

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Stevia



Gambar 1. Tanaman stevia

1. Klasifikasi tanaman stevia

Tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) mempunyai sistematika sebagai berikut (Rukmana 2003) :

- Divisio : Spermatophyta
- Subdivisio : Angiospermae
- Classis : Dicotyledonae
- Ordo : Campanulatae
- Familia : Compositae (Asteraceae)
- Genus : Stevia
- Spesies : *Stevia rebaudiana* Bertoni

2. Nama daerah tanaman stevia

Tanaman stevia berasal dari Amambai dan Iguagu di perbatasan antara Brazil, Paraguay, dan Argentina (Amerika Selatan). Tanaman stevia di daerah asalnya disebut caa-ehe, ca-enhem, atau azucaca (Rukmana 2003).

3. Morfologi tanaman stevia

Tanaman stevia merupakan famili dari Compositae yang berbentuk perdu basah. Tanaman ini tingginya dapat mencapai 60-70 cm yang mempunyai banyak cabang. Daun stevia merupakan daun tunggal, daunnya duduk berhadapan, berbentuk lonjong, tepi daun bergerigi halus. Panjang helai daun antara 2-5 cm. Tangkai daun pendek, tulang daun menyirip, pada permukaan daun bagian bawah kelihatan menonjol (Ratnani dan R. Anggraeni 2005).

Tanaman stevia mempunyai batang yang berbentuk bulat lonjong dan berbulu halus. Tanaman stevia memiliki bunga sempurna dengan mahkota berbentuk tabung. Akar tanaman stevia merupakan akar serabut yang terbagi menjadi dua yaitu perakaran halus dan perakaran tebal. Tanaman stevia memiliki daya regenerasi yang kuat sehingga tahan terhadap pemanasan (Rukmana 2003).

4. Kegunaan tanaman

Tanaman stevia digunakan sebagai pemanis alami, kandungan yang memberikan rasa manis yaitu steviosida. Stevia memiliki keunggulan tidak menyebabkan karies gigi, menurunkan tekanan darah tinggi, kandungan kalori yang rendah, dan tingkat kemanisan yang tinggi daripada gula tebu yaitu 200-300 kali lebih manis (Chandra 2015).

Daun stevia digunakan sebagai antibakteri, antifungi, dan antimikroba. Daun stevia mengandung berbagai macam zat seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin (Putri *et al* 2017). Penelitian Priyono *et al.* (2017) gula stevia dapat menurunkan kadar glukosa darah.

5. Kandungan senyawa kimia daun stevia

Kandungan senyawa kimia yang terdapat daun stevia adalah protein, lemak, karbohidrat, kalium, kalsium, magnesium, fosfor, sodium dan sulfur (Tandhani dan Rema 2006). Penelitian sebelumnya disebutkan dalam hasil skrining kandungan daun stevia bahwa daun stevia mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan steroid (Siddique *et al.* 2014). Penelitian Tandhani dan Rema (2006) daun stevia terdapat kandungan saponin. Komponen yang terkandung dalam ekstrak daun stevia terdiri dari rebaudioside A 28,8%, rebaudioside C 25,2%, stevioside 17,0%, dan dulcoside A 10,2% (Limanto 2017).

5.1 Flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang biasanya ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk senyawa fenolik dengan struktur molekul $C_6-C_3-C_6$. Terdiri dari satu cincin aromatik A dan satu cincin aromatik B (Redha 2010).

Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid selain menghambat fungsi membran juga dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri (Bontjura *et al.* 2015).

5.2 Tanin. Tanin adalah senyawa astringent yang memiliki rasa sepat dari gugus polifenolnya yang dapat mengikat dan mengendapkan atau menyusutkan protein. Tanin dapat larut dalam air, kelarutannya besar dan akan mengikat apabila dilarutkan dalam air panas, tanin akan larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton, dan pelarut organik lainnya. Tanin berwarna putih kekuning-kuningan sampai coklat terang, tergantung dari sumbernya. Tanin berbentuk serbuk atau berlapis-lapis, berbau khas dan mempunyai rasa sepat. Tanin mempunyai sifat atau daya bakterostatik, fungsistatik, dan merupakan racun. Warna tannin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya langsung atau dibiarkan di udara terbuka (Ismarani 2012).

Tanin memiliki kemampuan menginaktifkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ngajow *et al.* 2013).

5.3 Alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan dan hewan. Senyawa ini memiliki banyak atom nitrogen, sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan terutama angiosperm. Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai tanaman, seperti bunga, biji, daun, ranting, akar, dan kulit batang. Senyawa ini berkhasiat sebagai antidiare, antidiabetes, antimikroba dan antimalaria. Alkaloid bersifat basa sehingga dapat

mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan (Ningrum *et al.* 2016).

Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Ernawati dan Kumala 2015).

5.4 Steroid. Steroid merupakan golongan senyawa yang larut dalam pelarut non polar (Sa'adah dan Henny 2015). Steroid merupakan terpenoid lipid yang dikenal dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Struktur senyawanya cukup beragam. Steroid berperan penting bagi tubuh dalam menjaga keseimbangan garam, mengendalikan metabolisme dan meningkatkan fungsi organ seksual serta perbedaan fungsi biologis lainnya antara jenis kelamin. Tubuh manusia memproduksi steroid secara alami yang terlibat dalam berbagai proses metabolisme (Nasrudin *et al.* 2017).

Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Bontjura *et al.* 2015).

5.5 Saponin. Senyawa saponin merupakan senyawa glikosida kompleks yaitu terdiri dari senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan suatu senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non-gula (aglikon). Struktur saponin tersebut menyebabkan saponin bersifat seperti sabun (Bintoro *et al.* 2017).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, mengikat membran sitoplasma, mengganggu dan mengurangi kestabilan. Proses ini menyebabkan sitoplasma bocor

keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida (Ngajow 2013).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Utomo *et al.* 2009). Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral (Prasetyo dan Entang 2013).

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman merupakan isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya atau zat-zat nabati lainnya yang dikeluarkan dari tanamannya. 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 mineral adalah simplisia berupa bahan mineral yang belum atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Prasetyo dan Entang 2013).

2. Pengeringan simplisia

Pengeringan merupakan suatu proses pengeluaran air dari bahan dengan energi panas. Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Proses pengeringan akan terjadi berkurangnya kadar air dan penghentian reaksi enzimatik sehingga bisa mencegah terjadinya penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Pengeringan simplisia dilakukan sampai kering (bobot konstan) dan kadar air kurang dari 10 %. Sisa air dalam simplisia jika melebihi kadar yang disyaratkan maka dapat menjadikan tempat pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya. Pengeringan simplisia dapat dilakukan dengan pengeringan alamiah dan pengeringan buatan. Pengeringan alamiah dapat dilakukan dengan sinar matahari langsung dan sinar matahari tidak langsung, berupa menutup kain hitam diatas bahan yang akan dikeringkan. Pengeringan buatan dapat dilakukan dengan menggunakan lemari pengering atau oven (Utomo *et al.* 2009).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstrak

Ekstrak merupakan bahan baku produk obat dan memiliki ciri yang sangat khas dan kompleks baik dari aspek fisik atau kimianya, mengandung kumpulan senyawa-senyawa dari berbagai golongan yang terlarut dalam pelarut yang sesuai. Faktor-faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak antara lain, kualitas bahan baku yang digunakan, jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran partikel bahan, suhu proses ekstraksi, pH ekstrak dan metoda pemurnian (Hernani *et al.* 2007).

2. Pengertian ekstraksi

Proses ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun bahan cair dengan bantuan pelarut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut yang mampu mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu bahan dari campurannya. Penggunaan pelarut pada ekstraksi berdasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Tuhuloula *et al.* 2013).

3. Metode ekstraksi

Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam sampel pada suhu kamar dengan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Maserasi dilakukan dengan merendam sampel selama 3-5 hari. Sambil diaduk untuk mempercepat proses penarikan analit (Leba 2017).

Kelebihan metode maserasi adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan dengan pemanasan (Leba 2017). Kerugian dari metode maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyaringan kurang sempurna (Depkes 1986).

4. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut air dan pelarut organik. Teknik pemisahan ekstraksi cairan ini biasanya dilakukan dengan

menggunakan corong pisah dengan dua pelarut yang tidak saling bercampur, kemudian dikocok dan didiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi kedalam fase masing-masing tergantung pada kelarutan terhadap fase tersebut. Terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas dan bawah, dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Dalimunthe *et al.* 2016).

5. Pelarut

Pada proses ekstraksi pelarut yang digunakan harus sesuai. Pemilihan pelarut harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut yang baik harus memenuhi kriteria murah, tersedia dalam jumlah yang besar, tidak beracun, tidak korosif, tidak mudah terbakar, tidak eksplosif bila tercampur dengan udara, tidak menyebabkan emulsi, stabil secara mekanis maupun termis (Nasir *et al.* 2009).

5.1 Etanol. Etanol (disebut juga etil-alkohol atau alkohol saja) adalah alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Etanol bersifat tidak beracun dipakai sebagai pelarut dalam dunia farmasi dan industri makanan dan minuman. Sifat kimia etanol yaitu mudah menguap dan mudah terbakar (Anggraini *et al.* 2017).

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol (Haeria 2013). Etanol dapat melarutkan senyawa alkaloid, diglikosida, fenolik, flavonoid, dan sedikit minyak atsiri (Mardiyaningsih dan Resmi 2014). Berdasarkan penelitian Sulastri (2009) pelarut etanol dapat melarutkan senyawa tanin, Sa'adah dan Henny (2015) pelarut etanol dapat melarutkan senyawa steroid.

5.2 *n*-heksan. *n*-heksan merupakan pelarut jenis nonpolar sehingga *n*-heksan dapat melarutkan senyawa bersifat nonpolar (Romadanu *et al.* 2014). Pelarut *n*-heksan merupakan hasil penyulingan minyak mentah. Seluruh isomer heksana sering digunakan sebagai pelarut organik yang bersifat inert karena nonpolarnya (Utomo 2016). Pelarut *n*-heksana bersifat inert, memiliki titik didih yang rendah serta dapat melarutkan dengan cepat (Aziz 2009). Penelitian Haeria *et al.* (2016) menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana mampu menarik golongan senyawa flavonoid, terpenoid atau steroid, dan fenolik. Penelitian Arundina *et al.*

(2015) menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana mampu menarik golongan senyawa alkaloid.

5.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semipolar dapat melarutkan senyawa semipolar pada dinding sel (Romadanu *et al.* 2014). Etil asetat adalah cairan jernih, tidak berwarna, berbau khas, jika dibandingkan dengan etanol, etil asetat memiliki koefisien distribusi yang lebih tinggi dibanding etanol termasuk kelarutannya dalam gasoline. Pembuatan etil asetat biasanya dilakukan dengan esterifikasi (Azura Nst *et al.* 2015). Etil asetat dapat melarutkan senyawa golongan alkaloid, aglikon, monoglikosida, terpenoid, dan steroid (Mardiyaningsih dan Resmi 2014). Penelitian Heni *et al.* (2015) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mampu menarik golongan senyawa flavonoid, saponin dan polifenol.

5.4 Air. Penggunaan air sebagai larutan pengestrak karena air dapat mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat polar karena air bersifat polar, air sebagai pelarut polar umumnya akan melarutkan senyawa golongan gula, asam amino, protein, poliglikosida, tanin, garam alkaloid, dan polifenol (Mardiyaningsih dan Resmi 2014).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia kimia tidak sama, sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolaran. Hal ini menyebabkan terjadinya pemisahan komponen-komponen kimia di dalam ekstrak (Alen *et al.* 2017).

Analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Sampel diletakkan dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam chamber. Fase gerak harus dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Proses fase gerak telah berakhir bergerak

sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, lempang dikeringkan. Zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok (Wulandari 2011).

Kelebihan metode KLT yaitu pelaksanaanya lebih mudah, lebih murah, dan peralatan yang digunakan lebih sederhana. Metode KLT memberikan fleksibilitas yang lebih besar dalam hal memilih fase gerak, mempunyai berbagai macam teknik untuk optimasi pemisahan, proses kromatografi dapat diikuti dengan mudah, dan semua komponen dalam sampel dapat dideteksi karena metode ini memungkinkan terjadinya pemisahan sampel secara serentak (Wulandari *et al* 2013).

Pereaksi semprot merupakan pereaksi untuk mengetahui golongan senyawa pada bercak kromatogram. Deteksi dilakukan pada semua jenis golongan senyawa dengan pereaksi. Beberapa pereaksi semprot yang digunakan adalah dragendorff untuk mendeteksi senyawa golongan alkaloid. Sitroborat untuk mendeteksi senyawa golongan flavonoid. AlCl_3 digunakan untuk mendeteksi senyawa golongan fenolik. KOH 10% dalam metanol digunakan untuk mendeteksi senyawa golongan antrakinon. Liebermann burchard untuk mendeteksi senyawa golongan steroid (Dewi dan Wahyono 2015).

E. Sterilisasi

Sterilisasi dalam mikrobiologi ialah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada atau di dalam suatu benda. Ada tiga cara utama yang umum dipakai dalam sterilisasi yaitu penggunaan panas, penggunaan bahan kimia, dan penyaringan. Metode sterilisasi menggunakan panas bersama-sama dengan uap air dapat dikatakan sterilisasi panas lembab atau sterilisasi basah. Sterilisasi tanpa kelembapan dapat dikatakan sebagai sterilisasi panas kering atau sterilisasi kering. Sterilisasi kimia dapat dilakukan dengan menggunakan gas atau radiasi. Pemilihan metode sterilisasi berdasarkan dari sifat bahan yang akan disterilkan (Hadioetomo 1985).

Sterilisasi basah dapat dilakukan dengan autoklaf atau sterilisator uap dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121°C selama 15 menit. Panas lembab merupakan sterilisasi yang efektif meskipun pada suhu yang tidak terlalu tinggi, karena uap air berkondensasi pada bahan-bahan yang disterilkan. Panas pada sterilisasi basah dapat mendenaturasi protein pada organisme hidup sehingga dapat membunuh organisme pada bahan yang disterilkan. Bahan yang dapat disterilisasi dengan sterilisasi basah yaitu media biakan yang umum, air suling, peralatan laboratorium, biakan yang akan dibuang, media tercemar, dan bahan-bahan dari karet (Hadioetomo 1985).

Sterilisasi kering dapat dilakukan pada suhu 160-175°C. Sterilisasi kering dilakukan pada suhu tinggi serta membutuhkan waktu yang lama jika dibandingkan dengan sterilisasi basah sehingga sterilisasi kering kurang efisien. Sterilisasi kering baik untuk bahan yang tidak rusak, menyala, hangus, atau menguap pada suhu tinggi. Bahan-bahan yang dapat dilakukan dengan sterilisasi kering yaitu bahan pecah belah seperti pipet, tabung reaksi, cawan petri dari kaca, botol sampel, peralatan (jarum suntik), dan bahan-bahan yang tidak tembus uap (gliserin, vaselin, dan bahan bubuk). Bahan yang disterilisasi sebaiknya dilindungi dengan cara membungkusnya atau dalam wadah tertutup untuk mencegah kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven (Hadioetomo 1985).

Sterilisasi penyaringan dilakukan pada suhu kamar, larutan atau suspensi dibebaskan dari semua organisme hidup dengan cara melewati saringan dengan ukuran pori kecil sehingga bakteri atau sel-sel yang lebih besar tertahan di atasnya. Filtrat hasil dari penyaringan dapat ditampung ditempat yang steril (Hadioetomo 1985).

F. *Streptococcus mutans*

1. Klasifikasi *Streptococcus mutans*

Klasifikasi *Streptococcus mutans* menurut Warganegara dan Devi (2016) adalah :

Kingdom : Monera
 Divisi : Firmicutes
 Classis : Bacilli
 Ordo : Lactobacilalles
 Famili : Streptococcaceae
 Genus : Streptococcus
 Spesies : *Streptococcus mutans*

2. Morfologi *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat yang khas membentuk pasangan atau rantai selama masa pertumbuhannya. Streptococcus merupakan salah satu golongan bakteri yang heterogen. Beberapa diantaranya merupakan anggota flora normal pada manusia. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri Gram positif, bersifat non motil (tidak bergerak), berdiameter 1-2 µm, bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk bulat atau bulat telur, tersusun seperti rantai dan tidak membentuk spora (Andries *et al.* 2014).

3. Patogenesis

Streptococcus mutans merupakan spesies utama pada plak gigi yang memiliki peran penting dalam etiologi karies. *Streptococcus mutans* memiliki enzim glukosiltransferase dan fruktosiltransferase yang mengubah sukrosa makanan menjadi glukosa dan fruktosa membantu perlekatan bakteri lain dengan gigi. Akumulasi bakteri penyebab karies menyebabkan produksi asam meningkat sehingga pH plak turun dan terjadi karies (Chairani *et al.* 2018).

Mula-mula permukaan email yang keseluruhannya non-seluler mengalami demineralisasi. Hal ini terjadi akibat pengaruh asam hasil peragian bakteri. Dekomposisi dentin dan sementum yang terjadi selanjutnya akan meliputi pencernaan matriks protein oleh bakteri. Langkah pertama yang penting dalam karies adalah pembentukan plak pada permukaan email yang keras dan halus. Plak ini terdiri dari endapan gelatin dari glukosa yang mempunyai berat molekul besar, di sini bakteri penghasil asam melekat pada email polimer karbohidrat (glukosa) terutama dihasilkan oleh Streptococcus (*S. mutans*, *Peptostreptococcus*) yang dapat bekerja sama dengan *Actinomyces* (Andrianto 2012).

G. Antibakteri

1. Pengertian antibakteri

Antibakteri merupakan substansi yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme (bakteri), yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan ataupun membunuh mikroorganisme lain. 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 (Andries *et al.* 2014).

Berdasarkan cara kerjanya, antibakteri dibedakan menjadi bakterisidal dan bakteriostatik. Antibakteri bakteriostatik adalah zat yang bekerja menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan antibakteri bakterisidal adalah zat yang bekerja mematikan bakteri. Aktivitas senyawa antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar “paper disk” (Siregar *et al.* 2012).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme antibakteri dapat dibedakan sebagai berikut :

2.1 Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel. Antibakteri merusak dinding sel mikroba dengan menghambat sintesis enzim atau inaktivasi enzim, sehingga menyebabkan hilangnya viabilitas dan sering menyebabkan sel lisis. Antibiotik menghambat sintesis dinding sel terutama dengan mengganggu sintesis peptidoglikan. Antibakteri dapat menghambat sintesis dinding sel dengan penghambatan enzim polymerase (Firdaus *et al.* 2013).

2.2 Antibakteri mengganggu metabolisme sel mikroba. Antimikroba bekerja memblokir terhadap metabolit spesifik mikroba, seperti sulfonamida. Sulfonamida menghambat pertumbuhan sel dengan menghambat sintesis asam folat oleh bakteri. Sulfonamida secara struktur mirip dengan asam folat, PABA, dan bekerja secara kompetitif untuk enzim-enzim yang langsung mempersatukan PABA dan sebagian menjadi dihidraptoat. bakteri memerlukan *para amino benzoic acid* (PABA) untuk mensintesis purin dan pirimidin (prekursor DNA dan RNA), bila asam fosfat tidak ada, sel-sel tidak dapat tumbuh atau membelah (Lukman 2016).

2.3 Antibakteri menghambat fungsi membran. Antibiotik bekerja dengan merusak dan menghilangkan fungsi membran sitoplasma. Daya kerja antibiotik dilakukan dengan menginisiasi kerusakan fungsi sel yang menyebabkan pelepasan lipopolisakarida dan komponen intraseluler keluar sel. Mekanisme kedua dengan membuat lubang pori pada membran sel. Kerja penghambatan jenis ini sebagian besar dihasilkan oleh jenis non-antibiotik. Antibakteri berinteraksi secara elektrostatis dengan membran fosfolipid, tanpa penggabungan dengan lipid pada membran. Proses ini akan menimbulkan kebocoran cairan sitoplasma dan kemungkinan menimbulkan efek sekunder berupa pelepasan fosforilasi oksidasi atau dapat dikatakan sebagai interaksi peptida (Firdaus *et al.* 2013).

2.4 Antibakteri penghambat sintesis protein. Sintesis protein terjadi di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Kedua komponen ini bersatu pada pangkal rantai mRNA agar berfungsi pada sintesis protein yang menjadi ribosom 70S.

Penghambatan sintesis terjadi dengan berbagai cara yaitu antibakteri berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Proses ini akan menyebabkan terbentuknya protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Antibakteri yang berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Proses ini mengakibatkan rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru (Gunawan 2009).

2.5 Antibakteri menghambat sintesis asam nukleat. Asam nukleat merupakan bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Untuk pertumbuhannya, kebanyakan sel tergantung pada sintesis DNA, sedangkan RNA diperlukan untuk transkripsi dan menentukan informasi sintesis protein dan enzim. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Dalam hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat, seperti berikatan dengan enzim

polymerase-RNA (pada subunit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Contoh quinolon, pyrimetamin, trimethoprin, dan trimetrexat (Lukman 2016).

H. Metode Pengujian Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder dapat dilakukan dengan meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinkubasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa sehingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji, diinkubasi dan pertumbuhan bakteri dapat diamati setelah proses inkubasi, untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. Metode lubang dapat dilakukan dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinkubasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian. Lubang diisi dengan larutan yang akan diuji, diinkubasi dan pertumbuhan bakteri dapat diamati setelah proses inkubasi, untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinkubasi dengan bakteri, pertumbuhan bakteri dapat diamati setelah proses inokulasi, untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyatini dan NI 2007).

Metode pengenceran yaitu mengencerkan zat antimikroba dan dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi steril, masing-masing tabung itu ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah diketahui jumlahnya. Pada interval waktu tertentu, dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung-tabung berisi media steril yang lalu diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan (Kusmiyatini dan NI 2007).

I. Media

Media merupakan tempat pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri. Beberapa jenis bakteri dapat hidup baik pada media yang sederhana, yang hanya mengandung garam anorganik ditambah sumber karbon organik seperti gula. Beberapa jenis bakteri memerlukan suatu media yang sangat kompleks selain mengandung sumber karbon dan nitrogen juga perlu penambahan darah atau bahan-bahan kompleks lainnya. Media harus mengandung nutrisi yang merupakan substansi dengan berat molekul rendah dan mudah larut dalam air. Nutrisi dalam media harus memenuhi kebutuhan dasar makhluk hidup (Supriatin dan Muqni 2016).

Jenis media berdasarkan sifat fisik berupa media cair, media padat dan semi padat. Media cair merupakan media berbentuk cairan yang tidak mengandung agar atau media padatan yang lain. Media padat merupakan media cair dengan penambahan agar sebanyak 1,5-2% untuk membentuk permukaan padatan gel yang keras (Istinah *et al.* 2018). Media semi padat atau semi cair yaitu media yang menggunakan agar dengan presentase 50% (Sastrahidayat *et al.* 2013).

J. Ciprofloxacin

Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif adalah Ciprofloxacin. Ciprofloxacin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon. Fluorokuinolon mempunyai daya antibakteri yang lebih besar dan toksisitas yang lebih rendah. Ciprofloxacin memiliki efek antibakteri dengan spektrum luas. Mekanisme kerja Ciprofloxacin menyekat sintesis DNA bakteri dengan jalan menghambat topoisomerase II (DNA girase) pada bakteri. Penghambatan DNA girase akan mencegah relaksasi *supercoiled* DNA secara positif yang dibutuhkan untuk proses replikasi DNA (Irene dan Mochammad 2009).

K. Landasan Teori

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat yang khas membentuk pasangan dan rantai selama pertumbuhan. *Streptococcus mutans* merupakan spesies utama pada plak gigi yang memiliki peran penting dalam etiologi karies (Chairani *et al.* 2018). Penyakit karies gigi merupakan penyakit yang disebabkan oleh plak gigi, yang sampai saat ini masih menjadi masalah utama dalam bidang kesehatan mulut dan gigi. Plak gigi adalah lengketan yang berisi bakteri dan produk-produknya yang terbentuk pada permukaan gigi. Bakteri yang berperan penting dalam pembentukan plak gigi adalah bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk polisakarida ekstraseluler, yaitu jenis *Streptococcus*. Bakteri *Streptococcus* yang ditemukan dalam jumlah besar pada plak penderita karies adalah *Streptococcus mutans* (Handayani *et al.* 2017).

Daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) merupakan salah satu spesies tanaman yang termasuk famili dari *Asteraceae* (Putri *et al.* 2017). Penelitian sebelumnya disebutkan dalam hasil skrining kandungan daun stevia bahwa daun stevia mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan steroid (Siddique *et al.* 2014). Komponen yang terkandung dalam ekstrak daun stevia terdiri dari rebaudioside A 28,8%, rebaudioside C 25,2%, stevioside 17,0%, dan dulcoside A 10,2% (Limanto 2017).

Penelitian aktivitas antibakteri ekstrak daun stevia terhadap *Streptococcus mutans* pernah dilakukan Mohammadi-Sichani *et al.* (2012). Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia terhadap *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 10% membentuk diameter zona hambat 27,0 mm sehingga perlu dilanjutkan ke tahap fraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk menarik senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun stevia yang memiliki sifat antibakteri sesuai dengan polaritasnya.

Pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang paling sederhana (Leba 2017). Hasil dari ekstraksi kemudian dilanjutkan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang aktif. Fraksinasi merupakan suatu metode pemisahan

senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut air dan pelarut organik (Dalimunthe *et al.* 2016).

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol, *n*-heksana, etil asetat dan air. Etanol yang juga disebut etil alkohol merupakan jenis pelarut yang mudah menguap, mudah terbakar, dan tidak berwarna serta memiliki aroma yang khas. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol (Haeria 2013). Etanol dapat melarutkan senyawa alkaloid, diglikosida, fenolik, flavonoid, dan sedikit minyak atsiri (Mardiyaningsih dan Resmi 2014). *n*-Heksan merupakan pelarut jenis nonpolar sehingga *n*-heksan dapat melarutkan senyawa bersifat nonpolar (Romadanu *et al.* 2014). Pelarut *n*-heksan bersifat inert, memiliki titik didih yang rendah serta dapat melarutkan dengan cepat (Aziz 2009). *n*-Heksan mampu menarik golongan senyawa flavonoid, terpenoid/steroid, dan fenolik, alkaloid (Haeria *et al.* 2016).

Etil asetat merupakan pelarut semipolar dapat melarutkan senyawa semipolar pada dinding sel (Romadanu *et al.* 2014). Etil asetat dapat melarutkan senyawa golongan alkaloid, aglikon, monoglikosida, terpenoid, dan steroid (Mardiyaningsih dan Resmi 2014). Penelitian Heni *et al.* (2015) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mampu menarik golongan senyawa flavonoid, saponin dan polifenol. Air dipilih sebagai pelarut karena dapat mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat polar karena air bersifat polar, air sebagai pelarut polar umumnya akan melarutkan senyawa golongan gula, asam amino, protein, poliglikosida, tanin, garam alkaloid, dan polifenol (Mardiyaningsih dan Resmi 2014).

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode dilusi dan metode difusi. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah Ciprofloxacin. Ciprofloxacin adalah antibiotik golongan fluorokuinolon. Mekanisme kerja Ciprofloxacin menyekat sintesis DNA bakteri dengan jalan menghambat topoisomerase II (DNA girase) pada bakteri. Penghambatan DNA

girase akan mencegah relaksasi *supercoiled* DNA secara positif yang dibutuhkan untuk proses replikasi DNA.

L. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini, yaitu :

Pertama, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) stevia merupakan fraksi yang paling aktif terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Ketiga, nilai KHM dan KBM dari ekstrak dan fraksi teraktif daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dapat ditentukan.