

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Biduri

1. Sistematika tanaman biduri

Klasifikasi tanaman biduri (*Calotropis Gigantea* L.) adalah sebagai berikut (ITIS 2018) :

Kingdom : Plantae
Divisio : Magnoliophyta
Classis : Magnoliopsida
Subclass : Asteridae
Ordo : Gentianales
Familia : Asclepiadaceae
Genus : *Calotropis*
Spesies : *Calotropis gigantea* (L.)



Gambar 1. Daun biduri (Dalimartha 2000).

2. Nama lain

Di Indonesia tanaman biduri mempunyai beberapa nama lokal seperti rembega, remingu (Melayu), rumbigo (Minangkabau), rubik (Aceh), widuri (Sunda), saduri, sidoguri (Jawa), dan bidhuri (Madura). Juga modo kapauk dan modo kampauk (Nusa Tenggara), manori, maduri (Bali) sedangkan dalam bahasa Inggris dikenal dengan nama Giant Milkweed, Crown Flower dan Indian Bowstring Hemp (Dalimartha 2000).

3. Morfologi tanaman

Biduri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah, dan pantai berpasir. Semak tegak, tinggi 0,5-3 m. batang bulat, tebal, ranting muda berambut tebal berwarna putih, daun tunggal, bertangkai pendek, letak berhadapan. Helaian daun berbentuk bulat telur atau bulat panjang, ujung tumpul, pangkal berbentuk jantung, tepi rata, pertulangan menyirip, panjangnya 8-30 cm, lebar 4-15 cm, berwarna hijau muda. Permukaan atas helaian daun muda berambut rapat berwarna putih (lambat daun menghilang), sedangkan permukaan bawah tetap berambut tebal berwarna putih. Bunga majemuk dalam anak payung, di ujung atau ketiak daun. Tangkai bunga berambut rapat, mahkota bunga berbentuk kemudi kapal, berwarna lila, kadang-kadang putih. Buahnya buah bumbung, berbentuk bulat telur atau bulat panjang, pangkal buah berupa kaitan, panjang 9-10 cm, berwarna hijau. Bijinya kecil, lonjong, pipih, berwarna cokelat, berambut pendek dan tebal, umbai rambut serpuu sutera panjang. Jika salah satu bagian tumbuhan dilukai maka akan mengeluarkan getah berwarna putih, encer, rasanya pahit dan kelat, lama-kelamaan terasa manis, baunya sangat menyengat dan beracun. Kulit batang biduri mengandung bahan serat yang dapat digunakan untuk membuat jala. Tanaman biduri dapat diperbanyak dengan biji (Dalimartha 2000).

4. Ekologi dan penyebaran

Biduri (*Calotropis Gigantea* L) adalah tanaman gulma gurun yang mampu tumbuh liar di daerah pesisir pantai sehingga untuk pembudidayaanya sangat mudah.

5. Kandungan kimia

Penelitian yang telah dilakukan oleh Desak *et al.* (2018) menunjukkan bahwa pada daun tanaman biduri terdapat senyawa aktif seperti tanin, saponin, flavonoid, dan polifenol yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

5.1 Flavonoid. Flavonoid merupakan golongan dari senyawa fenol. Flavonoid terdapat pada unsur polifenol yang terdapat pada kebanyakan tumbuhan, biji, kulit buah, kulit kayu, dan bunga. Sejumlah besar tumbuhan obat mengandung flavonoid, flavon, flavanon, isoflavon dan antosianidin. Senyawa

flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba sehingga efektif sebagai zat antibakteri yang ampuh melawan berbagai mikroorganisme. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Warganegara dan Restina 2016).

5.2 Tanin. Tanin merupakan sejenis kandungan tanaman bersifat fenol yang memiliki rasa sepat. Tanin larut dalam pelarut organik yang polar, tetapi tidak larut dalam pelarut organik nonpolar seperti benzena. Kadar tanin yang tinggi mampu menjadi pertahanan bagi tanaman yaitu untuk membantu mengusir hewan pemangsa tanaman. Beberapa tanin terbukti mempunyai aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor, dan menghambat enzim seperti reverse transkriptase dan DNA topoisomerase. Secara kimia, terdapat dua jenis utama tanin yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi terjadi karena reaksi polimerisasi (kondensasi) antar flavonoid, sedangkan tanin terhidrolisis terbentuk dari reaksi esterifikasi asam fenolat dan gula (glukosa). Tanin mempunyai kemampuan mengendapkan protein, karena tanin mengandung sejumlah kelompok fungsional ikatan yang kuat dengan molekul protein dan menghasilkan ikatan silang yang besar dan kompleks yaitu protein-tanin. Terdapat tiga mekanisme reaksi antara tanin dengan protein sehingga terjadi ikatan yang cukup kuat antara keduanya yaitu ikatan hidrogen, ikatan ion dan ikatan cabang kovalen antara protein dengan tanin (Warganegara dan Restina 2006). Tanin pada daun jati belanda bersifat sebagai astringen. Saat kontak dengan membran mukosa usus halus, senyawa tanin berikatan dengan protein dalam sel epitel mukosa menghasilkan ikatan silang. Ikatan silang protein-tanin ini membentuk ikatan yang rapat sehingga menyebabkan makanan yang akan diabsorpsi oleh usus halus menjadi terhambat.

5.3 Saponin. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang dihasilkan dari grup triterpen atau steroid yang berikatan dengan gula. Senyawa ini bersifat sebagai hipokolesterolemik dan antikarsinogen serta mampu meningkatkan sistem antibodi. Saponin menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba dengan cara berinteraksi dengan membran sterol. Efek utama

saponin terhadap bakteri adalah pelepasan protein dan enzim dari dalam sel-sel. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar dari sel bakteri. Senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma serta mengganggu dan mengurangi kestabilan dinding sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida (Warganegara & Restina 2016).

6. Kegunaan daun biduri

Kulit akar biduri berkhasiat kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alteratif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu biduri berkhasiat emetik, bunga berkhasiat tonik, dan menambah nafsu makan (stomakik). Daun biduri (*Calotropis gigantea*) berkhasiat *rubifasien* dan menghilangkan gatal. Getahnya beracun dan dapat menyebabkan muntah. Namun berkhasiat sebagai obat pencahar (Dalimartha 2000).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan alami untuk obat yang telah dikeringkan dan belum mengalami proses apapun. Simplisia dibagi menjadi 3 golongan, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau bagian hewan yang masih berupa zat kimia murni. Simplisia mineral adalah simplisia berupa bahan mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana (Gunawan dan Mulyani 2004). Faktor yang mempengaruhi yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia, cara penyimpanan bahan baku simplisia dan cara pengepakan. Pesyaratan minimal simplisia harus terpenuhi untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, dari kemampuan maupun kegunaannya. (Depkes RI 2000).

2. Pengumpulan simplisia

Pengumpulan dan pemanenan herba pada umumnya ketika herba telah berbunga. Pengumpulan herba sebaiknya dilakukan pada saat cuaca kering, bila kondisi basah akan menurunkan mutunya (Depkes RI 2007).

3. Pencucian dan pengeringan simplisia

Pencucian dilakukan bertujuan untuk memisahkan kotoran dari simplisia. Proses ini dilakukan menggunakan air bersih. Bahan simplisia mengandung zat yang mudah larut dalam air sehingga pencucian harus dilakukan secara tepat dan cepat (Ningsih 2016).

Pengeringan secara alami dapat dilakukan dengan menggunakan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang stabil apabila terkena panas. Pengeringan alamiah lainnya adalah dengan cara diangin-anginkan, cara ini dipakai untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti daun dan bunga. Tujuan dari pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan untuk mengantisipasi timbulnya bakteri serta jamur. Dalam pengeringan simplisia yang harus diperhatikan adalah jenis bahan, suhu pengeringan dan waktu pengeringan, agar simplisia tidak mudah rusak (Gunawan dan Mulyani 2004).

C. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat atau cair yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes RI 2000). Menurut Tiwari *et al.* (2011) ekstraksi adalah pemisahan zat aktif dari jaringan tumbuhan ataupun hewan melalui prosedur yang telah ditetapkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Selama proses ekstraksi, pelarut akan berdifusi masuk ke dalam material padat tanaman sehingga dapat melarutkan senyawa dengan polaritas yang sesuai dengan pelarutnya dan bahan berkhasiat akan tertarik secara sempurna.

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut yang dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang (Depkes 2000). Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana. Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, kemudian ditambahkan 10 bagian pelarut. Direndam selama 6 jam sambil sekali-kali diaduk, kemudian diamkan. Maserat dipisahkan dengan cara sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Dilakukan pengulangan proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI 2013).

2. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu metode untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama kandungan yang lain. Fraksinasi juga merupakan suatu cara untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Jumlah dan jenisnya dipisah menjadi fraksi yang berbeda, yaitu ekstrak kental difraksinasi berturut turut dengan larutan penyari yang berbeda polaritasnya, mula-mula akan disari dari pelarut non polar, selanjutnya disari dengan pelarut semi polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar. Pelarut akan memisahkan kelompok kandungan kimia yang ada secara selektif (Harborne 2006).

3. Pelarut

Pelarut adalah cairan yang digunakan dalam proses ekstraksi. Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi dari bahan alam tertentu berdasarkan daya larut zat aktif dan zat yang tidak aktif . Kriteria dalam pemilihan pelarut harus memenuhi syarat yaitu murah, mudah diperoleh, stabil secara fisik dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan terbakar, selektif yaitu menarik zat yang berkhasiat yang dikehendaki, dan tidak mempengaruhi zat yang

berkhasiat. Ada tiga macam cairan penyari atau pelarut yaitu pelarut polar, semi polar dan non polar (Depkes RI 2000).

3.1 *n*-heksan. *n*-heksan merupakan pelarut non polar yang mampu melarutkan senyawa seperti terpenoid, triterpenoid, sterol dan fenilpropanoid. Pelarut *n*-heksan didapatkan dari hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas rangkaian campuran hidrokarbon, bersifat mudah terbakar, transparan, baunya khas, tidak dapat larut dengan air, dan mampu larut dengan alkohol, benzen, eter dan kloroform (Tiwari *et al.* 2011).

3.2 Etil asetat. Etil asetat pelarut yang bersifat semi polar, tidak beracun, tidak berwarna, mudah menguap dan memiliki aroma yang khas. Pelarut etil asetat mampu melarutkan senyawa alkaloid, flavonoid dan polifenol (Susanti 2012).

3.3 Etanol 96%. Etanol 96% pelarut yang bersifat polar. Etanol merupakan pelarut efektif yang baik digunakan untuk pendahuluan karena memiliki toksisitas terendah dibandingkan yang lainnya dan hasil yang diperoleh baik. Etanol lebih selektif, kapang dan kuman sulit untuk tumbuh dalam etanol diatas 20%, dapat bercampur dengan air pada berbagai konsentrasi, absorbsinya baik dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Pelarut etanol lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut etanol yaitu alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin (Depkes RI 2000).

3.4 Air. Air pelarut universal, digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena sifatnya yang stabil, tidak menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air dapat melarutkan gula, minyak menguap, lemak, peptida, zat warna, garam alkohol dan asam organik (Tiwari *et al.* 2011).

D. Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu metode yang dilakukan guna membebaskan media dan alat dari kontaminan mikroba. Peralatan atau bahan yang digunakan dalam mikrobiologi harus steril, artinya tidak terkontaminasi oleh mikroba yang tidak

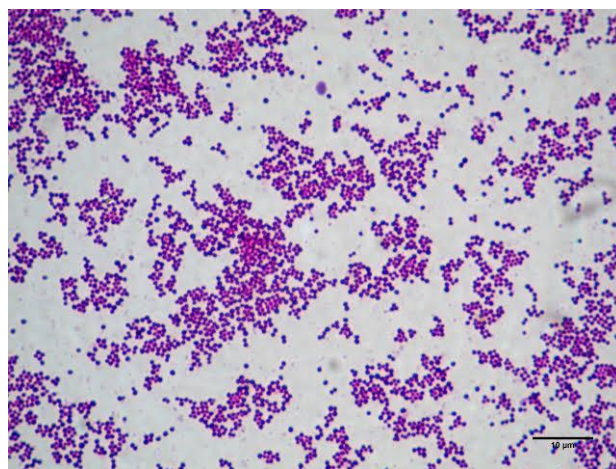
diharapkan karena dapat mengganggu media dan proses yang sedang dikerjakan. Sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara meliputi sterilisasi secara fisika yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar gelombang pendek seperti sinar gamma, sinar-X dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol dan larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan filter untuk bahan yang akan mengalami penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmadi 2008).

E. *Staphylococcus aureus*

1. Sistematika *Staphylococcus aureus*

Sistematika bakteri *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut (ITIS 2018) :

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



Gambar 2. *Staphylococcus aureus* (National Center for Biotechnology Information).

2. Morfologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif anaerobik fakultatif berbentuk bulat (*coccus*) yang memiliki ukuran 0,7-1,2 μ m. Bakteri ini tumbuh berkisar pada suhu 15-40°C dan kebanyakan berkoloni pada saluran hidung juga pada bagian tubuh yang lain. *Staphylococcus aureus* memiliki bentuk tidak beraturan yang bergerombol seperti buah anggur. Koloni pada medium padat berbentuk bulat, menonjol, halus, dan berkilau serta membentuk pigmen berwarna emas. (Radji 2011).

3. Patogenesis

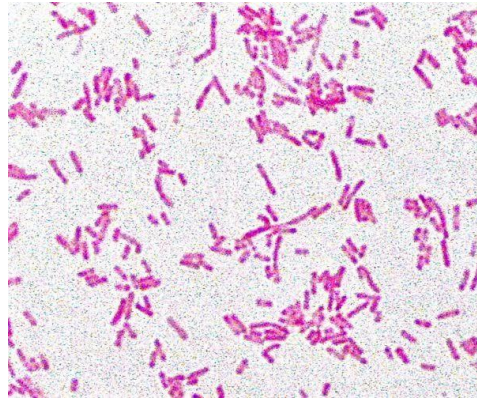
Bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat pada lubang hidung, tenggorokan dan sebagian besar juga terdapat pada rambut dan kulit. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab infeksi yang bersifat *pyogenes* (pembentuk nanah). Bakteri ini dapat masuk kedalam tubuh melalui folikel rambut, kelenjar keringat atau luka luka kecil. Mekanisme infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu dengan cara melakukan pelekatan pada protein sel inang, invasi, perlawanan terhadap sistem pertahanan inang dan pelepasan beberapa jenis toksin (Radji 2011). Struktur sel *Staphylococcus aureus* memiliki protein permukaan untuk membantu penempelan bakteri pada sel inang. Protein yang dimaksud adalah laminin dan fibronektin yang mampu meningkatkan penempelan bakteri pada darah dan jaringan.

F. *Escherichia coli*

1. Sistematika *Escherichia coli*

Sistematika bakteri *Escherichia coli* adalah sebagai berikut (ITIS 2018) :

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 3. *Escherichia coli* (Paramedics World).

2. Morfologi dan sifat *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri yang banyak ditemukan pada saluran pencernaan manusia terutama dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif dengan morfologi berbentuk batang pendek, memiliki ukuran $0,4-0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ dan beberapa strain mempunyai kapsul. Tempat yang paling sering terinfeksi bakteri *Escherichia coli* adalah saluran empedu, saluran kemih dan tempat-tempat lain di dalam perut. Bakteri ini menyebabkan diare karena memproduksi enterotoksin dan menyebabkan sekresi air dan klorida sehingga menghambat reabsorpsi natrium (Widyarto 2009).

3. Patogenesis *Escherichia coli*

Beberapa strain dari *Escherichia coli* selama proses evolusi mendapat kemampuan virulensi yang membantu mereka menginfeksi *host*. Jenis *Escherichia coli* yang patogen tersebut dapat mengakibatkan gangguan intestinal dan infeksi saluran kemih (Jawetz *et al.* 2012).

G. Antibakteri

1. Pengertian antibakteri

Antibakteri adalah zat, yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan ataupun membunuh bakteri yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme (bakteri). Aktivitas antibakteri diukur secara *in vitro* untuk menentukan potensi agen antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan kerentanan mikroorganisme tertentu terhadap obat

dengan konsentrasi tertentu. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba *in vitro* yaitu pH lingkungan, komponen medium, stabilitas obat, ukuran inokulum, lama inkubasi, dan aktivitas metabolik mikroorganismenya (Andries *et al.* 2014).

2. Mekanisme antibakteri

Mekanisme antibakteri merupakan peristiwa penghambatan bakteri oleh antibakteri. Menurut Radji (2011) mekanisme kerja antibakteri dapat dikelompokkan sebagai berikut :

2.1 Menghambat sintesis dinding sel mikroba. Dinding sel bakteri sangat penting untuk mempertahankan struktur sel bakteri. Oleh karena itu, zat yang dapat merusak dinding sel akan melisis dinding sel sehingga dapat mempengaruhi bentuk dan struktur sel, yang pada akhirnya dapat membunuh sel bakteri. Contoh antibiotik golongan ini antara lain penisilin, sefalosporin, fosfomisin, vankomisin, sikloserin, dan basitrasin.

2.2 Mengganggu atau merusak membran sel. Membran sel mempunyai peran penting dalam mengatur transportasi nutrisi dan metabolit yang keluar masuk sel. Membran sel juga berfungsi sebagai tempat berlangsungnya respirasi dan aktivitas biosintesis dalam sel. Beberapa jenis antibiotik dapat mengganggu membran sel sehingga dapat mempengaruhi kehidupan sel bakteri, antara lain polimiksin, nistatin, golongan makrolida, dan poliena (misalnya amfoterisin B).

2.3 Mengganggu biosintesis asam nukleat. Proses replikasi DNA di dalam sel merupakan siklus yang sangat penting bagi kehidupan sel. Beberapa jenis antibiotik dapat mengganggu metabolisme asam nukleat, sehingga dapat mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan sel bakteri. Antibiotik yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon. Antibiotik ini dapat menghambat enzim DNA-girase yang membuat lilitan pada DNA untai ganda (Pratiwi 2008).

2.4 Menghambat sintesis protein. Sintesis protein merupakan suatu rangkaian proses yang terdiri atas proses transkripsi (yaitu DNA ditranskripsi menjadi *mRNA*) dan proses translasi (yaitu *mRNA* ditranslasi menjadi protein). Antibiotik yang dapat menghambat proses-proses tersebut akan menghambat

sintesis protein. Antibiotik yang termasuk dalam golongan ini antara lain streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan gentamisin (Pratiwi 2008).

3. Uji aktivitas antibakteri

Pada uji ini diukur respons pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antimikroba. Kegunaan uji antimikroba adalah diperolehnya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Menurut Pratiwi (2008) terdapat bermacam-macam metode uji antimikroba, antara lain :

3.1 Metode Difusi. Metode difusi merupakan metode yang sering digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroba.

3.1.1 Metode *disc diffusion* (Tes Kirby & Bauer) untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.

3.1.2 E-test Metode ini digunakan untuk mengestimasi MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah hingga tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar.

3.1.3 *Ditch-plate technique* Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba.

3.1.4 Cup-plate technique Metode ini serupa dengan metode *disc diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji.

3.1.5 Gradient-plate technique Pada metode ini konsentrasi agen antimikroba pada media agar secara teoritis bervariasi dari 0 hingga maksimal. Media agar dicairkan dan larutan uji ditambahkan. Campuran kemudian tuang ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring. Nutrisi kedua selanjutnya dituang di atasnya. Plate diinkubasi selama 24 jam untuk memungkinkan agen antimikroba berdifusi dan permukaan media mengering. Mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan pada arah mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. Hasil diperhitungkan sebagai panjang total pertumbuhan mikroorganisme maksimum yang mungkin dibandingkan dengan panjang pertumbuhan hasil goresan.

3.2 Dilusi. Dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

3.2.1 Metode dilusi cair/broth dilution test (serial dilution). Metode ini mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum, KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM.

3.2.2 Metode dilusi padat/solid dilution test serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (*solid*). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

H. Media

1. Pengertian media

Media adalah substrat yang diperlukan untuk mengembangbiakan mikroba. Media untuk suatu penelitian harus dalam keadaan steril, artinya tidak ditumbuhkan oleh mikroba lain yang tidak diharapkan. Media harus memenuhi suatu persyaratan tertentu agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media juga harus mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba (Suriawira 2005).

2. Sifat media

Berdasarkan sifatnya, media dapat dibedakan menjadi: Media umum, media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum, seperti Nutrient Agar. Media pengaya jika media tersebut digunakan untuk memberi kesempatan terhadap satu jenis atau kelompok mikroba untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat dari yang lainnya yang bersama-sama dalam satu sampel. Media selektif adalah media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih mikroorganisme tertentu, tetapi akan menghambat atau mematikan jenis lainnya. Media diferensial, yaitu media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba tertentu serta penentuan sifat-sifatnya. Media penguji yaitu media yang digunakan untuk penguji senyawa atau benda-benda tertentu dengan bantuan mikroba (Radji 2011).

3. Macam-macam bentuk media

Ada tiga jenis bentuk media menurut Suriawira (2005) yaitu media padat, cair, dan semi padat atau semi cair.

Pertama, media padat. Media ini pada umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang juga mikroalga. Bahan media padat ditambahkan antara 12-15 g tepung agar-agar per 1000 mL media.

Kedua, media cair. Media ini biasanya digunakan untuk pembiakan mikroalga tetapi juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Pada media cair ini tidak ditambahkan zat pematat.

Ketiga, media semi padat atau semi cair. Penambahan zat pematat dalam media ini hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Media ini umumnya digunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerob atau fakultatif.

4. Cara pembuatan media

4.1 Medium Nutrient Agar. Sebanyak 3,3 gram NA dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut. Bahan yang sudah homogen di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit.

4.2 Medium Brain Heart Infusion. Sebanyak 3,7 gram BHI dilarutkan dengan 100 ml aquadest dalam erlenmeyer, kemudian panaskan di atas penangas air sambil diaduk hingga homogen, turunkan dari penangas air dan masukkan ke dalam tabung reaksi, mulut tabung ditutup dengan kapas kering dan masukkan ke dalam plastik bening lalu ikat dan beri label, disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

4.3 Medium Endo Agar. Sebanyak 4,6 gram EA dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut. Bahan yang sudah homogen di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit.

4.4 Medium Vogel Johnson Agar. Sebanyak 6 gram VJA dilarutkan dengan 100 ml aquadest dalam erlenmeyer kemudian panaskan di atas penangas air sambil diaduk hingga homogen, turunkan dari penangas air dan masukkan ke dalam tabung reaksi, mulut tabung ditutup dengan kapas kering dan diberi label, disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian setelah di sterilisasi tambahkan 6 ml kalium telurit 3,5% dan dihomogenkan.

4.5 Medium Muller Hinton Agar. Sebanyak 3,8 gram MHA dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest, kemudian dipanaskan hingga homogen. Bahan yang sudah homogen di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

I. Siprofloksasin

Penelitian ini menggunakan siprofloksasin sebagai kontrol pembanding, siprofloksasin merupakan senyawa bakterisid turunan fluorokuinolon. Mekanisme

kerja dari siprofloksasin adalah dengan menghambat biosintesis dari asam nukleat mikroba sehingga mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan sel bakteri. Kerja antibiotik dalam menghambat secara selektif sintesis asam nukleat (DNA) bakteri yaitu dengan memblok sub unit A enzim DNA-girase, suatu tipe II topoisomerase. Hambatan tersebut menyebabkan sintesis DNA bakteri terganggu, sehingga menyebabkan bakteri mati. Penghambatan suatu antibiotika terhadap bakteri penyebab infeksi juga bergantung pada spektrum antibiotik. Spektrum adalah luas aktivitas obat anti-mikrobal terhadap suatu jenis bakteri. Antibiotika dengan spektrum luas efektif baik terhadap bakteri Gram negatif maupun bakteri Gram positif. Siprofloksasin digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif, seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Shigella sp* dan *Pseudomonas aeruginosa*, serta bakteri gram positif, seperti *Staphylococcus sp*, dan *Streptococcus sp* (Siswandono dan Soekardjo 2000).

J. Landasan Teori

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang sangat penting di masyarakat Indonesia. Mayoritas penyebab penyakit infeksi ditimbulkan oleh bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* merupakan mikroorganisme yang menjadi penyebab timbulnya infeksi. Penggunaan antibiotik sintetis menimbulkan permasalahan yang baru yaitu timbulnya bakteri yang multiresisten. Hal ini mendorong untuk mengembangkan penemuan obat baru yang lebih efektif, salah satunya dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan yang mengandung zat aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Hariyati *et al.* 2015).

Pengembangan untuk penemuan antimikroba saat ini dari tanaman dianggap sebagai hal yang penting karena tanaman diindikasikan mempunyai efek samping yang rendah bahkan ada yang tidak menimbulkan efek samping apabila penggunaannya dilakukan secara tepat. Tanaman yang digunakan sebagai obat salah satunya adalah tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Tanaman biduri merupakan gulma gurun yang mampu tumbuh liar di pesisir pantai dan lahan kering sehingga mudah ditemukan dimana saja dan dapat dibudidayakan.

Daun dari tanaman biduri diketahui terdapat senyawa aktif seperti tanin, saponin dan flavonoid yang mempunyai potensi sebagai antibakteri di dalamnya. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Desak *et al.* (2018) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun biduri mengandung senyawa aktif seperti tanin, saponin dan flavonoid yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun biduri tersebut dilakukan dengan menggunakan metode *disc diffusion Kirby Bauer*, hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun biduri dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan penelitian Sulistyaningsih *et al.* (2014), daun tapak dara yang masih satu famili dengan daun biduri mengandung senyawa yang hampir sama, membuktikan bahwa ekstrak daun tapak dara mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 50%; 40%; 30%; 20%; 10% dengan diameter hambat sebesar 1,39 cm; 1,98 cm; 1,45 cm; 1,21 cm.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini terhadap daun biduri adalah metode maserasi. Metode yang sederhana dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam pelarut. Cairan penyari selanjutnya akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang di dalamnya mengandung zat aktif. Setelah mendapat hasil ekstraksi, kemudian dilanjutkan ke tahap fraksinasi untuk mendapatkan fraksi teraktif.

Fraksinasi merupakan suatu metode untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama kandungan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran tanaman. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan untuk fraksinasi adalah *n*-Heksana, etil asetat dan air. Pelarut *n*-heksana berfungsi untuk menarik senyawa-senyawa non polar, etil asetat berfungsi untuk menarik senyawa-senyawa semi polar dan air berfungsi untuk menarik senyawa-senyawa yang polar (Harborne 2006).

Pemilihan pelarut yang akan digunakan adalah berdasarkan tingkat kepolarannya, pelarut non polar seperti *n*-heksan yang mampu melarutkan senyawa seperti terpenoid, triterpenoid, sterol dan fenilpropanoid, pelarut semi polar seperti etil asetat yang mampu melarutkan senyawa seperti alkaloid, tanin

dan flavonoid, pelarut polar seperti etanol dan air mampu melarutkan senyawa seperti saponin, tanin, dan senyawa ionik. Pelarut etil asetat diduga menjadi pelarut yang paling efektif karena mampu menarik senyawa flavonoid dan tanin yang terdapat pada daun biduri.

Antibiotik adalah suatu senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi mikroba seperti bakteri atau jamur (Muhtar *et al.* 2017). Hal ini kemudian berkembang menjadi senyawa yang dalam tingkat konsentrasi tertentu mampu menghambat bahkan membunuh suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.* 2013). Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Siprofloksasin. Penghambatan suatu antibiotika terhadap bakteri penyebab infeksi juga bergantung pada spektrum antibiotik. Spektrum adalah luas aktivitas obat antimikrobal terhadap suatu jenis bakteri. Antibiotik siprofloksasin memiliki spektrum yang luas, sehingga efektif digunakan terhadap bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif (Siswandono dan Soekardjo 2000), oleh karena itu antibiotik Siprofloksasin diharapkan mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922

Penelitian ini menggunakan metode difusi dan dilusi untuk menguji kemampuan efek antibakteri dari daun biduri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Metode difusi yang digunakan adalah dengan menggunakan cakram (disc). Cakram kertas digunakan sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring yang mengandung zat antimikroba tersebut diletakkan pada media yang telah diinokulasi dengan mikroba uji kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji yaitu pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Amati dan lakukan pengukuran terhadap zona hambat yang terbentuk setelah diinkubasi (Diana dan Misna 2016).

Metode dilusi diklasifikasikan menjadi 2 yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Penelitian ini menggunakan dilusi cair untuk mengukur KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba yang diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Tiap konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri dalam media

cair yang kemudian diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan timbulnya kekeruhan. Larutan uji senyawa antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM, kemudian KHM tersebut dikultur ulang pada media agar tanpa penambahan mikroba uji atau senyawa antimikroba dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008).

K. Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun biduri (*Calotropis gigantea*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun biduri (*Calotropis gigantea*) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, terdapat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) antara ekstrak dan fraksi daun biduri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.