

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**

Belimbing wuluh disebut juga sebagai belimbing sayur yang merupakan tumbuhan yang hidup pada ketinggian 5 hingga 500 meter di atas permukaan laut (Rahayu, 2013). Belimbing wuluh sering disebut belimbing sayur atau belimbing asam karena memiliki rasa yang cukup asam dan biasanya digunakan sebagai bumbu masakan atau ramuan jamu. Belimbing wuluh berasal dari kepulauan Maluku dan menyebar ke seluruh bagian negara Indonesia. Nama ilmiah belimbing wuluh adalah *Averrhoa bilimbi* L. (Gendrowati, 2015). Belimbing wuluh memiliki batang yang kasar berbenjol-benjol, bercabang sedikit, arahnya condong keatas. Cabang muda berambut halus seperti beludru, warna coklat muda. Daun berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur sampai lonjong, ujung runcing, pangkal memudar tepi rata, panjang 2-10 cm, lebar 1-3 cm, warna hijau, permukaan bawah berwarna hijau muda (Herbie, 2015). Menurut Gendrowati (2015), batang pohon belimbing wuluh memiliki ketinggian mencapai  $\pm 15$  meter dengan percabangan yang sedikit. Batangnya tidak terlalu besar dengan diameter sekitar 30 cm. Daunnya tersusun ganda dengan bentuk kecil, bulat telur. Ukurannya antara 2-10 cm  $\times$  1-3 cm dan berwarna hijau. Bunganya merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam malai sepanjang 5-20cm secara berkelompok. Bunga keluar dari percabangan dengan bentuk seperti bintang yang berwarna ungu kemerahan. Buahnya bentuknya lonjong bulat persegi. Panjangnya sekitar 4-6,5cm, berwarna hijau agak kekuningan.

Biji dalam bentuk gepeng. Pohon belimbing wuluh dapat tumbuh didataran rendah hingga mencapai 500 mdpl. Rasa buahnya asam (Samtosa, 2014).

Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah salah satu tanaman yang banyak tumbuh di pekarangan dan dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Tanaman ini tumbuh subur di Indonesia, Filipina, Sri Lanka, Myanmar, dan Malaysia. Kelebihan tanaman ini adalah termasuk salah satu jenis tanaman tropis yang dapat berbuah sepanjang tahun (Rahayu, 2013). Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) termasuk kedalam familia Oxalidaceae. Nama lokalnya antara lain : Limeng, Selimeng, Thilimeng (Aceh); Selemneg (Gayo); Asom, Belimbing, Balimbingan (Batak); Malimbi (Nias); Balimbieng (Minangkabau); Belimbing Asam (Melayu); Balimbing (Lampung); Calingcing, Balingbing (Sunda); Bhalingbhing Bulu (Madura); Blingbing Buloh (Bali); Limbi (Bima); Balimbeng (Flores); Libi (Sawu); Belerang (Sangi) (Herbie, 2015).



**Gambar 1.** Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Sumber : (Ali, 2008)

Belimbing wuluh diklasifikasikan sebagai berikut (Herbie, 2015):

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta

Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Roside
Ordo	: Geraniales
Famili	: Oxalidaceae
Genus	: <i>Averrhoa</i>
Spesies	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.

### **1. Kandungan kimia buah belimbing wuluh**

Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung banyak vitamin C alami yang berguna sebagai penambah daya tahan tubuh dan perlindungan terhadap berbagai penyakit. Belimbing wuluh mempunyai kandungan unsur kimia yang disebut asam oksalat dan kalium. Menurut Herlih (1993), dalam Rahayu (2013) dari hasil pemeriksaan kandungan kimia buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung golongan senyawa oksalat, minyak menguap, fenol, flavonoid, dan pektin. Herbie (2015) menyebutkan batang belimbing wuluh mengandung saponin, tannin, glukosida, kalsium oksalat, sulfur, asam format, peroksidase. Sedangkan daunnya mengandung tannin, sulfur, asam format, peroksidase, kalsium oksalat, dan kalium sitrat. Belimbing wuluh mengandung banyak zat tannin, saponin, glukosida sulfur, asam format, peroksida, flavonoid, serta terpenoid. Karena rasanya yang sangat masam, sudah bisa dipastikan bahwa belimbing wuluh juga mengandung banyak vitamin C (Gendrowati, 2015).

Ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh menunjukkan uji positif pada pengujian flavonoid dan terpenoid (Rahayu, 2013). Flavonoid adalah pigmen tumbuhan, bertanggung jawab atas warna bunga, buah, dan kadang daun. Bila tidak

langsung terlihat, mereka sering bertindak sebagai *co-pigmen*. Misalnya, pigmen flavon dan flavonol tak berwarna melindungi jaringan tanaman dan senyawa seperti antosianin terhadap kerusakan radiasi ultraviolet (Hoffmann, 2003). Dari penelitian senyawa flavonoid bersifat aktif sebagai antimikroba. Senyawa flavonoid merupakan salah satu antimikroba yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Flavanoid merupakan senyawa yang mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, butanol, dan aseton. Flavanoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, senyawa fenol mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Denaturasi protein menyebabkan gangguan dalam pembentukan sel sehingga merubah komposisi komponen protein. Fungsi membran sel yang terganggu dapat menyebabkan meningkatnya permeabilitas sel, sehingga mengakibatkan kerusakan sel jamur. Kerusakan tersebut menyebabkan kematian sel jamur. Flavanoid merupakan senyawa fenol yang dapat menyebabkan denaturasi protein dan berfungsi sebagai antibakteri dan antijamur. Denaturasi protein dapat merusak sel secara permanen dan tidak bisa diperbaiki lagi (Rahayu, 2013).

Saponin adalah sekelompok glikosida tanaman yang dapat larut dalam air dan dapat menempel pada steroid lipofilik ( $C_{27}$ ) atau triterpenoid ( $C_{30}$ ) (Hoffmann, 2003). Mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida. Hal ini akhirnya mengakibatkan sel bakteri mengalami lisis (Kurniawan dan Aryana, 2015).

Alkaloid adalah senyawa-senyawa organik yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan, bersifat basa, dan struktur kimianya mempunyai lingkaran heterosiklis dengan nitrogen sebagai hetero atomnya. (Sumardjo, 2009). Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme kerjanya adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel. Rusaknya dinding sel akan menyebabkan terhambatnya perumbuhan sel bakteri dan pada akhirnya bakteri akan mati (Retnowati, Bialangi and Posang, 2011).

Tanin adalah zat organik yang ada dalam ekstrak tumbuhan yang dapat larut dalam air, merupakan senyawa polifenol ( $C_6-C_3-C_6$ ) yang mengendapkan protein dan membentuk kompleks dengan polisakarida, dan terdiri dari kelompok oligomer dan polimer yang sangat beragam (Hoffmann, 2003). Mekanisme antimikroba tanin berkaitan dengan kemampuan tannin membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis (Sujatmiko, 2014) (Sumardjo, 2009).

## **2. Manfaat buah belimbing wuluh**

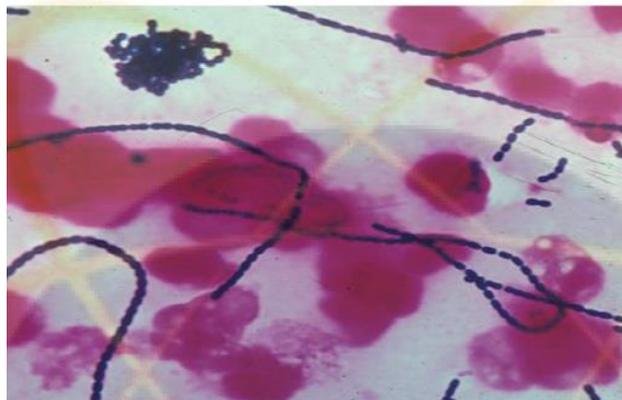
Belimbing wuluh di kalangan masyarakat sangat populer, bahkan melebihi belimbing manis. Banyak hasil penelitian yang menyebutkan potensi suatu tanaman dalam mengobati penyakit tertentu ataupun sebagai antibakteri. Akan tetapi, penggunaan bahan antimikroba kimia, di lingkungan masyarakat dalam produk pangan lebih populer. Hasil dari penggunaan bahan antimikroba kimia sebagai

pengawet lebih efektif dan biayanya relatif murah. Ada yang memanfaatkan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) untuk dibuat manisan dan sirup, sebagai obat untuk sariawan, sakit perut, gondongan, rematik, batuk rejan, gusi berdarah, sakit gigi berlubang, memperbaiki fungsi pencernaan, untuk membersihkan noda pada kain, menghilangkan bau amis, sebagai bahan kosmetik serta mengkilapkan barang-barang yang terbuat dari kuningan (Rahayu, 2013). Biasanya buah, batang, bunga maupun daunnya banyak digunakan untuk menyembuhkan penyakit seperti; pegal, gondongan, batuk pada anak, batuk biasa maupun batuk rejan, rematik, sariawan, jerawat dan panu (Herbie, 2015). Belimbing Wuluh juga dapat menghilangkan sakit (analgetik), memperbanyak pengeluaran empedu, antiradang, peluruh kencing, astringent (Putra, 2015).

Dalam buku Aneka Tanaman Apotek Hidup di Sekitar Kita mengatakan, hampir diseluruh Indonesia secara tradisi orang sakit sariawan dan tenggorokan memetik buah belimbing wuluh, memotongnya dan menempelkannya pada luka sariawan, dan ada pulang yang memerasnya lalu diminum. Rasanya tentu saja sangat asam dah perih, tetapi banyak orang percaya belimbing wuluh sanggup mengobati sariawan dan sakit tenggorokan. Disamping dapat mengobati sariawan, buah belimbing wuluh berkhasiat pula untuk menyembukan batuk, rematik, hipertensi, sakit gigi, diabetes, gondongan, dan juga menghilangkan jerawat serta panu. Selain itu ekstrak daun dan buah belimbing wuluh juga mengandung sejumlah senyawa flavonoid dengan tipe luteoin. Senyawa ini, bersama dengan apigenin dikenal cukup ampuh dalam menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri seperti *Bacillus cereus*, , *Corney bacterium diphteria*. (Akbar, 2015).

## B. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri Gram positif, nonmotil, tidak berspora, membentuk kokus yang berbentuk rantai, berdiameter 0,6-1,0 mikrometer dan fakultatif anaerob. Bakteri ini melakukan metabolisme secara fermentasi. *Streptococcus pyogenes* digolongkan ke dalam bakteri  $\beta$ -hemolitik, sehingga membentuk zona bening bila ditumbuhkan dalam media agar darah (Cunningham, 2000). *Streptococcus pyogenes* merupakan salah satu patogen yang banyak menginfeksi manusia. Diperkirakan 5-15% individu normal memiliki bakteri ini dan biasanya terdapat pada saluran pernafasan, namun tidak menimbulkan gejala penyakit. *Streptococcus pyogenes* dapat menginfeksi ketika pertahanan tubuh inang menurun atau ketika organisme tersebut mampu berpenetrasi melewati pertahanan inang yang ada. Bila bakteri ini tersebar sampai ke jaringan yang rentan, maka infeksi supuratif dapat terjadi. Infeksi ini dapat berupa faringitis, tonsilitis, impetigo dan demam scarlet. *Streptococcus pyogenes* juga dapat menyebabkan penyakit invasif seperti infeksi tulang, necrotizing fasciitis, radang otot, meningitis dan endokarditis (Cunningham, 2000).



**Gambar 2.** Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Sumber : (Brooks *et al.*, 2012)

*Streptococcus pyogenes* mengandung antigen grup A. *Streptococcus pyogenes* tumbuh di agar darah berbentuk kokus dan tersusun menjadi rantai, mempunyai ukuran 0,5 mm. Bakteri yang memiliki strain A memiliki kapsul yang mengandung asam hialuronat yang berfungsi untuk mengganggu proses fagositosis. Berikut dibawah ini taksonomi dari *Streptococcus pyogenes* (Rahman, 2015) :

Kingdom: Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Lactobacillales

Famili : Streptococcaceae

Genus : Streptococcus

Spesies : *Streptococcus pyogenes*

Kolonisasi dari bakteri *Streptococcus* grup A di epitel faring dipermudah dengan adanya kerusakan epitel sebelumnya. Penempelan *Streptococcus* grup A diperantarai oleh protein M pada permukaannya. Protein M pada *Streptococcus* grup A dapat menahan dari fagositosis saat antibodi spesifik tidak ada. Sintesis dari anti-M diperantarai oleh IgG. Protein M dapat memicu respons tubuh melalui produksi dari IL – 6 yang menyebabkan terjadinya inflamasi (Rahman, 2015). Umumnya *Streptococcus* bersifat anaerob fakultatif, hanya beberapa jenis yang bersifat anaerob obligat. Pada umumnya tekanan O<sub>2</sub> harus dikurangi, kecuali untuk enterokokus. Pada perbenihan biasa, pertumbuhannya kurang subur jika ke dalamnya tidak ditambahkan darah atau serum. Kuman ini tumbuh baik pada pH 7,4-7,6, suhu optimum untuk pertumbuhan 37°C, pertumbuhannya cepat berkurang pada 40° C (Cunningham, 2000).

*Streptococcus pyogenes* mudah tumbuh dalam semua *enriched* media. Untuk isolasi primer harus dipakai media yang mengandung darah lengkap, serum atau transudat misalnya cairan asites atau pleura. Penambahan glukosa dalam konsentrasi 0,5% meningkatkan pertumbuhannya tetapi menyebabkan penurunan daya lisisnya terhadap sel darah merah. Dalam lempeng agar darah yang diinkubasi pada 37<sup>0</sup> C setelah 18-24 jam akan membentuk koloni kecil keabu-abuan, bentuknya bulat, pinggir rata, pada permukaan media, koloni tampak sebagai setitik cairan (Cunningham, 2000).

Sebagian besar *Streptococcus* yang mempunyai antigen grup A adalah *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes* merupakan prototipe patogen pada manusia. *Streptococcus pyogenes* digunakan untuk mengilustrasikan ciri-ciri umum *Streptococcus* dan ciri-ciri spesifik spesies tersebut. *Streptococcus pyogenes* merupakan patogen utama pada manusia yang berhubungan dengan invasi lokal atau sistemik dan penyakit imunologis pascainfeksi-*Streptococcus*. *Streptococcus pyogenes* secara khas menghasilkan zona-zona hemolisis- $\beta$  yang besar (diameter 1 cm) disekitar koloni yang berdiameter lebar dari 0,5mm. *Streptococcus pyogenes* bersifat PYR-positif (menghidrolisis l-pyrrolidonyl-2-naphthylamide) dan biasanya sensitif terhadap basitrasin (Brooks *et al.*, 2012).

## **1. Morfologi dan Identifikasi**

Berikut merupakan morfologi dan identifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* (Brooks *et al.*, 2012) :

### **a. Organisme tipikal**

Masing-masing kokus berbentuk bulat atau ovoid dan tersusun menyerupai rantai. Kokus membelah diri pada bidang yang tegak lurus terhadap sumbu panjang

rantai. Anggota kokus yang tersusun dalam rantai sering memiliki gambaran diplokokus yang nyata, dan sesekali tampak menyerupai batang. Panjang rantai sangat bervariasi dan dipengaruhi faktor lingkungan. *Streptococcus* bersifat gram positif, tetapi seiring bertambahnya usia kultur dan kematian bakteri, *Streptococcus* kehilangan sifat gram-positifnya dan tampak sebagai gram-negatif; untuk sebagian *Streptococcus*, hal ini dapat terjadi setelah inkubasi selama satu malam.

Sebagian besar galur grup A menghasilkan kapsul yang tersusun atas asam hialuronat. Kapsul paling nyata terlihat pada kultur yang masih sangat baru. Kapsul tersebut menghambat fagositosis. Kapsul asam hialuronat mungkin memiliki virulensi bakteri lebih besar dari yang diperkirakan, dan bersama protein M, diduga merupakan faktor penting dalam peningkatan kembali jumlah kasus demam rematik di Amerika Serikat pada tahun 1980-an dan 1990-an. Kapsul berikatan dengan protein pengikat asam hialuronat, CD44, yang terdapat pada sel epitel manusia. Pengikatan tersebut merusak taut intraselular sehingga memungkinkan mikroorganisme tetap berada diluar sel sementara mereka menembus epitel. Dinding sel *Streptococcus pyogenes* mengandung protein (antigen M, T, dan R), karbohidrat (spesifik grup), dan peptidoglikan. Pili mirip rambut menonjol keluar dari kapsul pada *Streptococcus* grup A. Pili tersebut sebgaiian tersusun dari protein M dan diselubungi dengan *lipoteichoic acid*. *Lipoteichoic acid* ini penting untuk perlekatan *Streptococcus* ke sel epitel.

#### b. Kultur

Sebagian besar streptococcus tumbuh pada medium solid sebagai koloni diskoid, biasanya berdiameter 1-2mm. *Streptococcus pyogenes* merupakan  $\beta$  - hemolitik.

c. Karakteristik pertumbuhan

Energi utama diperoleh dari pemanfaatan glukosa dengan asam laktat sebagai produk akhir. Pertumbuhan *Streptococcus* cenderung buruk pada medium yang padat atau dalam kaldu, kecuali diperkaya dengan darah atau cairan jaringan. Kebutuhan nutritif sangat bervariasi antarspesies yang berbeda. Patogen pada manusia adalah yang memiliki kebutuhan nutrisi yang paling banyak, memerlukan beragam faktor pertumbuhan. Pertumbuhan dan hemolisis ditingkatkan dengan inkubasi dalam CO<sub>2</sub> 5-10%. Sebagian besar *Streptococcus* hemolitik patogen tumbuh paling baik pada suhu 37°C. Kebanyakan *Streptococcus* merupakan organisme anaerob fakultatif, serta tumbuh pada kondisi aerobik dan anaerobik.

d. Variasi

Varian pada galur *Streptococcus* yang sama dapat memperlihatkan bentuk koloni yang berbeda. Hal ini khususnya pada galur *Streptococcus pyogenes* yang membentuk koloni yang mengkilap ataupun buram. Koloni yang tampak buram, terdiri atas organisme yang menghasilkan banyak protein M dan biasanya bersifat virulensi. *Sstreptococcus pyogenes* pada koloni yang mengkilap cenderung menghasilkan sedikit protein M dan sering kali tidak virulensi.

## 2. Patogenitas dan gambaran klinis

Menurut Brooks (2012) infeksi paling umum yang diakibatkan oleh *Streptococcus pyogenes* adalah faringitis. *Streptococcus pyogenes* melekat ke epitel faring dengan menggunakan pili permukaan yang dilapisi *lipoteichoic acid* dan juga dengan asam hialuronat pada galur yang berkapsul. Pada bayi dan anak kecil, nyeri tenggorokan bermanifestasi sebagai nasofaring subakut disertai demam ringan,

tetapi dengan kecenderungan penyebaran infeksi ke telinga tengah dan mastoid. Kelenjar getah bening servikalis biasanya membesar. Penyakit dapat menetap selama berminggu-minggu.

Pada anak yang lebih besar dan dewasa, penyakit terjadi lebih akut dan ditandai dengan tonsillitis dan nasofaringitis berat, serta eritema dan edema yang berat pada membrane mukosa dengan eksudat purulent, pembesaran dan nyeri tekan pada kelenjar getah bening servikalis, dan (biasanya) demam tinggi. Dua puluh persen infeksi tidak menimbulkan gejala. Gambaran klinis serupa dapat terjadi pada mononukleosis infeksiosa, difteri, infeksi gonokokus, dan infeksi adenovirus.

### **C. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses pengambilan komponen suatu sampel yang larut dalam suatu pelarut dengan cara merendam dan pelarutan. Dalam tahapan ekstraksi ini adalah penting untuk memperhatikan sifat kimia dan sifat fisika dari suatu komponen yang akan diekstraksi atau diisolasi. Apabila komponen yang akan diekstraksi bersifat ionik (seperti senyawa garam organik) atau senyawa sangat polar (seperti turunan glikosida) maka pelarut air adalah yang paling sesuai untuk komponen tersebut. Komponen minyak atsiri lebih baik diekstraksi dari suatu bahan dengan pelarut seperti *n-heksana*, benzena, atau eter (dietil eter), selain itu perlu mengetahui komponen yang akan diisolasi netral, asam atau basa. Umumnya senyawa bersifat netral, golongan flavonoid bersifat sedikit asam (seperti fenolat), sebagian terpenoid ada yang bersifat asam dari gugus asam karboksilat, dan golongan alkaloid bersifat basa. Senyawa-senyawa alam yang bersifat asam dan

basa tergolong kedalam senyawa yang bersifat polar, pelarut yang sesuai adalah etanol dan methanol (Hargono 1996 dalam buku (Afrianti, 2010)

Proses ekstraksi pada dasarnya adalah proses perpindahan masa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia kedalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk kedalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi kedalam pelarut. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk kedalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi kedalam pelarut. Proses ini terus berulang sampai pada keseimbangan konsentrasi zat aktif antara di dalam sel dengan konsentrasi zat aktif di luar sel (Marjoni, 2016).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Sampel yang akan diekstraksi dapat berbentuk sampel segar ataupun sampel yang telah dikeringkan. Sampel yang umum digunakan adalah sampel segar karena penetrasi pelarut akan berlangsung lebih cepat. Selain itu penggunaan sampel segar dapat mengurangi kemungkinan terbentuknya polimer resin atau artefak lain yang terbentuk selama proses pengeringan. Penggunaan sampel kering juga memiliki kelebihan yaitu dapat mengurangi kadar air yang terdapat didalam sampel, sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya senyawa akibat aktifitas antimikroba. Terdapat beberapa jenis ekstraksi, salah satunya adalah ekstraksi secara dingin. Metode ekstraksi secara dingin bertujuan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang terdapat dalam

simplisia yang tidak tahan terhadap panas atau bersifat thermolabil. Ekstraksi secara dingin dapat dilakukan dengan beberapa cara (Marjoni, 2016) :

### **1. Maserasi**

Maserasi berasal dari bahasa latin “macerare” yang berarti merendam, sehingga maserasi dapat diartikan sebagai suatu sediaan cair yang dibuat dengan cara merendam bahan nabati menggunakan pelarut bukan air atau pelarut setengah air seperti etanol encer selama waktu tertentu. Maserasi adalah proses ekstraksi sederhana yang dilakukan hanya dengan cara merendam simplisia dalam satu atau campuran pelarut selama waktu tertentu pada temperatur ruang dan terlindung dari cahaya.

Prinsip kerja dari maserasi adalah proses melarutnya zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut (*like dissolved like*). Ekstraksi zat aktif dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pelarut yang digunakan akan menembus dinding sel dan kemudian masuk ke dalam sel tanaman yang penuh dengan zat aktif. Pertemuan antara sel aktif dan pelarut akan mengakibatkan terjadinya proses pelarutan dimana zat aktif akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang ada di dalam sel mengandung zat aktif sementara pelarut yang ada di luar sel belum terisi zat aktif, sehingga terjadi ketidak seimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dengan konsentrasi zat aktif yang ada di luar sel. Perbedaan konsentrasi ini akan mengakibatkan terjadinya proses difusi, dimana larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar sel dan digantikan oleh pelarut dengan konsentrasi rendah. Proses ini terjadi berulang-ulang sampai di dapat suatu

kesetimbangan konsentrasi larutan antara di dalam sel dengan konsentrasi larutan di luar sel.

## **2. Perkolasi**

Perkolasi adalah proses penyarian zat aktif secara dingin dengan cara mengalirkan pelarut secara kontinu pada simplisia selama waktu tertentu.

### **D. Pengukuran Aktivitas Antimikroba**

Penentuan kerentanan suatu patogen bakteri terhadap obat antimikroba dapat dilakukan dengan dua metode utama yaitu dilusi atau difusi. Berikut merupakan metode untuk pengukuran aktivitas antimikroba yaitu (Brooks *et al.*, 2012):

#### **1. Metode dilusi**

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat kemudian media diinokulasi bakteri uji dan diinkubasi. Tahap akhir dilarutkan antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair dan dilusi padat (Irianto, 2014).

##### **a. Metode dilusi cair**

Metode ini mengukur KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji (Irianto, 2014).

b. Metode dilusi padat

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (*solid*). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Irianto, 2014).

## 2. Metode difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah inkubasi, diameter zona hambatan sekitar cakram dipergunakan mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji. Metode difusi agar dibedakan menjadi dua sebagai berikut (Vandepitte dkk, 2011)

a. Cara *Kirby Bauer*

Metode difusi disk (*Kirby Bauer*) dilakukan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. Keunggulan uji difusi cakram agar mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa.

b. Cara sumuran

Metode ini serupa dengan metode difusi disk, di mana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji.

Interpretasi hasil tes difusi harus didasarkan pada perbandingan antara metode difusi dan dilusi. Perbandingan demikian telah menghasilkan nilai standar rujukan. Garis-garis regresi linier dapat memperlihatkan hubungan antara log konsentrasi inhibitorik minimum dalam tes dilusi dan diameter zona inhibisi dalam tes difusi (Brooks dkk., 2012). Aktivitas antimikroba ada yang kuat, sedang, dan lemah. Berikut merupakan kategori daya hambat bakteri.

**Tabel 1** Kategori Daya Hambat Bakteri

Diameter Zona Hambat	Kategori
$\leq 5$ mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
$\geq 20$ mm	Sangat kuat

Sumber: Susanto, Sudrajat dan Ruga (2012) dalam Permadani, Puguh, dan Sarwiyono (2014)

### 3. Faktor – faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba

Jika inokulum terlalu encer, zona hambatan akan menjadi lebih lebar walaupun kepekaan 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). Dibawah ini merupakan factor-faktor yang mempengaruhi ukuran zona pada metode difusi cakram (Brooks *et al.*, 2012) :

### **1. 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 sebagai resisten.

### **2. Suhu inkubasi**

Uji kepekaan biasanya diinkubasi pada suhu 35° C untuk pertumbuhan yang optimal. Jika suatu suhu diturunkan, waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan efektif akan memanjang dan dihasilkan zona yang lebih lebar. Koloni-koloni yang resisten dapat dilihat lebih mudah bila agar dibiarkan selama beberapa jam pada suhu ruang sebelum pembacaan hasil.kolono-koloni tersebut harus selalu diidentifikasi untuk memeriksa apakah merupakan pencemar.

### **3. 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 dilanjutkan secara rutin dan hasilnya harus selalu dipastikan setelah masa inkubasi konvensional.

### **4. Ukuran lempeng, ketebalan media agar, dan pengaturan jarak cakram antimikroba**

Uji kepekaan biasanya dikerjakan menggunakan cawan petriukuran 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 yang tepat sangat penting untuk mencegah tumpang tindihnya zona hambatan atau deformasi didekat tepi-tepi lempeng.

#### **5. 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.

#### **6. Komposisi media**

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

Banyak faktor yang mempengaruhi diameter zona yang mungkin diperoleh pada uji organisme yang sama nyata – nyata menunjukkan perlunya standarisasi pada metode difusi-cakram. Hasil yang sah hanya bisa didapatkan bila kondisi yang ditetapkan untuk metode tertentu diikuti secara ketat. Perubahan pada salah satu faktor yang mempengaruhi pemeriksaan dapat menghasilkan laporan-laporan yang sangat menyesatkan klinisi.

#### **E. Antibiotik**

Antibiotik adalah suatu substansi (zat-zat) kimia yang diperoleh atau dibentuk oleh mikroorganisme dan zat-zat tersebut dalam jumlah yang sedikit sudah mampu menghasilkan daya penghambatan terhadap aktivitas mikroorganisme yang lain. Berbagai jenis antibiotik yang telah ditemukan, hanya beberapa golongan antibiotik yang dapat digunakan dalam pengobatan. Antibiotik

harus memiliki sifat-sifat menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak inang, tidak menyebabkan resistensi pada kuman, berspektrum luas dan tidak menimbulkan alergi. Antibiotik memiliki sifat yaitu bakteristatik dan bakterisida. Bakteristatik, yaitu menghambat atau menghentikan pertumbuhan bakteri sehingga bakteri yang bersangkutan menjadi stasioner dan tidak terjadi lagi multiplikasi atau perkembangbiakan. Bakterisida, yaitu membunuh bakteri (Waluyo, 2016). Salah satu jenis antibiotik adalah *Amoxicillin*.

*Amoxicillin* adalah antibiotik spektrum luas yang banyak digunakan untuk mengobati penyakit manusia dan hewan, dan termasuk kedalam kelompok yang tidak mengalami perubahan saat diekskresikan dalam urin dan feses (Elizalde *dkk*, 2016).

*Amoxicillin* adalah obat semi sintetis, yang termasuk dalam golongan antibiotik yang disebut penisilin (antibiotik  $\beta$ -laktam). Obat ini telah terbukti efektif terhadap berbagai macam infeksi yang disebabkan bakteri gram positif dan gram negatif dan digunakan untuk pengobatan dan pencegahan infeksi bakteri saluran pernapasan, gastrointestinal, kencing dan kulit karena sifat farmakologis dan farmakokinetiknya. Selain penggunaannya dalam pengobatan manusia, *Amoxicillin* juga digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit hewan serta digunakan sebagai promotor pertumbuhan untuk banyak hewan domestik dan makanan, termasuk anjing, kucing, merpati, kuda, ayam broiler, babi, kambing, domba, sapi dan ikan (Elizalde *dkk*, 2016).

*Amoksisilin* sangat erat kaitannya dengan *Amphisilin* dengan aktivitas spektrum dan potensi yang sama namun jauh lebih baik diserap bila diberikan secara oral, mencapai konsentrasi darah kira-kira dua kali lebih tinggi dari yang

diperoleh dengan *Amphisilin*. *Amoxicillin* bekerja mengikat penisilin pengikat protein (PBP-1A) yang berada di dalam dinding sel bakteri, *Amoxicillin* asilasi domain terminal C-terminal sensitif peptida dengan membuka cincin laktam yang menyebabkan inaktivasi enzim, mencegah pembentukan ikatan silang. dari dua helai peptidoglikan linier, menghambat tahap ketiga dan terakhir dari sintesis dinding sel bakteri, yang diperlukan untuk pembelahan sel dan bentuk sel dan proses penting lainnya, yang menghasilkan sebagai konsekuensi lisis sel bakteri. Dua metabolit utama *Amoxicillin* adalah asam *Amoksikilloat* dan piperazin-2, 5-dione (diketopiperazine). Metabolit ini telah kehilangan aktivitas antibakteri dari komponen induknya, namun asam *Amoksicilloic* berpotensi memiliki sifat alergi yang potensial (Elizalde *dkk*, 2016).