

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman stevia

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi tanaman stevia menurut Depkes RI (2000) sebagai berikut:

- Divisio : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Bangsa : Asterales
- Suku : Compositae
- Marga : Stevia
- Jenis : *Stevia rebaudiana* Bertonii M.



Gambar 1. Tanaman stevia

2. Morfologi dan habitat

Tanaman stevia termasuk ke dalam famili Compositae yang merupakan tanaman perdu dengan tinggi 60-90 cm. Tanaman ini memiliki batang bulat, berbulu, beruas, tegak, dan bercabang banyak. Daunnya berwarna hijau, berhadapan tunggal dan tebal, berbentuk lonjong dengan ujung tumpul, pangkal

runcing, tepi daun bergerigi, pertulangan menyirip, permukaannya berbulu halus, dan bertangkai pendek. Bunga stevia berada di ujung dan di ketiak daun. Mahkota bunga berbentuk terompet, mejemuk, dan berwarna putih. Kelopak bunga berbentuk tabung, berbulu, berbagi lima, dan berwarna hijau. Tangkai benang sari putih pendek, kepala sari kuning, dan putik berbentuk silindris. Tanaman ini memiliki sistem perakaran tunggang, halus, dekat dengan permukaan tanah, berwarna putih kotor, tebal, rapat dan kasar tumbuh menembus ke dalam tanah (Ulung 2014 & Depkes RI 2000).

Tanaman stevia cocok tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah-daerah yang mempunyai ketinggian 500-1000 meter dari permukaan laut, suhu udara antara 14°C-27°C. Tanaman ini menghendaki tempat yang terbuka atau cukup mendapat sinar matahari (Rukmana 2003).

3. Kandungan kimia

Kandungan kimia yang terdapat pada daun stevia adalah gula steviosida dan rebaudiosida-A (glikosida diterpen), protein, serat, karbohidrat, fosfor, kalium, kalsium, magnesium, natrium, besi, vitamin A, C dan minyak. Hasil skrining fitokimia daun stevia pada penelitian Siddique *et al.* (2014), menunjukkan kandungan yang melimpah pada daun tersebut yaitu alkaloid, steroid, tanin, saponin dan flavonoid.

Alkaloid merupakan golongan senyawa organik bahan alam yang terbesar jumlahnya, baik dari segi jumlah maupun sebarannya. Alkaloid didefinisikan sebagai golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen, dan biasanya dalam bentuk cincin heterosiklik. Alkaloid mempunyai aktivitas fisiologi yang menonjol dan sering digunakan secara luas dalam bidang pengobatan, seperti penolak nyamuk dan antibakteri (Paramawati & Dumilah 2016). Sifat fisiko-kimia yang bersifat semipolar dan mampu berinteraksi dengan membran sel. Kontribusi atom N di dalam struktur memberikan efektifitas interaksi kimiawi dengan reseptor (Saifudin 2014). Alkaloid dapat memberikan rasa pahit (Ernawati 2016). Alkaloid sebagai antibakteri memiliki mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan sel lisis dan kematian pada bakteri (Amalia *et al.* 2014).

Steroid merupakan golongan senyawa dengan struktur kimia yang memiliki empat buah cincin, yaitu cincin siklopentanoperhidrofenantrena. Cincin siklopentanoperhidro-fenantrena merupakan kombinasi antar lingkaran siklopentana dan perhidrofenantrena (fenantrena jenuh). Kelompok steroid yang telah banyak diketahui sifat dan peranannya adalah sterol, asam empedu, hormon kelamin, hormon korteks adrenal, dan prazat vitamin antirakitik (Sumardjo 2008). Steroid juga memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Steroid akan berinteraksi dengan membran fosfolipid yang bersifat permeabel, menyebabkan keutuhan membran menurun dan morfologi membran sel berubah sehingga sel rapuh dan lisis (Sapara *et al.* 2016).

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol dari kelompok flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan kuat, antiperadangan dan antikanker (Yuliarti 2009). Tanin mempunyai rasa sepat dan memiliki khasiat sebagai antibakteri (Anggraini *et al.* 2017). Konsumsi makanan yang mengandung tanin sebaiknya tidak berlebihan karena tanin memiliki kemampuan untuk berikatan dengan protein dan zat besi, sehingga kedua zat tersebut akan menjadi kurang tersedia di dalam tubuh (Astawan & Kasih 2008). Sebagai antibakteri, tanin bekerja dengan cara menonaktifkan molekul yang menempel pada sel inang yang terdapat pada permukaan sel bakteri, dan mampu menghambat enzim transport protein melalui dinding sel (Romas *et al.* 2015).

Saponin merupakan golongan senyawa glikosida kompleks yaitu senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non-gula (aglikon) (Paramawati & Dumilah 2016). Saponin berfungsi sebagai bahan pembuih dan hemolitik, serta mempunyai rasa pahit (Makfoeld *et al.* 2002). Saponin berfungsi sebagai antibakteri dengan cara meningkatkan tegangan permukaan pada dinding sel bakteri. Dinding sel akan mengalami peregangan yang sangat kuat dan kemudian mengakibatkan kerusakan dinding sel, dan pada akhirnya sel bakteri lisis (Romas *et al.* 2015).

Flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar 15 atom karbon, terdiri

dari 2 cincin benzena yang terikat pada suatu rantai propana, sehingga membentuk susunan C₆-C₃-C₆. Flavonoid telah menunjukkan perannya sebagai antioksidan, antimutagenik, antineoplastik, dan vasodilator (Yuslianti 2018). Flavonoid juga memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga merusak dinding sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Sani *et al.* 2017).

4. Manfaat tanaman

Daun stevia dapat digunakan sebagai alternatif dalam pembuatan gula alami rendah kalori atau non kalori, karena daun stevia memiliki steviosida yang dapat memberikan rasa manis 250-300 kali lebih manis dari gula. Keunggulan lain dari pemanis alami ini adalah tidak memiliki sifat karsinogenik sehingga aman dikonsumsi, selain itu juga digunakan sebagai pengganti gula pada penderita diabetes. Tanaman ini juga memiliki efek kariostatik, yaitu dapat mengurangi dan menghambat timbulnya karies gigi (infeksi yang merusak struktur gigi dan menyebabkan gigi berlubang) (Ulung 2014).

Daun stevia juga terbukti dapat membunuh beberapa bakteri, di antaranya adalah *Escherchia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* serta menghambat infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain seperti *Corynebacterium diphtheriae* serta jamur *Candida albicans* (Ulung 2014). Sumber lain menyebutkan manfaat lain dari daun stevia, yaitu mengatasi hipertensi, mengurangi peradangan dan melangsingkan tubuh karena gula yang dikandung bersifat non kalori (Murtie 2014).

B. Simplisia

1. Pengertian

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apa pun, dan jika tidak dinyatakan atau disebutkan lain, simplisia merupakan bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat tanaman.

Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu dikeluarkan oleh selnya (Suharmiati & Maryani 2004).

Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagian hewan, atau zat-zat yang berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Suharmiati & Maryani 2004).

2. Pengumpulan bahan baku

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda, antara lain tergantung pada bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman saat panen, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh (Suharmiati & Maryani 2004).

3. Sortasi basah

Sortasi perlu dilakukan untuk membuang bahan lain yang tidak berguna atau berbahaya. Bahan yang dibuang misalnya rumput, kotoran binatang, bagian tanaman yang busuk, dan benda lain yang dapat mempengaruhi kualitas simplisia (Suharmiati & Maryani 2004).

4. Pencucian

Agar bahan baku bersih dan bebas dari tanah atau kotoran yang melekat, maka perlu dilakukan pencucian. Air yang digunakan untuk pencucian bisa menggunakan air PDAM, air sumur, atau air sumber yang bersih. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air, sebaiknya dicuci sesingkat mungkin (Suharmiati & Maryani 2004).

5. Pengeringan

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik bisa mencegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Air yang masih tersisa dalam simplisia dengan kadar tertentu, merupakan media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya. Enzim tertentu dalam sel masih dapat bekerja menguraikan senyawa aktif sesaat setelah sel mati dan selama bahan

simplisia tersebut masih mengandung sejumlah kadar air (Suharmiati & Maryani 2004).

Pengeringan simplisia dilakukan menggunakan sinar matahari atau menggunakan alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan. Pengeringan bahan simplisia tidak dianjurkan menggunakan alat atau bahan yang terbuat dari plastik, karena plastik tidak menyerap air (Suharmiati & Maryani 2004).

6. Sortasi kering

Sortasi setelah pengeringan merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuannya adalah untuk memisahkan benda-benda asing, seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih ada dan tertinggal. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dibungkus atau dikemas dan disimpan (Suharmiati & Maryani 2004).

7. Penyimpanan

Tujuan penyimpanan adalah untuk melindungi agar simplisia tidak rusak atau berubah mutunya karena beberapa faktor, baik dari dalam maupun dari luar, seperti cahaya, oksigen, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, kotoran atau serangga. Simplisia disimpan di tempat yang kering, tidak lembab, dan terhindar dari sinar matahari langsung (Suharmiati & Maryani 2004). Persyaratan wadah yang digunakan yaitu tidak beracun, mampu melindungi bahan simplisia dari cemaran mikroba, kotoran, maupun serangga, mampu melindungi bahan simplisia dari penguapan kandungan aktif, serta melindungi bahan simplisia dari pengaruh cahaya, oksigen dan uap air (Gunawan & Mulyani 2004).

8. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan derajat kehaluan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus. Derajat kehalusan serbuk simplisia untuk

pembuatan ekstrak merupakan serbuk simplisia halus, kecuali dinyatakan lain (Kemenkes RI 2013).

Tabel 1. Klasifikasi serbuk berdasarkan derajat halus (Kemenkes RI 2013)

Nomor Pengayak	Ukuran (μm)	Untuk mendapat derajat kehalusan
8	2360	Serbuk sangat kasar
20	850	Serbuk kasar
40	425	Serbuk agak kasar
60	250	Serbuk halus
80	180	Serbuk sangat halus

C. Ekstrak

1. Pengertian

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair yang dibuat dengan cara mengambil sari simplisia menurut cara yang tepat dan ada di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Sudewo 2009). Ekstak merupakan campuran yang sangat kompleks dan di dalamnya terkandung puluhan bahkan ratusan komponen senyawa organik, tergantung karakteristik bahan (Haryoto & Priyatno 2018).

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih senyawa-senyawa (analit) dari suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai. Prinsip pemisahan didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu (Leba 2017).

3. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Proses tersebut berulang hingga mencapai keseimbangan antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Depkes RI 1986).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin dan sitrak. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain. Cairan penyari yang

menggunakan air, untuk mencegah tumbuhnya kapang dapat ditambahkan bahan pengawet yang diberikan di awal penyarian (Depkes RI 1986).

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk berulang-ulang. Setelah 5 hari diserukai, ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan diserukai, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup, dibiarkan di tempat sejuk yang terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian endapan dipisahkan (Depkes RI 1986).

Proses pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan, sehingga tetap terjaga derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dan di luar sel. Hasil penyarian perlu dibiarkan selama waktu tertentu untuk mengendapkan zat-zat yang tidak diperlukan tetapi ikut terlarut dalam cairan penyari seperti lilin. Keuntungan ekstraksi dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaan lama dan penyariannya kurang sempurna (Depkes RI 1986).

4. Fraksinasi

Ekstrak yang diperoleh masih kompleks kandungannya, maka perlu dilakukan fraksinasi atau ekstraksi cair-cair dari ekstrak berdasarkan tingkat polaritasnya, yaitu non polar, semi polar dan polar (Saifudin 2014). Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair ini melibatkan ekstraksi analit dari fasa air ke dalam pelarut organik yang bersifat non polar atau agak polar seperti heksana, metilbenzene atau diklorometan. Senyawa yang mudah terekstraksi dalam pelarut organik adalah molekul-molekul netral yang dapat berinteraksi dengan pelarut yang bersifat non polar atau agak polar, sedangkan senyawa yang mudah mengalami ionisasi akan tertahan pada fasa air (Leba 2017).

Pada ekstraksi cair-cair, alat yang digunakan adalah corong pisah. Corong pisah adalah alat yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam suatu campuran antara dua fasa pelarut dengan densitas atau massa jenis yang berbeda yang tidak saling campur. Corong pisah yang digunakan di laboratorium

terbuat dari kaca borosilikat dan krannya terbuat dari kaca atau teflon. Ukuran corong pisah bervariasi antara 50 mL sampai 3 L (Leba 2017).

5. Pelarut

Cairan pelarut dalam proses ekstraksi adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat, sehingga senyawa tersebut dapat terpisahkan dari senyawa lain. Dalam hal ekstrak total, maka cairan penyari dipilih yang melarutkan hampir semua kandungan metabolit sekunder (Depkes RI 2000). Pemilihan pelarut yang akan dipakai dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya (Septiana & Asnani 2012).

Etanol merupakan pelarut polar yang mampu menyari sebagian besar kandungan kimia simplisia (Nihayati 2016). Pelarut ini biasa digunakan untuk ekstraksi awal simplisia, baik murni atau dicampur dengan air (Saifudin 2014). Pelarut etanol dapat menembus dinding sel daun dengan baik, sehingga proses penyarian kandungan kimia dari dalam sel dengan pelarut ini lebih direkomendasikan (Nihayati 2016). Menurut Tiwari *et al.* (2011), etanol dapat menyari golongan senyawa seperti tanin, polifenol, flavonol, terpenoid, sterol, dan alkaloid.

n-Heksana merupakan pelarut yang bersifat non polar dan mudah menguap, sehingga ekstrak dapat dengan mudah diperoleh (Agustina *et al.* 2018). Penelitian Agustina *et al.* (2018) menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana mampu menyari golongan senyawa steroid dan triterpenoid.

Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa seperti aglikon flavonoid. Etil asetat bersifat volatil, tidak beracun dan tidak higroskopis (Purwanto 2015). Penelitian Firdiyani *et al.* (2015) menunjukkan bahwa pelarut etil asetat dapat menyari golongan senyawa fenolik, terpenoid, steroid, dan flavonoid. Penelitian lain yang dilakukan Wati *et al.* (2017), golongan metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi etil asetat yaitu senyawa alkaloid, fenolik dan flavonoid.

Air merupakan pelarut polar yang dapat menarik golongan senyawa polar seperti antosianin, tanin, saponin, polipeptida, dan juga pati (Tiwari *et al.* 2011). Air sebagai cairan penyari memiliki keuntungan yaitu murah, mudah diperoleh, stabil, tidak beracun, tidak mudah menguap, dan tidak mudah terbakar. Kerugiannya adalah ekstrak yang didapat mudah ditumbuhi kapang (Sa'adah & Nurhasnawati 2015).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan kromatografi dengan fase diam berupa lapisan tipis suatu adsorben (misalnya gel silika) yang dilapiskan pada lempeng dan fase gerak berupa campuran pelarut. Sampel diaplikasikan pada lempeng, kemudian diletakkan berdiri dengan ujung bawahnya mengenai fase gerak. Komponen sampel akan terbawa dalam fase gerak yang merambat ke atas dengan kecepatan yang berbeda karena adanya gaya kapiler pada fase diam (Sumawinata 2004). Evaluasi lempeng KLT dapat dilakukan secara langsung maupun dengan instrumen. Noda yang berwarna dapat dilihat dengan visualisasi langsung pada lempeng KLT menggunakan cahaya matahari, atau dapat dibantu dengan sinar ultraviolet yang memberikan pencahayaan pada panjang gelombang tertentu. Noda yang tidak berwarna dapat dilakukan dengan cara penyemprotan atau pencelupan ke dalam pereaksi penampak noda (Wulandari 2011).

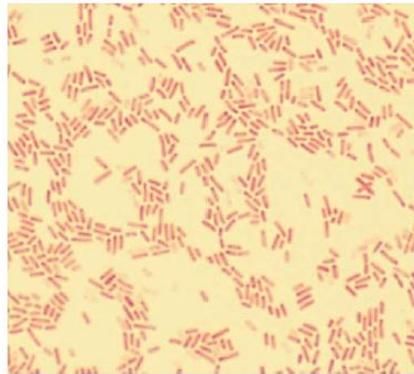
KLT memiliki kelebihan yaitu analisis berupa sampel dapat dilakukan secara simultan dengan menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya, serta lebih ramah lingkungan. Metode pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal (Wulandari 2011). Kekurangannya yaitu, metode ini tidak efektif untuk skala besar karena akan memerlukan banyak lempeng KLT, sehingga biaya menjadi mahal (Kumalasari *et al.* 2018).

E. Bakteri Uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1. Sistematika bakteri

Klasifikasi bakteri *P. aeruginosa* sebagai berikut:

- Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Classis : Gamma Proteobacteria
Ordo : Pseudomonadales
Familia : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Species : *Pseudomonas aeruginosa* (Kaushik & Chauhan 2009).



Gambar 2. Pewarnaan Gram bakteri *P. aeruginosa*
(Jawetz *et al.* 2013)

2. Morfologi dan sifat

Bakteri *P. aeruginosa* berbentuk batang dengan ukuran $0,5-0,8 \times 1,3-3,0 \mu\text{m}$. Bakteri ini tampak dalam bentuk tunggal, berpasangan, dan kadang-kadang berantai pendek. *P. aeruginosa* bergerak dengan satu flagela polar (sel-sel dengan dua flagela atau lebih jarang didapat) (Sastrahidayat 2015). Bakteri ini memiliki pigmen piosianin berwarna biru dan pigmen pioverdin berwarna hijau, sehingga menimbulkan warna koloni biru kehijauan (Murwani 2015). Pigmen tersebut terlarut dan dapat menyebar pada medium *Pseudomonas Agar P* (PAP) (Radji 2010).

P. aeruginosa adalah bakteri Gram-negatif, aerob yang merupakan flora normal pada kulit manusia (Bahmani *et al.* 2016). *P. aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik yang menginfeksi individu dengan *immunocompromised*

(sistem imun lemah), terutama pada pasien AIDS, sistik fibrosis, dan pasien kemoterapi (Mabhiza *et al.* 2016).

3. Patogenesis

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan penyebab umum infeksi luka bakar, dibentuk melalui kolonisasi bakteri pada luka bakar oleh flora normal kulit pasien sendiri atau dari lingkungan (Gillespie & Hawkey 2006). *P. aeruginosa* dapat masuk ke luka bakar, kulit yang rusak, atau lapisan mukosa menggunakan flagela dan pili, lalu memperbanyak diri untuk menginfeksi. Eksotoksin dan endotoksin yang dilepaskan oleh *P. aeruginosa* akan terus menyebabkan peradangan yang membahayakan, walaupun sudah diterapi dengan antibiotik (Mabhiza *et al.* 2016). Pasien luka bakar yang terinfeksi oleh *P. aeruginosa* memiliki tingkat kematian yang tinggi (Gillespie & Hawkey 2006).

F. Antibakteri

1. Pengertian

Antibakteri merupakan substansi kimia yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme, pada konsentrasi rendah mampu menghambat atau membunuh mikroorganisme lain (Harti 2015). Obat yang dapat digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik pada manusianya (Gunawan 2009).

2. Mekanisme kerja

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam lima kelompok yaitu:

2.1 Menghambat metabolisme sel. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila antibakteri menang melawan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Dihidrofolat harus diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu asam tetrahidrofolat. Enzim dihidrofolat reduktase

yang berperan dihambat oleh antibakteri, sehingga asam dihidrofolat tidak dapat direduksi menjadi asam tetrahidrofolat yang fungsional (Gunawan 2009).

2.2 Menghambat sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan, yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antibakteri menghambat reaksi yang paling awal dari proses sintesis dinding sel dan menghambat reaksi terakhir (transpeptidasi) dalam rangkaian reaksi tersebut. Tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi daripada di luar sel, maka kerusakan dinding sel kuman akan menyebabkan terjadinya lisis yang merupakan efek bakterisidal pada kuman yang peka (Gunawan 2009).

2.3 Mengganggu keutuhan membran sel. Antibakteri dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba, atau bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Gunawan 2009).

2.4 Menghambat sintesis protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Pada sintesis protein, kedua komponen tersebut akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S (Gunawan 2009).

Antibakteri dapat berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Rantai polipeptida tersebut tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Mekanisme lainnya yaitu antibakteri berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino. Mekanisme yang terakhir, antibakteri berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase (Gunawan 2009).

2.5 Menghambat sintesis asam nukleat. Antibakteri berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada *sub unit*), sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Penghambatan enzim DNA girase pada kuman yang

fungainya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa cukup dalam sel kuman yang kecil (Gunawan 2009).

3. Metode uji

Pengujian aktivitas antibakteri secara *in-vitro* dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu:

3.1 Metode difusi. Metode ini disebut juga *disk-diffusion method* atau *Kirby-Bauer test* (Harti 2015). Prinsipnya adalah menetapkan kerentanan organisme terhadap antibakteri dengan menginokulasi biakan pada media agar dan membiarkan antibakteri berdifusi ke dalam media tersebut. Efektifitas antibakteri ditunjukkan oleh zona hambat. Zona hambat tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris. Ukuran zona hambatan dapat dipengaruhi oleh kepadatan media biakan, kecepatan difusi antibakteri, konsentrasi antibakteri, dan sensitivitas organisme terhadap antibakteri (Harmita & Radji 2008). Metode difusi mewakili prosedur sederhana untuk menyelidiki zat dalam menentukan apakah zat tersebut signifikan dan mempunyai aktivitas antibakteri yang berguna (Harmita & Radji 2008).

3.2 Metode dilusi. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan KHM dan KBM suatu antibakteri. Prosedur metode dilusi dilakukan dengan medium cair (*broth*) (Yanuhar 2016).

Bahan antibakteri yang akan diujikan dalam berbagai konsentrasi cair dan setelah dicampur volumenya tidak lebih dari 2 mL. Tabung kontrol pertumbuhan (kontrol positif) adalah sejumlah inokulum awal bakteri tanpa bahan antibakteri. Kontrol tidak ada pertumbuhan (kontrol negatif) adalah larutan bahan uji tanpa inokulum. Tabung yang telah diinkubasi, semuanya diamati terjadi kekeruhan atau tidak. Konsentrasi terendah dari bahan yang menghambat bakteri, dilihat dari tidak adanya kekeruhan (dibandingkan dengan kontrol negatif) ditentukan sebagai KHM (Yanuhar 2016).

KHM mengukur kemampuan bahan antibakteri untuk menghambat perbanyakan bakteri, sehingga apabila bahan ini dihilangkan maka bakteri dapat tumbuh kembali. Pengukuran KBM dari hasil uji dilusi tabung tersebut diteruskan

dengan melakukan inokulasi pada medium agar padat. Sejumlah volume tertentu (biasanya 0,1 mL) dari tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan, diinokulasi pada medium agar padat (Yanuhar 2016).

G. Medium

Medium merupakan substrat atau dasar makanan yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Pengertian lain dari medium adalah bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di atas atau di dalamnya. Kebutuhan dasar nutrisi bagi mikroorganisme meliputi air, karbon, energi, mineral, dan faktor tumbuh (Lestari & Hartati 2006). Medium pertumbuhan dapat berbentuk cair (*broth*), padat (*agar*), atau semisolid. Pertumbuhan bakteri pada media cair ditandai dengan kekeruhan media, sedangkan media padat ditandai dengan terbentuknya koloni. Media semisolid umumnya digunakan untuk melihat motilitas bakteri (Murwani 2015).

Syarat medium agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang baik di dalam media yaitu mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba, memiliki tekanan osmosa, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Sebagian besar bakteri tumbuh dengan baik pada pH 7, maka medium dibuat antara pH 6,8-7, sedangkan medium untuk bakteri patogen sekitar 7,3. Media juga harus steril, tidak ditumbuhi mikroba yang dimaksud ataupun mikroorganisme lain yang tidak diharapkan (Lestari & Hartati 2006).

H. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu proses dengan metode tertentu yang dapat memberikan hasil akhir, yaitu suatu bentuk keadaan tidak dapat ditunjukkan lagi adanya mikroorganisme hidup. Sterilisasi memiliki beberapa metode, yaitu metode uap panas bertekanan tinggi, metode panas kering, dan metode gas kimia. Prinsip metode uap panas bertekanan tinggi adalah uap panas pada suhu, tekanan, dan waktu paparan tertentu mampu membunuh mikroba dengan cara denaturasi protein dari enzim dan membran sel. Sterilisator metode ini disebut *autoclave*. Metode ini

banyak digunakan karena aman, cukup efektif, serta mudah dalam pengoperasiannya (Darmadi 2008).

Metode panas kering melalui mekanisme konduksi, panas akan diabsorpsi oleh permukaan dari peralatan yang disterilkan. Lalu merambat ke bagian yang lebih dalam dari peralatan tersebut sampai suhu untuk sterilisasi merata. Mikroba terbunuh dengan cara oksidasi, yaitu protein mikroba mengalami koagulasi. Sterilisasi ini masih banyak digunakan, operasinya mudah namun memerlukan energi yang lebih besar (Darmadi 2008).

Metode gas kimia dengan etilen oksida, mikroba dibunuh melalui reaksi kimia yaitu reaksi alkilasi. Pada reaksi ini terjadi penggantian atom hidrogen pada sel mikroba dengan gugus alkil, sehingga metabolisme dan reproduksi sel terganggu. Gas etilen oksida cukup toksik sehingga dapat menyebabkan iritasi pada kulit, mata, dan saluran pernapasan. Metode kimia dengan formaldehid, mikroba terbunuh melalui pengikatan gugus asam amino dari protein mikroba. Gas formaldehid baunya sangat menyengat dan juga menyebabkan iritasi pada kulit, mata, dan saluran pernapasan (Darmadi 2008).

I. Gentamisin

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang diperoleh dari jamur *Micromonospora purpurea* dan *Micromonospora echinospora*. Gentamisin memiliki dua molekul gula yang dihubungkan oleh sikloheksan. Antibiotik ini berkhasiat terhadap *Pseudomonas*, *Proteus* dan *Stafilokok* yang resisten terhadap penisilin dan metisilin (MRSA). Mekanisme kerja gentamisin adalah menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom di dalam sel. Proses translasi (sintesis protein) diganggu, sehingga biosintesis protein tidak terjadi (Tjay & Rahardja 2015).

J. Landasan Teori

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan salah satu patogen yang menyebabkan infeksi nosokomial, terutama pada pasien rawat inap di bangsal luka bakar (Goudarzi *et al.* 2015). Bakteri tersebut dapat memperbanyak diri dalam luka bakar,

menyebarkan melalui jaringan sekitarnya dan masuk ke dalam aliran darah (Everett *et al.* 2017).

Tanaman stevia termasuk ke dalam famili Compositae yang merupakan tanaman perdu dengan tinggi 60-90 cm (Ulung 2014). Hasil skrining fitokimia daun stevia pada penelitian Siddique *et al.* (2014), menunjukkan kandungan kimia yang melimpah pada daun tersebut yaitu alkaloid, steroid, tanin, saponin dan flavonoid. Penelitian Arab dan Salem (2010), menunjukkan adanya zona hambat pada ekstrak aseton, kloroform, *n*-heksana dan metanol dari daun stevia dengan konsentrasi masing-masing 50 mg/mL terhadap bakteri *P. aeruginosa* ETCC 9027. Masing-masing ekstrak memiliki zona hambat sebesar 15, 11, 11 dan 15 mm.

Golongan senyawa metabolit sekunder pada daun stevia tersebut memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Alkaloid yang memiliki mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis dinding sel bakteri (Amalia *et al.* 2014). Steroid akan berinteraksi dengan membran fosfolipid yang bersifat permeabel, menyebabkan keutuhan membran menurun dan morfologi membran sel berubah sehingga sel rapuh dan lisis (Sapara *et al.* 2016). Tanin menonaktifkan molekul yang menempel pada sel inang yang terdapat pada permukaan sel bakteri, dan mampu menghambat enzim transport protein melalui dinding sel. Saponin meningkatkan tegangan permukaan pada dinding sel bakteri, kemudian dinding sel akan mengalami peregangan yang sangat kuat, lalu mengakibatkan kerusakan dinding sel dan akhirnya sel bakteri lisis (Romas *et al.* 2015). Flavonoid membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga merusak dinding sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Sani *et al.* 2017).

Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi masih kompleks kandungannya, maka perlu dilakukan fraksinasi dari ekstrak berdasarkan tingkat polaritasnya, yaitu non polar, semi polar dan polar (Saifudin 2014). Pelarut yang digunakan adalah etanol, *n*-heksana, etil asetat, dan air. Etanol digunakan sebagai cairan penyari pada ekstraksi maserasi. Etanol merupakan pelarut polar yang mampu menyari sebagian besar kandungan kimia

simplisia (Nihayati 2016), maka biasa digunakan pada tahap awal ekstraksi simplisia (Saifudin 2014).

Pada fraksinasi pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana, etil asetat, dan air. *n*-Heksana merupakan pelarut yang bersifat non polar dan mudah menguap (Agustina *et al.* 2018). Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar, volatil, tidak beracun dan tidak higroskopis (Purwanto 2015). Penelitian Firdiyani *et al.* (2015) menunjukkan bahwa etil asetat dapat menyari golongan senyawa fenolik, terpenoid, steroid, dan flavonoid. Penelitian lain yang dilakukan Wati *et al.* (2017), golongan senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat yaitu alkaloid, fenolik dan flavonoid. Hal tersebut yang menjadi landasan bahwa fraksi etil asetat dapat menjadi fraksi teraktif sebagai antibakteri, karena etil asetat dapat menarik hampir semua senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada daun stevia. Air merupakan pelarut polar yang dapat menarik golongan senyawa polar (Tiwari *et al.* 2011). Air sebagai cairan penyari memiliki keuntungan yaitu murah, mudah diperoleh, stabil, tidak beracun, tidak mudah menguap, dan tidak mudah terbakar (Sa'adah & Nurhasnawati 2015).

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi dan dilusi. Pada metode difusi, efektifitas antibakteri ditunjukkan oleh zona hambat (Harmita & Radji 2008). Metode difusi bertujuan untuk menentukan fraksi teraktif sebagai antibakteri, kemudian fraksi teraktif yang didapat dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode dilusi bertujuan untuk menentukan nilai KHM dan KBM suatu antibakteri (Yanuhar 2016). Antibiotik gentamisin digunakan sebagai kontrol positif pada tahap difusi, memiliki aktivitas terhadap penyakit infeksi yang disebabkan oleh *P. aeruginosa*.

K. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka dapat disusun beberapa hipotesa dalam penelitian ini yaitu:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun stevia memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat daun stevia merupakan fraksi paling aktif sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, KHM dan KBM fraksi teraktif daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853, dapat ditentukan dari hasil penelitian.