dalam keadaan panas berbentuk cair yang pada keadaan dingin berbentuk padat. Media padat dibuat dengan penambahan agar yang diperoleh dari bahan organik alamiah seperti kentang, alga/ganggang yang berfungsi sebagai bahan pematat (Sutedjo & Mulyani 1996).

1. Brain-Heart Infusion (BHI)

Brain-Heart Infusion (BHI) adalah media cair untuk penyubur berbagai macam bakteri. Bahan utama media ini terdiri dari beberapa jaringan hewan, pepton, buffer fosfat dan sedikit dekstrosa. Penambahan karbohidrat memungkinkan bakteri dapat menggunakan sumber energi (Atlas 2004).

2. *Mueller Hinton Agar (MHA)*

Media MHA adalah media terbaik untuk pemeriksaan uji sensitivitas bakteri menggunakan metode *Kirby-Bauer* pada bakteri nonfastidious baik aerob maupun aerob fakultatif. Media ini ditemukan oleh Mueller dan Hinton tahun 1941, pada awalnya media MHA digunakan untuk mengisolasi bakteri *Neisseria sp.* Komposisi media MHA adalah beef extract 2 g, acid hydrolysate of casein 17,5 g, starch 1,5 g, agar 17 g, dan aquadest 1 liter. Semua bakteri dapat tumbuh karena media ini bukan merupakan media selektif dan media differensial. Mengandung starch (tepung padi) yang berfungsi untuk menyerap racun yang dikeluarkan bakteri, sehingga tidak mengganggu antibiotik.

3. *Vogel Johnson Agar (VJA)*

Vogel Johnson Agar (VJA) merupakan media selektif untuk mendeteksi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mengidentifikasi koagulase dan fermentasi mannitol strain. Pepton merupakan sumber karbon, nitrogen, vitamin dan mineral. Penghambatan organisme nonstaphylococcal dicapai dengan kalium yang menghambat beberapa jenis spesies Gram positif dan Gram negatif oleh lithium klorida dan glisin. *Staphylococcus aureus* mengubah tellurite kalium ke tellurite logam dan menyebabkan koloni pertumbuhan menjadi hitam. Fermentasi mannitol ditunjukkan zona kuning di sekitar koloni hitam dan mengubah warna merah menjadi kuning (Hadietomo 1993).

I. Uji Aktivitas Bakteri

1. Metode difusi

Metode difusi berguna untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk disekitar obat berupa zona jernih yang dianggap sebagai ukuran daya hambat suatu senyawa antibakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode silinder dilakukan dengan difusi antibiotik secara tegak lurus dari silinder pada lapisan media agar dalam cawan petri (Mohammadzadeh *et al.* 2012). Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang pada media agar yang sudah diinokulasikan bakteri. Kelebihan metode sumuran yaitu memudahkan dalam

pengukuran zona hambat. Zona hambat yang terbentuk oleh isolat tidak hanya di permukaan media, tetapi juga sampai ke bagian dasar media. Metode cakram kertas dilakukan dengan menjenuhkan bahan uji ke dalam kertas cakram. Cakram kertas yang sudah jenuh ditanam pada media yang telah diinokulasi bakteri. Kelebihan metode ini dapat dilakukan pengujian secara lebih banyak dalam satu kali kegiatan dan tidak terlalu memerlukan tenaga yang banyak. Beberapa faktor yang mempengaruhi metode tersebut diantaranya, ketebalan media, macam media, inoculum, laju difusi bahan antibakteri, suhu inkubasi dan pH (Listari 2009; Bonang & Koeswardono 1982).

2. Metode dilusi

Metode dilusi bertujuan untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM). Metode ini dilakukan dengan mengencerkan bahan antibakteri sehingga didapatkan berbagai variasi konsentrasi. Masing-masing konsentrasi diujikan ke bakteri selama 18-24 jam dan ditentukan nilai KHM dan KBM (Bonang & Koeswardono 1982; Mohammadzadeh *et al.* 2012). Metode ini memiliki kelebihan yaitu hasil data yang diperoleh lebih akurat karena pengamatan dan pengukuran dilakukan dengan spektrofotometri, tetapi metode ini memerlukan waktu pengujian yang relatif lebih lama dan pengujian yang kurang praktis (Jawetz 1986).

J. Landasan Teori

Beras hitam merupakan tanaman yang mudah ditemui di Indonesia mengingat fungsinya sebagai bahan pangan. Beras hitam diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Tan, Mayulu, & Kawengian 2016), antiinflamasi (Hartati 2016), antidiabetes (Wardani 2010) dan antikanker (Hui *et al.* 2010). Kandungan senyawa terbesar dalam beras hitam adalah flavonoid. Selain itu juga terdapat golongan senyawa alkaloid dan tanin.

Penelitian aktivitas antibakteri berbagai macam beras berpigmen yang dilakukan oleh Pornpan & Natthanej (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol beras hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan nilai KHM 125 µg/ml dan KBM 250 µg/ml. Pada beras ketan hitam, beras merah

dan beras coklat memiliki nilai KHM 250 µg/ml dan KBM 500 µg/ml. Aktivitas antibakteri diketahui berasal dari senyawa utama tumbuhan, yaitu alkaloid, flavonoid dan tannin.

Mekanisme senyawa flavonoid sebagai antibakteri dengan merusak membran sitoplasma sehingga mengakibatkan kebocoran metabolit penting, nukleotida dan asam amino merembes keluar, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri (Volk *et al.* 1998). Senyawa flavonoid kebanyakan aktif melawan bakteri Gram positif daripada Gram negatif. Hal tersebut dikarenakan pada membran sel bakteri Gram negatif tersusun atas lapisan lipopolisakarida sebagai pertahanan diri dan menghalangi masuknya senyawa antibakteri. Senyawa alkaloid dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan karena dinding sel bakteri tidak terbentuk sempurna (Cowan 1999). Senyawa tanin dapat mengerutkan dinding sel bakteri mengakibatkan permeabilitas sel terganggu, sehingga pertumbuhan bakteri dapat dihambat (Jones *et al.* 1994).

Pemisahan senyawa menggunakan metode fraksinasi dilakukan untuk memisahkan komponen senyawa berdasarkan perbedaan sifat kepolaran pelarut. Senyawa non polar dapat dipisahkan dengan menggunakan pelarut non polar seperti *n*-heksana, senyawa semi polar dapat dipisahkan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Senyawa polar dapat dipisahkan dengan menggunakan pelarut air. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa seperti sterol, fenil propanoid, alkaloid dan triterpenoid (Robinson 1995). Etil asetat dapat melarutkan senyawa golongan flavonoid dan senyawa-senyawa fenolik seperti fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antrakuinon dan xanton (Harbone 2006). Air merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar seperti garam alkaloid, tanin, gula, lilin, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode dilusi menggunakan senyawa antibakteri dengan kadar yang menurun dan bertahap menggunakan media cair. Media cair ditambahkan suspensi bakteri dan bahan yang akan diuji aktivitas antibakterinya. Kemudian ditentukan konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat dan mematikan bakteri uji. Metode difusi merupakan salah satu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan suatu cakram

atau silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu yang ditempatkan pada kultur bakteri. Metode difusi bertujuan untuk menentukan fraksi yang paling aktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Zona hambat jernih dianggap sebagai ukuran kekuatan senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Jawetz *et al.* 2007). Fraksi etil asetat dimungkinkan merupakan fraksi dengan aktivitas antibakteri teraktif dikarenakan pada fraksi semi polar dapat menyari berbagai macam senyawa seperti flavonoid, tanin dan alkaloid. Senyawa tersebut memiliki mekanisme berbeda-beda dalam menghambat antibakteri sehingga dapat memperkuat aktivitas antibakteri. Pada metode dilusi digunakan untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh minimum (KBM). Prinsip metode dilusi adalah dengan pengenceran sehingga didapatkan beberapa macam konsentrasi.

K. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori di atas, hipotesis dalam penelitian ini adalah:

Pertama, ekstrak dan fraksi dari ekstrak etanol beras hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat dari beras hitam merupakan fraksi yang teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, dapat ditentukan konsentrasi KHM dan KBM fraksi teraktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.