

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Karandas

1. Sistematika tanaman

Menurut Jayakumar dan Muthuraman (2018) sistematika tanaman karandas secara lengkap sebagai berikut :

Kingdom	:	Plantae
Class	:	Angiospermae
Ordo	:	Gentianales
Family	:	Apocynaceae
Genus	:	Carissa
Spesies	:	<i>Carissa carandas</i> L.



Gambar 1. Tanaman karandas (*Carissa carandas* L.).
Sumber : Jayakumar dan Muthuraman (2018)

2. Nama daerah

2.1 Nama lain. *Carissa salicina* Lam., *Arduina carandas* (L.) Baill., *Echites spinosus* Burm.f., *Jasminonarium carandas* (L.) (Ali *et al.* 2015). Bengal Currant atau Christ's thorn (English), karanda, kerenda (Malaysia), karaunda (India), nam phrom atau namdaeng (Thailand), caramba (Philippines), kakai (Tamil), dan ci huang guo (Chinese) (Swami *et al.* 2010).

2.2 Nama lokal. Buah Samarinda (Jawa); Buah Renda (Sumatera, Melayu); Senggaritan (Nusa Tenggara Timur) (Swami *et al.* 2010).

3. Morfologi tanaman

Tanaman karandas merupakan pohon kecil atau semak besar setinggi 3 meter. Batang tegak, bulat, bercabang banyak, permukaan kasar, berduri tajam, berwarna coklat. Daun tunggal, berwarna hijau, tangkai pendek, berhadapan, helai daun lonjong, ujung bulat, pangkal bulat, tepi rata, panjang 4-8 cm, lebar 2,5-5 cm, permukaan licin, tulang daun menyirip. Bunga majemuk, bentuk payung, diujung cabang dan ketiak daun, tangkai panjang 6-20 mm, kelopak berbulu, panjang 2,5-3 mm, benang sari melekat pada dasar bunga, dasar mahkota membentuk tabung. Buah buni, bulat memanjang, panjang 1-2 mm, lunak, saat masih muda berwarna merah setelah tua berwarna kehitaman. Biji bulat pipih, jumlah banyak, kecil, berwarna putih. Akar tunggang berwarna putih (Swami *et al.* 2010)

4. Khasiat tanaman

Secara empiris tanaman karandas digunakan oleh masyarakat sebagai obat antidiare, stomatika, dan anthelmintika (Agarwal *et al.* 2012). Selain itu bagian buah digunakan untuk antiscorbutik, diabetes, gangguan pencernaan, penyakit kulit, gangguan kemih, luka, meningkatkan nafsu makan, dan untuk memperkuat otot-otot jantung. Batang digunakan untuk meredakan penyaki kulit. Akar digunakan untuk obat sakit perut, gangguan kemih, gangguan pencernaan, dan luka. Daunnya digunakan untuk menyembuhkan diare, sakit telinga, demam, nyeri pada mulut dan tenggorokan, dan sifilis (Ali *et al.* 2015).

5. Kandungan kimia

Kandungan tanaman karandas berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa daun karandas mengandung triterpenoid, carissin, carandinol, tanin, asam oleanolic, asam ursolic, asam betulinic, stigmasterol, dan β -sitosterol (Siddiqui *et al* 2003; Begum *et al* 2013; Mehmood *et al* 2014). Penelitian lain menyebutkan kandungan dalam daun karandas adalah alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, dan steroid (Verma *et al.* 2011).

5.1 Alkaloida. Alkaloid biasanya terwarna, besifat optis aktif, dan banyak yang berbentuk kristal, hanya sedikit yang berupa cairan, serta dapat dideteksi

menggunakan pereaksi Dragendorff. Pengujian alkaloid dilakukan secara sederhana, untuk alkaloid yang terkandung dalam daun atau buah segar memiliki rasa pahit di lidah. Sebagai basa, alkaloid dari tumbuhan diekstraksi menggunakan pelarut alkohol yang bersifat asam lemah (HCl 1 M atau asam asetat 10%), selanjutnya diendapkan dengan amonia pekat (Harborne 1987). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Alamsyah *et al.* 2014).

5.2 Saponin. Saponin adalah senyawa aktif yang dapat membentuk sabun, pada konsentrasi rendah dapat menghemolisasi sel darah merah (Harborne 1987). Penyarian senyawa saponin menggunakan pelarut etanol 70% karena dapat memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri, sehingga mengakibatkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat, dan nukleotida keluar, menyebabkan sel bakteri lisis (Alamsyah *et al.* 2014).

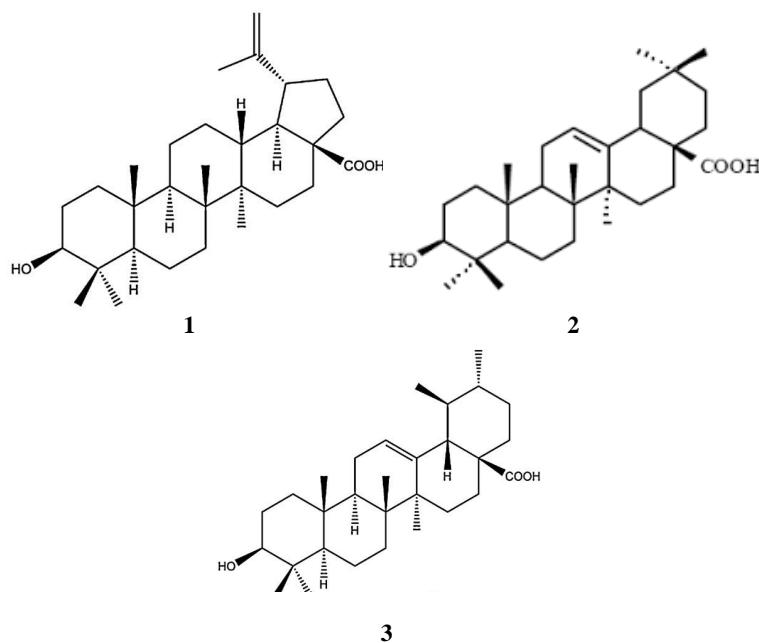
5.3 Flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air, dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada lapisan air setelah dikocok dengan eter. Flavonoid termasuk golongan senyawa polifenol yang strukturnya merupakan turunan dari anti aromatik flavan atau 2 fenil-benzopira. Flavonoid dapat digambarkan dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆, yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambung oleh rantai alifatik tiga karbon (Illing *et al.* 2017). Flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang merupakan bentuk kombinasi glikosida (Harborne 1987).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan mengganggu sintesis membran sel melalui penghambatan yang menyebabkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang pada peptidoglikan membran sel sehingga menuju struktur yang lemah dan mengakibatkan kerusakan dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2015).

5.4 Tanin. Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol yang karakteristiknya dapat membentuk senyawa kompleks. Tanin larut dalam pelarut organik polar tetapi

tidak larut dalam pelarut non polar (Jayanegara *et al.* 2008). Mekanisme tanin sebagai antibakteri dengan mengerutkan membran sel atau dinding sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri itu sendiri (Alamsyah *et al.* 2014).

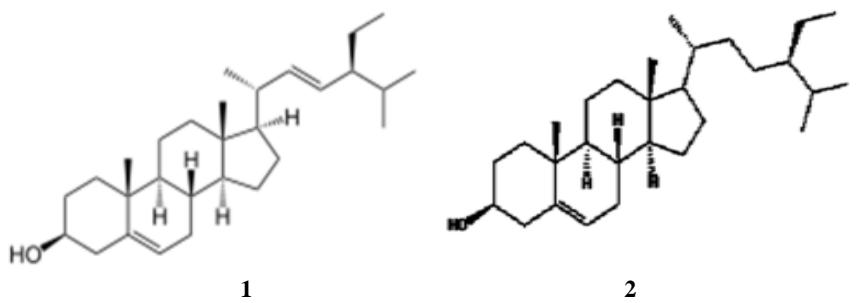
5.5 Triterpenoid. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik. Triterpene yang tersebar luas diketahui pada tanaman yaitu triterpena pentasiklik α -amirin dan β -amirin serta asam turunannya yaitu asam ursolat dan asam oleanolat, asam batulinat (Harborne 1987). Mekanisme kerja triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer kuat yang menyebabkan porin rusak. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuk senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2015).



Gambar 2. Struktur senyawa (1) asam batulinat, (2) asam oleanolic, (3) asam ursolic
Sumber : Begum *et al.* 2013

5.6 Steroid. Steroid adalah golongan senyawa triterpenoid. Senyawa fitosterol yang terdapat pada setiap tumbuhan tinggi yaitu β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne 1987). Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri dengan menghambat penyerapan kolesterol pada bakteri sehingga mengurangi kolesterol yang dibutuhkan oleh bakteri. Steroid dapat berinteraksi dengan

membran fosfolipid sel yang impermeabel terhadap senyawa lipofilik, sehingga menyebabkan integritas menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Sulastrianah *et al.* 2015).



Gambar 3. Struktur senyawa (1) stigmasterol dan (2) β -sitosterol
Sumber : Jannah *et al.* (2013)

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia berasal dari kata simpel yang berarti satu atau sederhana, oleh karena itu istilah simplisia digunakan untuk menyebut bahan obat alam yang masih alami, belum mengalami perubahan bentuk, atau biasanya berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplia yang berasal dari tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat tanaman, atau gabungan dari ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia bagian dari hewan yang belum diolah atau masih utuh, bagian hewan atau zat-zat yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral sama dengan simplisia nabati ataupun hewani, belum mengalami pengolahan atau telah diolah dengan cara sederhana, dan belum berupa bahan kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

2. Pengumpulan simplisia

Bagian simplisia yang digunakan misalnya daun, buah, bunga, biji, batang, rimpang, umbi lapis, atau akar. Beberapa tanaman, zat berkhasiat tidak terdapat diseluruh bagian tanaman, ada bagian dari tanaman yang mengandung racun dan tidak dikehendaki. Bagian tanaman yang dikehendaki seperti daun sebaiknya tidak tercampur dengan bagian lain dari tanaman seperti tangkai, bunga, dan biji. Pengumpulan simplisia harus memperhatikan kondisi khusus seperti pemanenan

daun yang dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, yaitu saat tanaman mulai berbunga atau buah mulai masak. Untuk pengambilan pucuk daun, dipetik pada saat warna pucuk daun berubah menjadi daun tua (Gunawan & Mulyani 2004).

3. Pengeringan simplisia

Pengeringan simplisia bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tidak mudah ditumbuhinya bakteri dan kapang. Pengeringan berakibat hilangnya aktivitas enzim yang dapat menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif dan mempermudah dalam proses pengolahan selanjutnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pengeringan yaitu ketebalan bahan, luas permukaan bahan, kelembaban bahan, suhu pengeringan, waktu pengeringan, dan kelembaban udara, serta sirkulasi udara (Gunawan & Mulyani 2004).

4. Penyerbukan

Proses penyerbukan dimaksudkan agar meningkatkan luas permukaan bahan, sehingga senyawa kimia dalam tanaman dapat ditarik secara optimal. Daun yang sudah kering selanjutnya dihaluskan dengan blender atau grinding dan diayak dengan ayakan mesh nomor 40 (Voigt 1995).

C. Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Proses penyarian pada sel yang dindingnya masih utuh, zat aktif yang terlarut pada cairan penyari untuk keluar dari sel harus melewati dinding sel. Proses penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk dan perbedaan konsentrasi mulai dari pusat butir serbuk sampai ke permukaan maupun pada perbedaan konsentrasi pada lapisan batas (Depkes 1986).

Ekstrak adalah bentuk sediaan berupa kering, kental, atau cair dibuat dengan cara menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, soxletasi, perkolasasi, atau penyeduhan dengan air mendidih (Anief 2010). Cairan penyari yang dapat digunakan berupa air, etanol, eter, atau campuran etanol dalam air (Depkes 1986).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses penyarian yang sederhana. Pengekstrakan simplisia menggunakan beberapa pelarut dengan penggojokan berkali-kali atau pengadukan pada suhu ruang (kamar). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel, maka larutan yang terpekat akan didesak keluar sel. Proses ini terus berlangsung sampai terjadi keseimbangan konsentrasi di luar dan di dalam sel (Depkes 1986).

Pembuatan ekstrak dengan maserasi menggunakan pelarut yang sesuai, jika tidak dinyatakan lain menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:10). Serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol gelap yang ditambahkan pelarut etanol. Maserat didiamkan selama 6 jam pertama dan digojok sesekali, kemudian didiamkan selama 18 jam. Selanjutnya maserat dan residu dipisahkan, proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan setengah jumlah pelarut yang sama. Semua maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 40°C sampai didapatkan maserat yang pekat (Depkes 2013).

Maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung senyawa aktif mudah larut dalam pelarut dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. Penyarian dengan pelarut air dapat ditambahkan dengan bahan pengawet (gula, etanol, kloroform, atau gliserin) pada awal penyarian untuk mencegah tumbuhnya kapang, khamir, dan kuman. Kelebihan metode maserasi yaitu penggerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, serta mudah diperoleh. Kelemahan metode ini yaitu jumlah pelarut yang digunakan banyak dan hasil penyarian kurang sempurna (Depkes 1986).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang umumnya digunakan dalam fraksinasi yaitu *n*-heksan, kloroform, dan air. Penarikan senyawa non polar dan lemak digunakan pelarut *n*-heksan, untuk

senyawa semi polar digunakan kloroform, dan untuk menarik senyawa polar menggunakan pelarut air. Dari proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar, sedangkan senyawa non polar akan larut pada pelarut yang bersifat non polar juga. Setiap fraksi diuapkan sampai kental dengan alat *rotary evaporator* pada suhu kurang lebih 50°C (Mutiasari 2012).

4. Pelarut

Penyarian ekstrak daun karandas dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya dikarenakan kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun karandas memiliki polaritas yang berbeda-beda, sehingga dengan dilakukannya fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling aktif terhadap bakteri *Escherichia coli*.

4.1. Etanol 70%. Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kuman dan kapang sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan senyawa alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakuinon, flavonoid, steroid, damar, dan klorofil. Sedikit larut pada lemak, malam, tanin, dan saponin. Kerugian penggunaan etanol adalah harganya yang mahal (Depkes 1986). Pelarut etanol lebih mudah menembus mebran sel untuk mengekstrak senyawa intraseluler dari tanaman. Metanol lebih polar dari pada etanol tetapi karena sifat sitotoksik, maka metanol tidak cocok untuk uji aktivitas antibakteri karena dapat menyebabkan hasil yang tidak sesuai (Tiwari *et al.* 2011).

4.2. *n*-heksan. Pelarut *n*-heksan adalah pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksan dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar seperti golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, serta keratenoid (Tiwari *et al.* 2011).

4.3. Kloroform. Kloroform merupakan pelarut organik yang mampu memisahkan lipid dan terpenoid (Harborne 1987). Kloroform termasuk pelarut semi polar berupa cairan tidak berwarna, tidak mudah terbakar, memiliki titik didih 61°C, berbau khas, sangat mudah menguap, merupakan asam lemah, tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik, dan kloroform murni peka terhadap cahaya. Kloroform merupakan pelarut yang baik untuk banyak senyawa organik seperti garam ammonium, sulfanium, dan phospharium, minyak asetat, lemak, alkaloida, lilin dan damar (Vogel 1979). Kloroform juga dapat melarutkan flavonoid dan triterpenoid, diantaranya asam ursolic, asam oleanolic, asam batulinic, carandinol, stigmasterol, dan β-sitosterol (Tiwari *et al.* 2011)

4.4. Air. Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena murah dan mudah diperoleh, sifatnya yang stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alami. Air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, tanin, gula, dan glikosida. Air juga dapat melarutkan gom, pati, protein, enzim, lilin, lendir, lemak, pektin, zat warna, dan asam organik (Depkes 1986).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu metode pemisahan kandungan kimia dalam suatu bahan. Proses pemisahan berdasarkan keseimbangan heterogen yang terjadi selama bergeraknya pelarut yang disebut fase gerak melewati fase diam untuk memisahkan dua atau lebih komponen dari materi yang dibawa oleh pelarut. Fase diam berupa padatan atau cairan, dan fase gerak dapat berupa cairan atau gas.

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi, atau gabungannya. KLT dapat digunakan untuk pemisahan senyawa yang sangat berbeda seperti, senyawa organik alam dan senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion anorganik. Kelebihan lain dari KLT yaitu memerlukan peralatan sederhana, sampel yang dipakai sangat sedikit (2-20 µg) dan waktu yang dibutuhkan tidak lama (2-5 menit). Kelemahan saat menggunakan KLT adalah tidak efektif untuk skala industry (Gritter *et al.* 1991).

Metode kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk penentuan nilai *Retention Factor* (Rf) pada bercak noda, dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Harga Rf berkisar 0,2-0,8 dan dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya suhu, pelarut, struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, tebal dan kerataan dari lapisan penyerap, jumlah cuplikan yang digunakan serta teknik percobaan (Sastrohamidjojo 2007).

1. Fase diam

Fase diam adalah lapisan tipis penyerapan atau media terpilih yang digunakan sebagai media pembawa. Penjerap diletakan pada penyangga sebagai pelapis untuk mendapatkan lapisan yang stabil dengan ukuran sesuai. Penyangga yang sering digunakan adalah lempeng gelas, lembaran plastik, dan aluminium. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika gel, alumina, selulosa, dan kieselguhr (Gritter *et al.* 1991).

Lempeng KLT yang sering digunakan memiliki ukuran standar 20 x 20 cm, ukuran lain dari lempeng KLT yaitu 5 x 20 cm, 10 x 20 cm, dan 20 x 40 cm. Lapisan tipis dapat mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak tak berwarna pada lapisan yang telah dikembangkan. Lapisan yang mengandung fluoresensi akan berpendar apabila disinari pada panjang gelombang yang sesuai. Apabila senyawa bercak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau mengandung cincin aromatik, maka sinar UV yang mengeksitasi tidak akan mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya berupa bercak gelap dengan latar belakang berfluoresensi. Indikator terkandung pada penjerap dengan konsentrasi 1% (Gritter *et al.* 1991).

2. Fase gerak

Sifat dan komposisi kimia fase gerak ditentukan oleh jenis zat yang dipisahkan dan jenis penjerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi fase gerak dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut. Pelarut digolongkan berdasarkan kemampuan dasarnya membuat ikatan

hidrogen. Fase gerak yang biasa digunakan yaitu heksana, eter, kloroform, aseton, toluen, asetonitril, etil asetat, etanol, metanol, dan air (Gritter *et al.* 1991).

3. Pereaksi semprot

Penyemprotan digunakan untuk mengetahui letak bercak senyawa yang terwarna pada lapisan yang telah dielusi. Cara penampakan digolongkan dalam penampakan bercak umum dan bercak khas. Bercak umum digunakan untuk semua atau sebagian besar senyawa organik. Bercak khas hanya digunakan untuk jenis senyawa atau golongan tertentu. Pereaksi semprot yang dipakai harus disimpan dalam lemari asam yang baik. Contoh pereaksi semprot khas yang digunakan dalam KLT diantaranya Stibium triklorida dalam CHCl_3 untuk mendeteksi senyawa steroid dan glikosid steroid ditandai dengan terbentuknya warna, pereaksi dragendorff akan membentuk warna jingga jika positif mengandung alkaloid, dan FeCl_3 akan berubah warna apabila positif mengandung senyawa fenol (Gritter *et al.* 1991).

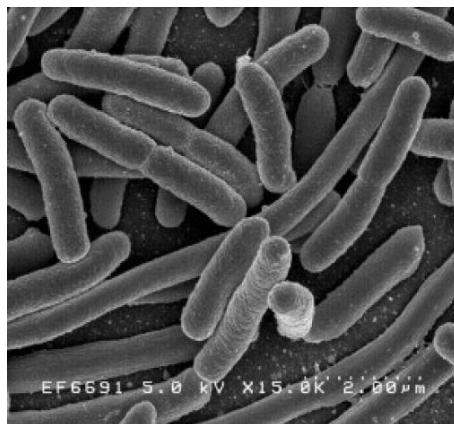
E. *Escherichia coli* ATCC 25922

1. Klasifikasi *Escherichia coli*

Menurut Jawetz *et al.* (2007) sistematika bakteri *Escherichia coli* sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryotae
Divisi	: Gracilicutes
Classis	: Scotobacteria
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia

Species : *Escherichia coli*



Gambar 4. Morfologi bakteri *Escherichia coli*
Sumber : Escherich 1885

2. Morfologi dan Identifikasi

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek (kokobasil), mempunyai flagel, berukuran $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$, dan memiliki simpai. *Escherichia coli* termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae, tumbuh dengan baik pada hampir semua media pertumbuhan bakteri, dapat meragi laktosa, dan bersifat mikro aerofilik (Radji 2010). Pada biakan *Endo Agar* akan membentuk koloni berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. *Escherichia coli* dapat hidup soliter maupun berkoloni, umumnya motil, tidak membentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter & Wise 2004).

Kebanyakan *Escherichia coli* dalam usus bersifat non patogen serta membantu fungsi normal dan nutrisi. Bakteri *Escherichia coli* menjadi patogen apabila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran kemih dapat menyebabkan ISK, di paru-paru atau di peritoneum dapat menyebabkan peradangan. Sebagian besar penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak dimasak. Penularan penyait infeksi ini dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Jawetz *et al.* 2012).

3. Fisiologi bakteri

Bakteri *Escherichia coli* tumbuh baik pada temperatur $8-48^\circ\text{C}$ dan pada temperatur optimum 37°C . Bakteri ini menghasilkan kolisin, yang dapat melindungi

saluran pencernaan dari bakteri usus yang patogenik, dipakai sebagai indikator untuk menguji adanya pencemaran air oleh tinja. *Escherichia coli* bersifat lateral yaitu peritrik dimana flagel tersebar dari ujung-ujung sampai pada sisi. Rata-rata pergerakan bakteri kira-kira 10 cm/jam. Flagel digunakan untuk bergerak, melekat, dan juga berkonjugasi. *Escherichia coli* berada dalam medium yang mengandung sumber karbon maka akan mengubah derajat asam (pH) dalam medium menjadi asam dan akan membentuk gas sebagai hasil proses terurainya glukosa menjadi senyawa lain (Melliawati 2009).

4. Toksin

4.1 *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC). Enterotoksin yang berhasil diisolasi dari *Escherichia coli* adalah toksin LT (termolabil) dan toksin ST (termostabil). Produksi kedua jenis toksin ini diatur oleh plasmid. Plasmid dapat berpindah dari satu sel bakteri ke bakteri yang lainnya. Bakteri *Escherichia coli* mempunyai dua jenis plasmid yaitu plasmid yang menyandi pembentukan toksin LT dan ST serta plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja. Toxin LT bersifat sitopatik terhadap sel tumor adrenal dan sel ovarium. Toxin LT bekerja merangsang enzim adenilat siklase yang terdapat dalam sel epitel mukosa usus halus, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel usus halus sehingga terjadi akumulasi cairan dalam usus dan berakhir dengan diare. Kekuatan toxin LT 100 kali lebih rendah dibandingkan dengan toxin kolera dalam menyebabkan diare. Toxin ST tidak merangsang aktivitas enzim adenilat siklase. Toxin ST bekerja dengan mengaktifkan enzim guanilat siklase menghasilkan guanosin monofosfat siklik, yang menyebabkan gangguan absorpsi natrium, klorida, dan dapat menurunkan motilitas usus halus (Radji 2010).

4.2 *Escherichia coli* enteroagregatif (EAggEC). Sebagian strain *Escherichia coli* dapat melekat pada sel enterik sehingga menyebabkan agregasi sel enterik tersebut. *Escherichia coli* tidak menginvasi sel dan dapat menyebabkan diare kronik. Bakteri ini diselubungi oleh struktur fibri yang diduga memperantarai penempelan. Strain mengekspresikan toksin yang menyerupai ST atau toksin yang menyerupai hemolisin (Gillespie & Bamford 2009).

4.3 *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC). *Escherichia coli* enteropatogenik merupakan yang pertama dikenal sebagai patogen primer yang menyebabkan wabah diare pada tempat perawatan anak. Penempelan berhubungan dengan hilangnya mikrofili dan disebabkan oleh pengaturan ulang dari aktin sel pejamu (Gillespi & Bamford 2009).

4.4 *Escherichia coli* enterohemoragik (EHEC). Strain ini menghasilkan verotoksin yang dinamakan demikian karena aktivitasnya pada sel vero *in vitro*. Diare berdarah yang disebabkan dapat dipersulit oleh hemolisis dan gagal ginjal akut: sindrom hemolitik-uremik. Organisme ini komensal pada sapi dan ditransmisikan pada manusia melalui higiene yang buruk di tempat pemotongan hewan dan tempat produksi makanan (Gillespi & Bamford 2009).

5. Pengobatan

Penyakit usus dalam terapinya harus mempertahankan keseimbangan cairan dan elektrolit. Pemberian antibiotik dapat memperpendek durasi gejala, antibiotik yang diperlukan dalam terapi penyakit ekstra intestinal yaitu Ampisilin, Sefotaksim, Aminoglikosida, Siprofloksasin, Trimetoprim atau Sulfametoksazol (Cornelissen *et al.* 2015).

Bakteri *Escherichia coli* diisolasi dari infeksi yang terjadi pada masyarakat biasanya sensitif terhadap obat antimikroba yang efektif terhadap bakteri Gram negatif meskipun ada beberapa galur yang resisten. Galur yang resisten terutama dijumpai pada penderita yang memiliki riwayat pengobatan antibiotik. Cairan infus dan elektrolit perlu diberikan pada penderita diare berat (Radji 2010).

F. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat atau senyawa yang dapat menekan atau membunuh pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Senyawa yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksitas selektif setinggi mungkin, artinya senyawa tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap bakteri tetapi relatif tidak toksik terhadap hospes. Berdasarkan sifat toksitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri

yang dikenal sebagai zat bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh bakteri yang dikenal sebagai bakterisid. Konsentrasi senyawa minimum yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Ganiswara 2007).

2. Mekanisme kerja antibakteri

2.1 Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif disusun oleh lapisan peptidoglikan yaitu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Mekanisme kerjanya dengan mencegah ikatan silang peptidoglikan pada tahap akhir sintesis dinding sel dan memblok aktivitas enzim transpeptidase yang membungkus ikatan silang polimer-polimer gula panjang yang membentuk dinding sel bakteri sehingga dinding sel menjadi rapuh dan mudah lisis (Pratiwi 2008). Contoh antibakteri yang dapat menghambat sintesis dinding sel yaitu golongan penisilin, sefalosporin, fosfomisin, vankomisin, sikloserin, dan basitrasin (Radji 2010).

2.2 Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel digunakan sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang tidak terlarut lainnya. Kerusakan selaput sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen dari dalam sel bakteri yaitu protein, nukleotida, asam nukleat, dan lain-lain. Contoh antibakteri yang dapat mengganggu permeabilitas membran sel sehingga mempengaruhi kehidupan sel bakteri yaitu nistatin, polimiksin, golongan makrolida, dan poliena seperti amfoterisin B (Radji 2010).

2.3 Penghambatan sintesis protein. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein dengan bantuan mRNA dan tRNA berlangsung di ribosom. Mekanisme kerja antibakteri dengan menyebabkan koenzim pada mRNA salah dibaca oleh tRNA saat sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel bakteri. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini adalah rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, aktinomisin, eritromisin, klindamisin, gentamisin, dan kloramfenikol (Radji 2010).

2.4 Penghambatan sintesis asam nukleat (DNA/RNA). Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik terhadap sel tubuh hospes, sehingga hanya bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri. Contoh antibakteri yang termasuk golongan ini yaitu asam nalidiksat, golongan kuinolon, dan rifampisin (Radji 2010). Rifampisin menghambat sintesis mRNA dengan cara mengikat subunit β -RNA polimerase bakteri sehingga menghambat transkripsi mRNA. Antibiotik kuinolon dan asam nalidiksat menghambat enzim DNA girase pada replikasi DNA, sehingga menghambat proses replikasi DNA dan transkripsi mRNA (Pratiwi 2008).

2.5 Penghambatan sintesis metabolit esensial. Penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial dengan adanya kompetitor yaitu antimetabolit. Antimetabolit merupakan substansi yang menghambat metabolit mikroorganisme secara kompetitif, karena memiliki struktur menyerupai dengan substrat normal bagi enzim metabolisme. Contoh antimetabolit yang bekerja menghambat metabolisme esensial adalah sulfonamide dan *para-amino benzoid acid* (PABA) (Pratiwi 2008).

3. Uji aktivitas antibakteri

3.1 Metode difusi. Metode *disc diffusion* (tes Kirby & Bauer) dilakukan dengan mengukur area jernih pada permukaan media agar yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Evaluasi pada pengujian ini untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas antibakteri pada media tersebut. Zona hambat yang terbentuk dilihat dari area bening disekitar cakram yang berisi larutan uji. Keuntungan metode ini adalah lebih cepat dan mudah, tidak memerlukan alat dan bahan yang banyak. Kelemahan dari metode ini yaitu aktivitas antibakterinya dapat dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium dan faktor difusibilitas obat karena suspensi bakteri tidak tersebar merata seperti metode dilusi (Pratiwi 2008).

3.2 Metode dilusi. Metode dilusi atau pengenceran bertujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi-fraksi terhadap bakteri *Escherichia coli*. Pertumbuhan

bakteri yang terhambat atau bakteri yang mati dikarenakan adanya zat antibakteri yang dapat melakukan penghambatan terhadap metabolisme sel mikroba, sintesis dinding sel, penghambatan permeabilitas membran sel bakteri, penghambatan sintesis protein, dan penghambatan sintesis asam nukleat. Secara garis besar bakteri Gram negatif memiliki lapisan membran fosfolipid yang tersusun atas polisakarida sehingga membuat dinding sel bakteri Gram negatif impermeabel terhadap antibakteri. Bakteri Gram positif lebih rentan terhadap antibakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan di bagian luar yang permeabel (Ravikumar *et al.* 2011).

Cara yang dilakukan dengan membuat seri pengenceran antimikroba pada medium cair yang ditambahkan 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 selanjutnya dikultur ulang pada media padat tanpa penambahan mikroba uji. Cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam. Media padat yang masih terlihat bening setelah diinkubasi ditetapkan sebagai nilai KBM. Keuntungan metode ini yaitu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008). Kekurangan metode ini yaitu sampel yang digunakan harus jernih, jika keruh mempersulit pengamatan (Jawetz *et al.* 2012).

G. Diare

Diare adalah penurunan konsentrasi dari tinja (menjadi lunak atau cair) dalam waktu 24 jam. Gambaran secara klinis diare adalah dengan frekuensi BAB tiga kali atau lebih dalam sehari dan menyebabkan badan lesu dan lemas, tidak nasu makan, dan sering didahului dengan muntah. Secara klinis penyebab diare dapat dikelompokkan dalam 5 golongan yaitu infeksi (bakteri, virus, dan parasit), malabsorbsi, alergi, keracunan, dan imunisasi/defisiensi. Salah satu bakteri yang menjadi pemicu diare adalah bakteri *Escherichia coli* (Kairupan *et al.* 2014). Penyebab penyakit diare itu sendiri antara lain virus yaitu *Rotavirus* (40-60%), bakteri *Escherichia coli* (20-30%), *Shigella sp.* (1-2%), dan parasit *Entamoeba histolytica* (<1%). Diare dapat terjadi karena higiene dan sanitasi yang buruk,

malnutrisi, lingkungan padat, dan sumber daya medis yang buruk (Ragil & Dyah 2017).

H. Siprofloksasin

Siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini karena merupakan pengobatan pertama pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter*, *Haemophylus sp*, dan *Chlamydia sp*. Mekanisme kerja antibiotik ini bertarget pada DNA girase dan topoisomerase IV. Antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui kanal protein terisi air (porins) pada membran luar bakteri secara intra seluler, obat ini menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA gyrase (Topoisomerase II) selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Topoisomerase IV memisahkan molekul DNA terikat silang yang dihasilkan dari replikasi DNA dan juga merupakan target dari siprofloksasin.

Resistensi terhadap kuinolon dapat berkembang melalui mutasi dalam gen kromosom bakteri yang mengkode DNA girase atau topoisomerase IV atau melalui transpor aktif obat keluar dari bakteri. Tidak ada mekanisme menginvasi kuinolon yang telah teridentifikasi. Sensitivitas telah menurun khususnya pada *Pseudomonas* dan *Staphylococcus*. Sensitivitas fluorokuinolon juga menurun pada *Salmonella*, *Netsseria gonorrhoeae*, dan *Streptococcus pneumonia* (Goodman & Gilman 2007).

I. Media

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh, mengandung nutrisi yang tepat untuk kehidupan mikroba. Media harus mengandung energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Media harus mengandung sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, dan faktor pertumbuhan organik. Media yang digunakan harus memenuhi persyaratan antara lain: mengandung nutrisi yang sesuai dengan bakteri spesifik yang akan dibiakkan, kelembaban dan kadar oksigen baik, pH sesuai, media harus steril dan tidak mengandung mikroorganisme lain, serta media diinkubasi pada suhu tertentu (Radji 2010). Media harus dalam keadaan steril, yaitu

sebelum ditanami mikroba yang diinginkan tidak ditumbuhkan mikroba lain. Pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium disebut media kultur. Pengetahuan tentang habitat normal mikroorganisme sangat membantu dalam pemilihan media yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium (Pratiwi 2008).

Bentuk media yang dikenal ada tiga jenis yaitu media padat (*solid medium*), media cair (*liquid medium*), dan media semi cair (*semi solid medium*) yang dapat dilihat dari ada tidaknya penambahan zat pemanfaat misalnya gelatin, agar-agar, dan lain-lain. Media padat dibuat dengan penambahan 12-15 gram agar-agar per 1000 mL media. Media yang memerlukan kadar air tinggi, jumlah agar-agar harus rendah sedangkan media yang memerlukan kadar air rendah, maka penambahan agar-agar harus banyak. Media padat umumnya digunakan untuk penanaman bakteri, jamur, ragi, dan juga mikroalga. Media cair tidak ditambahkan zat pemanfaat, digunakan untuk perbaikan mikroalga, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi, penambahan zat pemanfaat hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup fakultatif (Suriawiria 1986).

J. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, yang artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak ditemukan mikroba yang tidak diinginkan kehadirannya, baik yang mengganggu dan merusak media atau mengganggu kehidupan dan proses yang dilakukan (Waluyo 2004).

Kegiatan sterilisasi yang dilakukan mula-mula sterilisasi secara fisik yaitu dengan pemanasan, penggunaan sinar gelombang pendek seperti UV, atau dengan radiasi. Kemudian sterilisasi secara kimiawi yaitu memakai bahan kimia seperti dengan memakai desinfektan larutan alkohol dan larutan formalin. Selanjutnya sterilisasi secara mekanik yaitu dengan penggunaan saringan atau filter dengan pori-pori halus sehingga dapat menahan bakteri. Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang dari gelas dengan ukurannya disterilkan dengan autoklaf dan yang tidak ada

ukurannya disterilkan di oven suhu 170-180°C selama 2 jam, alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas dengan formalin (Suriawiria 1986).

K. Landasan Teori

Penelitian yang dilakukan oleh Verma *et al.* (2011) melaporkan bahwa ekstrak kloroform, etanol, diklorometan, aseton, toluen, dan etil asetat daun karandas yang diekstraksi dengan metode maserasi mempunyai kandungan senyawa alkaloid, glikosid, saponin, terpenoid, flavonoid, tanin, dan steroid. Penelitian lain yang dilakukan oleh Agarwal *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa ekstrak metanol, etanol, dan etil asetat daun karandas memiliki zona hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 berturut-turut adalah 21,0 mm; 19,5 mm; dan 22,0 mm.

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit diare. Mekanisme kerja *Escherichia coli* dalam menyebabkan diare dengan cara memproduksi enterotoksin yang berlebih. Kelebihan enterotoksin menimbulkan invasi pada lapisan epitelium dinding usus yang menyebabkan peradangan dan kekurangan cairan tubuh. Salah satu penyebab diare karena mengkonsumsi air atau makanan yang tercemar oleh bakteri *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan infeksi pada usus. Kebanyakan pasien yang terinfeksi bakteri ini mengalami gejala lesu, lemas, muntah, dan tidak nafsu makan (Kairupan *et al.* 2014).

Salah satu tanaman obat yang digunakan oleh masyarakat untuk mengobati diare adalah daun karandas yang memiliki kandungan senyawa triterpenoid, carissin, carandinol, tanin, asam oleanolic, asam ursolic, stigmasterol, β -sitosterol, alkaloid, flavonoid, saponin dan steroid. Senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Siddiqui *et al* 2003; Begum *et al* 2013; Mehmood *et al* 2014; Verma *et al* 2011).

Berdasarkan penelitian tersebut memberikan pemikiran kepada penulis bahwa daun karandas mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada penelitian ini penulis ingin membuktikan bahwa ekstrak maserasi dan fraksinasi daun karandas memiliki efek antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia

menggunakan beberapa pelarut dengan penggojokan berkali-kali atau pengadukan pada suhu ruang (kamar) yang bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan (Depkes 1986).

Fraksinasi digunakan untuk memisahkan komponen senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksan, kloroform, dan air. Pelarut *n*-heksan dapat melarutkan senyawa non polar, seperti golongan minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, serta keratenoid. Kloroform merupakan senyawa semi polar yang dapat melarutkan golongan senyawa organik seperti flavonoid dan terpenoid, diantaranya asam oleanolic, asam ursolic, asam batulinic, stigmasterol, β -sitosterol, dan carandinol (Tiwari *et al.* 2011). Senyawa-senyawa metabolit lainnya tidak ikut tertarik oleh pelarut kloroform sehingga dapat diperoleh senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri secara optimal. Air dapat melarutkan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan gula (Depkes 1986).

Pengukuran uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui fraksi teraktif yang didapatkan dilihat dari diameter zona hambat terhadap bakteri, setelah diketahui fraksi teraktif dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode dilusi dilakukan pada fraksi teraktif saja untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

L. Hipotesis

Berdasarkan teori dan hasil penelitian sebelumnya, sehingga dapat ditarik hipotesis sebagai berikut :

Pertama, fraksi *n*-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol 70% daun karandas memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi kloroform merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol daun karandas yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, dapat menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi paling aktif dari daun karandas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.