

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Jeruk Lemon

1. Klasifikasi jeruk lemon

Menurut Nurlaely (2016), Klasifikasi botani tanaman jeruk lemon sebagai berikut :

Regnum : *Plantae*

Divisio : *Spermathophyta*

Subdivisio : *Angiospermae*

Classis : *Dicotylodeneae*

Subclassis : *Dialypetalae*

Ordo : *Rutales*

Familia : *Rutaceae*

Genus : *Citrus*

Species : *Citrus Limon (L.) Burm. f.*



Gambar 1. Jeruk Lemon

(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

2. Deskripsi jeruk lemon

Jeruk lemon merupakan pohon perdu, batang berduri panjang tetapi tidak rapat, tegak, percabangan simpodial. Daun berwarna hijau dengan tepi rata, tunggal, berseling, lonjong, ujung dan pangkal meruncing, panjang 7 – 8 cm, lebar 4 – 5 cm, tangkai silindris, permukaan licin. Kelopak bunga berbentuk bintang dan berwarna hijau. Benang sari panjang sekitar 1,5 cm, kepala sari bentuk ginjal berwarna kuning, tangkai putik silindris, panjang kurang lebih 1 cm, kepala putik bulat berwarna kuning, mahkota lima helai yang berbentuk bintang, dan berwarna putih keuningan (Indriani, Mulqie, dan Hazar, 2015). Buah jeruk lemon berkulit kasar, berwarna kuning, berbentuk bulat telur dengan panjang 5 - 8 cm dan dasarnya menonjol, tebal kulitnya 0,5 - 0,7 cm, bijinya kecil dengan bentuk ovoid, dan banyaknya rata – rata 10 - 15 dan permukaan biji halus (Nurlaely, 2016).

3. Kandungan jeruk lemon

Buah jeruk lemon dikenal sebagai sumber vitamin C. Satu cangkir jus lemon terdapat 55 g vitamin C atau lebih dari 70% dari kecukupan gizi yang dianjurkan untuk wanita. Selain itu jeruk lemon mengandung potassium dan beberapa jumlah kalsium dan zat besi. Selain itu juga mengandung protein, lemak, fosfor, niasin, kalium, dan pektin (Susanto, 2016).

Setiap 100 g yang setara dengan dua buah jeruk lemon ukuran sedang terdapat 29 kalori, 1,1 g protein, 0,3 g lemak, 2,9 g gula alami, dan 2,8 g serat. Jeruk lemon memiliki kandungan utama gula dan asam sitrat. Kandungan jeruk antara lain asam folat, vitamin (C, A, B1, dan P), dan mineral (kalium, magnesium). Jeruk lemon juga mengandung bioflavonoid, asam dan minyak -

minyak volatil pada kulitnya, α -terpinen, α -pinen, β -pinen dan citral (Indriani, Mulqie, dan Hazar, 2015). Perasan buah jeruk lemon mengandung banyak senyawa bioaktif seperti asam sitrat, flavonoid, saponin, limonoid, tanin, dan terpenoid. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam jeruk lemon masing – masing memiliki sifat antibakteri (Handayani, 2009).

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Kandungan flavonoid pada sitrus memiliki aktivitas biologis yang luas, termasuk sebagai antibakteri, antijamur, antidiabetes, antikanker, dan aktivitas antivirus. Flavonoid dapat berfungsi sebagai antioksidan langsung dan menangkap radikal bebas, serta memiliki kapasitas dalam memodulasi aktivitas enzim dan menghambat proliferasi sel (Batubara, 2017). Flavonoid menyebabkan terganggunya fungsi dinding sel bakteri sebagai pemberi bentuk sel dan melindungi sel dari lisis. Senyawa ini merupakan antimikroba karena membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler, mengubah sifat fisik dan kimiawi sitoplasma, dan mendenaturasi dinding sel bakteri dengan cara melalui ikatan hidrogen. Aktivitas ini akan mengganggu fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, dan pengendalian susunan protein sehingga menyebabkan kematian pada bakteri. Terganggunya dinding sel akan menyebabkan lisis pada sel (Ramadhinta, Nahzi, dan Budiarti, 2016).

Selain itu, flavonoid memiliki aktivitas antibakteri melalui hambatan fungsi DNA gyrase sehingga kemampuan replikasi bakteri dihambat. Senyawa ini akan melakukan kontak dengan DNA pada inti sel bakteri. Adanya perbedaan

kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid menyebabkan kerusakan struktur lipid DNA bakteri sehingga bakteri akan lisis dan mati (Aida, Suswati, dan Misnawi, 2016).

b. Tanin

Tanin merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA *topoisomerase* yang berfungsi pada proses transkripsi dan replikasi, sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tanin juga memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikrobial, menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel bakteri. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ngajow, Abidjulu, dan Kamu, 2013).

c. Terpenoid

Terpenoid merupakan turunan terpena atau senyawa-senyawa yang strukturnya mirip terpena. Molekul terpenoid dapat mengandung gugus karboksil, hidrosil, formil, atau gugus yang lain. Aktivitas antibakteri terpenoid diduga melibatkan pemecahan membran oleh komponen – komponen lipofilik. Selain itu, senyawa fenolik dan terpenoid memiliki target utama yaitu membran sitoplasma yang mengacu pada sifat alamnya yang hidrofobik (Ngajow, Abidjulu, dan Kamu, 2013).

d. Saponin

Saponin adalah sekelompok glikosida tanaman yang dapat larut dalam air dan dapat menempel pada steroid lipofilik (C27) atau triterpenoid (C30). Senyawa ini memiliki struktur asimetri hidrofobikidrofi, yang menyebabkan senyawa ini memiliki kemampuan untuk menurunkan tegangan permukaan dan bersifat seperti sabun. Saponin ada pada seluruh tanaman dan ditemukan dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu yang dipengaruhi oleh varietas tanaman dan pertumbuhan (Illing, Safitri dan Erfiana, 2017).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sel bakteri sehingga terjadi kebocoran sel bakteri dan mengakibatkan keluarnya senyawa intraseluler. Saponin akan berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan sel bakteri. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian bakteri (Ngajow, Abidjulu, dan Kamu, 2013).

e. Minyak Atsiri

Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil (Parwata dan Dewi, 2008). Minyak atsiri terdiri atas berbagai senyawa yang mudah menguap. Salah satu komponen minyak atsiri yang banyak dalam jeruk lemon yaitu limonene ($\pm 70\%$) (Indriani, Mulqie, dan Hazar, 2015). Adanya limonoid pada spesies sitrus, yang dianggap mampu melawan bakteri yang terisolasi secara klinis (Batubara, 2017). Mekanisme kerja minyak atsiri dalam membunuh bakteri adalah dengan cara mengubah permeabilitas membran sel, menghilangkan ion-ion dalam sel,

menghalangi proton-*pump*, dan menurunkan produksi ATP. Minyak atsiri bersifat lipofilik yang dapat melewati dinding bakteri karena dinding bakteri terdiri atas polisakarida, asam lemak, dan fosfolipid. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel sehingga dapat membunuh bakteri (Dewi, 2015).

f. Asam Organik

Kandungan utama perasan buah jeruk lemon adalah asam sitrat. Asam sitrat merupakan asam organik yang terkandung paling banyak pada perasan buah jeruk lemon yang mempunyai aktivitas antibakteri. Kandungan vitamin C dan asam sitrat membuat derajat keasaman (pH) perasan buah jeruk lemon menjadi asam. pH asam dapat mengakibatkan pH internal sel bakteri menurun sehingga dapat mengganggu aktivitas sel bakteri dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat (Berti, 2015). Asam sitrat sebesar 7-7,6% yang dapat mendenaturasi protein sel bakteri dengan cara mengacaukan jembatan garam dengan adanya muatan isotonik. Mekanisme kerja dari senyawa tersebut yaitu dengan merusak dinding sel bakteri dan masuk ke dalam inti sel bakteri, mengganggu proses respirasi sel menghambat aktivitas enzim bakteri, dan menekan terjemahan dari regulasi produk gen tertentu (Batubara, 2017).

4. Manfaat jeruk lemon

Jeruk lemon merupakan sumber vitamin C dan kalsium yang sangat baik. Fungsi utama Vitamin C adalah berperan dalam sintesis kolagen, proteoglikan, dan zat organik lainnya misalnya pada tulang, gigi, dan endotel kapiler. Selain itu, jeruk lemon juga bisa digunakan sebagai *cooling drink* jika mengalami demam. Jeruk lemon juga merupakan *astringent* yang bagus dan bisa digunakan untuk lotion dalam kasus *sunburn*. Selain digunakan untuk kesehatan, minyak dari kulit

jeruk lemon dapat digunakan untuk perasa dan aroma, seperti pada deterjen, shampoo, sabun, dan parfum. Jeruk lemon juga dapat mengubah warna gigi menjadi lebih putih karena mengandung asam malat. Asam malat adalah dikarboksilat yang mempunyai kemampuan memutihkan gigi dengan cara mengoksidasi permukaan email gigi (Wijaya, 2008). Di Afrika Selatan, jus lemon telah digunakan dalam pengobatan *oral thrush* pada pasien HIV/AIDS (Damayanti, 2014).

Jeruk lemon juga bermanfaat dalam kesehatan seperti sebagai antikanker karena mengandung antioksidan, mengatasi masalah pencernaan dan membantu memperbaiki saluran pencernaan, mampu mencegah infeksi, pembersih racun alami, menurunkan berat badan, baik bagi jantung sehat dan mencegah terjadinya penyakit jantung, dan baik untuk kecantikan (Susanto, 2016). Selain itu, jeruk lemon dapat berfungsi sebagai pembersih racun alami, memperindah kulit, mencegah sepsis, dan membantu menangkal radikal bebas (Nuraini, 2017).

Masyarakat Mesir kuno percaya bahwa mengonsumsi lemon sangat penting untuk melindungi mereka dari racun dan dalam buku "*You Are What You Eat*", Dr. Gillian McKeith juga menjelaskan, segelas air hangat dengan perasan lemon di pagi hari setelah bangun tidur dapat membersihkan berbagai lendir tidak berguna dalam tubuh sehari sebelumnya (Susanto, 2016). Jeruk lemon juga digunakan sebagai salah satu bahan dari produk kecantikan wajah khusus untuk kulit berminyak dan berjerawat seperti pembersih wajah *antiacne*, penyegar, bahan *facial* untuk wajah, *facial wash* maupun yang lainnya. Hal tersebut dikarenakan jeruk lemon mempunyai khasiat sebagai antioksidan, mencegah penuaan dini, anti jerawat, mencerahkan wajah, dan menghilangkan minyak di

wajah (Hasan, Rasyid, dan Ririn, 2017). Sebagai obat jerawat alami, jeruk lemon bisa membantu mengurangi iritasi dan pembengkakan kulit dan menetralkan rasa sakit akibat jerawat sehingga membantu menyembuhkan sekaligus memperhalus kulit (Mayuna, 2013).

B. Bakteri *Propionibacterium acnes*

1. Klasifikasi bakteri *Propionibacterium acnes*

Menurut Putri (2010), bakteri *Propionibacterium acnes* memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Actinobacteria*

Class : *Actinobacteridae*

Order : *Actinomycetales*

Family : *Propionibacteriaceae*

Genus : *Propionibacterium*

Spesies : *Propionibacterium acnes*



Gambar 2. Morfologi Bakteri *Propionibacterium acnes*

(Sumber : Abate, 2013)

2. Morfologi dan fisiologi bakteri *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes adalah flora normal kulit terutama di wajah yang tergolong dalam kelompok bakteri Corynebacteri. *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri anaerob yang tumbuh dengan lambat dan bersifat gram positif (Radji, 2010). Bakteri ini berperan pada patogenesis jerawat yang dapat menyebabkan inflamasi. Inflamasi timbul karena perusakan stratum corneum dan stratum germinativum dengan mensekresikan bahan kimia yang menghancurkan dinding pori (Saraswati, 2015).

Bentuk selnya batang dan non motil. Bakteri ini memiliki ukuran yang kecil dengan lebar 0,5 μm dan panjang 1,5 μm . Pada pewarnaan gram, spesies ini sangat pleomorfik, menunjukkan ujung yang melengkung, berbentuk runcing, bentuk panjang dengan pewarnaan yang tidak rata seperti manik – manik dan terkadang berbentuk kokoid atau sferis. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora serta bakteri ini tipikal bakteri anaerob gram positif yang toleran terhadap udara (Indriani, Mulqie, dan Hazar, 2015).

Meskipun organisme ini termasuk ke dalam organisme anaerob, *Propionibacterium acnes* dapat mentoleransi saturasi oksigen hingga saturasinya mencapai 100% dengan laju pertumbuhan organisme yang menurun. Pada *in vitro*, organisme ini mampu bertahan selama 8 bulan dalam keadaan anaerob tanpa subkultur, menunjukkan bahwa *Propionibacterium acnes* juga dapat bertahan pada jaringan – jaringan tubuh manusia dalam keadaan oksidasi yang rendah. *Propionibacterium acnes* memiliki kemampuan resistensi terhadap fagositosis dan dapat bertahan di dalam makrofag. Resistensi terhadap fagositosis

disebabkan struktur dinding sel organisme yang kompleks dan memiliki lapisan fibrilar pada permukaannya (Oktavia, 2014).

3. Patogenesis bakteri *Propionibacterium acnes*

Patogenesis *Propionibacterium acnes* yang utama terfokus pada kemampuan organisme ini untuk memproduksi produk eksoseluler bioaktif dan interaksinya dengan system imun. *Propionibacterium acnes* memiliki komponen yang bersifat kemoatraktan (penarikan leukosit oleh suatu kemotaktik factor) dan organisme ini sendiri dapat mengaktifkan komplemen melalui *pathway* klasik maupun alternatif yang menyebabkan pembentukan factor kemotaktin C5-dependen (Beylot dkk, 2013).

Propionibacterium acnes ialah bakteri agen utama etiologi inflamasi jerawat. Ia merangsang pelepasan IL-1, IL-8, TNF- α dan mengaktifkan sistem komplemen. *Propionibacterium acnes* merusak stratum corneum dan germinat pada kulit. Bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan sebum yang diproduksi di folikel sebagai sumber utama makanan. Dengan menggunakan enzim khusus, bakteri ini menghasilkan asam lemak bebas melalui hidrolisis trigliserida kelenjar sebacea oleh lipasenya. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya jerawat (Khan, Assi, dan Moore, 2009). Selain itu, *Propionibacterium acnes* menghasilkan enzim ekstraseluler, seperti protease, yang dapat berpartisipasi dalam inflamasi oleh kerusakan matriks dan pelepasan proteolitik oleh keratinosit folikel. Bakteri ini dapat juga menyebabkan blepharitis dan endophthalmitis kronis bahkan sering sekali diikuti dengan operasi atau pembedahan intraokular. Genom dari bakteri ini dirangkai dan penelitian dari

genom bakteri ini menunjukkan beberapa gen yang dapat menghasilkan enzim-enzim untuk menurunkan kondisi kulit dan proteinprotein yang mungkin immunogenik (sistem kekebalan aktif) (Rosyad, 2009).

C. Antimikroba dan Mekanisme Kerja Antimikroba

1. Definisi antimikroba

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba khususnya mikroba yang merugikan manusia. Obat antimikroba yang ideal memperlihatkan toksisitas selektif artinya obat atau zat tersebut harus bersifat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi tidak toksik terhadap jasad inang atau hospes. Berdasarkan jenis mikroorganisme yang dimatikan atau dihambat pertumbuhannya, antimikroba terbagi menjadi antibakteri, antifungi, antivirus, dan antiprotozoa (Aziz, 2010). Obat - obat atau bahan yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia termasuk diantaranya antibiotika, antiseptik, disinfektasia, dan preservatif (Hidayah, 2016).

2. Sifat antimikroba

Menurut Damayanti (2014) sifat antimikroba terdiri dari :

- a. Bakteriostatik yaitu menghambat atau menghentikan pertumbuhan bakteri sehingga bakteri yang bersangkutan menjadi stationer dan tidak terjadi multiplikasi atau perkembangbiakan. Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamida, tetrasiklin, kloramfenikol, enteromisin, novobiosin, para amino salisilat, linkomisin, kindamisin, dan nitrofuratoin (dalam suasana basa dengan konsentrasi rendah).
- b. Bakterisida yaitu membunuh bakteri. Antimikroba yang masuk kedalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, streptomisin, eritromisin,

neomisin, kanamisin, gentamisin, novobiosin, polimiksin, kolistin, kotrimokazol, isoniasid, vankomisin, basitrasin, dan nitrofurantoin (dalam suasana asam dengan konsentrasi tinggi).

3. Mekanisme kerja antimikroba

Menurut Damayanti (2014) berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok yaitu :

a. Menghambat metabolisme sel

Asam folat dibutuhkan oleh bakteri untuk kelangsungan hidupnya. Asam folat tersebut didapatkan dari asam para amino benzoat (PABA) yang kemudian disintesis sendiri oleh bakteri untuk kebutuhan hidupnya. Untuk mengganggu kehidupan dari bakteri, sulfonamid yang memiliki kemiripan struktur dengan PABA akan berkompetisi untuk ikut dalam pembentukan asam folat, sehingga terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya, kehidupan bakteri akan terganggu. Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamid, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS), dan sulfon. Dari mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteristatik.

b. Menghambat sintesis dinding sel

Dinding sel bakteri memiliki tekanan osmotik internal yang tinggi dan berfungsi untuk mempertahankan bentuk dan ukuran sel. Maka ketika terjadi kerusakan pada dinding sel, ini akan menyebabkan terjadinya lisis. Mekanisme kerja ini diperoleh efek bakterisidal. Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, bacitrasin, vankomisin, dan sikloserin.

c. Mengganggu keutuhan membran sel

Membran sitoplasma memiliki peranan yang penting bagi sel, karena berfungsi sebagai sawar permeabilitas yang selektif, melakukan transport aktif, dan mengontrol komposisi dalam sel. Ketika membrane sitoplasma sel mengalami kerusakan, maka menyebabkan keluarnya makromolekul seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan ion – ion penting lain. Mekanisme kerja ini diperoleh efek bakterisidal. Obat yang termasuk kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antibakteri kemoterapeutik, seperti antiseptik *surface active agents*.

d. Menghambat sintesis protein sel

Bakteri membutuhkan protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein sel berlangsung di dalam ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Bakteri memiliki ribosom yang terdiri dari 2 subunit, 30S dan 50S. Kemudian kedua komponen tersebut menyatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S agar dapat digunakan untuk sintesis protein. Kerusakan atau penghambatan pada proses tersebut menyebabkan gangguan pada protein sel. Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah aminoglikosid, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol.

e. Menghambat sintesis asam nukleat sel

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin dan golongan kuinolon. Rifampisin berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA gyrase pada kuman yang fungsinya menata

kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral sehingga muat dalam sel kuman yang kecil.

D. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba digunakan untuk mengukur kemampuan zat antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri *in vitro*. Kemampuan ini dapat diperkirakan melalui metode dilusi atau difusi (Vandepitte dkk, 2010).

Potensi dari suatu antimikroba diperkirakan dengan membandingkan penghambatan pertumbuhan terhadap mikroorganisme yang sensitif dari hasil penghambatan suatu konsentrasi antibiotik uji dibandingkan dengan antibiotik referensi (Aziz, 2010). Metode uji antimikroba terdiri dari :

1. Metode difusi

Cakram kertas yang telah diresapi sejumlah tertentu antimikroba, ditempatkan pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Tingginya konsentrasi dari zat antimikroba yang terbentuk oleh difusi dari cakram dan pertumbuhan organisme uji dihambat penyebarannya sepanjang difusi antimikroba (terbentuk zona jernih disekitar cakram), sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri yang sensitif terhadap antimikroba (Vandepitte dkk, 2010). Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dan telah diketahui konsentrasinya (Aziz, 2010). Pada metode difusi, media yang dipakai adalah Mueller Hinton Agar. Ada beberapa cara pada metode difusi, yaitu:

a. *Disk diffusion (Kirby-Bauer)*

Metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Cakram kertas saring yang berisi jumlah obat yang terukur ditempatkan pada permukaan media padat yang permukaannya telah diinokulasikan organisme uji.

Setelah inkubasi, diameter zona hambat yang jelas di sekitar cakram ditentukan sebagai ukuran daya hambat obat melawan jenis organisme uji tertentu. Metode ini subjektif pada berbagai faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisme (misalnya sifat medium, diffusibility, ukuran molekul, dan stabilitas obat) (Jawetz, Melnick dan Adelberg's, 2013).

Dari metode ini terdapat dua zona yang akan terbentuk. Zona hambat dibagi menjadi zona radikal dan iradikal. Zona radikal merupakan suatu daerah di sekitar cakram yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibiotik diukur dengan mengukur diameter zona radikal. Sementara itu, zona iradikal adalah suatu daerah di sekitar cakram yang menunjukkan pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik tersebut. Di zona iradikal ini akan terlihat adanya pertumbuhan kurang subur atau lebih jarang dibanding dengan daerah di luar pengaruh antibiotik tersebut (Aziz, 2010).

b. Sumuran

Serupa dengan *disk diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi antimikroba yang akan diuji (Aziz, 2010).

2. Metode dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif. Antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu, yang kemudian diinokulasi dengan bakteri yang akan diuji. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan konsentrasi hambatan minimum / KHM (*minimal*

inhibitory concentration / MIC) zat tersebut. Nilai MIC dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat yang diketahui tercapai dalam serum dan cairan tubuh lainnya (Vandepitte dkk, 2010). Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu :

a. Metode dilusi cair

Metode ini digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibakteri, dan diinkubasi selama 18 – 24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Prayoga, 2013).

b. Metode dilusi padat

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampurkan dengan media agar lalu ditanami bakteri dan diinkubasi. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antibakteri yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa bakteri uji (Prayoga, 2013).

Penentuan daya hambat zat antibakteri pada suatu bahan alam dapat ditentukan dengan cara melihat ukuran dari zona hambat yang dihasilkan dan dikategorikan pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1
Kategori Daya Hambat Zat Antibakteri

| Diameter Zona Hambat | Kategori Daya Hambat |
|----------------------|----------------------|
| ≥ 21 mm | Sangat Kuat |
| 11 – 20 mm | Kuat |
| 6 – 10 mm | Sedang |
| ≤ 5 mm | Lemah |

Sumber : Yanti dan Mitika (2017)

E. Faktor – Faktor Yang Memengaruhi Aktivitas Antimikroba

Menurut Vandepitte dkk (2010) terdapat beberapa faktor yang memengaruhi aktivitas antimikroba, berikut merupakan hal – hal yang harus dipertimbangkan karena akan memengaruhi hasil pemeriksaan yaitu :

1. Kepekatan inokulum

Jika inokulum terlalu encer, zona hambatan akan menjadi lebih lebar walaupun kepekatan organismenya tidak berubah. Galur yang relatif resisten mungkin dilaporkan sebagai sensitif. Sebaliknya, jika inokulum terlalu pekat, ukuran zona akan menyempit dan galur yang sensitif dapat dilaporkan sebagai resisten. Biasanya hasil optimal didapat dengan ukuran inokulum yang menghasilkan pertumbuhan yang hampir menyatu (konfluen).

2. Waktu pemasangan cakram

Jika setelah ditanami dengan galur uji, lempeng agar dibiarkan pada suhu ruang lebih lama dari waktu baku, perkembangbiakan inokulum dapat terjadi sebelum cakram dipasang. Ini menyebabkan zona diameter mengecil dan dapat menyebabkan suatu galur sensitif dilaporkan resisten.

3. Suhu inkubasi

Uji kepekaan biasanya diinkubasi pada suhu 35°C untuk pertumbuhan optimal. Jika suhu diturunkan, waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan efektif akan memanjang dan dihasilkan zona yang lebih besar. Jika galur *Staphylococcus aureus* yang heteroresisten diuji dengan metisilin (oksasilin), bagian yang resisten dapat dideteksi pada suhu 35°C atau lebih rendah, koloni yang resisten tumbuh di dalam zona hambatan. Koloni – koloni yang resisten dapat dilihat lebih mudah bila agar dibiarkan selama beberapa jam pada suhu ruang sebelum pembacaan hasil. Koloni – koloni tersebut harus selalu diidentifikasi untuk memeriksa apakah merupakan pencemar.

4. Waktu inkubasi

Kebanyakan teknik menerapkan masa inkubasi antara 16 – 18 jam. Walaupun demikian, pada keadaan darurat, laporan pendahuluan dapat dibuat setelah 6 jam. Ini tidak dianjurkan secara rutin dan hasil – hasilnya harus selalu dipastikan setelah masa inkubasi konvensional.

5. Ukuran lempeng, ketebalan media agar, dan pengaturan jarak cakram antimikroba

Uji kepekaan biasanya dikerjakan menggunakan cawan petri ukuran 9 – 10 cm dan tidak lebih dari 6 atau 7 cakram antimikroba pada tiap lempeng agar. Jika jumlah antimikroba yang harus diuji lebih banyak, lebih disukai menggunakan dua lempeng atau satu lempeng agar berdiameter 14 cm. Zona hambatan yang sangat besar mungkin terbentuk pada media yang sangat tipis, dan sebaliknya berlaku untuk media yang tebal. Perubahan kecil dalam ketebalan lapisan agar efeknya dapat diabaikan. Pengaturan jarak cakram yang tepat sangat penting untuk

mencegah tumpang tindihnya zona hambatan deformasi di dekat tepi – tepi lempeng.

6. Potensi cakram antimikroba

Diameter zona hambatan terkait dengan jumlah obat dalam cakram. Jika potensi obat berkurang akibat rusak selama penyimpanan, zona hambatan akan menunjukkan pengurangan ukuran yang sesuai.

7. Komposisi media

Media memengaruhi ukuran zona melalui efeknya terhadap kecepatan pertumbuhan organisme, kecepatan difusi obat antimikroba, dan aktivitas obat. Penggunaan media harus sesuai dengan metode tersebut.

F. Antibiotik Kloramfenikol

Antibiotik ialah suatu bahan kimia yang dikeluarkan oleh jasad renik atau hasil sintesis atau semisintesis yang mempunyai struktur yang sama dan zat ini dapat merintangikan atau memusnahkan jasad renik yang lainnya. Antibiotik dibagi menjadi dua golongan berdasar kegiatannya yaitu antibiotik yang memiliki kegiatan luas (*Broad Spectrum*), yaitu antibiotik yang dapat mematikan gram positif dan bakteri gram negatif. Antibiotik jenis ini diharapkan dapat mematikan sebagian besar bakteri, termasuk virus tertentu dan protozoa. Tetrasiklin dan derivatnya, kloramfenikol serta ampisillin merupakan golongan *broad spectrum*. Golongan kedua adalah antibiotik yang memiliki kegiatan sempit (*Narrow spectrum*). Antibiotik golongan ini hanya aktif terhadap beberapa jenis bakteri. penicillin, streptomisin, neomisin, basitrasina (Wasitaningrum, 2009).

Antibiotik kloramfenikol atau kloramisetin dihasilkan oleh jamur *Streptomyces venezuelae*. Kloramfenikol sukar larut dalam air tetapi mudah larut

dalam metanol, etanol, etil asetat, dan aseton; serta tidak larut dalam benzena (Wasitaningrum, 2009). Kloramfenikol adalah antibiotik bakteriostatik berspektrum luas yang aktif melawan organisme aerob maupun anaerob gram positif dan gram negatif. Mekanisme kerja antibiotik ini melalui penghambatan sintesis protein mikroba. Kloramfenikol berikatan dengan subunit 50S ribosom. Kloramfenikol menghambat ikatan asam amino baru pada rantai peptide yang memanjang karena kloramfenikol menghambat enzim peptidil transferase. Kloramfenikol bersifat bakteriostatik dan bakteri bias tumbuh lagi jika pengaruh obat dihilangkan. Mikroorganisme resisten terhadap kloramfenikol menghasilkan enzim kloramfenikol asetil transferase yang merusak aktivitas obat. Produksi enzim ini biasanya di bawah kontrol plasmid (Jawetz, Melnick dan Adelberg's, 2013).