

II. TINJAUAN PUSTAKA

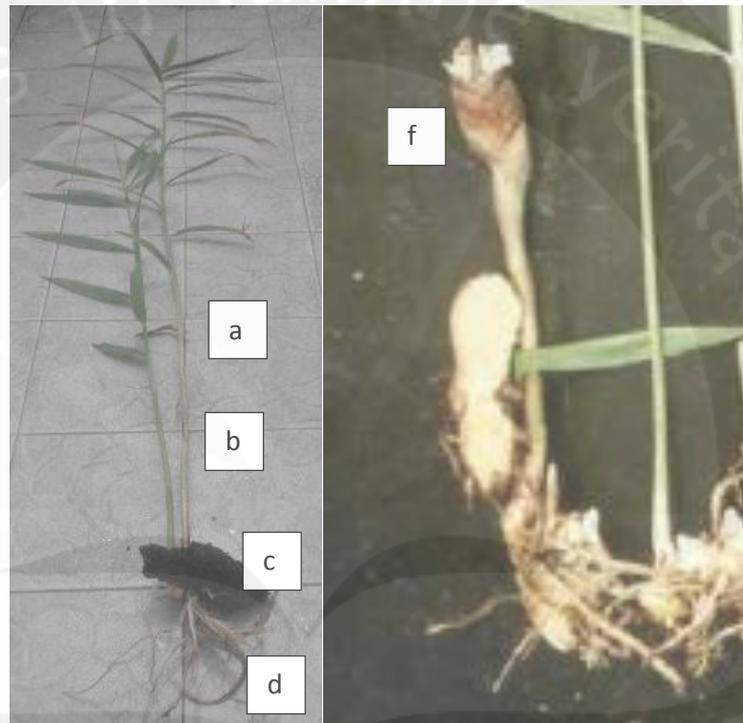
A. Morfologi, Kondisi Pertumbuhan, dan Manfaat Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Tanaman bangle (Gambar 1) merupakan herba berumur tahunan. Tanaman bangle bersifat adaptif, dapat hidup di dataran rendah hingga daerah dengan ketinggian 1.300 m di atas permukaan laut. Bangle dapat dibudidayakan di pekarangan yang cukup terkena sinar matahari. Bangle untuk pertumbuhannya memerlukan tanah yang subur, gembur, cukup sinar matahari, dan memerlukan jarak tanam yang cukup luas yaitu 50x50 cm (Muhlisah, 2011). Kedudukan taksonomi bangle sebagai berikut:

Kerajaan	: Tumbuhan
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Zingiber</i>
Jenis	: <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.

Batang bangle tumbuh tegak dan memiliki rumpun yang rapat. Tinggi tanaman bangle dapat mencapai 1,2-1,8 m. Batang semu bangle tersusun atas kumpulan dari pelepah daun. Meskipun daun bangle berpelepah, daun bangle tidak memiliki tangkai, atau disebut daun duduk. Letak daun bangle tersusun secara menyirip berseling. Bentuk daun bangle lanset ramping, meruncing ke ujung, dan mengecil ke pangkal. Panjang daun bangle mencapai 23-53 cm dan lebar daun 2-3,2 cm. Permukaan daun bangle lemas, tipis, dan licin tidak berbulu, tetapi punggung daun bangle berbulu halus (Muhlisah, 2011).

Pemetikan daun bangle sebelum waktu panen justru menyebabkan kematian tanaman. Hal ini dikarenakan jumlah daun mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Penelitian Rosita dkk. (2005) menunjukkan bahwa penambahan tinggi, jumlah anakan, dan jumlah akar tanaman bangle meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah daun.



Gambar 3. Tanaman bangle: a) Daun, b) Batang, c) Rimpang, d) Akar, e) Bunga (Sumber: dokumentasi pribadi; Muhlisah, 2011)

Bunga bangle muncul dari permukaan tanah, berasal dari rimpang samping, dan bukan dari tengah-tengah rumpun. Bunga bangle berbentuk gelendong, dan tangkai bunga merupakan tangkai semu yang tersusun dari tumpukan daun penumpu bunga. Daun penumpu bunga tersusun seperti sisik ikan, bentuknya kaku, tebal, dan berwarna merah atau hijau kecoklatan. Benang sari bunga bangle berwarna putih kekuningan dan ujungnya berbentuk

keriting. Buah bangle berbentuk bulat, kecil, dan hanya berukuran sekitar 17 mm. Kulit buah bangle tipis, berbiji banyak, berwarna ungu, dan ukuran bijinya kecil (Muhlisah, 2011).

Bentuk rimpang bangle agak bulat pendek dan tidak banyak bercabang dengan kulit luar berwarna coklat muda dan daging rimpang berwarna oranye tua atau kecoklatan. Panen bangle dapat berlangsung setelah tanaman berumur 1 tahun lebih (Muhlisah, 2011). Rimpang sebagai bahan obat dipanen setelah tua, yaitu umur 9-12 bulan setelah tanam (Ahmad dkk., 2016). Penelitian Rosita dkk. (2005) menunjukkan masih adanya penambahan ukuran rimpang bangle hingga tanaman mencapai umur 10 bulan. Selain umur panen, tanaman dari suku Zingiberaceae yang siap panen dapat dicirikan oleh perubahan warna daun dari hijau menjadi kuning dan batang layu atau mati, sehingga panen dapat berlangsung setelah tanaman berumur kurang atau lebih dari 1 tahun (Kardinan dan Ruhnayat, 2008).

Lahan seluas 1 hektar yang ditanami bangle akan menghasilkan bangle sekitar 10-30 ton bangle segar. Rimpang bangle dapat dijual dalam keadaan segar atau berupa bahan jamu dalam bentuk simplisia. Pembuatan simplisia rimpang bangle dilakukan dengan merajang dan menjemur rimpang bangle yang telah dicuci bersih di tempat yang terlindung agar dapat kering angin (Muhlisah, 2011).

Rimpang bangle mengandung minyak atsiri dan bahan lain seperti amilum, resin, dan tanin. Bangle biasa digunakan untuk jamu atau obat tradisional. Khasiat dari rimpang bangle antara lain obat luka yang lama

sembuh, obat kejang pada anak-anak, luka memar atau sakit akibat benturan, perawatan wanita yang baru melahirkan (perawatan kulit perut dan pembersih darah), menurunkan berat badan, meningkatkan penglihatan yang kurang, dan obat hepatitis. Khasiat lain dari rimpang bangle antara lain digunakan sebagai antidotum, mengobati demam, obat cacangan, obat diare, penawar racun, dan peluruh gas di perut (Muhlisah, 2011). Daun bangle bermanfaat menambah nafsu makan dan mengatasi perut terasa penuh (Haryanto, 2009).

B. Prinsip dan Metode Ekstraksi Bahan Tanaman

Metode ekstraksi bahan tanaman disesuaikan dengan tekstur dan kandungan air dalam bahan tanaman yang akan diekstraksi dan disesuaikan dengan jenis senyawa yang akan diisolasi. Ekstraksi dilakukan dengan mematikan jaringan tanaman, seperti mencegah terjadinya oksidasi enzimatik atau hidrolisis dan memotong jaringan daun atau bunga segar. Perendaman bahan tanaman menggunakan etanol dapat menyempurnakan ekstraksi. Alkohol merupakan pelarut yang baik dalam ekstraksi pendahuluan (Harborne, 1998). Sifat-sifat senyawa organik umumnya memiliki titik didih dan titik lebur yang rendah, sehingga suhu dalam proses ekstraksi harus dikontrol dan disesuaikan (Sumardjo, 2009).

Bahan tanaman dapat dimaserasi dalam suatu blender dan filter, tetapi tetap dibutuhkan ekstraksi lengkap. Keberhasilan isolasi senyawa dari jaringan hijau berhubungan dengan jumlah klorofil yang dapat larut dalam pelarut. Senyawa yang memiliki berat molekul rendah diasumsikan telah terekstrak

sempurna ketika debris (sisa) jaringan tanaman bebas dari zat warna hijau secara sempurna dengan ekstraksi berulang (Harborne, 1998).

Metode ekstraksi yang akan digunakan dalam penelitian yaitu metode maserasi. Maserasi merupakan prosedur melarutkan pektin dalam lamela tengah pada dinding sel tanaman sehingga jaringan akan terurai (disintegrasikan) menjadi sel individual (Mulyani, 2006). Metode maserasi dilakukan dengan merendam sampel di dalam pelarut yang sesuai dengan senyawa yang akan diekstrak (prinsip *like dissolve like*) dan disertai dengan proses pengocokan pada suhu ruang (15-30°C). Perendaman biasanya dilakukan selama 24 jam pada kecepatan pengocokan 150 rpm (menggunakan *rotary shaker*) yang diikuti dengan tahap penggantian pelarut yang baru (Meloan, 1999). Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dan dilanjutkan dengan pemekatan ekstrak pada kondisi vakum menggunakan *rotary evaporator*. Filtrat akan mengalami penurunan volume dan diperoleh hasil berupa ekstrak kental (Harborne, 1998).

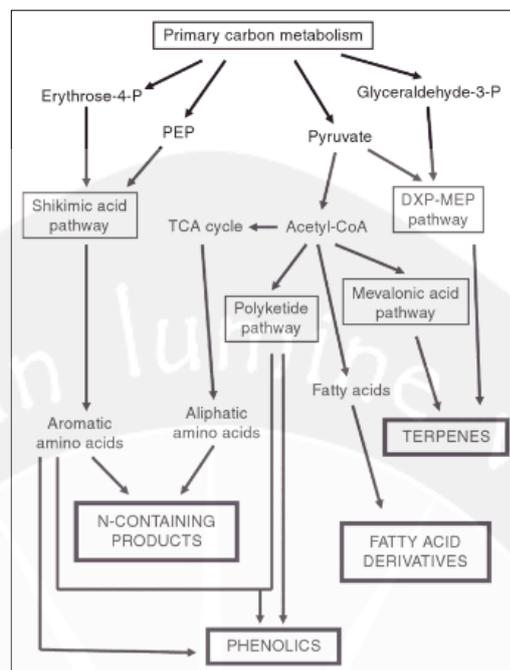
Keuntungan metode maserasi yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang sederhana, tetapi membutuhkan waktu yang cukup lama dan ekstraksi kurang sempurna (Meloan, 1999). Meskipun demikian, pengocokan selama proses maserasi membantu pelarut berdifusi ke dalam partikel dan memaksimalkan senyawa yang terekstrak bersama dengan pelarut (Singh, 2008). Penggunaan etanol dalam pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dapat mengendapkan klorofil dan lemak, sehingga dengan keterampilan khusus, konsentrat *aqueous* yang bebas lemak dapat diambil. Ekstrak kental yang diperoleh seringkali mengandung kristal (gumpalan), sehingga diperlukan filtrasi. Kristal dapat

mengandung campuran senyawa yang diinginkan, sehingga kristal dapat dilarutkan kembali menggunakan pelarut yang sesuai (Harborne, 1998).

C. Identifikasi Fitokimia (Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Tanin, Terpenoid, dan Steroid)

Tanaman memproduksi sejumlah besar senyawa dengan berbagai struktur kimia. Senyawa kimia yang diproduksi tanaman (fitokimia) dibedakan menjadi metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer seperti karbohidrat, protein, dan lemak diproduksi dalam jumlah banyak tetapi kurang memiliki peran penting bagi tanaman. Metabolit sekunder diproduksi dalam jumlah sedikit tetapi memiliki peran penting bagi tanaman. Metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tanin, dan saponin dalam banyak tanaman berperan sebagai *anti-feedants*, *sex-attractants*, dan antibiotik, tetapi sejumlah metabolit sekunder tidak memiliki peran biologis dalam tanaman (Aguinaldo dkk., 2004).

Jalur sintesis metabolit sekunder tanaman dibangun dari metabolisme primer tertentu. Alkaloid, glukosinolat, dan produk lain yang mengandung nitrogen disintesis dari sejumlah kecil asam amino. Senyawa fenolik secara spesifik disintesis dari asam amino aromatik fenilalanin atau asetil-CoA melalui jalur poliketida. Asetil Co-A juga merupakan sumber karbon tunggal untuk 1 atau 2 jalur sintesis terpenoid. Senyawa lain disintesis dari piruvat dan gliseraldehid-3-fosfat. Turunan asam lemak disintesis dari asam lemak tertentu yang juga berasal dari asetil Co-A. Jalur sintesis metabolit sekunder dari metabolisme primer dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 4. Jalur sintesis metabolit sekunder dari metabolisme primer (Sumber: Gershenzon dkk., 2012)

Metabolit sekunder biasanya tidak didistribusikan secara seragam di seluruh bagian tanaman. Distribusi sejumlah metabolit sekunder terbatas pada organ spesifik seperti akar dan biji, dan metabolit sekunder lainnya terbatas pada jaringan spesifik seperti epidermis. Lokasi penyimpanan suatu senyawa dalam sel atau lapisan sel spesifik tidak menunjukkan bahwa senyawa tersebut disintesis oleh sel tersebut. Akumulasi metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh musim dan tahap perkembangan suatu tanaman (Wink, 1987).

Alkaloid yang telah disintesis ditransportasikan menuju epidermis melalui floem (Wink, 1987). Terpenoid biasanya bersifat hidrofobik dan disimpan dalam kanal resin (*resin ducts*), sel minyak, atau trikoma glandular. Steroid saponin terkandung dalam monokotil, terutama tanaman dari suku tertentu, salah satunya Zingiberaceae. Sejumlah saponin disimpan sebagai bidesmosidik dalam vakuola (Wink, 2011).

Analisis fitokimia biasanya menggunakan jaringan tanaman segar. Bahan tanaman harus direbus dalam alkohol selama beberapa menit untuk mengumpulkan senyawa kimia yang diinginkan. Selain tanaman segar, tanaman dapat dikeringkan terlebih dahulu sebelum diekstraksi untuk memperoleh kandungan senyawa kimianya. Pengeringan bahan tanaman harus dilakukan dengan kondisi tertentu untuk mencegah terjadinya perubahan kimia. Pengeringan harus dilakukan secepat mungkin tanpa menggunakan suhu tinggi, dapat dikeringkan dengan kering-angin. Keuntungan dari pengeringan bahan tanaman yaitu tanaman dapat disimpan dalam waktu yang lama (Harborne, 1998).

Identifikasi fitokimia perlu memperhatikan faktor kontaminasi yang dapat memengaruhi hasil analisis. Tanaman harus dipastikan terbebas dari penyakit, tidak terinfeksi virus, bakteri, atau jamur. Hal ini disebabkan adanya kemungkinan mikroorganisme mensintesis senyawa tertentu yang terdeteksi dalam tanaman. Infeksi yang terjadi juga dapat memengaruhi metabolisme tanaman sehingga dimungkinkan terbentuknya produk yang tidak diinginkan dalam jumlah besar. Kontaminasi dapat terjadi ketika pengumpulan tanaman, ketika jamur tumbuh secara parasit pada tanaman yang dikumpulkan, semua jaringan tanaman yang terinfeksi harus dipisahkan dari sampel (Harborne, 1998).

Analisis fitokimia dilakukan dengan tujuan memperoleh senyawa metabolit sekunder baru atau memperoleh struktur senyawa yang tidak biasa, atau bertujuan memastikan keberadaan suatu senyawa yang telah diketahui

sebelumnya. Analisis fitokimia juga bertujuan mengetahui prinsip penyebab keracunan atau penyebab efek kesehatan dari suatu ekstrak kental tanaman. Senyawa metabolit sekunder dalam tanaman umumnya berada dalam jumlah sedikit dan sedikit labil. Senyawa dapat mengalami perubahan selama proses ekstraksi (Harborne, 1998). Senyawa metabolit sekunder dalam tanaman antara lain:

a) Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder tanaman yang ditemukan dalam jumlah paling banyak. Alkaloid merupakan senyawa basa yang mengandung 1 atau lebih atom nitrogen, biasanya berkombinasi dengan sistem siklik. Alkaloid bersifat toksik bagi manusia dan memiliki aktivitas fisiologis sehingga sering digunakan untuk keperluan medis (Harborne, 1998).

Alkaloid biasanya tidak berwarna, merupakan senyawa aktif optik, sebagian besar berbentuk kristal tetapi beberapa alkaloid berbentuk cair pada suhu ruang (15-30°C). Identifikasi alkaloid dalam daun dan buah segar dapat dilakukan dengan uji organoleptik untuk rasa pahit. Fungsi alkaloid dalam tanaman belum diketahui secara pasti, tetapi sejauh ini diketahui berperan sebagai regulator pertumbuhan dan sebagai penolak (*repellents*) atau penarik (*attractants*) serangga (Harborne, 1998).

Alkaloid dalam tanaman larut dalam air dan dapat diekstrak dengan pelarut alkohol dan larutan HCl 1 M. Pengujian terhadap keberadaan alkaloid menggunakan reagen Mayer sering menunjukkan hasil yang *false*

positive karena kandungan protein dalam tanaman yang bereaksi dengan reagen. Hal ini diatasi dengan menambahkan larutan HCl pada ekstrak tanaman sebelum menambahkan reagen (Aguinaldo dkk., 2004).

b) Flavonoid

Flavonoid memiliki aktivitas antivirus, antifungi, antiinflamasi, dan sitotoksik. Flavonoid merupakan pigmen fenolik tanaman yang umumnya mengandung inti γ -benzopyrone (Aguinaldo dkk., 2004). Struktur flavonoid merupakan turunan dari senyawa induk flavon. Flavonoid dibedakan menjadi beberapa sub kelas, terdiri dari antosianin, proantosianin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavon, kalkon dan auron, flavonon, serta isoflavon (Harborne, 1998).

Flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi menggunakan etanol 70% sehingga flavonoid akan terekstrak ke dalam lapisan *aqueous*, kemudian dilanjutkan dengan partisi menggunakan petroleum eter. Flavonoid termasuk senyawa fenolik sehingga perubahan warna mudah diamati ketika ditambah dengan amonia. Flavonoid mengandung sistem aromatik terkonjugasi yang menunjukkan penyerapan yang tinggi terhadap sinar UV spektrum yang terlihat. Flavonoid biasanya berada dalam tanaman dengan berikatan pada gula sebagai glikosida atau dalam bentuk flavonoid aglikon yang merupakan kombinasi dari beberapa asam glikosida. Oleh sebab itu, analisis flavonoid sebaiknya juga menentukan keberadaan aglikon dalam ekstrak tanaman yang terhidrolisis,

sebelum menentukan beragam glikosida yang mungkin terkandung dalam ekstrak (Harborne, 1998).

c) Saponin

Saponin merupakan glikosida triterpenoid maupun glikosida steroid. Saponin merupakan senyawa *surface active* seperti pada sabun. Saponin dapat diidentifikasi dengan melihat kemampuannya menghasilkan busa dan kemampuannya menghidrolisis sel darah. Bagian glikosidik dari saponin seringkali kompleks, memiliki kurang lebih 5 unit gula dan memiliki asam glukuronat yang menjadi komponen utama (Harborne, 1998).

Saponin berdasarkan struktur aglikonnya dibedakan menjadi saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid ditemukan pada banyak tanaman monokotil, dan saponin triterpenoid ditemukan pada banyak tanaman dikotil. Saponin steroid dan saponin triterpenoid memiliki ikatan glikosidik pada C-3. Saponin memiliki struktur yang menyebabkan saponin menghasilkan warna tertentu jika dilakukan uji Liebermann-Burchard untuk sterol dan triterpenoid tak jenuh. Warna yang dihasilkan antara lain hijau, merah muda, merah, ungu, atau violet jika bereaksi dengan reagen (Aguinaldo dkk., 2004).

d) Tanin

Tanin memiliki kemampuan bereaksi dengan protein, membentuk kopolimer stabil yang tidak larut dalam air. Tanin memiliki kemampuan berikatan silang dengan protein sehingga dimanfaatkan untuk proses penyamakan kulit. Tanin di dalam sel tanaman terpisah dari protein dan

enzim sitoplasma, tetapi ketika jaringan tanaman rusak, tanin akan bereaksi dengan protein (Harborne, 1998).

Kandungan tanin dalam ekstrak tanaman dapat diuji menggunakan uji gelatin. Tanin akan mengendapkan protein dan reaksi uji dibuat lebih sensitif dengan penambahan NaCl untuk meningkatkan *salting-out* dari kompleks protein-tanin. Uji positif dapat dikonfirmasi dengan uji FeCl₃. Tanin terhidrolisis akan menghasilkan warna biru atau biru kehitaman, dan tanin terkondensasi akan menghasilkan warna hijau kecoklatan (Aguinaldo dkk., 2004).

e) Terpenoid

Terpenoid dibentuk dari molekul isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan rangka karbon tersusun dua atau lebih unit isoprena (C₅). Terpenoid berdasarkan kelipatan jumlah C₅ kemudian diklasifikasikan menjadi monoterpenoid (C₁₀), seskuiterpenoid (C₁₅), diterpenoid (C₂₀), triterpenoid (C₃₀), tetraterpenoid (C₄₀). Monoterpen dan seskuiterpen bersifat lebih volatil (mudah menguap) daripada diterpen, sedangkan triterpen, sterol, (C₃₀) dan pigmen karotenoid (C₄₀) bersifat tidak volatil (Harborne, 1998). Terpenoid ditemukan dalam bentuk glikosida atau ester glikosil. Terpenoid secara komersial dijadikan bahan dasar pembuatan parfum dan bumbu (Aguinaldo dkk., 2004).

Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan berada dalam sitoplasma sel tanaman. Minyak esensial terkadang terkandung dalam sel glandular khusus pada permukaan daun. Karotenoid khususnya berhubungan dengan

kloroplas pada daun dan kromoplas pada mahkota bunga. Isolasi monoterpen dan seskuiterpen dari jaringan tanaman dilakukan dengan ekstraksi menggunakan eter, *light petroleum*, atau kloroform (Harborne, 1998).

f) Steroid

Triterpenoid tidak berwarna, berbentuk kristal, memiliki titik leleh tinggi, dan merupakan senyawa optik aktif yang sulit diidentifikasi karena reaktivitas kimianya yang rendah. Triterpenoid diidentifikasi menggunakan reaksi Liebermann-Burchard (asetat anhidrat dan H₂SO₄ pekat) yang akan menghasilkan warna biru kehijauan apabila sampel mengandung triterpen dan sterol. Triterpenoid dibedakan menjadi 4 kelompok, yaitu triterpena, steroid, saponin, dan kardiak glikosida. Saponin dan glikosida sebenarnya merupakan triterpenoid atau steroid yang terbentuk sebagai glikosida (Harborne, 1998).

Kebanyakan senyawa antibakteri menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan menghambat sintesis dinding sel, asam nukleat, atau mencegah sintesis protein (Maikai, 2009). Banyak senyawa alkaloid dan turunannya memiliki aktivitas antimikroba baik lemah maupun kuat (Roberts dan Wink, 1998). Mekanisme antimikroba flavonoid tidak diketahui secara pasti, tetapi aktivitas antibakteri flavonoid diperkirakan berupa perubahan terhadap struktur membran, penghambatan kerja enzim yang memodifikasi DNA, dan mengganggu metabolisme energi. Toksisitas flavonoid diketahui dapat menghambat sintesis ATP pada eukariot dan prokariot. Flavonoid dapat

berikatan dengan subunit γ dan menghalangi rotasinya (Villa dan Veiga-Crespo, 2014).

Saponin menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak membran sel dan komponen selular bakteri sehingga menyebabkan kematian sel (Al-Bayati dan Al-Mola, 2008). Bagian aglikon dari saponin menentukan aktivitas antibakteri dari saponin (Hasan dkk., 2010). Tanin dan polifenol terkait memiliki aktivitas antibiotik yang cukup baik. Tanin bersifat toksik terhadap jamur, bakteri, dan khamir. Mekanisme antimikroba tanin dapat berupa penghambatan enzim, pengambilan substrat dan ion logam yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba, atau aksi langsung terhadap membran bakteri (Gross dkk., 1999).

Hasil penelitian Hayashi dkk. (2008) menunjukkan bahwa sel bakteri yang terpapar tanin akan membentuk gugus dan menunjukkan adanya kematian sel. Tanin memengaruhi struktur permukaan bakteri dan menginduksi sel bakteri untuk bergabung. Membran sel bakteri menjadi target dari aktivitas antibakteri tanin. Sitoplasma pada semua makhluk hidup dilindungi oleh membran sel yang terdiri dari membran lemak yang mengontrol komposisi internal sel, sehingga kerusakan pada membran sel akan menyebabkan kematian sel.

Menurut Gross dkk. (1999), campuran tanin dari sumber polifenol tanaman yang berbeda dapat menjadi senyawa antimikroba potensial. Hubungan antara struktur dan aktivitas antimikroba dijelaskan oleh adanya pola oksigenasi cincin B pada proantosianidin dan keberadaan gugus galloil

pada flavan-3-ols. Peningkatan aktivitas antimikroba selanjutnya dipengaruhi oleh jumlah fungsi hidroksil pada cincin B dan galloilasi pada molekul induk.

D. Kelarutan Senyawa Organik dalam Pelarut dan Polaritas Pelarut

Sebagian besar senyawa organik tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut-pelarut non-polar seperti eter, benzena, heksana, dan kloroform. Akan tetapi, senyawa-senyawa organik yang mempunyai radikal polar seperti -OH, -SO₃H, dan -COOH, dapat larut dalam air (Sumardjo, 2009). Pelarut berdasarkan konstanta dielektriknya dibedakan menjadi pelarut polar dan non-polar. Etanol (C₂H₆O) yang digunakan dalam penelitian merupakan pelarut polar, sedangkan heksana (C₆H₁₄) merupakan pelarut non-polar. Pelarut polar memiliki tingkat kepolaran tinggi yang cocok untuk mengekstrak senyawa organik polar dari tanaman. Pelarut polar cenderung digunakan universal karena tetap dapat mengekstrak senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah, sedangkan pelarut non-polar baik untuk mengekstrak senyawa organik yang sama sekali tidak larut dalam pelarut polar seperti berbagai jenis minyak (Sudarmadji dkk., 1989).

Etanol memiliki gugus polar dan non-polar sehingga dapat menarik senyawa polar dan non-polar. Etanol merupakan pelarut moderat untuk garam dan molekul dengan polaritas tinggi. Etanol juga memiliki daya van der Waals yang menyebabkan etanol menjadi pelarut yang baik untuk berbagai senyawa organik (Daley dan Daley, 2013). Etanol larut dalam air dan memiliki titik didih pada suhu 78,5°C (Smith, 2011).

Polaritas etanol lebih kecil dibandingkan air. Etanol memiliki konstanta dielektrik sebesar 24,6, lebih kecil dari konstanta dielektrik air yaitu 78,3 (Kerton dan Marriott, 2013). Indeks polaritas etanol sebesar 5,2 dan air sebesar 9 (Schirmer, 2000).

Heksana digunakan untuk melarutkan minyak tanpa menghilangkan protein dan senyawa bukan minyak lainnya (Wakelyn dan Wan, 2001). Titik didih heksana berada pada suhu 69°C (Kelter dkk., 2009), memiliki konstanta dielektrik sebesar 1,9 (Kerton dan Marriott, 2013), dan indeks polaritas 0 (Schirmer, 2000). Heksana tidak dapat larut dalam air, kelarutan heksana dalam air hanya sebesar 2 fraksi mol $\times 10^6$ (de Nevers, 2010). Heksana sedikit lebih larut dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO), 2,9 gram heksana dapat larut dalam 100 cc DMSO pada suhu 20-30°C (Gaylord Chemical Company, 2007).

Dimetil sulfoksida (DMSO) memiliki rumus kimia $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ merupakan pelarut bagi banyak uji anorganik dan organik. Dimetil sulfoksida berupa cairan tak berwarna, tak berbau, dan bersifat agak higroskopik (Pudjaatmaka, 2002). Dimetil sulfoksida merupakan salah satu pelarut organik terkuat, efektif dalam melarutkan berbagai material organik termasuk polimer dan banyak garam anorganik, khususnya logam transisi nitrat, sianida, dan dikromat. Dimetil sulfoksida larut dalam air dan hampir semua cairan organik (Gaylord Chemical Company, 2007).

E. Morfologi, Sifat, Kondisi Pertumbuhan, dan Sensivitas Bakteri Uji terhadap Antibiotik

Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang terdiri dari 2 lapisan, sedangkan dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari lapisan lebih tebal yang terdiri dari 1 jenis molekul (Madigan dkk., 2012). Dinding sel bakteri tersusun dari struktur eksoskeleton dengan stabilitas mekanik tinggi, biasa disebut peptidoglikan. Peptidoglikan membentuk sakulus yang terdiri dari rantai polisakarida yang berikatan silang melalui ikatan peptida (Seltmann dan Holst, 2002). Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang lebih sederhana dengan jumlah peptidoglikan yang relatif banyak, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan lebih sedikit (Campbell dan Reece, 2003).

Banyak antibiotik menghambat sintesis ikatan silang peptidoglikan dan mencegah pembentukan suatu dinding fungsional khususnya pada jenis bakteri Gram positif (Campbell dan Reece, 2003). Peptidoglikan dapat dihancurkan oleh senyawa tertentu seperti enzim lisosim. Enzim lisosim merupakan protein yang dapat memutus ikatan β -1,4-glikosida antara N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat yang terdapat dalam peptidoglikan sehingga melemahkan dinding sel. Peptidoglikan juga menjadi target dari antibiotik golongan penisilin, penisilin mencegah biosintesis peptidoglikan dengan melemahkan molekul dan lisis osmotik (Madigan dkk., 2002).

Spesies bakteri Gram negatif yang termasuk dalam bakteri patogen penyebab penyakit umumnya lebih berbahaya dibandingkan spesies Gram positif. Bakteri Gram negatif umumnya lebih resisten terhadap antibiotik dibandingkan dengan bakteri Gram positif karena membran bagian luar

menghalangi masuknya obat-obatan. Membran luar pada dinding sel Gram negatif mengandung lipopolisakarida, yaitu karbohidrat yang terikat pada lemak. Lipopolisakarida yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram negatif sering bersifat toksik dan membran bagian luar membantu melindungi bakteri patogen melawan sistem pertahanan inangnya (Campbell dan Reece, 2003).

Banyak prokariot mensekresikan bahan kental dan lengket yang membentuk lapisan pelindung lainnya di luar dinding sel, disebut kapsul. Kapsul memungkinkan organisme menempel pada substratnya dan memberikan perlindungan tambahan yang meliputi peningkatan resistensi prokariot patogenik terhadap sistem pertahanan inang. Kapsul bergelatin menyatukan banyak sel prokariot yang hidup sebagai koloni (Campbell dan Reece, 2003).

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, tidak menghasilkan spora, biasanya motil (Sussman, 1997), anaerob dan fakultatif anaerob, dan dapat tumbuh optimum pada suhu 37°C dan pH 7,2. Koloni *E. coli* yang ditumbuhkan pada medium agar nutrisi selama 18 jam pada suhu 37°C berukuran besar, berbentuk lingkaran (*circular*), elevasi *low convex*, berwarna putih keabuan, permukaan halus, dan keruh atau agak transparan (*opaque* atau *translucent*) (Parija, 2009). *Escherichia coli* pada medium agar miring berwarna putih, keruh, permukaan mengkilat, dan pertumbuhannya menyebar (Breed dkk., 1957). Pertumbuhan *Escherichia coli* pada medium cair nampak keruh dan terdapat endapan yang akan larut jika dikocok. *Escherichia coli* merupakan katalase positif, pereduksi nitrat, dan

dapat memfermentasi laktosa, glukosa, manitol, maltosa, sukrosa dan gula lainnya menghasilkan asam dan gas (Breed dkk. 1957 dan Parija, 2009).

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *E. coli* dibedakan menjadi infeksi spesifik dan non-spesifik. Infeksi spesifik yaitu kolonisasi *E. coli* pada permukaan mukosa seperti infeksi usus dan saluran kemih. Infeksi non-spesifik merupakan hasil kontaminasi langsung terhadap luka atau celah peritoneal selama operasi, atau merupakan hasil penyebaran dari infeksi spesifik. *Escherichia coli* termasuk patogen multipoten yang memiliki kemampuan untuk menyebabkan penyakit di beberapa sistem tubuh, terutama saluran pencernaan (diare) dan saluran kemih (infeksi saluran kemih). Kolonisasi *E. coli* pada permukaan mukosa merupakan awal penyebab penyakit, koloni bakteri menghasilkan eksotoksin atau menginvasi sel mukosa yang diikuti dengan multiplikasi intraselular (Sussman, 1997).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, berbentuk kokus, aerobik dan anaerobik fakultatif, tidak motil (Bhunia, 2008), tumbuh optimum pada suhu 37°C dan pH 7. Koloni *S. aureus* pada medium agar nutrisi berbentuk bulat (*round*) diameter 2-4 mm, elevasi *convex*, permukaan halus mengkilat, dan berwarna kuning keemasan (Parija, 2009). Kultur *S. aureus* pada medium agar miring berwarna kuning, agak keruh, permukaan halus, dan pertumbuhannya menyebar (Breed dkk., 1957). *Staphylococcus aureus* pada medium cair tidak berwarna dan keruh (Breed dkk., 1957). *Staphylococcus aureus* merupakan katalase positif, pereduksi nitrat, dan dapat memfermentasi manitol, sukrosa, maltosa, dan gula lainnya pada kondisi

aerobik menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas (Breed dkk.,1957 dan Holt dkk., 1994).

Staphylococcus aureus sensitif terhadap lisostafin, toleran terhadap garam, dan relatif resisten terhadap pengeringan dan pemanasan. *Staphylococcus aureus* memproduksi faktor virulensi seperti protein adesi, enterotoksin, superantigen, hemolisin pembentuk pori (*pore-forming hemolysins*), *ADP-ribosylating toxins*, dan protease. Sejumlah besar toksin dan enzim yang dihasilkan *Staphylococcus aureus* menyebabkan gastroenteritis (Bhunia, 2008).

Staphylococcus aureus bertanggung jawab atas 80% penyakit supuratif dengan permukaan kulit sebagai habitat alaminya. Infeksi kulit dan luka terbuka seperti ulkus, bekas terbakar, dan luka bekas operasi berpotensi terinfeksi *S. aureus* dan berakibat infeksi sistemik (Wistreich, 1999). Penyakit yang disebabkan *S. aureus* terjadi akibat invasi bakteri yang diikuti oleh perbanyakan bakteri, berakibat pada terbentuknya abses dan rusaknya berbagai jaringan oleh eksotoksin yang beberapa di antaranya merupakan superantigen (Lydyard dkk., 2010).

F. Mekanisme Kerja Antibiotik terhadap Mikroba

Antibiotik adalah obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri. Antibiotik bisa bersifat bakterisid (membunuh bakteri) atau bakteriostatik (mencegah berkembangbiaknya bakteri). Mekanisme kerja antibiotik dibedakan menjadi 2, yaitu mengganggu sintesis dinding sel dan menghambat

sintesis protein. Target antibiotik dalam mengganggu sintesis dinding sel antara lain:

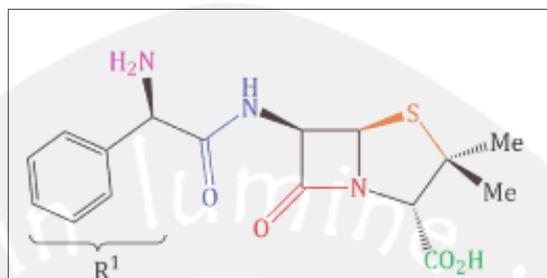
- a) Transpeptidase, contoh: antibiotik β -laktam (penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam)
- b) D-Ala-D-Ala, contoh: antibiotik glikopeptida (vankomisin, *teicoplanin*)
- c) Lipid II, contoh: antibiotik lantibiotik (nisin)
- d) MurA, contoh: antibiotik *epoxide* (fosfomisin).

Target antibiotik dalam menghambat sintesis protein yaitu subunit ribosomal 50S. Antibiotik dengan mekanisme menghambat sintesis protein antara lain antibiotik *macrolide* (eritromisin, kloramfenikol, linezolid, *tylosin*) dan *lincosamides* (linkomisin, klindamisin)(Koller, 2014).

Antibiotik sebagai kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ampisilin. Ampisilin merupakan antibiotik yang termasuk kelompok Penisilin dengan aktivitas antimikroba berspektrum luas, mampu menghambat bakteri Gram positif dan negatif, larut dalam air, dan resisten terhadap asam. Ampisilin mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus* yang tidak resistan terhadap antibiotik β -laktam. Ampisilin efektif terhadap *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus viridans*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella typhi*, banyak strain *Escherichia coli*, dan beberapa strain *Shigella* (Satoskar dkk., 2015).

Gugus fungsional dari penisilin berupa cincin amida, rantai samping amida, tioeter, dan asam karboksilat. Ampisilin memiliki 1 gugus tambahan yaitu amina yang terletak pada rantai samping R1 (Gambar 3) (Anderson dkk.,

2012). Ampisilin menyebabkan lisis sel dan kematian bakteri dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri.



Gambar 5. Struktur Ampisilin (Sumber: Anderson dkk., 2012).

Ikatan silang dinding sel bakteri dibentuk melalui beberapa tahapan. Efek antibakteri ampisilin ditujukan pada tahap terakhir pembentukan ikatan silang dinding sel. Ampisilin berikatan dengan komponen penyusun dinding sel dan menginaktivasi *penicillin-binding protein* yang merupakan enzim yang berperan dalam menghubungkan ikatan dinding sel bakteri (Jones and Bartlett Learning, 2009).

G. Parameter yang Digunakan untuk Menentukan Aktivitas Antibakteri

a) Luas Zona Hambat

Metode yang sering digunakan dalam uji aktivitas antibakteri antara lain metode silinder, lubang atau sumuran, dan cakram kertas. Pada penelitian ini, metode yang digunakan yaitu metode sumuran. Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri, jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan diuji. Sampel yang akan diuji diinjeksikan ke dalam sumuran kemudian medium diinkubasi. Aktivitas antibakteri dari

sampel ditentukan oleh luas daerah hambatan di sekeliling sumuran (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Rocha dkk. (2012) menggolongkan daya hambat yang dihasilkan beberapa tumbuhan menjadi kuat, sedang, dan lemah. Daya hambat suatu antimikroba dikatakan kuat apabila menghasilkan diameter zona hambat ≥ 20 mm, dikatakan sedang apabila menghasilkan diameter zona hambat $< 20-12$ mm, dan dikatakan lemah apabila menghasilkan diameter zona hambat < 12 mm.

b) Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi hambat minimum (KHM) adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan organisme tertentu. Metode yang banyak digunakan untuk menentukan KHM yaitu metode pengenceran kuantitatif (Quinto dan Santos, 2004). Konsentrasi hambat minimum juga dapat ditentukan dengan menggunakan konsentrasi tunggal suatu sampel dengan membandingkan kecepatan pertumbuhan mikroorganisme pada tabung kontrol dan tabung yang diberi sampel yang akan diuji (Harmita dan Radji, 2008).

Penentuan KHM dengan prosedur tabung pengenceran digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel yang masih efektif dalam mencegah pertumbuhan bakteri. Inokulum mikroorganisme yang telah distandardisasi ditambahkan ke dalam tabung yang mengandung seri pengenceran suatu sampel kemudian diinkubasi (Harmita dan Radji, 2008).

Pertumbuhan mikroorganisme akan terlihat dari perubahan kekeruhan. Pertumbuhan mikroorganisme ditunjukkan oleh medium yang keruh atau adanya endapan berwarna krem di bagian dasar atau permukaan medium. Konsentrasi hambat minimum dari suatu ekstrak tanaman ditunjukkan oleh tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme pada medium (Quinto dan Santos, 2004).

H. Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun bangle mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid, dan steroid. Ekstrak heksana daun bangle mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan steroid.
2. Ekstrak etanol daun bangle menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.
3. Konsentrasi hambat minimum ekstrak daun bangle terhadap *E. coli* dan *S. aureus* sebesar 0,05 dan 0,3 mg/ml.