

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Indonesia kaya akan tanaman obat-obatan, yang mana masih belum dimanfaatkan secara optimal untuk kesehatan. Indonesia diketahui memiliki keragaman hayati terbesar ke dua di dunia setelah Brazil. Tanaman obat di Indonesia sebagian besar sudah dikenal dari jaman nenek moyang dan diturunkan khasiatnya secara turun temurun. Tanaman obat adalah tanaman yang memiliki khasiat obat dan digunakan sebagai obat dalam penyembuhan maupun pencegahan penyakit (1).

Salah satu tanaman yang dapat di manfaatkan untuk pengobatan tradisional maupun mengatasi masalah bakteri adalah dengan menggunakan tanaman obat, karena bahan alami lebih banyak diminati daripada penggunaan sintetis. Tanaman obat memiliki beberapa kelebihan yaitu tidak memiliki efek samping bila digunakan dengan benar, harganya murah, efektif untuk penyakit yang sulit disembuhkan dan penggunaannya tidak memerlukan tenaga medis. Penggunaan tanaman atau ekstrak tanaman merupakan pilihan yang relatif aman dan efektif dalam mengobati penyakit, pencegahan penyakit atau meningkatkan daya tahan tubuh (2).

Banyak sekali tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional, diantaranya daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob). Salah satu tumbuhan obat yang memiliki potensi efek antibakteri adalah daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.)R.M. King & H. Rob). Tumbuhan ini

berasal dari Amerika Selatan dan Tengah, kemudian menyebar ke daerah tropis Asia, Afrika, dan Pasifik (3).

Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang mempunyai bentuk dan susunan sel sederhana, umumnya bersifat patogen yaitu dapat menghasilkan toksin berupa enterotoksin yang dapat mencemari makanan dan apabila dikonsumsi manusia akan menimbulkan penyakit (4). Salah satu bakteri tersebut adalah *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi kulit yang ringan disertai pembentukan abses (5).

*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) merupakan salah satu spesies dari genus bakteri *Staphylococcus* yang paling sering ditemui dalam kepentingan klinis. Bakteri ini adalah bakteri gram positif dan termasuk *staphylococcus* dengan koagulasi negatif. Sebagian besar bakteri ini adalah flora normal pada kulit dan membran mukosa manusia (6).

Penelitian sebelumnya (Munthe, N., dkk) telah dilakukan skrining fitokimia daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) dengan menggunakan methanol maka didapatkan senyawa positif mengandung flavonoid, alkaloid, steroid/terpenoid dan saponin. Penelitian ini juga didapat bahwa ekstrak methanol daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *staphylococcus aureus* dan *escherichia coli* (7).

Berdasarkan latar belakang diatas, penulis tertarik ingin melakukan penelitian uji efek antibakteri ekstrak etanol daun Kirinyuh (*Chromolaena*

*Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Apakah ekstrak etanol daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

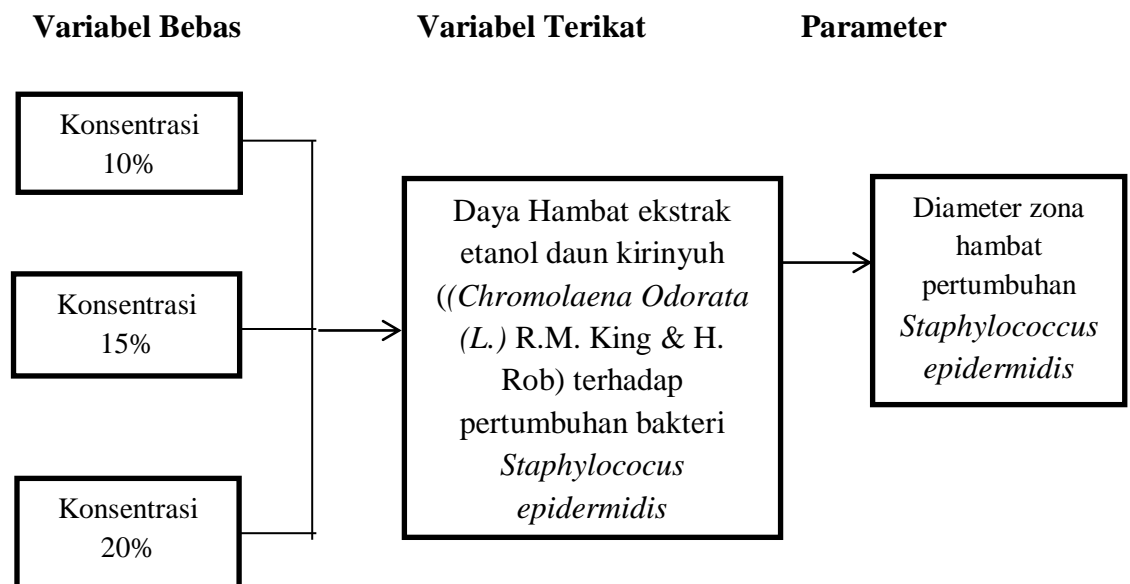
Untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang khasiat ekstrak etanol daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob).

## **1.5. Hipotesis**

Ekstrak etanol daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob) dapat menghambat bakteri *Staphylococcus epidemidis*.

## 1.6. Kerangka Konsep

Berdasarkan hal-hal yang dipaparkan diatas, maka kerangka konsep penelitian yang dilakukan sebagai berikut :



Gambar 1.1. Kerangka Konsep

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Uraian Tumbuhan**

Uraian tumbuhan meliputi habitat tumbuhan, sistematika tumbuhan, morfologi tumbuhan, kandungan dan manfaat tumbuhan .

##### **2.1.1. Habitat Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.) R.M. King & H. Rob*)**

Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.) R.M. King & H. Rob*) dalam bahasa Inggris disebut siam weed, Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.) R.M. King & H. Rob*) diperkirakan sudah tersebar di Indonesia sejak tahun 1910-an. Kirinyuh berasal dari Amerika Selatan dan Tengah, kemudian menyebar ke daerah tropis Asia, Afrika, dan Pasifik (8).

##### **2.1.2. Sistematika daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.) R.M. King & H. Rob*)**

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Dicotyledonae  
Ordo : Asterales  
Famili : Asteraceae  
Genus : *Chromolaena*  
Spesies : *Chromolaena odorata (L.) King & H.E. Robins*  
Nama Lokal : Kirinyuh



**Gambar 2.1.** Daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.)*  
R.M. King & H. Rob)

### 2.1.3. Nama Daerah

Nama-nama daerah Indonesia untuk tumbuhan ini antara lain : lenga-lenga (Sumatera Utara), Kirinyuh (Sunda), darismin (babanjaran), laruna, lahuna dan kopasanda (Makassar).

Istilah dalam bahasa Inggris dikenal sebagai *Siam Weed*, *Christmas Bush*, dan *Common Floss Flower*. *Chromolaena odorata (L.)* King & H. E. Robins memiliki nama lain : *Eupatorium odoratum L.*, *Eupatorium affine* Hook & Arn., *Eupatorium brachiatum* Wikstrom, *Osmiaodorata (L.)* Schultz-Bip, *Osmia floribunda* (Kunth) Schultz-Bip (8).

### 2.1.4. Morfologi Tumbuhan Daun Kirinyuh

Daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.)* R.M. King & H. Rob) adalah termasuk famili Asteraceae. Tumbuhan gulma siam ini tumbuh dengan tinggi 1-2 m, batang tegak, berkayu, ditumbuhi rambut-rambut halus, bercorak garis-garis membujur yang paralel. Helai daun berbentuk segitiga/bulat panjang dengan pangkal agak membulat dan ujung tumpul atau agak runcing, tepinya bergigi, mempunyai tulang daun tiga sampai lima, permukaan daun gulma siam berbulu

pendek, dan bila diremas terasa bau yang menyengat. Perbungaan majemuk berbentuk malai rata (*corymbus*) yaitu kepala bunga kira-kira berada pada satu bidang, lebarnya 6-15 cm, berbentuk bongkolan, warnanya lembayung kebiru-biruan.



**Gambar 2.2. Bunga** (*Chromolaena Odorata* (L.) R.M. King & H. Rob)

#### 2.1.5. Kandungan Tumbuhan Kirinyuh

Daun gulma siam mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavanoid, saponin, dan tanin. Flavonoid mengandung eriodiktol-7-4'-dimetil eter, naringenin-4'-metil eter dan 2',4-dihidroksi-4',5',6',- trimetoksi kalkon (Johari, dkk., 2012). Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun gulma siam adalah alkaloid pyrrolizidine, glikosida kardiak, tanin, terpenoid, saponin avenacin, senyawa fenol seperti protocatechuin, p-coumarin, ferulic, p-hidroksibenzoat, asam vanilik, flavonoid jenis quercetagetin, naringenin, kaempferol, sinensetin, scutellarein, luteolin, eriodiktiol, aromadendrin, apigenin, scutellarein, taxifolin, quercetagetin, minyak essensial seperti  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, germakren D,  $\beta$ -copaen-4-alpha-ol,  $\beta$ -caryopilen, geigeren, pregeijeren, cadinen, camphor, dan limonene (9).

### 2.1.6. Khasiat Daun Kirinyuh

Khasiat dari daun Kirinyuh adalah untuk menangani gigitan lintah, luka jaringan lunak, luka bakar, infeksi kulit. Daun gulma siam secara tradisional digunakan sebagai obat dalam penyembuhan luka, obat kumur untuk pengobatan sakit pada tenggorokan, obat batuk, obat malaria, antimikroba, sakit kepala, antidiare, astringent, antispasmodik, antihipertensi, antiinflamasi, mengobati diabetes, antikolesterol, antioksidan dan diuretik. Daun gulma siam juga telah diaplikasikan pada manusia untuk membantu pembekuan darah akibat luka bisul atau borok (9).

## 2.2. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstrak kering harus mudah digerus menjadi serbuk. Sebagai cairan penyari digunakan air, eter atau campuran etanol dan air (10). Ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat aktif dari bagian tanaman obat yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman obat tersebut (11).

Metode ekstraksi dapat dilakukan dengan cara :

### 1. Cara dingin

Metode ekstraksi secara dingin bertujuan untuk mengekstrakkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia yang tidak tahan terhadap panas atau bersifat *thermolabil*. Ekstraksi secara dingin dapat dilakukan dengan beberapa cara sebagai berikut :

a. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi simplisia dengan merendam dalam pelarut pada suhu kamar sehingga kerusakan atau degradasi metabolit dapat diminimalisasi. Pada maserasi, terjadi proses keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel sehingga diperlukan penggantian pelarut secara berulang. Kinetik adalah cara ekstraksi, seperti maserasi yang dilakukan dengan pengadukan, sedangkan digesti adalah cara maserasi yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar, yaitu 40-60 °C.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah cara ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Cara ini memerlukan waktu lebih lama dan pelarut lebih banyak. Untuk meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik.

2. Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah cara ekstraksi dengan pelarut pada suhu titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Agar hasil penyaringan lebih baik atau sempurna, refluks umumnya dilakukan berulang-ulang (3-6 kali) terhadap residu pertama. Cara ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan panas.

b. Soxhletasi

Soxhletasi adalah cara ekstraksi menggunakan pelarut organik pada suhu didih dengan alat soxhlet. Pada soxhletasi, simplisia dan ekstrak berada pada labu berbeda. Pemanasan mengakibatkan pelarut menguap, dan uap masuk dalam labu pendingin. Hasil kondensasi jatuh bagian simplisia sehingga ekstraksi berlangsung terus-menerus dengan jumlah pelarut relatif konstan. Ekstraksi ini dikenal sebagai ekstraksi sinambung.

c. Destilasi (penyulingan)

Destilasi merupakan cara ekstraksi untuk menarik atau menyari senyawa yang ikut menguap dengan air sebagai pelarut. Pada proses pendinginan, senyawa dan uap air akan terkondensasi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi. Cara ini umum digunakan untuk menyari minyak atsiri dari tumbuhan.

d. Infusa

Infusa adalah cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air, pada suhu 96-98°C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu 96°C tercapai). Bejana infusa tercelup dalam tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun.

e. Dekok

Dekok adalah cara ekstraksi yang mirip dengan infusa, hanya saja waktu ekstraksinya lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air (12).

### 2.3. Bakteri

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel, berukuran sangat kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai gen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat di bidang pangan, pengobatan, dan industri. Struktur sel bakteri relatif sederhana tanpa nucleus, kerangka sel, dan organel-organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Hal inilah yang menjadi dasar perbedaan antara sel prokariot dan sel eukariot yang lebih kompleks. Bakteri dapat ditemukan di hampir semua tanah, air, udara, dalam simbiosis dengan organisme lain maupun sebagai agen parasit (*pathogen*), bahkan dalam tubuh manusia (13).

#### 2.3.1. *Stapylococcus Epidermidis*

*Stapylococcus epidermidis* merupakan bakteri gram-positif, kokus berkelompok tidak teratur, koloni berwarna putih bakteri ini tumbuh cepat pada suhu 37 °C. Koloni pada pembenihan padat berbentuk bulat halus, menonjol, berkilau, tidak menghasilkan pigmen, berwarna putih porselen sehingga *stapylococcus epidermis* disebut *stapylococcus albus*, koagulasi-negatif dan tidak meragi manitol.

*Stapylococcus epidermidis* terdapat pada kulit, selaput lendir, bisul dan luka. Dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan (14).



Gambar 2.3 Bakteri *Staphylococcus Epidermidis*

Klasifikasi staphylococcus epidermidis adalah sebagai berikut :

|                 |   |
|-----------------|---|
| Divisi (Dvisio) | : Eukariota                               |
| Kelas (Classis) | : Schizomycetes                           |
| Bangsa (Ordo)   | : Eubacteriales                           |
| Suku (Familia)  | : Micrococcaceae                          |
| Marga (Genus)   | : Staphylococcus                          |
| Jenis (Spesies) | : <i>Staphylococcus Epidermidis</i> (14). |

### 2.3.2. Morfologi *Staphylococcus Epidermidis*

Bakteri yang memiliki genus *Staphylococcus* ini mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu warna koloni berwarna putih susu atau agak krem, bentuk koloni bulat, tepian timbul, serta sel bentuk bola, diameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  dan bersifat anaerob fakultatif. *Staphylococcus epidermidis* dapat menyebabkan infeksi kulit ringan yang disertai dengan pembentukan abses. *Staphylococcus epidermidis* biotipe-1 dapat menyebabkan infeksi kronis pada manusia.

Bakteri *Staphylococcus epidermis* merupakan bakteri gram-positif, tidak berspora, tidak motil, fakultatif anaerob, kemoorganotrofik, metil red positif, tumbuh optimum pada suhu 30-37  $^{\circ}\text{C}$  dan tumbuh baik pada NaCl 1-7%, dengan

dua pernafasan dan metabolisme fermentatif. Koloni biasanya buram, bisa putih atau krem dan kadang-kadang merah bata. Bakteri *Stapylococcus* mudah tumbuh pada berbagai macam-macam media, bermetabolisme aktif dengan meragikan karbohidrat dan menghasilkan pigmen yang bervariasi mulai dari pigmen berwarna putih sampai kuning tua (14).

### **2.3.3. Fatogenitas *Stapylococcus Epidermidis***

*Stapylococcus epidermidis* terdapat sebagai flora normal pada kulit manusia dan pada umumnya tidak menjadi masalah bagi orang normal yang sehat. Akan tetapi, kini organisme ini menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi nosokomial pada persendian dan pembuluh darah.

*Stapylococcus epidermidis* memproduksi sejenis toksin atau zat racun. Bakteri ini juga memproduksi semacam lendir yang memudahkannya untuk menempel dimana-mana, termasuk di permukaan alat-alat yang terbuat dari plastik atau kaca. Lendir ini pula yang membuat bakteri *stapylococcus epidermis* lebih tahan terhadap fagositosis (salah satu mekanisme pembunuhan bakteri oleh sistem kekebalan tubuh) dan beberapa antibiotika tertentu.

*Stapylococcus epidermidis* umumnya dapat menimbulkan penyakit pembengkakan (abses) seperti jerawat, infeksi kulit, infeksi saluran kemih, dan infeksi ginjal. *Stapylicoccus epidermidis* juga dapat menimbulkan infeksi pada neonatus, orang-orang yang sistem kekebalannya rendah, dan pada penderita yang menggunakan alat yang dipasang di dalam tubuh (15).

#### 2.3.4. Media Pertumbuhan Bakteri

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi (*nutrient*) yang digunakan oleh suatu mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembangbiak pada media tersebut. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi pada media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen selnya. Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (*nutrient*) yang berguna untuk membiakkan mikroba. Dengan mempergunakan bermacam-macam media dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat-sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroba (15).

#### 2.3.5. Macam-Macam Media

Media untuk kultur bakteri dalam mikrobiologi ada banyak jenisnya dan dapat menjadi tiga kelompok besar berdasarkan bentuk, komposisi/susunannya (15).

##### 1. Berdasarkan Bentuknya

Bentuk media ada tiga macam yang dapat dibedakan dari ada atau tidaknya bahan tambahan berupa bahan pematid seperti agar-agar atau gelatin. Bentuk media tersebut yaitu:

##### 1) Media Padat

Media padat merupakan media yang mengandung banyak agar atau zat pematid kurang lebih 15% agar sehingga media menjadi padat.

##### 2) Media semi padat

Media semi padat atau semi cair merupakan media yang mengandung agar kurang dari yang seharusnya kurang lebih 0,3% - 0,4% sehingga media menjadi kenyal, tidak padat dan tidak begitu cair.

### 3) Media cair

Media cair merupakan media yang tidak ditambahi bahan pematat, umumnya digunakan untuk pertumbuhan mikroalga.

## 2. Berdasarkan komposisi/susunannya

Berdasarkan komposisinya media dibagi atas :

- 1) Media alami/non sintesis merupakan media yang disusun dari bahan-bahan alami dimana komposisinya tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya seperti: kentang, tepung, daging, telur, dan ikan sayur. Contohnya: Tomato juice agar.
- 2) Media semi sintesis merupakan media yang disusun dari bahan-bahan alami dan bahan-bahan sintesis. Contohnya kaldu nutrisi disusun dari: Pepton 10,0 g, ekstrak daging 10,0 g, NaCl 5,0 g, dan aquadest 1000 ml.
- 3) Media sintesis, yaitu media yang disusun dari senyawa kimia yang jenis dan takarannya diketahui secara pasti. Contohnya : *Mac Conkey* Agar.

## 3. Berdasarkan bentuk

Berdasarkan bentuk, media perbenihan dapat dikelompokkan menjadi :

- 1) Media alami, yaitu media yang disusun oleh bahan-bahan alami seperti kentang, tepung, daging, telur, ikan, umbi-umbian lainnya dan sebagainya.
- 2) Media sintetis yaitu media yang disusun oleh senyawa kimia.

- 3) Media semi sintetik yaitu media yang tersusun oleh campuran bahan-bahan alam dan bahan-bahan sintesis.
4. Jenis-jenis media berdasarkan fungsinya
    - 1) Media basal (media dasar) adalah media yang digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat media lain yang lebih kompleks. Media ini dapat mendukung pertumbuhan hampir semua jenis *mikrobia*, contohnya adalah *nutrient broth*, dan kaldu pepton.
    - 2) Media diferensial adalah media yang bila ditumbuhi oleh mikroba yang berbeda, mikroba tersebut akan tumbuh dengan ciri khusus sehingga dapat dibedakan. Contohnya: Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), Media *Sulfit Indol Motility* (SIM), dan sebagainya.
    - 3) Media selektif adalah media yang memungkinkan suatu jenis mikroba tumbuh dengan pesat. Contohnya Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), *Thiosulphate Citrate Bile Salt* (TCBS), dan sebagainya.
    - 4) Media diperkaya (*enrichment*) adalah media yang dirancang untuk mendukung pertumbuhan mikroorganismenya. Media tersebut memiliki konstituen nutrisi yang mendorong pertumbuhan mikroba tersebut.
    - 5) Media pengkayaan adalah media yang mengandung bahan-bahan tertentu yang di satu pihak dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu, tetapi di lain pihak sebaliknya dapat menunjang pertumbuhan bakteri tertentu. Misalnya media Muller-Kauffmann mengandung natrium tetrasetat yang menunjang pertumbuhan *salmonella* tetapi menghambat pertumbuhan *Escherichia*.

- 6) Media uji (identifikasi) adalah media yang digunakan untuk identifikasi mikroba, misalnya medium litmus milk umumnya ditambah dengan substansi tertentu yang bisa menjadi indikator.
- 7) Media umum, media yang ditambahkan bahan-bahan yang bertujuan menstimulasi pertumbuhan mikroba secara umum. Contoh Nutrien Agar (NA) untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri, Potato Dextrose Agar (PDA) untuk menstimulir pertumbuhan fungi.
- 8) Media khusus (spesifik), merupakan medium untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan-perubahan kimia tertentu misalnya, medium tetes tebu untuk *Saccharomyces cerevisiae* dan media manitol salt agar (MSA) untuk *Staphylococcus aureus* warna berubah dari merah menjadi kuning.
- 9) Medium penguji (Assay medium), yaitu medium dengan susunan tertentu yang digunakan untuk pengujian senyawa-senyawa tertentu dengan bantuan bakteri misalnya medium untuk menguji vitamin-vitamin, antibiotika dan lain-lain.
- 10) Medium perhitungan jumlah mikroba yaitu medium spesifik digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu bahan, misalnya medium untuk menghitung jumlah bakteri *Escherichia coli* air sumur (14).
- 11) Medium uji kepekaan dan sensibilitas antibakteri yaitu media muller Hilton agar (MHA) (16).

## 2.4. Metode Pengujian Aktifitas Antibakteri

Aktifitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja (spektrum luas, spektrum sempit), cara kerja (bakterisidal dan bakteriostatik) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) serta potensi pada KHM. Suatu anti bakteri dikatakan mempunyai aktifitas yang tinggi apabila KHM terjadi pada kadar antibiotik yang rendah tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar. Metode yang umum digunakan untuk menguji daya antibakteri di antaranya(17).

### 1. Metode Difusi

#### a. Metode lubang (perforasi)

Bakteri uji yang umurnya 18-24 jam disuspensikan ke dalam media agar pada suhu sekitar 45°C. Suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah agar memadat, dibuat lubang-lubang dengan diameter 6-8 milimeter. Ke dalam lubang tersebut di masukkan larutan zat yang akan diuji sebanyak 20 µl, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C h selama 18-24 jam. Aktifitas antibakteri dapat dilihat dari daerah bening yang mengelilingi lubang (perforasi) (17).

#### b. Metode Cakram kertas

Zat yang akan diuji diserapkan ke dalam cakram kertas dengan cara meneteskan pada cakram kertas kosong larutan antibakteri sejumlah tertentu dengan kadar tertentu pula. Cakram kertas diletakkan di atas permukaan agar padat yang telah diolesi bakteri, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Aktifitas antibakteri dapat dilihat dari daerah hambat di sekeliling cakram tertentu (17).

## 2. Metode Dilusi

### a. Metode pengenceran tabung

Antibakteri disuspensikan dalam agar *tripticsoybroth* (TSB) dengan pH 7,2-7,4 kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan beberapa tabung reaksi. Selanjutnya dilakukan inokulasi bakteri uji yang telah disuspensikan dengan NaCl fisiologis steril atau dengan TSB, yang tiap mililiternya mengandung kurang lebih  $10^5$ - $10^6$  bakteri. Setelah diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam, tabung yang keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan tabung yang bening menunjukkan zat antibakteri yang bekerja (17).

### b. Metode pengenceran agar

Zat antibakteri dicampur sampai homogen pada agar steril yang masih cair dengan suhu terendah mungkin ( $\pm 45^\circ\text{C}$ ). Dengan menggunakan berbagai konsentrasi aktif, larutan tersebut dituangkan ke dalam cawan petri steril kemudian setelah memadat dioleskan bakteri uji pada permukaannya (17).

## 2.5. Uji Kepekaan Antibiotik (Penentuan KHM Secara Dilusi)

Kadar Hambat Minimal (KHM) suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Kadar Bunuh Minimal suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang dapat membunuh pertumbuhan mikroba tertentu. KHM dan KBM dapat ditentukan dengan prosedur tabung dilusi. Prosedur ini digunakan untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang masih efektif untuk mencegah

pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif dalam mengontrol infeksi pada pasien.

Metode dilusi disebut metode pengenceran. Pada metode ini obat (misalnya antibiotik) dibuat dalam berbagai konsentrasi, kemudian ditambahkan pada media yang mengandung mikroba uji. Hasil yang dibaca adalah kekeruhan. Kekeruhan menandakan adanya potensi hambat obat pada konsentrasi tersebut. Keuntungan metode ini dibandingkan dengan metode difusi adalah dapat menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari obat tersebut. Ada 3 macam cara dalam metode dilusi yaitu metode *Macro Broth Dilution*, metode *Micro Broth Dilution* dan metode agar dilusi (dilusi padat). Pada metode agar dilusi digunakan satu seri plate agar, masing-masing mengandung konsentrasi obat yang berbeda yang berkisar pada dosis terapeutik. Setelah inkubasi dapat dilihat hasilnya dengan membaca kekeruhan pada masing-masing konsentrasi sehingga bisa ditentukan MIC.

Metode dilusi (*dilution method*) menggunakan senyawa antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Pada media yang diinokulasi mikroba uji, dilarutkan senyawa antimikroba dengan menggunakan beberapa tingkatan konsentrasi senyawa antimikroba, dan kemudian diamati pada konsentrasi berapakah senyawa antimikrobia tersebut bersifat menghambat atau mematikan. Pada uji mikrodilusi cair dapat memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri. Metode ini dapat digunakan untuk penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) (18).

## 2.6. Antibiotik

Antibiotik adalah obat yang berasal dari seluruh atau bagian tertentu mikroorganisme dan digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Antibiotika tidak efektif untuk melawan virus. Antibiotik selain membunuh mikroorganisme atau menghentikan reproduksi bakteri juga membantu sistem pertahanan alami tubuh untuk mengeleminasi bakteri tersebut (19).

Antibiotik dapat diklasifikasikan berdasarkan spektrum atau kisaran kerja, mekanisme aksi, stain penghasil, cara biosintesis maupun berdasarkan struktur biokimianya. Berdasarkan spektrum atau kisaran kerjanya antibiotik dapat dibedakan menjadi antibiotik berspektrum sempit (*narrow spectrum*) dan antibiotik berspektrum luas (*broad spectrum*) (20).

## 2.7. Erythromycin

*Erythromycin* ditemukan oleh selman waksiman pada tahun 1952 didalam produk metabolit suatu galur *Streptomyces erythreus*, yang diisolasi dari tanah yang dikumpulkan di Philipina. *Erythromycin* diperoleh dari *Streptomyces erythreus* dan memiliki rumus kimia C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub>.

*Erythromycin* tergolong dalam kelompok kimiawi yang disebut antibiotik makrolide; anggota lainnya ialah oleandomisin dan spiramisin.

*Erythromycin* aktif terhadap sebagian besar bakteri gram positif, beberapa bakteri gram negatif (*Neisseria spp.* Dan *Bordetella pertussis*), dan spiroket patogenik. *Erythromycin* pada konsentrasi 0,1-2 µg/ml aktif terhadap bakteri gram positif, antara lain *pneumokokus*, *streptokokus*, dan *korine bakteria*. *Mycoplasma*, *chlamdia trachomatis*, *legionella pneumophila*, dan *campylobacter jejuni* juga

peka dan biasanya muncul selama pemberian obat. Hal ini terutama terjadi pada infeksi *staphylococcus*.

Dalam hal spektrum antibakterial dan kegunaan klinisnya, *erythromycin* menyerupai penisilin, namun antibiotik ini juga aktif terhadap organisme yang menjadi resistensi terhadap penisilin dan streptomisin. Antibiotik ini sering kali diberikan kepada pasien yang alergi terhadap penisilin (21).

### **2.7.1. Mekanisme Kerja dan Aktivitas Antimikroba**

*Erythromycin* efektif terhadap organisme-organisme gram positif, terutama *pneumokokkus*, *streptokokkus*, *stafilokokkus*, dan *corynebacteria*, dalam konsentrasi plasma sebesar 0,002-2  $\mu\text{g/ml}$ .

*Erythromycin* dapat bersifat menghambat atau bakteriostatik untuk organisme-organisme yang rentan, khususnya pada konsentrasi yang lebih tinggi. Aktivitas dapat di tingkatkan pada pH alkali. Hambatan sintesis protein terjadi melalui ikatan ke RNA ribosom 50S. Sintesis protein terhambat karena reaksi-reaksi translokasi aminoacyl dan hambatan pembentukan awal (22).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Metode Penelitian**

Metode penelitian untuk uji efektivitas antibakteri ekstrak daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.)* R.M. King & H. Rob) terhadap pertumbuhan koloni *Stapylococcus epidermidis* dibandingkan dengan *erythromycin* adalah dengan metode eksperimental yaitu untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (23).

#### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

##### **3.2.2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai Juli 2018 sampai dengan selesai

#### **3.3. Objek Penelitian**

Objek penelitian ini adalah daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.)* R.M. King & H. Rob) yang masih segar dan diambil langsung dari pohonnya di daerah Aceh Kecamatan Sungai Raya Kabupaten Aceh Timur.

### **3.4. Alat dan Bahan**

#### **3.4.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glas, kawa ose, elemayer, autoklaf, batang pengaduk, cawan petri, inkubator, kain flanel, kapas, kertas perkamen, labu terukur, lampu spiritus, mikroskop, oven, penangas air, rak tabung reaksi, tabung reaksi, kertas label, tisu, asbes, kertas cakram, *Rotary evaporator*, jangka sorong, timbangan, dan pinset.

#### **3.4.2. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata (L.) R.M. King & H. Rob*), *Stapylococcus Epidermidis*, Manitol Salt Agar (MSA), Media Muller Hinton Agar (MHA), Nutrien Agar (NA), BaCl<sub>2</sub> 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, etanol 96%, *erythromycin* dan aquadest.

### **3.5. Prosedur Kerja**

#### **3.5.1. Penyiapan Sampel**

Daun Kirinyuh yang masih segar, ditimbang sebanyak 3 kg kemudian dicuci bersih dan ditiriskan. Selanjutnya daun tersebut dikering anginkan selama 5 hari, kemudian dihaluskan dengan *homogenizer* dan diayak sehingga diperoleh serbuk halus. Serbuk kemudian dimaserasi dengan larutan etanol 96% selama 3-4 hari pada suhu kamar, kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak hasil tersebut kemudian diuapkan dalam *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

### 3.5.2. Pembuatan Ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mengambil ekstrak yaitu maserasi. Simplisia yang sudah berbentuk serbuk kering ditimbang sebanyak 200 g, kemudian dimaserasi dengan 2 liter etanol 96%.maserasi dilakukan sampai semua senyawa tertarik sempurna selama 3 hari, terlindung dari sinar matahari langsung, dan berada pada suhu ruang dengan beberapa kali pengadukan. Selanjutnya, hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Ampasnya di ambil dan direndam kembali dengan menggunakan etanol 96% untuk mengulangi proses maserasi selama 2 hari. Selanjutnya, filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45<sup>0</sup>C hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak yang sudah kental kemudian diuapkan sampai tidak mengandung etanol.

### 3.5.3. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170 °C selama ± 2 jam. Media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 120 °C selama 15 menit.

### 3.5.4. Prosedur dan Pembuatan Media Manitol Salt Agar (MSA)

Jumlah media manitol salt agar (MHA) yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 111 g/L. Banyaknya MSA yang diperlukan 50 ml adalah :

$$\frac{111 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 50 \text{ ml} = 5,55 \text{ g}$$

Pembuatan :

1. Ditimbang MSA sebanyak 5,55 g
2. Dimasukkan kedalam elemayer, dilarutkan aquadest sebanyak 50 ml
3. Dipanaskan sampai mendidih
4. Diangkat dan ditutup elemayer dengan kapas, dilapisi dengan kertas perkamen, kemudian diikat dengan benang
5. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
6. Setelah steril, diangkat dari autoklaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati
7. Didinginkan, lalu dibuka kertas perkamen yang diikat pada elemayer kemudian dituang kedalam cawan petri secara aseptis.

### **3.5.5. Prosedur dan Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

Jumlah media yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 20 g/L. Banyaknya Nutrient Agar yang dibutuhkan untuk 20 ml adalah :

$$\frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 20 \text{ ml} = 0,4 \text{ g}$$

Pembuatan :

1. Ditimbang Nutrient Agar sebanyak 0,4 g
2. Dimasukan kedalam elemayer, dilarutkan dengan aquadest sebanyak 20 ml
3. Dipanaskan sampai mendidih
4. Diangkat, lalu dibagi dalam beberapa tabung (sesuai kebutuhan), ditutup dengan kapas, dilapisi dengan kertas perkamen kemudian diikat dengan benang.

5. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah steril, diangkat dari autoklaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati.
6. Didinginkan, dibuka kertas perkamen yang diikatkan pada tabung kemudian dimiringkan tabung yang berisi Nutrient Agar untuk memperoleh agar miring.
7. Dibiarkan sampai membeku, setelah itu dilakukan penanaman bakteri dengan menggoreskan bakteri secara zig-zag pada media

#### **3.5.6. Prosedur dan Pembuatan Media Hilton Agar (MHA)**

Jumlah media yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 34 g/L. Banyaknya MHA yang diperlukan untuk 100 ml adalah :

$$\frac{34 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 3,4 \text{ g}$$

Pembuatan :

1. Ditimbang MHA sebanyak 3,4 g
2. Dimasukan kedalam elemayer, dilarutkan dengan aquadest 100 ml
3. Dipanaskan sampai mendidih
4. Diangkat dan ditutup elemayer dengan kapas, dilapisi dengan kertas perkamen kemudian diikat dengan benang.
5. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### **3.5.7. Prosedur dan Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %**

Pembuatan :

NaCl ditimbang sebanyak 0,9 g lalu dilarutkan dengan aquadest hingga 100 ml dalam labu terukur, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

### 3.5.8. Pembuatan Suspensi Standar Mc. Farland

Pembuatan :

Dicampurkan larutan Asam Sulfat dan larutan Barium Klorida kedalam tabung reaksi dan dikocok homogen. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi standar Mc. Farland, maka konsentrasi suspensi bakteri adalah  $10^{10}$  koloni/ml.

### 3.5.9. Pemiakan Bakteri

Langkah-langkah pemiakan bakteri antara lain :

1. Diambil satu ose dari suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*
2. Kemudian ditanam ke media MSA dengan cara digoreskan
3. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam
4. Diamati pertumbuhan koloni pada media
5. Setelah mendapat hasil, dilakukan pengecatan gram dengan cara :
  - a) Diambil biakan bakteri yang telah berumur 18-24 jam, diletakkan pada kaca objek yang telah diberikan aquadest terlebih dahulu, lalu difiksasi
  - b) Ditambahkan kristal violet, didiamkan 1-2 menit, kemudian dibilas dengan aquadest dan ditambahkan larutan lugol, dibiarkan selama 1 menit.
  - c) Setelah 1 menit lugol dibilas dengan alkohol 95%, didiamkan selama 5-15 detik, dibilas dengan aquadest
  - d) Ditambahkan larutan Fuchsin didiamkan kira-kira 20 detik, dibilas dengan aquadest lalu dikeringkan, diamati hasilnya dibawah mikroskop dengan perbesaran  $10 \times 40$  dan  $10 \times 100$ .

### 3.5.10. Pembuatan Inokulum Bakteri

Stok kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang tumbuh pada Nutrient Agar diambil dengan jarum ose steril, lalu disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan standart Mc. Farland, ini berarti konsentrasi bakteri adalah  $10^8$  koloni/ml. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan memipet 0,1 ml biakan bakteri ( $10^8$  koloni/ml), dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan NaCl 0,9% sebanyak 9,9 ml dan dikocok homogen, maka diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  koloni/ml.

### 3.5.11. Prosedur Pengujian Efek Antibakteri

1. Disterilkan semua alat dan bahan yang digunakan
2. Dibuat persediaan inokulum.
3. Dipipet 0,1 ml suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  koloni/ml, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
4. Dibuat media MHA 100 ml dengan suhu  $45^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$  kocok dahulu, kemudian tuangkan segera sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri steril, lalu dibiarkan memadat.
5. Dibuat 5 kelompok, 3 kelompok untuk ekstrak etanol daun Kirinyuh , 1 kelompok untuk aquadest sebagai kontrol negatif, dan 1 kelompok untuk *erythromycin* sebagai kontrol positif.
6. Ditetesi kedalam 0,1 ml ekstrak etanol daun Kirinyuh yang telah dibuat dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20%.
7. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

8. Dibaca hasilnya dengan mengukur zona hambatan berupa daerah yang tampak jernih yang tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus epidermidis*.
9. Diukur dalam satuan mm.

Percobaan dilakukan triplo yaitu dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing ekstrak etanol daun Kirinyuh .