

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Melati (*J. sambac* Ait.)

Terdapat 200 jenis melati yang telah diidentifikasi oleh para ahli botani dan baru sekitar 9 jenis melati yang umum dibudidayakan yaitu melati hutan (*J. multiflorum*), melati raja (*J. rex*), melati cablanca (*J. officinale*), *J. revotulum*, *J. mensy*, *J. parkery*, melati australia (*J. simplicifolium*), melati hibrida dan melati (*J. sambac*) (Rukmana, 1997).

Melati dikenal dengan beberapa nama di berbagai daerah antara lain yaitu *Jasminum sambac* Ait. sebagai nama ilmiah, malati (Sunda); melati, menur (Jawa); malur, merul (Batak); puti, bunga manor (Amboin); bunga maluru (Makasar) dan nama asing yaitu *jasmine* (Inggris); *mo li hua* (Cina) (Hieronymus, 2013).

1. Sistematika tanaman melati (*J. sambac* Ait.)

Tanaman melati (*J. sambac* Ait.) merupakan tanaman hias yang sudah umum dibudidayakan di Pulau Jawa. Tanaman melati termasuk suku melati-melatian atau famili Oleaceae. Kedudukan tanaman melati dalam sistematika tumbuhan adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Oleales
Famili	:	Oleaceae
Genus	:	<i>Jasminum</i>
Spesies	:	<i>Jasminum sambac</i> (L) W. Ait (Tjitrosoepomo, 2000)



Gambar1. Tanaman melati (*J. sambac Ait.*) (Dok. pribadi)

2. Morfologi tanaman melati (*J. sambac Ait.*)

Melati adalah tanaman perdu dengan tinggi tanaman sekitar 0,3-2 m.

Tanaman melati termasuk famili Oleaceae, tumbuh lebih dari setahun (perennial) dan bersifat merambat. Bunga melati berbentuk terompet dengan warna bervariasi tergantung pada jenis dan spesiesnya. Umumnya bunga melati tumbuh di ujung tanaman. Susunan mahkota bunga tunggal atau ganda (bertumpuk), beraroma harum tetapi beberapa jenis bunga melati tidak memiliki aroma (Hieronymus, 2013).

Daun melati bertangkai pendek dengan helaian berbentuk bulat telur. Panjang daun 2,5-10 cm dan lebarnya 1,5-6 cm. Ujung daun runcing, pangkal membulat, tepi daun rata, tulang daun menyirip, menonjol pada permukaan bawah dan permukaan daun hijau mengkilap. Letak duduk daun berhadapan pada setiap buku. Batangnya berwarna coklat, berkayu berbentuk bulat sampai segi empat, berbuku-buku dan bercabang banyak seolah-olah merumpun (Eren, 2013).

Sistem perakaran tanaman melati adalah akar tunggang dan bercabang yang menyebar ke semua arah dengan kedalaman 40-80 cm dari akar yang terletak dekat permukaan tanah. Akar melati dapat menumbuhkan tunas atau cikal bakal tanaman baru (Hieronymus, 2013).

Melati dapat tumbuh dengan baik di daerah dataran rendah maupun dataran tinggi hingga ketinggian 1.000 meter di atas permukaan laut. Perbanyakan tanaman melati dapat dilakukan dengan stek batang atau cangkok. Budidaya melati menghendaki media tanam yang mengandung bahan organik tinggi. Tanaman melati tidak memerlukan perlakuan khusus pada proses pembunganya. Melati banyak dimanfaatkan sebagai komponen taman, rangkaian bunga untuk pengantin, bunga tabur, campuran teh atau diambil minyak atsirinya sebagai bahan baku parfum. Selain itu, tanaman ini juga dimanfaatkan sebagai obat tradisional karena pengaruh dari senyawa kimia dan efek farmakologi yang dihasilkan (Endah, 2002).

3. Kandungan kimia dan efek farmakologi

Melati mengandung senyawa kimia yang sangat besar manfaatnya. Kandungan senyawa kimia pada bunga dan daun melati menimbulkan rasa manis, pedas dan bersifat sejuk. Sementara akarnya mempunyai rasa pedas, manis dan agak beracun (Arif dan Anggoro, 2008). Skrinning fitokimia yang dilakukan oleh Rastogi dan Mehrotra (1989) melaporkan adanya kandungan eugenol, linalool dan senyawa aktif lainnya pada bunga melati. Kandungan senyawa aktif pada bunga melati disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Skrining fitokimia bunga melati (*J. Sambac Ait.*)

No.	Senyawa	Tingkat kepolaran		
		Nonpolar	Semipolar	Polar
1.	<i>3-hexenol</i>			+
2.	<i>2-vinylpyridine</i>	+		
3.	<i>Indol</i>	+	+	+
4.	<i>Myrcene</i>			+
5.	<i>Geranyl linalool</i>	+		
6.	<i>Alpha terphenol</i>			+
7.	<i>Beta therpenol</i>			+
8.	<i>Linalyl acetate</i>	+		
9.	<i>Nerolidol</i>			+
10.	<i>Phytol</i>	+		
11.	<i>Isophytol</i>	+		
12.	<i>Farnesol</i>	+		
13.	<i>Eugenol</i>	+	+	+
14.	<i>Benzyl alcohol</i>			+
15.	<i>Methyl benzoate</i>	+	+	+
16.	<i>Benzyl cyanide</i>	+	+	+
17.	<i>Benzyl acetat</i>	+	+	+
18.	<i>Methyl anilate</i>	+		
19.	<i>Cis-jasmone</i>	+		
20.	<i>Methyl N-methylanthranilate</i>	+		
21	<i>Vanillin</i>			+
22	<i>Cis-hexenylbenzoate</i>			+
23.	<i>Asam benzoate</i>			+
24.	<i>Mthylpalmitate</i>	+		
25.	<i>Mthyl linoleat</i>	+		
26.	<i>8,9-dihydrojasminin</i>			+
27.	<i>Linalool</i>			+

Sumber: Rastogi dan Mehrotra (1989)

Tanaman melati mempunyai banyak manfaat dalam bidang kesehatan.

Efek farmakologis bunga melati di antaranya sebagai obat diare, influenza, jerawat, biduran, bengkak digigit binatang, cacingan, radang mata merah dan sesak napas (Eren, 2013). Bunga melati menghasilkan pigmen kuning yang berperan aktif dalam memperbaiki metabolisme dan jaringan dalam tubuh termasuk kulit (Anonim, 2006). Berbagai khasiat yang diperoleh dari bunga

melati tersebut disebabkan keberadaan sejumlah senyawa aktif yang dapat diperoleh melalui proses ekstraksi.

B. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Pada umumnya ekstraksi akan semakin baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan demikian, semakin halus serbuk simplisia maka akan semakin baik ekstraksinya. Selain luas bidang, ekstraksi juga dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia simplisia yang bersangkutan (Ahmad, 2006).

Proses pemisahan senyawa dari simplisia dilakukan dengan menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan sifat senyawa yang akan dipisahkan. Pemisahan senyawa berdasarkan kaidah *like dissolved like* yang artinya suatu senyawa akan larut dalam pelarut yang sama tingkat kepolarannya. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Kepolaran suatu pelarut ditentukan oleh besar konstanta dielektriknya, yaitu semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka polaritasnya semakin besar. Menurut Ahmad (2006) beberapa aspek yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut antara lain:

1. Selektifitas, yaitu pelarut hanya melarutkan komponen target yang diinginkan dan bukan komponen lain.

2. Kelarutan, yaitu kemampuan pelarut untuk melarutkan ekstrak yang lebih besar dengan sedikit pelarut.
3. Toksisitas, yaitu pelarut tidak beracun.
4. Penguapan, yaitu pelarut yang digunakan mudah diuapkan.
5. Ekonomis, yaitu harga pelarut relatif murah.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan bermacam-macam metode tergantung dari tujuan ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan dan senyawa yang diinginkan. Metode ekstraksi yang paling sederhana adalah maserasi. Maserasi adalah perendaman bahan dalam suatu pelarut. Metode ini dapat menghasilkan ekstrak dalam jumlah banyak serta terhindar dari perubahan kimia senyawa-senyawa tertentu karena pemanasan (Pratiwi, 2009).

Secara umum metode ekstraksi dibagi dua macam yaitu ekstraksi tunggal dan ekstraksi bertingkat. Ekstraksi tunggal adalah melarutkan bahan yang akan diekstrak dengan satu jenis pelarut. Kelebihan dari metode ini yaitu lebih sederhana dan tidak memerlukan waktu yang lama, akan tetapi rendemen yang dihasilkan sangat sedikit. Adapun metode ekstraksi bertingkat adalah melarutkan bahan atau sampel dengan menggunakan dua atau lebih pelarut. Kelebihan dari metode ekstraksi bertingkat ini ialah dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya.

Ekstraksi bertingkat dilakukan secara berturut-turut yang dimulai dari pelarut non polar berupa kloroform, selanjutnya pelarut semipolar berupa etil asetat dan dilanjutkan dengan pelarut polar seperti metanol atau etanol

(Sudarmadji dkk., 2007). Beberapa jenis pelarut organik dan sifat fisiknya disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Jenis pelarut organik dan sifat fisiknya

Pelarut	Titik didih	Titik beku	Konstanta dielektrik	Indeks polaritas
Akuades	100,0	0	80,2	10,2
Methanol	64,0	-98	32,6	5,1
Etanol	78,4	-117	24,3	5,2
Kloroform	61,2	-64	4,8	4,1
Etil asetat	77,1	-84	6,0	4,4
Dietil eter	35,0	-116	4,3	2,8
Aseton	56,0	-95	20,7	5,1

Sumber: Sudarmadji dkk., (2007)

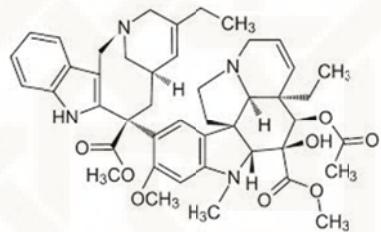
C. Senyawa Aktif Tanaman

Tanaman pada umumnya termasuk melati mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan senyawa aktif lain. Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktif dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit (Lenny, 2006).

1. Alkaloid

Menurut Darwis dan Ahmad (2001) bahwa alkaloid adalah golongan senyawa basa bernitrogen yang sebagian besar berupa heterosiklik dan banyak terdapat pada tanaman. Senyawa aktif jenis alkaloid ini umumnya larut pada

pelarut organik nonpolar, akan tetapi ada beberapa kelompok seperti pseudoalkaloid dan protoalkaloid yang larut pada pelarut polar seperti air (Lenny, 2006). Senyawa aktif golongan alkaloid dapat berperan sebagai antibakteri. Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa alkaloid yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson 1995). Struktur alkaloid disajikan pada gambar 2.

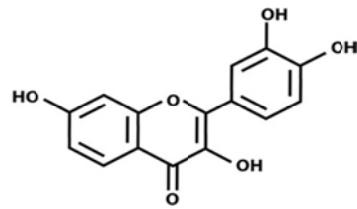


Gambar 2. Struktur alkaloid (Fattorusso dan Taglillatella, 2008)

2. Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol yang ditemukan di alam (Lenny, 2006). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang berperan dalam mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme (Ganiswara, 1995). Sabir (2005) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

Struktur dasar flavonoid disajikan pada gambar 3.

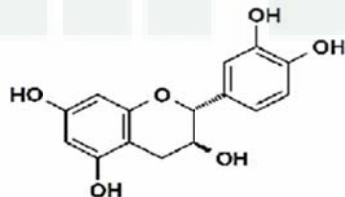


Gambar 3. Struktur flavonoid (Pieta, 2000)

3. Tanin

Senyawa tanin merupakan komponen zat organik yang terdapat dalam beberapa jenis tanaman terutama tanaman berkeping dua (dikotil). Ekstrak tanin terdiri dari campuran senyawa polifenol yang sangat kompleks dan biasanya tergabung dari karbohidrat rendah seperti glukosa (Linggawati dkk., 2002). Senyawa tanin dapat berperan sebagai antibakteri karena dapat mengganggu sintesa peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel bakteri menjadi kurang sempurna. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri menurut Naim (2004) berhubungan dengan target penyerangan tanin terhadap kerusakan polipeptida yang terdapat pada dinding sel bakteri sehingga mengganggu sintesa peptidoglikan yang menjadikan pembentukan dinding sel tidak sempurna dan mengakibatkan inaktivasi sel bakteri pada sel inang.

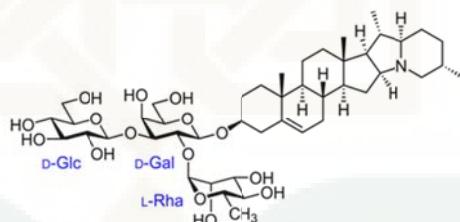
Struktur tanin disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Struktur tanin (Hagerman, 2002)

4. Saponin

Saponin secara umum merupakan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan titerpen. Saponin adalah senyawa yang dapat menimbulkan busa bila dikocok dalam air. Saponin dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah. Hal ini disebabkan karena saponin berikatan dengan kolesterol dari membran sel sehingga dapat merusak membran (Faradisa, 2008). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga menyebabkan kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Robinson, 1995). Struktur saponin disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur saponin (Harborne dan Baxter, 1995)

D. Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme bakteri patogen. Menurut Jawetz dan Adelbergs, (2005) antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu:

1. Menghambat pembentukan dinding sel

Mekanisme penghambatan dinding sel oleh antibakteri ditujukan untuk dinding sel bakteri yang terdiri dari peptidoglikan yang merupakan suatu senyawa kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Penyerangan tersebut menyebabkan tekanan osmotik di dalam sel lebih tinggi daripada di luar sel sehingga mengakibatkan terjadinya sel lisis atau kebocoran sel, misalnya penggunaan penicillin.

2. Mengubah permeabilitas membran sel

Membran sel berperan penting dalam mengatur keluar masuknya zat antar sel dengan lingkungan luar. Mekanisme kerja antibakteri dalam mengubah permeabilitas membran sel bakteri yaitu dengan cara merusak membran sel sehingga fungsi permeabilitas membran mengalami kerusakan yang mengakibatkan kematian sel. Contoh antibakteri yang dapat melakukan hal ini adalah polimiksin, kolistin, nistatin dan sebagainya.

3. Menghambat sintesis protein

Sintesis protein merupakan hasil akhir dari dua proses utama yaitu transkripsi dan translasi. Antibakteri yang dapat mengganggu proses transkripsi ataupun translasi sehingga menghambat sintesis protein adalah streptomisin, tetraksilin kloramfenikol dan sebagainya.

4. Menghambat sintesis asam nukleat

Antibakteri ini bekerja dengan cara membentuk kompleks dengan DNA yang menyebabkan terhambatnya proses replikasi DNA, misalnya asam nalidiksat.

Aktivitas penghambatan senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri dapat dilihat dengan melakukan uji aktivitas antibakteri dengan cara mengamati besar kecilnya zona hambat yang dibentuk. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi dua macam yaitu aktivitas bakteriostatik berupa penghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen dan aktivitas bakterisidal yaitu membunuh patogen dalam kisaran luas (Brooks dkk, 2005).

Aktivitas antibakteri dapat diuji dengan metode pengenceran dan metode difusi cakram. Metode pengenceran dilakukan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM), sedangkan uji difusi cakram dilakukan untuk mengetahui respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri yang ditandai dengan ukuran diameter zona bening (*clear zone*). Kelebihan dari metode kertas cakram yaitu dapat menunjukkan secara langsung aktivitas antibakteri yang ditandai dengan adanya zona hambatan di sekitar kertas cakram serta lebih sederhana dalam pengerjaannya dan tidak memerlukan waktu yang lama (Hermawan dkk, 2007).

Kefektifan suatu senyawa antibakteri dapat dilihat melalui diameter zona hambat yang dihasilkan. Davis dan Stouth (1971) mengemukakan berdasarkan pembentukan zona hambat kategori kekuatan antibakteri dibedakan sebagai

berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan daerah hambatan 5 mm atau kurang berarti lemah.

E. Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang khas bersifat uniseluler yang inti selnya tidak memiliki membran inti. Gram positif dan Gram negatif adalah klasifikasi bakteri yang dibedakan dari ciri-ciri fisik bakteri. Perbedaan yang mendasar terdapat pada komponen peptidoglikan dan lipid yang terkandung dalam dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut.

Peptidoglikan pada dinding sel bakteri Gram positif berupa lapisan tunggal yang bobotnya lebih dari 50% berat kering, sedangkan pada bakteri Gram negatif peptidoglikan berperan sebagai lapisan kaku dengan bobot sekitar 10% berat kering. Selain itu, lipid pada kelompok bakteri Gram positif lebih sedikit sehingga pertumbuhannya lebih mudah terhambat oleh senyawa antibakteri. Sebaliknya, lipid pada bakteri Gram negatif lebih tinggi sehingga lebih tahan terhadap senyawa antibakteri (Purwoko, 2007). Perbedaan struktur dan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Perbedaan struktur dan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif

Ciri-Ciri	Gram Positif	Gram Negatif
Struktur dinding sel	Tebal (15-80mm)	Tipis (10-15mm)
Komposisi dinding sel	Lipid rendah (1-4%) Peptidoglikan pada lapisan tunggal; jumlahnya lebih dari 50% berat kering pada beberapa bakteri Terdapat asam tekoat	Lipid tinggi (11-22%) Peptidoglikan terdapat pada lapisan kaku sebelah dalam; jumlahnya sekitar 10% berat kering Tidak ada asam tekoat

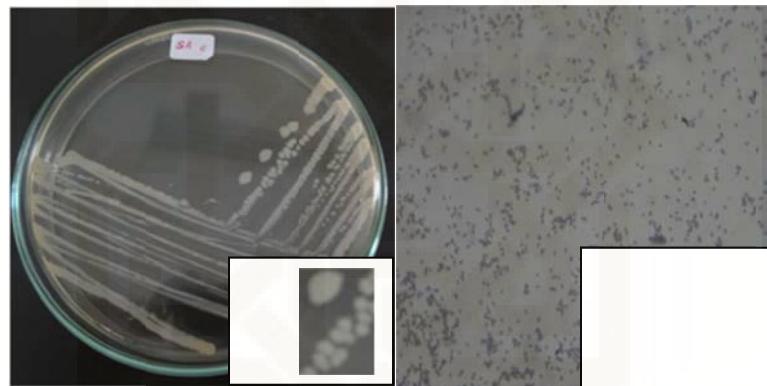
Sumber: Pelczar dan Chan (2006)

Terkait dengan peran bakteri dalam kehidupan manusia, bakteri pada umumnya dibagi menjadi dua golongan, yaitu bakteri menguntungkan dan merugikan. Bakteri menguntungkan merupakan kelompok bakteri banyak dimanfaatkan oleh manusia, seperti digunakan sebagai bahan pengawet makanan, fermentasi dan juga digunakan untuk meningkatkan kesehatan pencernaan. Selain bakteri yang menguntungkan ada juga bakteri yang merugikan. Salah satu kelompok bakteri merugikan yaitu bakteri patogen. Bakteri patogen yaitu bakteri yang dapat menginfeksi tubuh manusia, hewan maupun tanaman. Di antara bakteri yang sering menginfeksi manusia dan mencemari makanan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Shigella flexneri*.

1. *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *S. aureus* menurut Garrity *et al.*, (2004) adalah sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Micrococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 6. Koloni dan sel bakteri *S. aureus* pada perbesaran 1000x
(Dok. pribadi)

Staphylococcus berasal dari kata *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif dengan sel berbentuk kokus, mempunyai diameter 0,7-0,9 μm dan tidak membentuk spora. Selnya tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur. *S. aureus* bersifat patogen, tidak bergerak, memproduksi katalase dan termasuk dalam suku *Micrococcaceae* (Brooks dkk., 2005).

Bakteri *S. aureus* tumbuh secara fakultatif anaerob dengan membentuk kumpulan-kumpulan sel dan sering ditemukan pada makanan yang

mengandung protein tinggi, misalnya sosis, telur dan sebagainya. Keracunan bahan pangan yang tercemar *S. aureus* sebagian besar berhubungan dengan produk pangan yang telah dimasak. Gejala dari keracunan bahan pangan yang tercemar *S. aureus* bersifat intoksikasi. Pertumbuhan organisme ini dalam bahan pangan menghasilkan enterotoksin yang bila termakan dapat mengakibatkan serangan mendadak berupa kekejangan pada perut dan muntah-muntah yang hebat serta diare (Tenhagen dkk, 2009).

2. *Shigella flexneri*

Klasifikasi *S. flexneri* menurut Robert (1957) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacterales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Shigella</i>
Spesies	: <i>Shigella flexneri</i>



Gambar 7. Koloni dan sel bakteri *S. flexneri* pada perbesaran 1000x
(Dok. pribadi)

S. flexneri merupakan bakteri yang tidak membentuk spora dengan diameter sel sekitar 0,5-1,5 μm dan panjang sel sekitar 1-6 μm . Sel *S. flexneri*

merupakan bakteri berbentuk batang, Gram negatif, tidak bergerak dan bersifat fakultatif anaerob. Suhu optimum pertumbuhan yaitu 37°C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 45,5°C (Robert, 1957). Bakteri *S. flexneri* dapat tumbuh pada pH 5,0-7,3. Pada umumnya kelompok *Shigella* tidak tahan terhadap temperatur tinggi, pH rendah serta konsentrasi garam yang tinggi (Zaika & Phillips, 2005).

Shigella berasal dari nama seseorang ilmuan Jepang, Kiyoshi Shiga yang pertama kali mengisolasi *Shigella dysentriae* tipe 1 pada kasus epidemik disentri di Jepang pada tahun 1896. Sejak saat itu beberapa jenis *Shigella* lain ditemukan seperti *Shigella dysentri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei* dan termasuk juga *Shigella flexneri*. *S. flexneri* merupakan bakteri patogenik yang dapat mengakibatkan *shigellosis* atau disentri basiler pada manusia (Flowers, 2004).

Shigellosis merupakan penyakit infeksi saluran pencernaan yang ditandai dengan diare cair akut atau disentri yang berupa tinja bercampur darah, lendir, serta nanah dan pada umumnya disertai demam dan nyeri perut. *Shigellosis* berat dapat mengakibatkan komplikasi yang menjadi fatal yaitu perforasi usus, megakolon toksik, kejang, anemia septik, sindrom hemolitik uremia, dan hiponatremi. Penyakit ini ditularkan melalui rute fekal-oral dengan masa inkubasi 1–7 hari, untuk terjadinya penularan tersebut diperlukan dosis minimal penularan 200 bakteri *shigella* (Nafianti dan Sinuhaji, 2005).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga melati (*J. sambac* Ait.) dilakukan di Laboratorium Biologi bagian Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan selama empat bulan yang dimulai pada bulan November 2013 sampai dengan Februari 2014.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: inkubator (Haraeus), autoklaf (Astell), oven, *laminar air flow cabinet* (LAF) (ESCO), timbangan analitik (Advanturer Ohaus), blender, *Magnetic Stirrer* dan *Stirrer Bar*, kompor listrik (Branstead Thermolyne), *hair dryer*, mikroskop dan *vacuum rotary evaporator* (Heidolph laborata 4000).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga melati segar yang diperoleh dari Pasar Beringharjo Yogyakarta, isolat murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta, Kloroform *p.a* (*pro analisis*), Etil asetat 96 %, Etanol 70%, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), kertas saring, cat Gram, *amoxillin*, aquadest dan kertas cakram.

C. Prosedur Penelitian

Penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga melati (*J. sambac* Ait.) dilakukan dengan beberapa tahapan yang meliputi: ekstraksi bunga melati dengan tiga jenis pelarut, peremajaan bakteri uji, penapisan awal ekstrak pada konsentrasi 10% (bv), uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga melati dengan variasi konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% (b/v) yang dilanjutkan dengan analisis mekanisme aktivitas antibakteri .

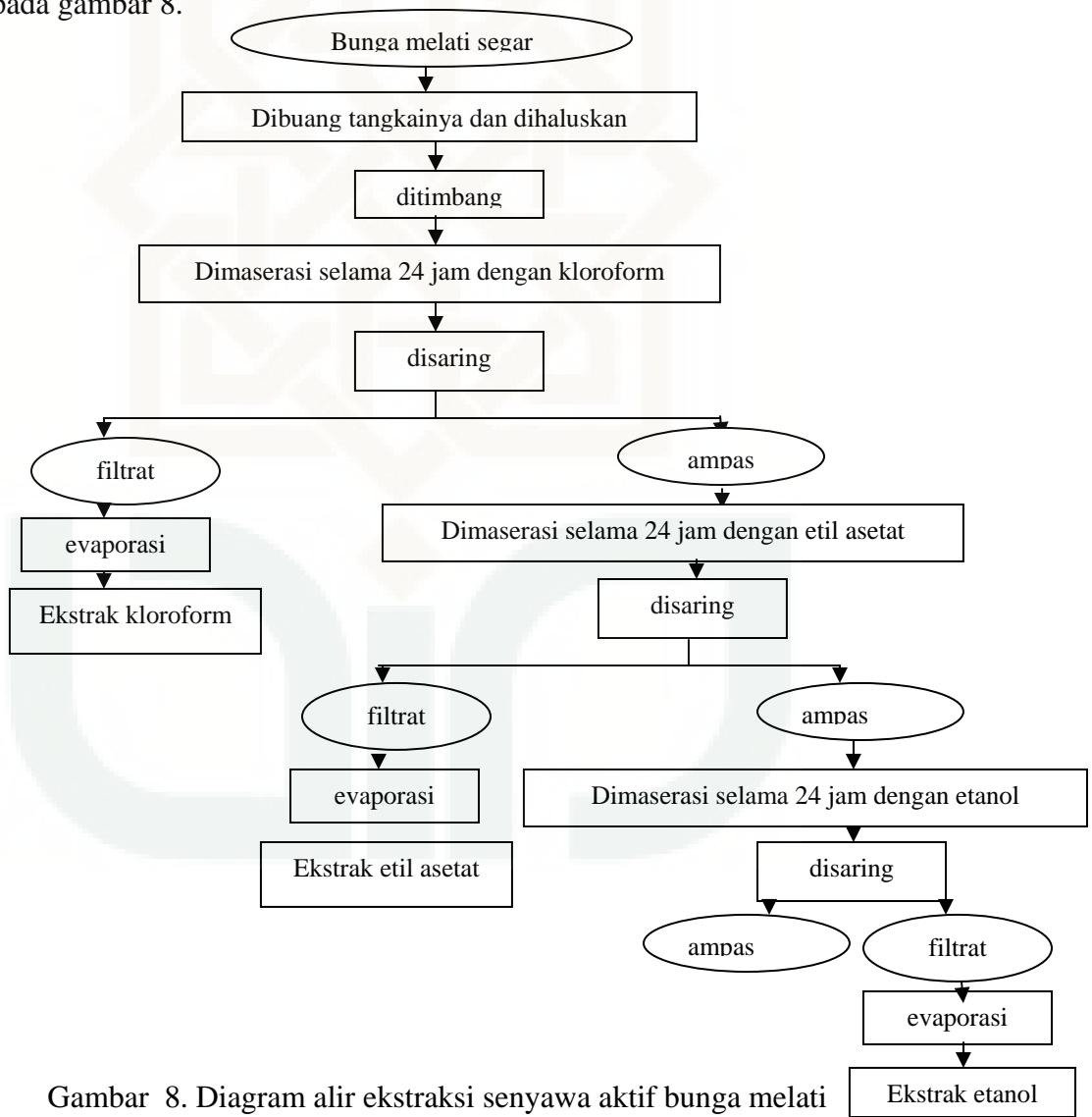
1. Ekstraksi bunga melati

Proses mengekstrak bunga melati diawali dengan pemotongan tangkai bunga segar yang dilanjutkan dengan pencucian bunga. Bunga yang telah dicuci dikeringanginkan untuk menghilangkan air cucian. Bunga kemudian dihaluskan dan hasilnya ditimbang.

Selanjutnya bunga dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 500 mL yang kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut kloroform ditutup rapat dengan kapas dan *alumunium foil*. Sampel yang akan dimaserasi didiamkan di atas *magnetic stirrer* selama 24 jam pada suhu ruang dengan menggunakan *stirrer bar* sebagai alat pengaduk. Setelah 24 jam, ampas dan filtrat dipisahkan melalui penyaringan.

Bagian ampas tahap ekstraksi kloroform kemudian direndam dengan pelarut kedua berupa etil asetat, dimaserasi kembali selama 24 jam dan disaring hingga diperoleh filtrat dan ampas kedua. Selanjutnya ampas kedua ini direndam lagi dengan pelarut ketiga berupa etanol kemudian dimaserasi

selama 24 jam dan disaring hingga diperoleh filtrat ketiga. Masing-masing filtrat dievaporasi dengan menggunakan evaporator vakum. Sampel yang telah terbebas dari pelarutnya selanjutnya berturut-turut disebut ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol (Quinn 1988 dalam Darusman dkk, 1995). Diagram alir proses ekstraksi senyawa bioaktif bunga melati disajikan pada gambar 8.



2. Peremajaan bakteri uji

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian merupakan bakteri patogen penyebab diare, yaitu *S. aureus* ATCC 25923 yang merepresentasikan kelompok bakteri patogen Gram positif dan *S. flexneri* ATCC 12022 yang merepresentasikan kelompok bakteri patogen Gram negatif. Peremajaan bakteri uji diawali dengan purifikasi dan pengecatan Gram yang bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri uji *S. aureus* dan *S. flexneri*. Tahapan berikutnya bakteri uji dibiakkan pada media NA miring kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak satu ose bakteri ke dari media NA miring tersebut diperbanyak dengan cara diinokulasikan ke dalam tabung berisi media NB sebanyak 10 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk memperoleh kultur kerja (Pranoto dkk., 2005).

Selanjutnya dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) terhadap kedua kultur bakteri dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm hingga diperoleh OD sebesar 0,5. Panjang gelombang 550 nm merupakan panjang gelombang yang dapat mengidentifikasi warna hijau hingga kuning. Sampel yang akan diukur nilai absorbansinya merupakan media *Nutrient Broth* (NB) yang mempunyai warna kuning sehingga panjang gelombang yang digunakan pada saat pengukuran sampel yaitu 550 nm (Reema 2004).

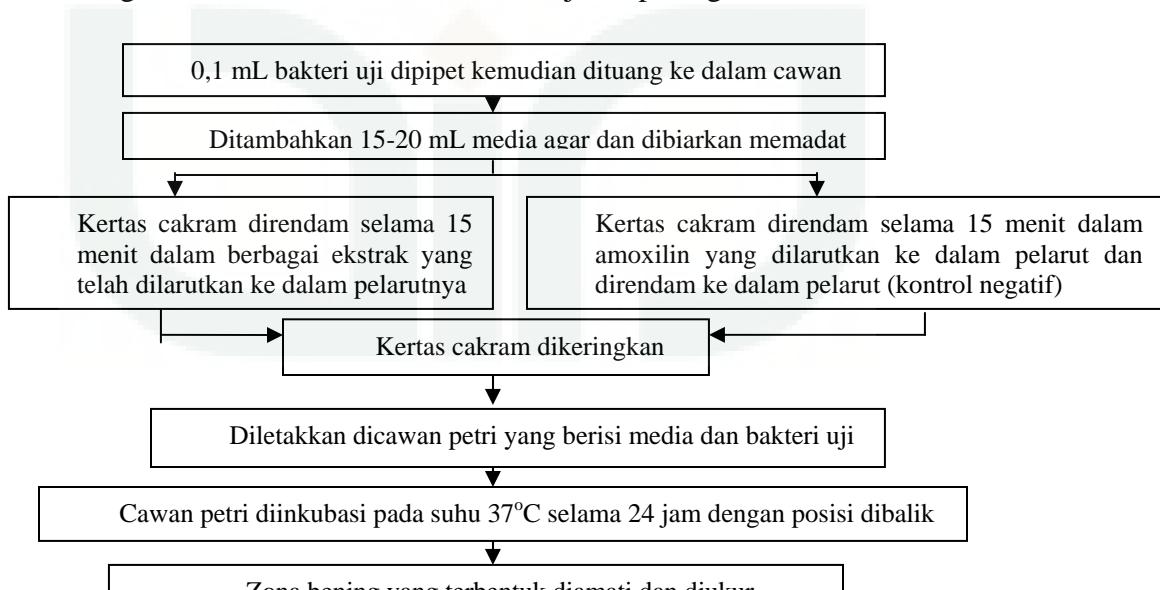
3. Penapisan awal senyawa antibakteri

Sebanyak 0,1 mL bakteri uji dipipet dan dituang ke dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan sebanyak 15-20 mL media agar yang masih cair, selanjutnya petri digoyang-goyangkan supaya media agar dan bakteri uji homogen. Setelah media memadat, kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam pelarutnya masing-masing pada konsentrasi 10% (b/v) selama 10-15 menit diambil untuk diuapkan pelarutnya. Selanjutnya kertas cakram diletakkan di dalam cawan petri yang berisi agar dan bakteri uji.

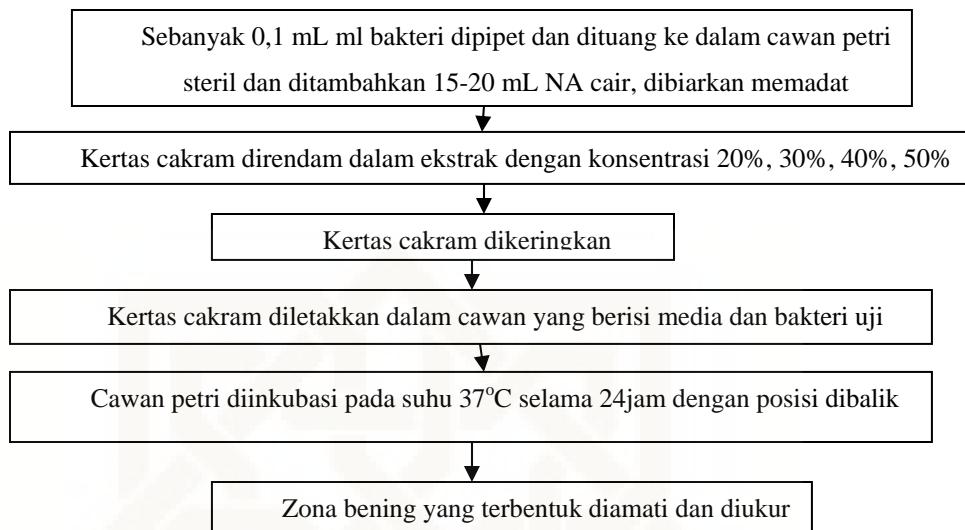
Di tempat terpisah, kertas cakram direndam ke dalam *amoxilin* yang sebelumnya telah dilarutkan dalam pelarut kloroform, etil asetat dan etanol sebagai kontrol positif dan kertas cakram yang direndam ke dalam pelarut kloroform, etil asetat dan etanol sebagai kontrol negatif. Kertas cakram diletakkan pada permukaan kultur. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktifitas antibakteri dapat dilihat dengan mengamati zona hambatan yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Zona hambatan yang terbentuk diamati untuk menyeleksi ekstrak yang mempunyai zona hambat terbesar yang akan diuji aktivitas antibakterinya. Diagram alir proses penapisan awal ekstrak disajikan pada gambar 9.

4. Uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga melati

Biakan *S. aureus* dan *S. flexneri* umur 24 jam dipipet sebanyak 0,1 mL dan dituang ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya ditambahkan media agar yang masih cair kemudian digoyang-goyangkan supaya kultur bakteri tersebar merata pada media. Selanjutnya potongan kertas yang telah dicelupkan pada rendamen ekstrak etil asetat 20% (b/v) ditempatkan pada tiap-tiap cawan yang telah berisi media dan bakteri, baik untuk biakan *S. aureus* maupun *S. flexneri*, dengan cara yang sama dilakukan untuk ekstrak konsentrasi 30%, 40% dan 50% (b/v). Selanjutnya semua biakan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk kemudian diamati dan diukur diameternya (diameter keseluruhan dikurangi diameter kertas cakram 5,4 mm) (Ardiansyah 2005). Diagram alir proses uji aktivitas antibakteri dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak disajikan pada gambar 10.



Gambar 9. Diagram alir proses penapisan awal senyawa aktif



Gambar 10. Diagram alir uji aktivitas antibakteri

5. Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri

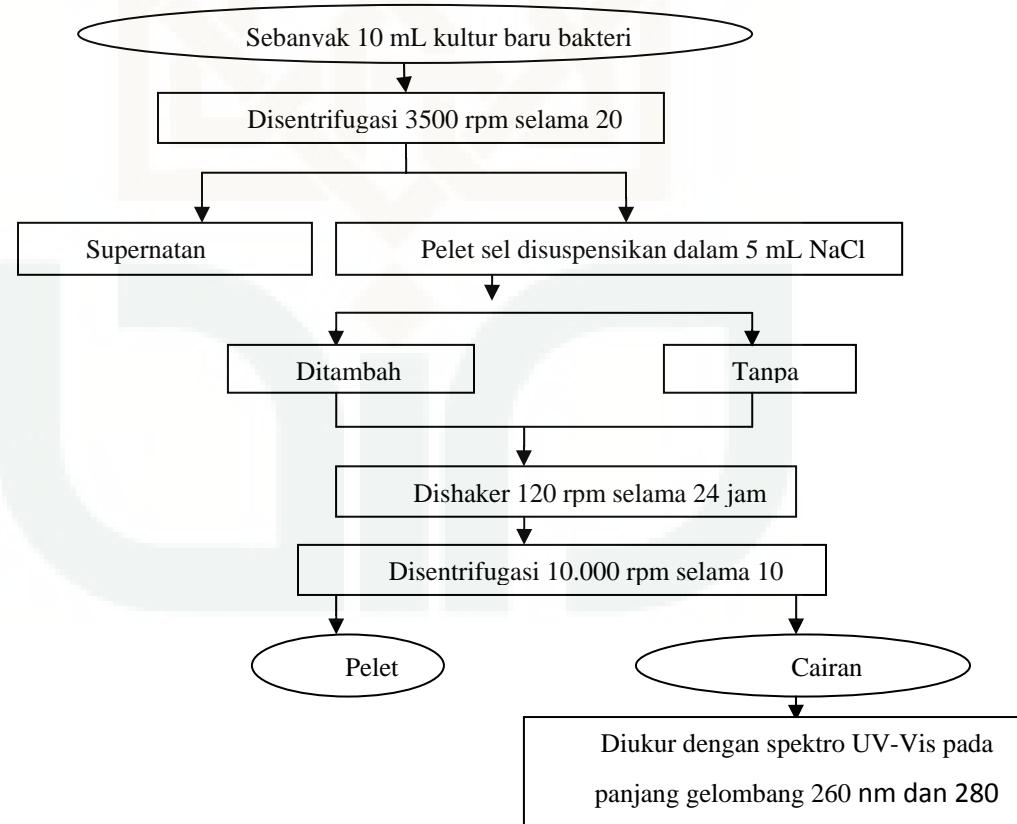
a) Penentuan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC)

Penentuan MIC dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Shigella flexneri* dengan metode difusi kertas cakram dengan konsentrasi ekstrak 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6% (b/v) (Kubo dkk., 1995).

b) Analisis kebocoran sel bakteri uji

Kultur baru bakteri uji umur 24 jam dipipet 10 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang lalu ditambahkan 5 mL NaCl 0,85% ke dalam endapan sel pada tabung reaksi. Larutan NaCl merupakan larutan isotonik yang berfungsi untuk menyeimbangkan konsentrasi yang ada di dalam sel dan di luar sel

agar sel tidak mudah lisis. Selanjutnya ditambahkan ekstrak etil asetat bunga melati dengan konsentrasi ekstrak 1x MIC dan 2x MIC, kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol digunakan sel bakteri yang sama tanpa penambahan ekstrak. Selanjutnya suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan disaring dengan kertas saring untuk memisahkan selnya. *Optical density* cairan supernatan dianalisis dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm untuk kebocoran asam nukleat dan 280 nm untuk kebocoran protein (Bunduki dkk., 1995).



Gambar 11. Diagram alir analisis kebocoran sel (Bunduki dkk., 1995)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

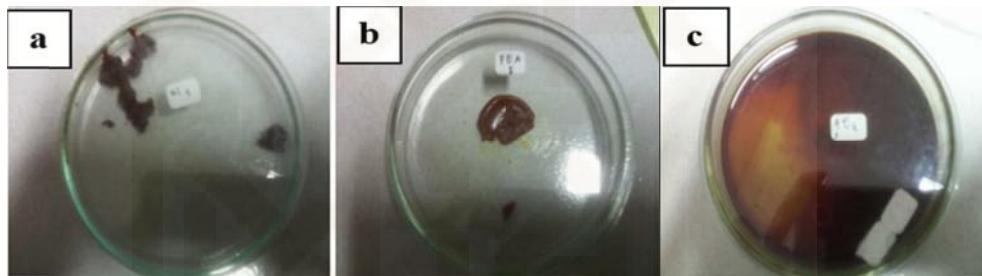
1. Ekstraksi senyawa aktif pada bunga melati (*J. sambac* Ait.)

Uji aktivitas senyawa antibakteri bunga melati (*J. sambac* Ait.) dilakukan melalui beberapa tahap. Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah ekstraksi senyawa aktif secara bertingkat. Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari bahan yang merupakan sumber komponennya. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi bertingkat yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa aktif dengan tingkat kepolaran yang berbeda dengan menggunakan tiga pelarut organik yaitu kloroform, etil asetat dan etanol. Hasil ekstraksi senyawa aktif pada bunga melati (*J. sambac* Ait.) disajikan pada tabel 4 dan gambar 12.

Tabel 1. Hasil ekstraksi senyawa aktif bunga melati (*J. sambac* Ait.) dengan tiga pelarut.

Ekstrak	Berat bahan (g)	Berat ekstrak (g)	Rendeman (%)	Tekstur	Warna
kloroform	350	1,0345	0,295	Kenyal	Coklat tua
Etil asetat	400	0,717	0,179	Keras	Coklat
Etanol	150	2,481	1,654	Lengket	Coklat kehitaman

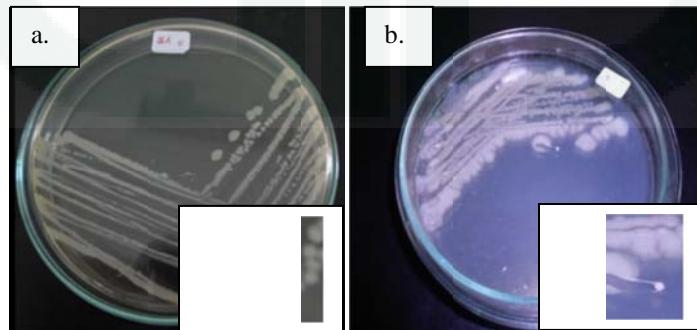
Hasil rendemen ekstraksi bertingkat senyawa aktif pada bunga melati dengan menggunakan pelarut kloroform, etil asetat dan etanol berturut-turut adalah 0,295%; 0,179% dan 1,654%. Ketiga ekstrak bunga melati menunjukkan karakter yang berbeda. Ekstrak kloroform tampak berwarna coklat tua dan mempunyai tekstur yang kental, ekstrak etil asetat berwarna coklat dan bertekstur keras sedangkan ekstrak etanol tampak coklat kehitaman dan lengket.



Gambar 12. a) Ekstrak kloroform; b) Ekstrak etil asetat; c) Ekstrak etanol

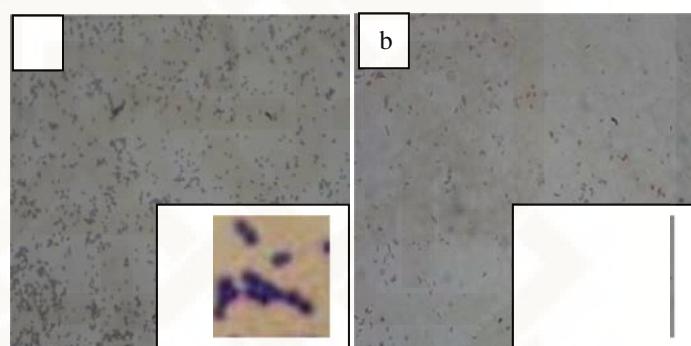
2. Peremajaan bakteri uji

Sebelum dilakukan peremajaan bakteri uji terlebih dahulu dilakukan purifikasi dan pengecatan Gram untuk memastikan bakteri yang digunakan adalah *S. aureus* dan *S. flexneri*. Hasil purifikasi disajikan pada gambar 13.



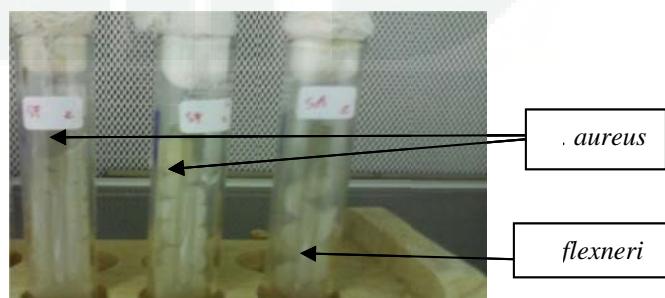
Gambar 13. Hasil purifikasi a). Koloni *S. aureus* dan b). Koloni *S. flexneri*

Hasil purifikasi menunjukkan koloni *S. aureus* berbentuk *circular* dan berwarna krem, sedangkan koloni bakteri *S. flexneri* berbentuk *irregular* dan berwarna krem. Tahap berikutnya yang dilakukan yakni pengecatan Gram. Hasil pengecatan Gram disajikan pada gambar 14.



Gambar 14. Hasil pengecatan Gram a). Sel *S. aureus* dan b). Sel *S. flexneri* pada perbesaran 1000x

Hasil pengecatan Gram menunjukkan bahwa sel bakteri *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk bulat atau *coccus*. Sedangkan sel *S. flexneri* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang atau *bacil*. Tahap berikutnya yang dilakukan yaitu penanaman isolat murni ke dalam media NA miring. Hasil pembuatan isolat murni ke dalam media NA miring disajikan pada gambar 15.



Gambar 15. Isolat murni *S. aureus* dan *S. flexneri* pada media NA miring

Tahap berikutnya adalah pembuatan kultur kerja bakteri uji pada media NB dan dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD). Pengukuran nilai OD bakteri uji disajikan pada lampiran 1. Setelah didapatkan hasil OD kemudian dilanjutkan dengan uji penapisan awal antibakteri ekstrak melati terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. flexneri*.

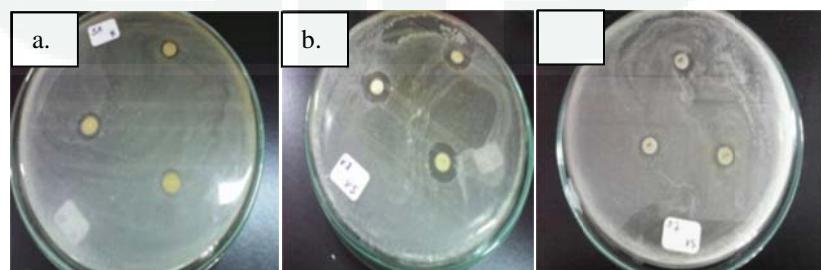
3. Penapisan awal antibakteri dari senyawa aktif ekstrak bunga melati terhadap *S. aureus* dan *S. flexneri*

Penapisan awal antibakteri dari senyawa aktif ekstrak bunga melati dilakukan dengan menggunakan konsentrasi ekstrak sebesar 10% (b/v). Hasil penapisan awal antibakteri disajikan pada tabel 5 serta gambar 16 dan 17.

Tabel 2. Hasil penapisan awal antibakteri dari senyawa aktif ekstrak bunga melati terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. flexneri* pada konsentrasi 10%

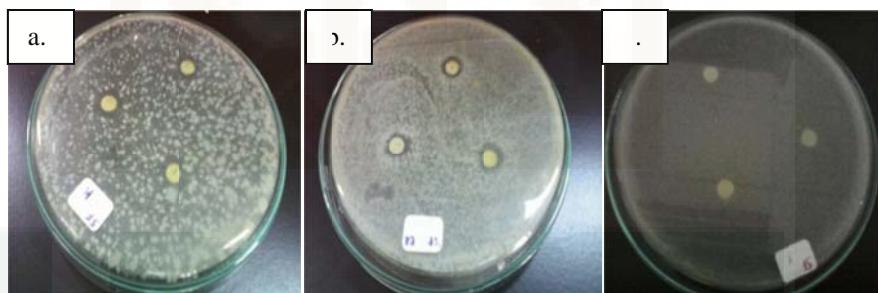
Bakteri Uji	Jenis Ekstrak	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Kekuatan Antibakteri (Davis dan Stouth, 1971)
<i>S. aureus</i>	E.K	3,1	Lemah
	E.EA	7,2	Sedang
	E.E	2,7	Lemah
<i>S. flexneri</i>	E.K	5,2	Sedang
	E.EA	7,2	Sedang
	E.E	0	-

*Keterangan: E.K = Ekstrak Kloroform, E.EA = Ekstrak Etil Asetat
E.E = Ekstrak Etanol



Gambar 16. Hasil penapisan awal antibakteri dari terhadap *S. aureus* a). Ekstrak kloroform, b). Ekstrak etil asetat dan c). Ekstrak etanol.

Hasil penapisan awal pada bakteri *S. aureus* yang menggunakan ekstrak kloroform terbentuk diameter zona hambat sebesar 3,1 mm dengan kategori kekuatan antibakteri yang lemah, pada penggunaan ekstrak etil asetat diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 7,2 mm dengan kekuatan antibakteri sedang, sedangkan ekstrak etanol membentuk diameter zona hambat yang paling kecil yaitu 2,7 mm dengan kategori kekuatan antibakteri lemah. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak yang dapat menghasilkan zona hambat terbesar terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* adalah ekstrak etil asetat.



Gambar 17. Hasil penapisan awal antibakteri terhadap *S. flexneri* a). Ekstrak kloroform, b). Ekstrak etil asetat dan c). Ekstrak etanol.

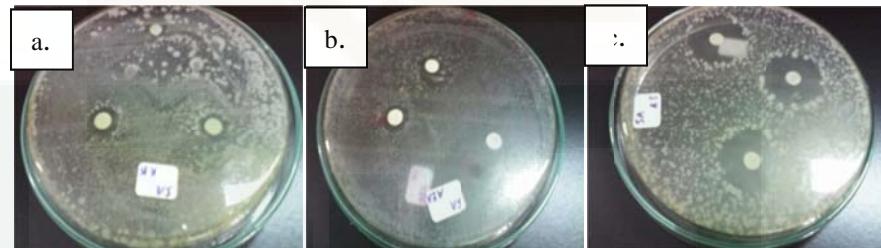
Sementara itu, diameter zona hambat yang terbentuk untuk ekstrak kloroform pada kultur *S. flexneri* lebih besar dari pada kultur *S. aureus* yaitu 5,2 mm dengan kategori kekuatan antibakteri sedang. Pada penggunaan ekstrak etil asetat, diameter zona hambat yang terbentuk lebih besar yaitu 7,2 mm dengan kategori kekuatan antibakteri sedang, sedangkan untuk ekstrak etanol tidak membentuk zona hambat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat merupakan ekstrak yang dapat membentuk zona hambat

terbesar terhadap pertumbuhan bakteri *S. flexneri*. Untuk membandingkan efektifitas ekstrak bunga melati dengan antibiotik murni maka pada uji penapisan awal antibakteri ini dilakukan uji antibiotik sebagai kontrol positif, antibiotik yang digunakan yaitu *amoxilin*. Hasil uji antibiotik disajikan pada tabel 6 serta gambar 18 dan 19.

Tabel 3. Hasil pengamatan uji antibiotik

Bakteri Uji	Pengujian	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Kekuatan Antibakteri (Davis dan Stouth, 1971)
<i>S. aureus</i>	A.K	3,1	Lemah
	A.EA	3,5	Lemah
	A.E	14,9	Kuat
<i>S. flexneri</i>	A.K	3,2	Lemah
	A.EA	16,6	Kuat
	A.E	5,7	Sedang

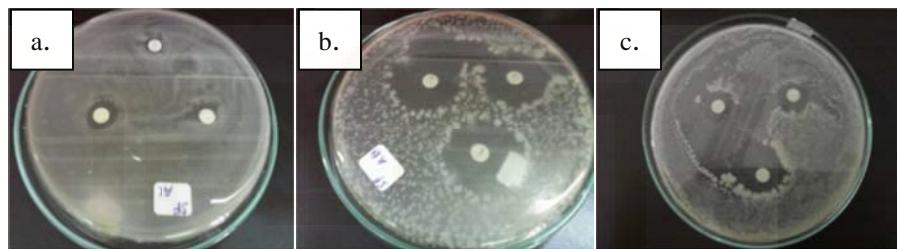
* Keterangan : A.K = Antibiotik dalam Kloroform, A.EA = Antibiotik dalam Etil Asetat
A.E = Antibiotik dalam Etanol



Gambar 18. Hasil uji antibiotik terhadap *S. aureus* a). Antibiotik dalam kloroform, b). Antibiotik dalam etil asetat, c). Antibiotik dalam Etanol.

Hasil uji antibiotik terhadap *S. aureus* menunjukkan bahwa antibiotik yang dilarutkan ke dalam pelarut etanol memberikan zona hambat terbesar dengan diameter sebesar 14,9 mm. Diameter zona hambat terbesar kedua dibentuk oleh antibiotik yang dilarutkan ke dalam pelarut etil asetat yaitu sebesar 3,5 mm, sedangkan antibiotik yang dilarutkan ke dalam pelarut

kloroform menghasilkan diameter zona hambat yang paling kecil yaitu sebesar 3,1 mm. Dengan demikian antibiotik yang dilarutkan ke dalam pelarut etanol memiliki zona hambat terbesar.



Gambar 19. Hasil uji antibiotik terhadap *S. flexneri* a). Antibiotik dalam kloroform, b). Antibiotik dalam etil asetat, c). Antibiotik dalam etanol

Zona hambat terbesar yang dihasilkan pada uji antibiotik terhadap *S. flexneri* dibentuk oleh antibiotik yang dilarutkan dengan pelarut etil asetat dengan diameter zona hambat 16,6 mm dengan kekuatan antibakteri kuat. Urutan zona hambat terbesar kedua yaitu antibiotik yang dilarutkan dalam pelarut etanol dengan diameter 5,7 mm dan zona hambat terkecil adalah 3,2 mm. Hal ini menunjukkan bahwa antibiotik yang dilarutkan ke dalam pelarut etil asetat menghasilkan diameter zona hambat terbesar pada kultur *S. flexneri*.

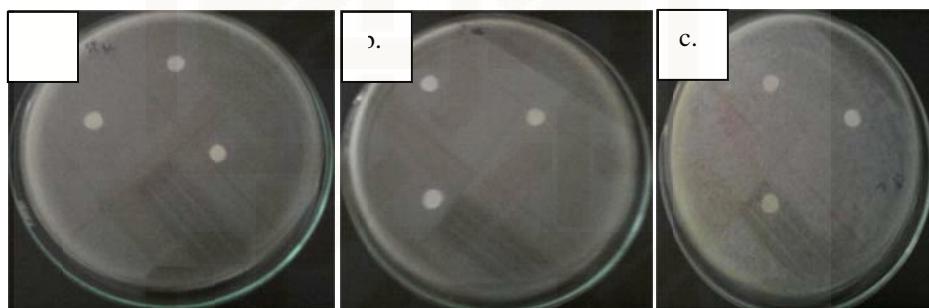
Hasil uji pelarut disajikan pada tabel 7 serta gambar 20 dan 21.

Tabel 7. Hasil pengamatan uji pelarut

Bakteri Uji	Pengujian	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)
<i>S. aureus</i>	Kloroform	-
	Etil asetat	-
	Etanol	-
<i>S. flexneri</i>	Kloroform	-
	Etil asetat	-
	Etanol	-



Gambar 20. Hasil uji pelarut terhadap *S. aureus* a). Pelarut kloroform, b). Pelarut etil asetat dan c). Pelarut etanol.



Gambar 21. Hasil uji pelarut terhadap *S. flexneri* a). Pelarut kloroform, b). Pelarut etil asetat dan c). Pelarut etanol.

Hasil uji kontrol negatif dengan menggunakan pelarut kloroform, etil asetat dan etanol terhadap *S. aureus* dan *S. flexneri* tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk. Tidak terbentuknya zona hambat pada uji pelarut ini menunjukkan bahwa ketiga pelarut yang digunakan tidak mempengaruhi pengujian aktivitas antibakteri maupun penapisan awal.

4. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dengan berbagai variasi konsentrasi

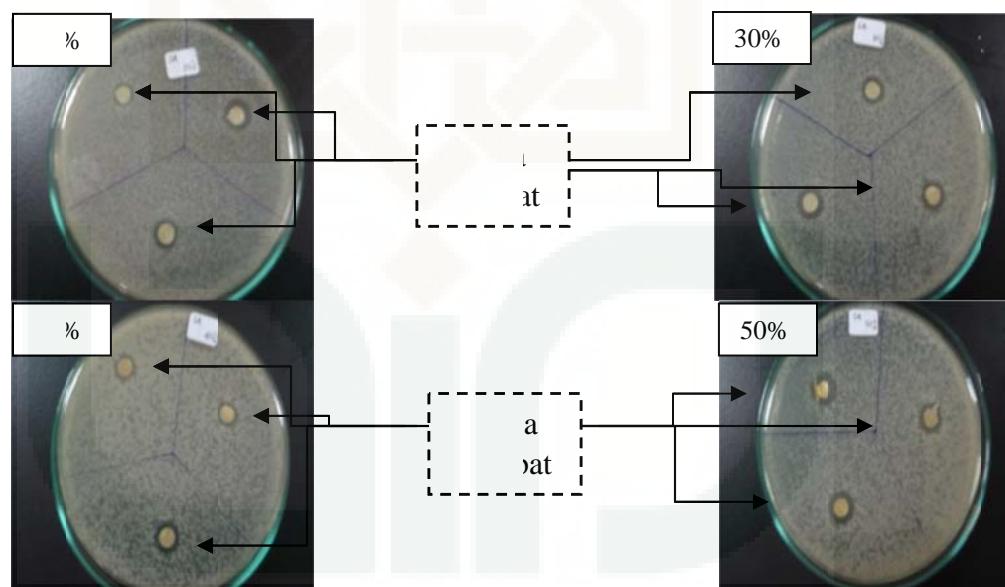
Uji aktivitas antibakteri dilakukan hanya dengan menggunakan ekstrak etil asetat. Hal ini disebabkan ekstrak etil asetat dapat membentuk diameter zona hambat terbesar pada kedua kultur bakteri uji pada penapisan awal. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan variasi kosentrasi ekstrak 20%, 30%,

40% dan 50% (b/v). Perhitungan konsentrasi ekstrak disajikan pada lampiran

2. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri disajikan pada tabel 8 serta gambar 22 dan 23.

Tabel 8. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat

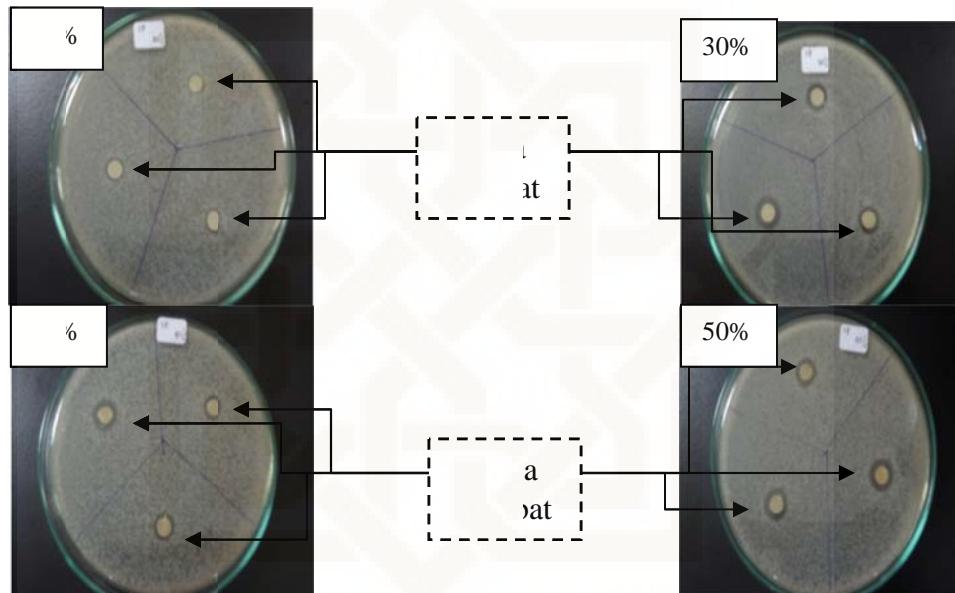
Bakteri Uji	Konsentrasi (%)	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Kekuatan Antibakteri (Davis dan Stouth, 1971)
<i>S. aureus</i>	20	4,0	Lemah
	30	4,2	Lemah
	40	3,4	Lemah
	50	4,9	Lemah
<i>S. flexneri</i>	20	1,5	Lemah
	30	3,8	Lemah
	40	3,0	Lemah
	50	4,3	Lemah



Gambar 22. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* variasi konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50%.

Diameter zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% (b/v) berturut-turut adalah 4,0 mm; 4,2 mm; 3,4 mm; dan 4,9 mm.

Keempat diameter zona hambat yang dihasilkan masih dalam kategori kekuatan antibakteri yang lemah. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak tidak dapat memperbesar diameter zona hambat yang dibentuk.



Gambar 23. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri terhadap *S. flexneri* variasi konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50%.

Sementara itu, diameter zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri pada kultur *S. flexneri* dengan konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% (b/v) berturut-turut adalah 1,5 mm; 3,8 mm; 3,8 mm dan 4,3 mm. Keempat diameter zona hambat yang dihasilkan juga masih dalam kategori kekuatan antibakteri yang lemah. Hasil diatas menunjukkan ekstrak dengan konsentrasi yang lebih tinggi tidak selalu berbanding lurus dengan diameter zona hambat yang dibentuk.

5. Mekanisme penghambatan antibakteri terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *S. flexneri*

Analisis mekanisme penghambatan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri uji diawali dengan penentuan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC) yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada tahap ini konsentrasi ekstrak etil asetat yang digunakan adalah 0,1%; 0,5%; 1%; 2%; 3%; 4%; 5% dan 6% (b/v). Hasil uji MIC disajikan pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil uji pengamatan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC)

Konsentrasi (%)	<i>S. aureus</i>	<i>S. flexneri</i>
0,1	-	-
0,5	-	-
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	+	-
5	+	+
6	+	+

*Keterangan: (-) tidak terbentuk zona hambat, (+) terbentuk zona hambat

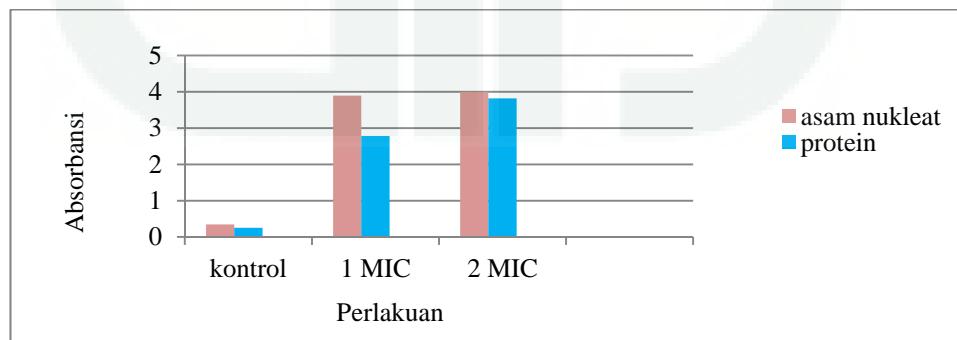
Hasil uji MIC menunjukkan bahwa konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus* dan *S. flexneri* masing-masing adalah 4% dan 5% (b/v). Tahap berikutnya yang dilakukan yaitu analisis kebocoran sel. Analisis kebocoran sel dilakukan dengan mengukur absorbansi kedua kultur bakteri uji yang ditambahkan dengan ekstrak. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm untuk kebocoran asam nukleat dan 280 nm untuk

kebocoran protein sel. Hasil pengukuran absorbansi kebocoran sel *S. aureus* disajikan pada tabel 10 serta gambar 24 dan 25.

Tabel 10. Nilai absorbansi kebocoran asam nukleat dan protein sel *S. aureus*

Panjang gelombang (nm)	Nilai absorbansi		
	Kontrol	1x MIC	2x MIC
260	0,345	3,896	4
280	0,255	2,783	3,819

Hasil pengukuran absorbansi kebocoran sel dengan perlakuan kontrol, 1x MIC dan 2x MIC terhadap *S. aureus* pada panjang gelombang 260 nm untuk kebocoran asam nukleat berturut-turut adalah 0,345; 3,896 dan 4, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm untuk kebocoran protein berturut-turut adalah 0,255; 2,783 dan 3, 819. Tabel di atas menunjukkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm lebih tinggi daripada nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Hal ini diduga terjadi karena senyawa-senyawa yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm lebih banyak dari pada senyawa-senyawa yang diserap pada panjang gelombang 280 nm.



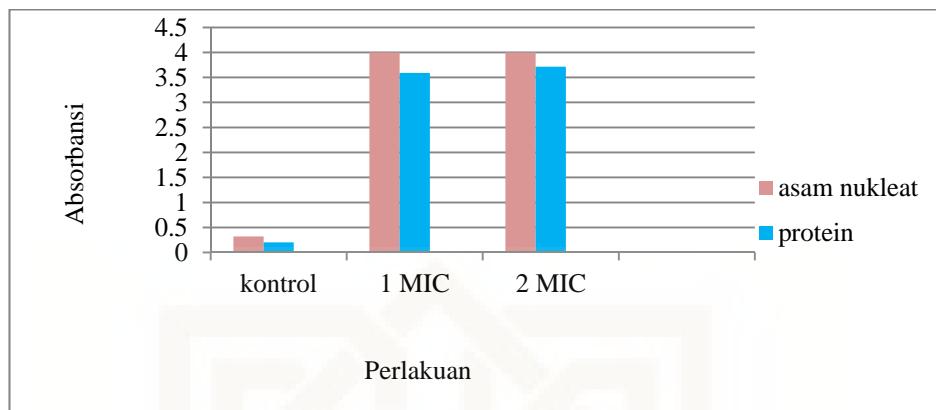
Gambar 24. Grafik nilai absorbansi kebocoran asam nukleat dan protein pada sel *S. aureus*.

Gambar grafik di atas menunjukkan bahwa sel yang tidak dipaparkan pada ekstrak atau perlakuan kontrol juga mengalami kerusakan sel. Hal ini diduga terjadi karena sel yang diuji tidak mendapatkan nutrisi yang cukup sehingga kebutuhan nutrisi tidak tercukupi dan mengakibatkan kerusakan sel.

Tabel 11. Nilai absorbansi kebocoran asam nukleat dan protein sel *S. flexneri*

Panjang gelombang (nm)	Nilai absorbansi		
	Kontrol	1x MIC	2x MIC
260	0,321	4	4
280	0,203	3,589	3,714

Sementara itu, nilai absorbansi kebocoran sel dengan perlakuan kontrol, 1x MIC dan 2x MIC terhadap *S. flexneri* dengan panjang gelombang 260 nm untuk kebocoran asam nukleat berturut-turut adalah 0,321; 4 dan 4, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm untuk kebocoran protein berturut-turut adalah 0,203; 3,589 dan 3,714. Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm lebih tinggi daripada nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Hal ini diduga terjadi karena senyawa-senyawa yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm lebih banyak dari pada senyawa-senyawa yang diserap pada panjang gelombang 280 nm.



Gambar 25. Grafik nilai absorbansi kebocoran asam nukleat dan protein sel bakteri *S. flexneri*.

Sama dengan halnya yang terjadi pada kultur *S. aureus*. Grafik analisis kebocoran sel pada *S. flexneri* juga menunjukkan bahwa sel yang tidak dipaparkan pada ekstrak atau perlakuan kontrol juga mengalami kerusakan sel. Hal ini diduga terjadi karena sel yang diuji tidak mendapatkan nutrisi yang cukup sehingga kebutuhan nutrisi tidak tercukupi dan mengakibatkan kerusakan sel. Selain itu, diduga terjadi karena adanya senyawa-senyawa lain yang terdapat pada cairan supernatant yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

B. PEMBAHASAN

1. Ekstraksi senyawa aktif pada bunga melati (*J. sambac* Ait.)

Ekstraksi dilakukan dengan beberapa tahapan kerja, yaitu preparasi sampel bunga melati yang meliputi: pencucian dan pengeringan, penghalusan, penimbangan, perendaman dengan pelarut atau yang disebut maserasi,

penyaringan hasil maserasi dan tahap yang terakhir yaitu pemisahan ekstrak dari pelarut.

Tahap pertama yang dilakukan yaitu pencucian dan pengeringan. Bahan yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran dan dikeringkan untuk menghilangkan air cucian. Selanjutnya bahan dipotong-potong dan dihaluskan agar ukurannya menjadi lebih kecil dan halus, hal ini dilakukan agar mempermudah proses pengadukan dan kontak bahan dengan pelarut pada saat proses perendaman. Tahap berikutnya adalah penimbangan bahan, yang bertujuan untuk mengetahui berat awal bahan sehingga rendemen yang dihasilkan dapat diketahui. Rendemen adalah perbandingan antara berat ekstrak kasar yang dihasilkan dengan berat awal bahan yang digunakan yang dinyatakan dalam persen (%). Perhitungan hasil rendemen disajikan pada lampiran 3.

Bahan yang telah ditimbang selanjutnya direndam dengan pelarut atau dimaserasi. Prinsip kelarutan dalam metode maserasi adalah *like dissolved like* yang berarti senyawa polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar (Pratiwi, 2009). Maserasi dilakukan pada suhu kamar dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan *stirrer bar* yang berfungsi dalam proses pengadukan. Pengadukan ini bertujuan untuk memperbesar tumbukan antar partikel yang dapat mengakibatkan pecahnya sel supaya komponen yang diinginkan dapat keluar dari jaringan bahan dan larut dalam pelarutnya. Selama proses maserasi, wadah ditutup dengan

alumunium foil untuk menghindari atau mencegah terjadinya penguapan pelarut dan senyawa volatil yang terdapat dalam bahan.

Maserasi merupakan metode yang sering digunakan untuk ekstraksi suatu senyawa aktif. Pada penelitian ini, proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu pelarut kloroform yang merupakan pelarut nonpolar, serta etil asetat dan etanol yang masing-masing merupakan pelarut semipolar dan polar. Tujuan ekstraksi bertingkat dengan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya adalah untuk mengekstrak komponen senyawa dalam suatu bahan sesuai dengan tingkat kepolarannya. Selain itu, senyawa aktif yang belum diketahui sifatnya diharapkan dapat terekstrak dengan salah satu pelarut yang digunakan.

Pasca maserasi, dilakukan penyaringan yang bertujuan untuk memisahkan ampas dan filtrat yang akan dievaporasi atau proses penguapan pelarut. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dievaporasi sehingga didapatkan senyawa hasil ekstraksi pekat yang diinginkan. Suhu yang digunakan dalam proses evaporasi adalah 40°C. Penggunaan suhu dalam evaporasi untuk memekatkan hasil ekstraksi sebaiknya berkisar antara 30°-40°C untuk mencegah terjadinya kerusakan senyawa aktif akibat pemanasan atau suhu yang tinggi (Harborne, 1995).

Hasil ekstraksi dari bunga melati (*J. sambac* Ait.) dapat dilihat pada tabel 4. Ketiga ekstrak yang diperoleh menghasilkan rendemen, tekstur dan

warna yang berbeda. Nilai rendemen terendah yaitu sebesar 0,179% yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat, rendemen terbesar kedua dihasilkan dari ekstrak kloroform sebesar 0,295% sedangkan rendemen tertinggi sebesar 3,101% dihasilkan oleh ekstrak etanol. Nilai rendemen ini menunjukkan bahwa bunga melati lebih banyak mengandung senyawa-senyawa yang bersifat polar dari pada senyawa semi polar maupun non polar. Selain itu, pelarut polar juga mempunyai kemampuan yang lebih besar dalam mengekstrak senyawa organik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Heat dan Reineccius (1987) yang mengungkapkan bahwa pelarut polar seperti metanol dan etanol mampu mengekstrak sebagian besar senyawa tanin dan senyawa lainnya yang menyebabkan hasil ekstraksi etanol cukup besar.

2. Peremajaan bakteri uji

Peremajaan bakteri uji bertujuan untuk mendapatkan isolat murni yang baru yang akan digunakan sebagai kultur kerja. Peremajaan bakteri diawali dengan purifikasi dan pengecatan Gram. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *S. aureus* dan *S. flexneri*. Hasil purifikasi dan pengecatan Gram bakteri uji dapat dilihat pada gambar 13 dan 14.

Hasil purifikasi dan pengecatan Gram menunjukkan sel *S. aureus* berbentuk kokus dan bersifat Gram positif. Bakteri *S. aureus* bersifat fakultatif anaerob yang dibuktikan dengan pertumbuhan bakteri yang merata

di bagian atas maupun bawah permukaan media NB. Hal ini sesuai dengan pernyataan Brooks dkk (2005) yang menyatakan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri dengan sel berbentuk kokus mempunyai diameter 0,7-0,9 μm , Gram positif dan bersifat fakultatif anaerob. Adapun sel bakteri *S. flexneri* berbentuk batang, mempunyai diameter 0,3-1 μm , gram negatif dan bersifat fakultatif anaerob yang ditunjukkan dengan pertumbuhan bakteri yang merata di bagian atas maupun bawah permukaan media NB.

Tahap selanjutnya dilakukan penanaman isolat murni pada media NA miring. Isolat murni yang diperoleh kemudian diinokulasikan ke dalam media NB dan diinkubasi selama 24 jam untuk selanjutnya diukur *Optical Density* (OD)-nya. Kultur bakteri yang telah diketahui OD-nya kemudian digunakan pada tahap penapisan awal antibakteri.

3. Penapisan awal antibakteri dari senyawa aktif ekstrak bunga melati terhadap bakteri *S.aureus* dan *S. flexneri*

Penapisan awal merupakan uji antibakteri dari senyawa aktif yang dilakukan sebelum dilakukannya uji aktivitas antibakteri. Tujuan dari penapisan awal ini untuk mengetahui atau menyeleksi ekstrak potensial yang dapat membentuk zona hambat terbesar terhadap pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri ekstrak potensial tersebut diuji lebih lanjut pada tahap berikutnya.

Penapisan awal antibakteri senyawa aktif terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. flexneri* dilakukan dengan menggunakan konsentrasi ekstrak 10% (b/v).

Hasil pengamatan penapisan awal menunjukkan bahwa ekstrak potensial yang dapat membentuk zona hambat terbesar pada kedua kultur bakteri uji adalah ekstrak etil asetat dengan diameter zona hambat yang sama sebesar 7,2 mm. Menurut Davis dan Stouth (1971) diameter zona hambat ini mengindikasikan tingkat kekuatan antibakteri yang sedang.

Ekstrak etil asetat bunga melati memberikan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi daripada ekstrak kloroform dan etanol. Hal ini disebabkan ekstrak etil asetat memiliki tingkat kepolaran senyawa yang optimum. Polaritas senyawa merupakan sifat fisik senyawa antibakteri yang penting. Menurut Kanazawa dan Ikeda, (1998) suatu senyawa yang mempunyai polaritas optimum akan mempunyai aktivitas antibakteri maksimum karena interaksi suatu senyawa antibakteri dengan bakteri memerlukan keseimbangan (HLB: *hydrophilic lipophilic balance*). Sifat hidrofilik diperlukan untuk menjamin senyawa larut dalam fase air yang merupakan tempat hidup bakteri, akan tetapi senyawa yang bekerja pada membran sel hidrofobik memerlukan sifat lipofilik, sehingga senyawa antibakteri memerlukan hidrofilik-lipofilik untuk mencapai aktivitas yang optimal (Branen dan Davidson, 1993).

Salah satu contoh senyawa aktif yang bersifat semipolar atau ekstrak etil asetat yaitu eugenol. Eugenol merupakan senyawa aktif yang diketahui bersifat *lipophilic* yang dapat menembus rantai asam lemak pada lapisan membran bilayer sehingga dapat mengubah permeabilitas membran sel. Perubahan permeabilitas membran sel tersebut dapat mengakibatkan

penghambatan bahkan kematian pada sel bakteri. Hal ini disebabkan komponen yang terkandung pada dinding sel bakteri mengalami kerusakan atau kebocoran sel (Miao dkk., 2007). Untuk membandingkan keefektifan antibakteri senyawa aktif bunga melati dengan antibiotik murni, dilakukan uji antibiotik terhadap kedua bakteri uji sebagai kontrol positif.

Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif adalah *amoxilin*. *Amoxilin* merupakan antibiotik yang dapat mengatasi penyakit kulit, saluran pernafasan dan sebagainya yang disebabkan oleh bakteri patogen seperti *Staphylococcus* sp. Penggunaan amoxilin pada penelitian ini berdasarkan kemampuannya yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Alcano, 1991). *Amoxilin* bekerja sebagai penghambat pembentukan dinding sel yang menyebabkan sel menjadi lisis. *Amoxilin* digunakan sebagai pembanding pada dosis 1000 ppm atau 1 mg/1 mL.

Selanjutnya uji kontrol pelarut dengan menggunakan pelarut kloroform *p.a*, etil asetat 96% dan etanol 70%. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ketiga pelarut tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* maupun *S. flexneri* sehingga pelarut yang digunakan tidak mempengaruhi pembentukan zona hambat pada uji penapisan awal maupun uji aktivitas antibakteri.

4. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dengan berbagai variasi konsentrasi

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui keefektifan ekstrak etil asetat dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dilakukan dengan variasi konsentrasi yaitu 20%, 30%, 40% dan 50% (b/v).

Pada pengujian ini tampak bahwa ekstrak etil asetat dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 20%, 30%, 40% dan 50% (b/v) tidak memberikan zona hambat yang lebih besar dari konsentrasi 10% (b/v). Kekuatan antibakteri yang dihasilkan masih dalam kategori lemah. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi tidak memperbesar diameter zona hambat yang dibentuk. Menurut Dewi (2010) diameter zona hambat tidak selalu berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga terjadi karena adanya perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar. Selain itu, jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda.

Penurunan diameter zona hambat diduga dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi menjadikan ekstrak lebih pekat sehingga ekstrak lebih sulit berdifusi ke dalam media yang mengandung bakteri. Menurut Maleki dkk., (2008) konsentrasi ekstrak yang terlalu pekat menyebabkan ekstrak sulit berdifusi secara maksimal ke dalam medium yang mengandung inokulum. Hal ini karena konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi dapat

menyebabkan kejemuhan sehingga senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tidak terlarut dengan sempurna.

Penelitian Iriano (2008) menunjukkan bahwa uji antibakteri infusum lidah buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* dengan metode difusi, zona hambatan terbesar dicapai pada konsentrasi 30% yaitu sebesar 1,75 mm, sedangkan konsentrasi 40-80% memiliki zona hambat yang lebih rendah yaitu berkisar antara 0,75-1 mm. Hal ini dapat disebabkan oleh banyaknya faktor yang berpengaruh terhadap besar zona hambat yang dihasilkan pada metode difusi antara lain kecepatan difusi, jumlah organisme yang diinokulasi dan kecepatan tumbuh bakteri.

Pembentukan zona hambat pada uji aktivitas antibakteri disebabkan terjadinya kerusakan sel bakteri yang mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat. Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri dipelajari melalui analisis kebocoran sel.

5. Mekanisme penghambatan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *S. flexneri*

Mekanisme penghambatan antibakteri dapat dipelajari dengan cara melihat kerusakan yang terjadi pada membran sel bakteri. Kerusakan membran sel merupakan salah satu tanda tidak normalnya sel setelah adanya perlakuan dengan ekstrak. Ekstrak yang ditambahkan merupakan ekstrak dengan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC). Hasil pengujian MIC

dapat dilihat pada tabel 9. Konsentrasi 4% (b/v) adalah MIC pada bakteri *S. aureus* sedangkan konsentrasi 5% (b/v) adalah MIC pada *S. flexneri*.

Hasil MIC menunjukkan bahwa *S. aureus* yang merupakan kelompok bakteri Gram positif memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan *S. flexneri* yang merepresentasikan kelompok bakteri Gram negatif. Hal ini disebabkan komponen penyusun dinding sel pada *S. flexneri* lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri *S. aureus*. Pada *S. flexneri* dinding sel tersusun atas dua lapisan membran sedangkan pada *S. aureus* dinding sel hanya tersusun satu lapis membran. Selain itu lipid pada *S. flexneri* lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan lipid pada *S. aureus*.

Hasil uji MIC tersebut sesuai dengan pernyataan Tian dkk., (2009) yang menyatakan bahwa bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap senyawa aktif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Adanya struktur membran luar yang kompleks dan adanya kapsul pada Gram negatif membatasi akses senyawa aktif ke dalam membran sel dan menjadikan bakteri Gram negatif lebih resisten terhadap antibakteri (Geidam dkk., 2007).

Analisis mekanisme aktivitas antibakteri dipelajari dengan cara uji kebocoran sel bakteri. Uji kebocoran sel yang dilakukan berupa kebocoran molekul asam nukleat dan protein. Kebocoran kedua molekul ini dapat dilihat dengan mengukur nilai absorbansi medium pertumbuhan bakteri yang dipaparkan pada ekstrak 1x MIC, 2x MIC dan tanpa ekstrak sebagai kontrol

dengan menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Peningkatan nilai absorbansi mengindikasikan terjadinya peningkatan bahan-bahan yang diserap pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Komponen yang diserap pada panjang gelombang tersebut dapat berupa nukleotida dan senyawa protein. Hal ini sesuai dengan pernyataan Naufalin (2005) yang menyatakan bahwa komponen senyawa yang dapat terdeteksi pada panjang gelombang 260 nm adalah RNA, DNA dan turunannya seperti purin, pirimidin dan ribonukleotida sedangkan panjang gelombang 280 nm adalah protein, asam amino, tirosin dan triptofan.

Perlakuan suspensi bakteri yang telah terpapar pada ekstrak mempunyai nilai absorbansi jauh lebih tinggi dibandingkan perlakuan tanpa ekstrak atau kontrol. Peningkatan nilai absorbansi dari konsentrasi 1x MIC yang meningkat pada konsentrasi 2x MIC menunjukkan bahwa terjadi peningkatan komponen senyawa yang dilepaskan oleh sel bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Adlof (2005) yang melaporkan bahwa terjadi peningkatan absorbansi pada medium pertumbuhan bakteri yang dipaparkan pada ekstrak 1x MIC meningkat pada konsentrasi ekstrak 2x MIC.

Kebocoran sel yang terjadi pada bakteri *S. aureus* dan *S. flexneri* menunjukkan bahwa asam nukleat yang dilepaskan lebih tinggi dibandingkan

dengan protein. Hal ini diduga terjadi karena adanya senyawa-senyawa lain yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm.