

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman Jeruk Nipis

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*, Swingle) merupakan tanaman berhabitus pohon kecil dengan cabang yang lebat tetapi tidak beraturan dan tinggi berkisar antara 1,5 sampai 5 meter (Gambar 1). Perakaran tanaman kuat, cukup dalam, dan dapat tumbuh dengan baik pada segala jenis tanah. Cabang dan rantingnya berduri pendek, kaku, dan tajam (Gambar 2A) (Rukmana, 2003).



Gambar 1. Pohon jeruk nipis (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2017)

Daun jeruk nipis, yang dapat dilihat pada Gambar 2B, memiliki susunan berselang-seling, berbentuk jorong sampai bundar, pangkalnya bulat, dan ujungnya tumpul. Daun jeruk nipis berukuran panjang 4-8 cm dan lebar 2-5 cm. Tepi daunnya bergerigi kecil dan tangkai daunnya bersayap sempit

(Sarwono, 2001). Permukaan daun bagian atas berwarna hijau tua mengkilap, sedangkan bagian bawahnya berwarna hijau muda (Rukmana, 2003).

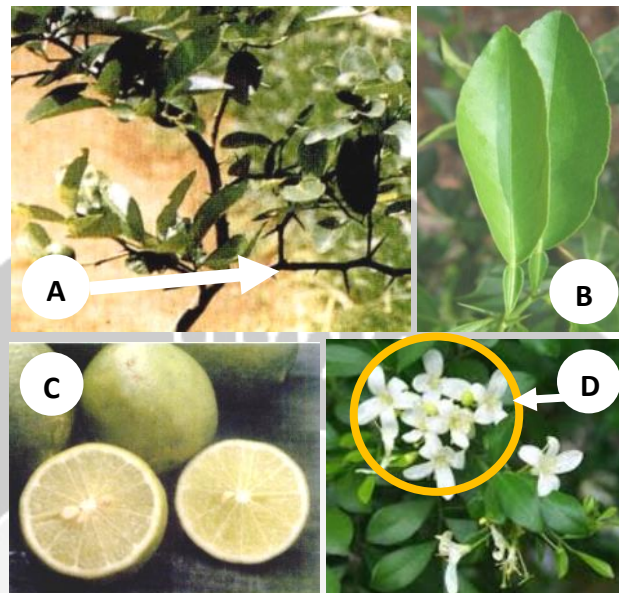
Buah jeruk nipis (Gambar 2C) memiliki rasa yang sangat asam, berbentuk bulat sampai bulat telur, dan berkulit tipis. Diameter buahnya sekitar 3 sampai 6 cm dan permukaannya memiliki banyak kelenjar. Buah jeruk nipis memerlukan waktu 5-6 bulan untuk berkembang. Buah yang masak pohon akan berubah warna dari hijau menjadi kuning dan jeruk akan jatuh ke tanah setelah mencapai tahap masak penuh (Sarwono, 2001).

Bunga jeruk nipis (Gambar 2D) berbentuk tandan pendek, berada di ketiak daun pada pucuk yang baru merekah. Banyak bunga per tandan sekitar 1-10 kuntum. Mahkota bunga sebanyak 4-6 helai dan panjangnya sekitar 8-12 cm. Benang sarinya berjumlah antara 20 sampai 25 utas. Tangkai putiknya mudah dibedakan dengan bakal buah (Sarwono, 2001).

Jeruk nipis tumbuh baik pada iklim tropis. Temperatur optimal untuk tanaman ini adalah 25 sampai 30°C dan kelembaban yang ideal adalah 70 sampai 80%. Di Indonesia, jeruk nipis dapat berbunga dan berbuah secara serentak, serta dapat berlangsung sepanjang tahun (Sarwono, 2001). Menurut

Rukmana (2003), klasifikasi tanaman jeruk nipis adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Subdivisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Rutales  
Suku : Rutaceae  
Marga : *Citrus*  
Jenis : *Citrus aurantifolia*, Swingle



Gambar 2. Bagian-bagian tanaman jeruk nipis (Sarwono, 2001)

Keterangan: (A) Batang jeruk nipis yang berduri; (B) Daun jeruk nipis; (C) Buah jeruk nipis; (D) Bunga jeruk nipis yang berbentuk tandan

## B. Senyawa pada Tanaman Jeruk Nipis

Bagian-bagian tanaman jeruk nipis dapat dimanfaatkan untuk mengobati berbagai penyakit, antara lain batang, bunga, buah, dan daunnya. Getah batang jeruk nipis yang ditambahkan sedikit garam dapat digunakan sebagai obat sakit tenggorokan. Buah jeruk nipis banyak digunakan untuk menurunkan panas, obat batuk, peluruh dahak, menghilangkan ketombe, influenza, antiinflamasi, antiseptik, dan obat jerawat (Kharismayanti, 2015). Daun dan bunga jeruk nipis dapat digunakan untuk pengobatan hipertensi, batuk, lendir tenggorokan, demam, panas pada malaria, jerawat, dan ketombe (Triayu, 2009).

Jeruk nipis mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang bermanfaat, seperti asam sitrat, asam amino, minyak atsiri, damar, glikosida, asam sitrun,

lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang vitamin B1 dan C (Lauma dkk., 2015). Daunnya sendiri juga memiliki banyak kandungan senyawa bioaktif, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, dan steroid. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme hambatnya masing-masing, yang menyebabkan daun jeruk nipis mempunyai sifat antibakteri, antara lain dengan cara merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma sel, mengubah struktur molekul protein dan asam nukleat, serta menghambat kerja enzim bakteri (Pelczar dan Chan, 1986). Senyawa fenol dan flavonoid juga dapat bersifat sebagai antioksidan (Fajarwati, 2013). Daun jeruk nipis bermanfaat untuk mengobati influenza dan malaria, sedangkan infusnya dapat mengobati demam yang disertai *jaundice* (timbulnya warna kuning pada kulit dan bagian putih mata karena tingginya kadar pigmen empedu), radang tenggorokan, dan dapat meringankan sakit kepala (Kharismayanti, 2015).

#### 1. Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder yang terbesar. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme antibakterinya adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Miftahendarwati, 2014).

## 2. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, dan aseton. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol yang mempunyai sifat efektif dalam menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Senyawa-senyawa flavonoid umumnya bersifat antioksidan dan banyak digunakan sebagai bahan baku obat-obatan (Miftahendarwati, 2014).

Flavonoid bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat bakteri dan mampu menghambat motilitas bakteri. Flavonoid bekerja dengan cara mengganggu pengikatan hidrogen pada asam nukleat sehingga proses sintesis DNA dan RNA terhambat. Flavonoid juga dapat mencegah pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu kestabilan membran sel dan metabolisme energi bakteri. Ketidakstabilan ini terjadi akibat adanya perubahan sifat hidrofilik dan hidrofobik membran sel, sehingga fluiditas membran sel berkurang yang berakibat pada gangguan pertukaran cairan dalam sel dan menyebabkan kematian sel bakteri (Miftahendarwati, 2014).

## 3. Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa kimia yang terdiri dari beberapa unit isopren. Kebanyakan terpenoid mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Senyawa terpenoid ini adalah salah satu senyawa kimia bahan alam yang banyak digunakan

sebagai obat. Sudah banyak peran terpenoid dari tumbuh-tumbuhan yang diketahui seperti menghambat pertumbuhan tumbuhan pesaingnya dan sebagai insektisida terhadap hewan tinggi (Ramadani, 2016).

Terpenoid merupakan komponen yang biasa ditemukan dalam minyak atsiri. Sebagian besar terpenoid mengandung atom karbon yang jumlahnya merupakan kelipatan lima. Terpenoid mempunyai kerangka karbon yang terdiri dari dua atau lebih unit C<sub>5</sub> yang disebut unit isopren. Berdasarkan jumlah atom C yang terdapat pada kerangkanya, terpenoid dapat dibagi menjadi hemiterpen dengan 5 atom C, monoterpen dengan 10 atom C, seskuioterpen dengan 15 atom C, diterpen dengan 20 atom C, triterpen dengan 30 atom C, dan seterusnya sampai dengan politerpen dengan atom C lebih dari 40 (Ariefta, 2012).

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999).

#### 4. Saponin

Saponin merupakan jenis glikosida yang banyak ditemukan dalam tumbuhan dan sifatnya polar. Saponin memiliki karakteristik berupa buih, sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk

buih yang dapat bertahan lama. Saponin mudah larut dalam air dan tidak larut dalam eter (Pradipta, 2011).

Saponin dibagi menjadi 2, yaitu saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C 27) dengan molekul karbohidrat, yang jika dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenai sebagai saraponin. Tipe saponin ini memiliki efek antijamur. Saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dengan molekul karbohidrat, yang jika dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang disebut sapogenin. Saponin merupakan suatu senyawa yang mudah dikristalkan lewat asetilasi sehingga dapat dimurnikan. Tipe saponin ini adalah turunan  $\beta$ -amirine (Pradipta, 2011).

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 dkk., 2013).

##### 5. 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 menginaktivkan adhesin sel mikrobial, menginaktivkan 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 dkk., 2013).

#### 6. Steroid

Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren, yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana (Harborne, 1987). Steroid alami berasal dari berbagai transformasi kimia dua triterpen, yaitu lanosterol dan sikloartenol. Pada umumnya, steroid tumbuhan berasal dari sikloartenol. Senyawa steroid dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan obat (Nuraini, 2007).

Mekanisme antibakteri steroid adalah dengan cara berhubungan dengan membran lipid pada sel bakteri dan menyebabkan kebocoran pada liposom (penyusun dinding sel bakteri) (Madduluri dkk., 2013). Steroid juga dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel bakteri yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran sel bakteri menurun serta morfologi membran selnya berubah yang akhirnya menyebabkan sel bakteri rapuh dan lisis (Bontjura dkk., 2015).



### C. Macam-Macam Metode Ekstraksi

Simplisia adalah bahan alamiah berupa tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat tanaman yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan atau mengalami pengolahan secara sederhana serta belum merupakan zat murni, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2011). Suatu simplisia banyak mengandung senyawa yang mempunyai khasiat pengobatan, yang dikenal sebagai senyawa fitokimia, yaitu kelompok senyawa alami yang bisa dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan dan mengobati penyakit. Senyawa fitokimia tanaman yang memberikan efek farmakologis adalah kelompok senyawa metabolit sekunder, antara lain golongan minyak atsiri, flavonoid, alkaloid, steroid, dan triterpenoid yang akan memberikan warna, aroma, dan rasa yang sangat spesifik pada tanaman asalnya (Hernani, 2011). Salah satu bentuk bahan atau produk kefarmasian yang umum dihasilkan dari proses pengolahan simplisia adalah ekstrak (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2009). Ekstrak adalah sediaan kental yang di dalamnya terdapat zat aktif yang telah disaring dari simplisia menggunakan bantuan pelarut yang sesuai (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Ekstrak diperoleh melalui proses ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat-zat dari bahan padat maupun cair menggunakan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan hanya mengekstrak substansi tanpa menyebabkan material lainnya ikut larut (Fajarwati, 2013). Menurut

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2000), ada beberapa metode ekstraksi yang menggunakan pelarut, antara lain:

#### 1. Cara dingin

Ekstraksi dengan cara dingin merupakan metode ekstraksi tanpa pemanasan atau menggunakan suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) untuk proses ekstraksinya. Cara ini biasanya digunakan untuk senyawa yang tidak tahan panas, sehingga dapat memperkecil kemungkinan terjadinya kerusakan pada senyawa tersebut (Ramayani dkk., 2016; Heinrich dkk., 2004). Metode ekstraksi dengan cara dingin antara lain metode maserasi dan perkolasi.

##### a. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ . Maserasi adalah suatu proses perendaman menggunakan pelarut untuk menyaring simplisia dengan beberapa kali pengadukan. Maserasi pengadukan kontinu merupakan maserasi yang dilakukan pengadukan secara terus-menerus, misalnya menggunakan *shaker*, sehingga dapat mengurangi waktu hingga menjadi 6-24 jam. Remaserasi adalah pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama dan seterusnya (Hargono dkk., 1986).

Menurut Voight (1995), maserasi akan lebih efektif jika dilakukan proses pengadukan secara berkala karena keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif.

Melalui usaha ini diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengestrak. Pada penelitian ini digunakan metode maserasi dengan pengadukan kontinyu dan remaserasi.

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) dan umumnya dilakukan pada suhu  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ .

2. Cara panas

Ekstraksi dengan cara panas merupakan metode ekstraksi yang menggunakan prinsip pemanasan untuk proses ekstraksinya. Cara ini biasanya digunakan untuk senyawa yang tahan pemanasan (Ramayani dkk., 2016). Metode ekstraksi dengan cara panas antara lain metode sokhletasi, refluks, digesti, infudasi, dan dekoktasi.

a. Sokhletasi

Sokhletasi merupakan metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal tersebut menyebabkan pecahnya dinding dan membran sel karena adanya perbedaan tekanan di dalam dan luar sel, sehingga metabolit sekunder di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Larutan kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Jika larutan melewati batas lubang pipa samping sokhlet, maka akan terjadi

sirkulasi. Sirkulasi berulang tersebut yang menghasilkan ekstrak yang baik.

b. Refluks

Metode ini termasuk dalam metode ekstraksi yang berkesinambungan. Siplisia direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap dan uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak, lalu akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali dilakukan selama 4 jam.

c. Digesti

Digesti merupakan maserasi kinetik, yaitu maserasi dengan pengadukan kontinu, yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ . Suhu yang digunakan biasanya pada suhu  $40-50^{\circ}\text{C}$ .

d. Infudasi

Infudasi merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih) dengan suhu terukur ( $96-98^{\circ}\text{C}$ ) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekoktasi

Dekoktasi adalah metode ekstraksi seperti infudasi, tetapi waktunya lebih lama dan suhu yang digunakan hingga titik didih air, yaitu pada suhu  $90-100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

#### D. Pelarut Ekstraksi Daun Jeruk Nipis

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, sehingga ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Faktor utama yang dipertimbangkan dalam memilih pelarut adalah selektivitas terhadap senyawa yang diinginkan, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, serta keamanan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Jenis pelarut dan tingkat kepolaran pelarut yang dipakai dalam proses ekstraksi dapat memengaruhi proporsi senyawa-senyawa kandungan yang tersari (Lestiani, 2008). Pelarut berperan dalam menghasilkan rendemen yang tinggi jika pelarut yang digunakan memiliki sifat kepolaran yang sama dengan sebagian besar komponen yang terdapat pada biomassa sel. Dalam hal ekstrak total, cairan pelarut yang dipilih adalah yang dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Pelarut yang sering digunakan pada metode maserasi adalah etanol. Etanol mempunyai gugus karboksil (alkohol) yang polar dan gugus karbonil (keton) yang nonpolar, sehingga etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa polar, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin, serta senyawa nonpolar, yaitu terpenoid dan steroid. Etanol juga memiliki daya ekstraksi yang luas sehingga semua metabolit sekunder dapat tersari dalam tiga kali maserasi (Saifudin, 2014). Pelarut etanol juga dipilih karena

tidak beracun sehingga cenderung aman atau tidak berbahaya, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, absorpsinya baik, dan mempunyai titik didih yang rendah, yaitu 78,3°C (Sa'adah dan Nurhasnawati, 2015).

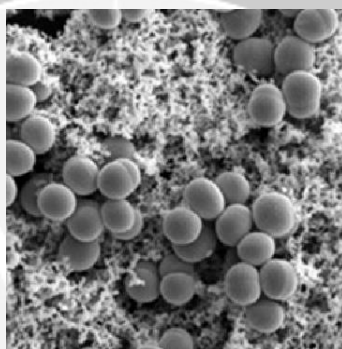
Konsentrasi pelarut etanol yang dipilih adalah etanol 70%. Etanol 70% merupakan pelarut yang terdiri dari 70% etanol dan 30% air. Etanol termasuk pelarut polar dengan konstanta dielektrik 33 dan air termasuk pelarut polar dengan konstanta dielektrik 80,4 (Moulana dkk., 2012; Young dan Freedman, 2000). Nilai konstanta dielektrik ( $\epsilon$ ) berbanding lurus dengan besarnya polaritas suatu pelarut (Saifudin, 2014). Semakin besar nilai konstanta dielektriknya, maka semakin polar pelarut tersebut (Rafsanjani dan Putri, 2015).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Tiwari dkk. (2011), meskipun etanol termasuk dalam pelarut yang polar, tetapi etanol mampu menarik senyawa aktif yang mempunyai sifat nonpolar, seperti polifenol, steroid, dan terpenoid. Hal itu dikarenakan kemampuan etanol yang mudah melakukan penetrasi ke membran sel, sehingga dapat mengekstrak senyawa intrasel pada bahan atau simplisia. Oleh karena itu, etanol 70% yang dipilih sebagai pelarut untuk mengekstraksi daun jeruk nipis.

#### **E. Deskripsi Bakteri Uji (*Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*)**

*Staphylococcus epidermidis* (Gambar 3), merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus atau bulat, bersifat aerob atau anaerob fakultatif,

dan termasuk *Staphylococcus* dengan koagulasi negatif. *S. epidermidis* tidak membentuk spora dan non-motil. *S. epidermidis* mempunyai diameter 0,8 – 1,0  $\mu\text{m}$ , biasanya berwarna putih atau krem, dan tumbuh cepat pada suhu optimum 37°C. Koloninya tumbuh menggerombol menyerupai buah anggur berbentuk bulat, halus (*entire*), menonjol, berkilau, dan tidak menghasilkan pigmen (Jawetz dkk., 2001).



Gambar 3. *Staphylococcus epidermidis* (Sumber: Samek dkk., 2014)

Menurut Breed dkk. (1957), klasifikasi bakteri *S. epidermidis* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Eukariota  
 Divisi : Protophyta  
 Kelas : Schizomycetes  
 Bangsa : Eubacteriales  
 Suku : Micrococcaceae  
 Marga : *Staphylococcus*  
 Jenis : *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* merupakan flora normal pada kulit dan membran mukosa manusia. *S. epidermidis* juga terdapat pada bisul dan luka, serta dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan (Jawetz dkk., 2001). Dahulu organisme ini jarang mengakibatkan infeksi yang signifikan, tetapi peningkatan penggunaan implan kateter dan alat prostetik menyebabkan *S. epidermidis* menjadi sumber

atau penyebab infeksi nosokomial. Infeksi *S. epidermidis* sebagian besar diperoleh dari rumah sakit (Ryan, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* (Gambar 4), merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar 0,5-1 x 3-4  $\mu\text{m}$ , ditemukan tunggal, berpasangan, dan kadang-kadang membentuk rantai pendek, non-spora, tidak mempunyai selubung (*sheath*), serta mempunyai flagel. Bakteri ini kadang-kadang memiliki dua atau tiga flagel, sehingga ia selalu bergerak. *P. aeruginosa* merupakan bakteri aerob atau fakultatif aerob (cenderung aerob), yang dapat tumbuh dengan mudah pada banyak jenis medium pembiakan, karena memiliki kebutuhan nutrisi yang sangat sederhana. *P. aeruginosa* membentuk koloni halus bulat dan memiliki struktur pinggir koloni yang tidak rata (*undulate*), serta mengeluarkan bau manis atau menyerupai anggur yang dihasilkan aminoasetafenon. *P. aeruginosa* juga menghasilkan piosianin, yaitu pigmen kebiru-biruan yang tak berfluoresensi bila diinkubasi pada suhu 35-37°C, tetapi jika diinkubasi pada suhu 20-30°C dapat dihasilkan fluoresensi (Jawetz dkk., 2001).



Gambar 4. *Pseudomonas aeruginosa* (Sumber: Potera, 2012)



*P. aeruginosa* tersebar luas di alam dan biasanya hidup di lingkungan yang lembab. Dalam jumlah kecil, bakteri ini terdapat pada flora usus normal dan kulit manusia. *P. aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi pada luka bakar dan menghasilkan nanah warna hijau biru, meningitis jika masuk melalui fungsi lumbal, dan infeksi saluran kencing jika masuk melalui kateter. *P. aeruginosa* juga dapat menyerang saluran pernafasan, seperti komplikasi *cystic fibrosis* dan pneumonia nekrotika jika respirator yang digunakan tercemar (Jawetz dkk., 2001).

Menurut Breed dkk. (1957), klasifikasi *P. aeruginosa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Eukariota  
Divisi : Protophyta  
Kelas : Schizomycetes  
Bangsa : Pseudomonadales  
Suku : Pseudomonadaceae  
Marga : Pseudomonas  
Jenis : *Pseudomonas aeruginosa*

#### **F. Uji Kemurnian Bakteri**

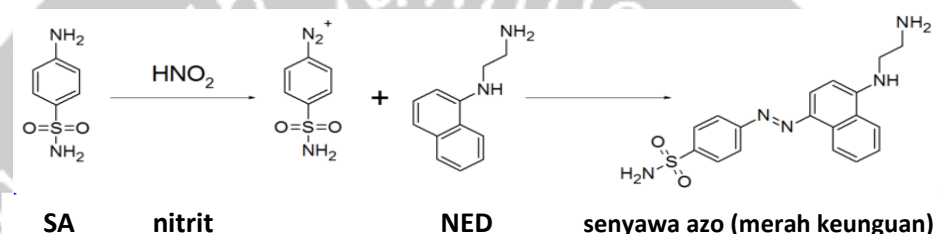
Pada penelitian ini dilakukan uji kemurnian bakteri. Uji kemurnian bakteri yang dilakukan meliputi uji morfologi sel menggunakan pengecatan Gram, uji morfologi koloni bakteri, uji motilitas dan sifat bakteri terhadap udara, dan uji biokimia. Uji biokimia terdiri dari uji fermentasi karbohidrat menggunakan glukosa, laktosa, dan sukrosa, uji reduksi nitrat, serta uji katalase.

Pewarnaan Gram merupakan salah satu pewarnaan diferensial dan prosedur yang penting dalam identifikasi bakteri. Pewarnaan Gram dapat membedakan bakteri menjadi 2 kelompok, yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Perbedaan ini dapat terjadi karena adanya perbedaan komposisi dinding sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang lebih tebal namun akan menyusut ketika diberi larutan alkohol (larutan Gram C) karena terjadi dehidrasi, sehingga pori-pori dinding selnya menutup dan mencegah zat warna ungu dari larutan violet (larutan Gram A) terlarut. Komposisi sel bakteri Gram negatif berbeda, yaitu dinding selnya memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi dan lipid tersebut dapat larut dalam alkohol (larutan Gram C). Larutnya lipid oleh alkohol diduga sebagai penyebab pori-pori dinding sel menjadi lebih besar dan menyebabkan warna merah dari larutan safranin (larutan Gram D) dapat terikat pada dinding sel (Madigan dkk., 2012).

Uji morfologi koloni bakteri (MKB) menggunakan metode *streak plate* di medium *Nutrient Agar* (NA) petri dengan tujuan untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri yang terpisah, sehingga mempermudah pengamatan morfologi koloninya (Nurdyanto dan Zubaidah, 2015).

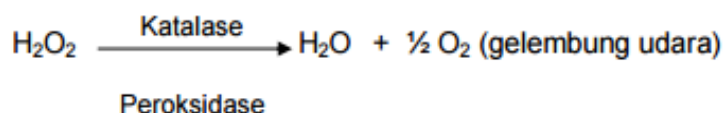
Uji nitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit (Hasanah dkk., 2012). Uji nitrat menggunakan medium NB yang diberi tambahan nitrat. Bakteri uji diinokulasikan ke dalam medium, diinkubasi, kemudian diuji menggunakan reagen *sulfanilic acid* (SA) dan *n-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride* (NED).

Bakteri yang memiliki enzim nitrat reduktase akan mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Nitrat yang telah tereduksi menjadi nitrit akan bereaksi dengan reagen SA dan NED membentuk senyawa azo berwarna merah keunguan (Jefferyy dkk., 1989). Reaksi nitrit dengan reagen uji dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi uji nitrat (Sumber: Jefferyy dkk., 1989)

Uji katalase merupakan uji yang biasanya dilakukan pada bakteri berbentuk kokus dengan tujuan untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif dan kelompok *Streptococcus* bersifat katalase negatif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) menjadi air (H<sub>2</sub>O) dan oksigen (O<sub>2</sub>) (Dewi, 2013). Uji katalase dilakukan dengan cara mengoleskan bakteri uji pada gelas benda, kemudian ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara (Dewi, 2013). Reaksi kimiawi yang dikatalisasikan oleh enzim katalase dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi uji katalase (Sumber: Dewi, 2013)  
Keterangan: Enzim katalase akan mengkatalisa penguraian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrogen peroksida) menjadi air dan oksigen (gelembung udara)

## G. Deskripsi dan Golongan Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri yang merugikan manusia (Pelczar dan Chan, 1986). Antibakteri yang ideal harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk mikrobia tetapi relatif tidak toksik untuk inang atau manusia (Kharismayanti, 2015). Menurut Madigan dkk. (2015), antibiotik dapat dibedakan menjadi tiga golongan, yaitu:

1. Bakteriostatik, merupakan antibiotik yang mampu menghambat proses biokimia penting, seperti sintesis protein, karena senyawa antibiotik dapat berikatan lemah dengan target seluler (ribosom), sehingga jika senyawa antibiotik dihilangkan maka pertumbuhan bakteri dapat berlanjut kembali.
2. Bakterisidal, merupakan antibiotik yang berikatan kuat dengan target seluler (ribosom) sehingga mampu membunuh bakteri tanpa melisis sel bakteri targetnya.
3. Bakteriolitik, merupakan antibiotik yang memiliki kemampuan membunuh bakteri dengan cara melisis atau memecahkan selnya, sehingga isi sitoplasmanya keluar dari sel. Antibiotik akan menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan menghambat enzim bakteri yang diperlukan untuk pemecahan sel dan sintesis seluler, sehingga bakteri akan mati akibat lisis sel (Kee dan Hayes, 1994).

## H. Deskripsi Antibiotik

Antibiotik merupakan zat-zat yang dihasilkan oleh suatu mikrobia dan zat-zat tersebut, dalam jumlah sedikit pun, mempunyai daya penghambat kegiatan mikrobia. Antibiotik ada yang mempunyai spektrum luas, yang berarti antibiotik tersebut efektif digunakan untuk banyak spesies bakteri, baik untuk bakteri Gram positif maupun negatif, atau yang berbentuk kokus, basil, maupun spiral. Antibiotik juga ada yang berspektrum sempit, yang berarti hanya efektif digunakan untuk spesies bakteri dengan bentuk tertentu, atau untuk bakteri Gram positif atau negatif saja (Dwidjoseputro, 1987).

Menurut Pratiwi (2008), antibiotik dapat dikelompokkan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu:

- a. Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel: kelompok antibiotik ini merusak lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Contohnya adalah penisilin, sefalosporin, basitrasin, sikloserin, ristosetin, dan vankomisin.
- b. Antibiotik yang merusak membran plasma: membran plasma bersifat semipermeabel dan mengendalikan transpor berbagai metabolit ke dalam dan ke luar sel. Adanya gangguan atau kerusakan struktur pada membran plasma dapat menghambat atau merusak kemampuan membran plasma sebagai penghalang (*barrier*) osmosis dan mengganggu sejumlah proses biosintesis yang diperlukan dalam membran. Contoh antibiotik pada kelompok ini adalah polimiksin, kolistin, nistatin, dan amforoterisin B.

- c. Antibiotik yang menghambat sintesis protein: kelompok antibiotik ini memiliki spektrum luas dan bersifat bakterisida dengan mekanisme penghambat pada sintesis protein. Antibiotik ini berikatan pada subunit 30S ribosom bakteri (beberapa terikat juga pada subunit 50S ribosom) dan menghambat translokasi peptidil-tRNA dari situs A ke situs P, dan menyebabkan kesalahan pembacaan mRNA dan mengakibatkan bakteri tidak mampu melakukan sintesis protein vital untuk pertumbuhannya. Contoh antibiotiknya adalah streptomisin, aktinomisin, rifampisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, dan klindamisin.
- d. Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat (DNA atau RNA): kelompok antibiotik ini melakukan penghambatan pada sintesis asam nukleat, berupa penghambatan terhadap transkripsi dan replikasi mikroorganisme. Contohnya adalah rifamisin, asam nalidiksat, novobiosin, pirimetamin, sulfonamida, dan trimetoprim.
- e. Antibiotik yang menghambat sintesis metabolit esensial: penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial antara lain dengan adanya kompetitor berupa anti-metabolit, yaitu substansi yang secara kompetitif menghambat metabolit mikroorganisme, karena memiliki struktur normal bagi enzim metabolisme. Contohnya antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfanilamid, trimetoprim, dan asam p-amino salisilat.

Ampicillin merupakan antibiotik turunan penicillin yang merupakan kelompok antibiotik  $\beta$ -laktam. Ampicillin memiliki spektrum yang luas, yaitu efektif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (Dwidjoseputro, 1987).

Ampicillin mampu menempel dan menembus pada bakteri Gram positif dan beberapa bakteri Gram negatif, karena adanya gugus amino yang membantu penetrasi ke dalam membran sel bakteri. Gugus amino ampicillin akan menghambat sintesis peptidoglikan pada dinding sel bakteri dan menyebabkan bakteri tidak mampu mengatasi perbedaan tekanan osmosis di luar dan di dalam sel, sehingga sel bakteri akan lisis atau mati (Wattimena, 1987).

### **I. Parameter dan Metode Uji Antibakteri**

Menurut Pratiwi (2008), metode uji antibakteri dibagi menjadi dua macam, antara lain metode difusi dan dilusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri suatu agen antimikrobia. Aktivitas antibakteri tersebut ditandai dengan terbentuknya area jernih pada permukaan medium agar. Metode difusi dibedakan menjadi dua, yaitu metode cakram Kirby Bauer (difusi disk) dan metode sumuran.

Metode cakram Kirby Bauer atau metode difusi disk dilakukan dengan cara menginokulasikan biakan pada permukaan medium agar, kemudian senyawa antibakteri diletakkan dalam medium agar yang mengandung organisme yang diuji. Senyawa antibakteri akan berdifusi ke medium agar dan efektivitasnya ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi tempat senyawa antibakteri terdifusi. Metode sumuran merupakan metode yang serupa dengan metode difusi disk, tetapi dibuat sumur pada medium agar yang telah ditanami biakan dan pada sumur diisi senyawa antibakteri yang akan diuji (Pratiwi, 2008).

Metode dilusi digunakan untuk mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM), yaitu konsentrasi senyawa antibakteri terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan organisme tertentu (Harmita dan Radji, 2006). Metode ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran senyawa antibakteri pada medium cair. Inokulum mikroorganisme ditambahkan ke dalam tabung yang mengandung seri pengenceran suatu senyawa antibakteri dan pertumbuhannya akan diamati melalui perubahan kekeruhan. Prosedur ini digunakan untuk menentukan konsentrasi senyawa antibakteri yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen. Metode dilusi ini dapat dilanjutkan dengan cara menginokulasikan senyawa antibakteri tersebut ke medium agar petri, sehingga jumlah koloni bakteri yang tumbuh dapat dihitung (Madigan dkk., 2012).

## **J. Hipotesis**

1. Konsentrasi optimum ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*, Swingle) yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* adalah 80% dengan uji luas zona hambat dan 40% dengan uji konsentrasi hambat minimum (KHM).
2. *Staphylococcus epidermidis* lebih rentan terhadap daya antibakteri ekstrak daun jeruk nipis daripada *Pseudomonas aeruginosa*.