

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi dan Taksonomi Tanaman Kluwih

Kluwih merupakan buah yang memiliki kulit keras dengan duri-duri kecil yang mirip buah sukun. Biji kluwih merupakan limbah hasil olahan pembuatan sayuran. Kandungan pada kluwih yaitu kalori, protein, karbohidrat, lemak, kalsium, fosfor, dan zat besi. Biji kluwih mengandung vitamin A dan B sehingga dapat digunakan sebagai cemilan yang diolah dengan cara direbus dan kemudian diolah menjadi keripik (Januarta dkk., 2018). Biji kluwih dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Biji kluwih (Haqi, 2018).

Klasifikasi biji kluwih menurut Becker dan Van (1965), yaitu sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae

Bangsa : Urticales
Famili : Moraceae
Marga : *Artocarpus*
Spesies : *Artocarpus communis J. R. & G*

Kluwih memiliki tinggi pohon sekitar 15-18 meter atau lebih. Diameter batang pohon 50-70 cm. Pohon kluwih memiliki bunga/buah per tandan 2-5 dan daun dengan panjang 40-60 cm yang berwarna hijau. Buah kluwih berbentuk lonjong panjang dengan lebar 4:3 (Hendalastuti dkk., 2006).

B. Senyawa Antibakteri Biji Kluwih dan Mekanisme Antibakterinya

Skrining fitokimia kluwih diketahui mengandung 32 senyawa turunan flavonoid (Syah, 2005). Senyawa utama yang terkandung pada kluwih yaitu flavonoid pada biji dan terpenoid pada daun, sedangkan senyawa lainnya yaitu poliprenol dan sikloartenol asetat pada batang serta senyawa β -amyirin asetat dan sikloeugenol pada kulit kluwih (Solichah dkk., 2021). Senyawa seperti alkaloid, flavonoid, glikosida dan saponin berfungsi sebagai antibakteri (Haqi, 2018). Senyawa flavonoid dapat mengganggu fungsi metabolisme mikroorganisme target. Flavonoid dapat mendenaturasi protease sel bakteri dan merusak membran sel tanpa perbaikan kembali (Pelczar dkk., 1988).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme senyawa flavonoid dengan cara menghambat sintesis makromolekul sel bakteri sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada membran sel bakteri (Mawan dkk., 2018). Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai responnya dalam sistem pertahanan terhadap infeksi oleh mikroorganisme sehingga flavonoid

dimanfaatkan sebagai senyawa antimikroba (Parubak, 2013). Flavonoid juga memiliki tiga mekanisme sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membran sitoplasma dan metabolisme energi (Haqi, 2018).

C. Standarisasi Simplisia

Standarisasi simplisia merupakan proses pengujian yang dilakukan pada bahan baku obat alami. Standarisasi simplisia bertujuan untuk mempertahankan stabilitas, keamanan dan konsistensi senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia (Evifania dkk., 2020). Standarisasi yang dilakukan pada penelitian ini antara lain kadar air, sari larut air, sari larut metanol, abu total dan abu tidak larut asam.

Kadar air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan air yang terdapat dalam suatu simplisia. Sari larut air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa aktif yang mampu diekstraksi oleh air (Vonna dkk., 2021). Abu tidak larut asam dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui baik tidaknya suatu pengolahan dan mengetahui kandungan mineral dalam simplisia (Indrasuari dkk., 2014). Sari larut metanol dilakukan dengan tujuan untuk memperkirakan banyaknya kandungan senyawa aktif suatu sampel yang bersifat polar atau larut dalam metanol. Abu total dilakukan dengan tujuan untuk melihat kandungan mineral (Utami dkk., 2017).

D. Metode Ekstraksi

Ekstrak merupakan sediaan pekat yang didapatkan dengan cara mengekstraksi zat aktif yang berasal dari simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, lalu pelarut yang digunakan diuapkan serta serbuk yang tersisa diberi perlakuan sampai memenuhi baku mutu yang sudah ditetapkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair disebut dengan ekstraksi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000). Cara pemisahan campuran beberapa zat agar menjadi komponen yang terpisah dapat diartikan sebagai ekstraksi (Winarno dkk., 1973). Metode ekstraksi terbagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi khusus dan ekstraksi sederhana. Perkolasi, evakolasi, maserasi, reperkolasi, dan dialokasi adalah metode ekstraksi sederhana, sedangkan ultrasonik, sokletasi, dan arus balik adalah metode ekstraksi khusus (Harborne, 1987).

1. Maserasi

Metode ekstraksi untuk mengekstrak sampel yang relatif tidak panas yaitu menggunakan maserasi. Metode ini dilakukan dengan cara sampel direndam pada pelarut dan dengan rentang waktu tertentu (24 jam) tanpa perlakuan pemanasan (Meloan, 1999). Prinsip metode maserasi yaitu serbuk tanaman direndam dalam pelarut tertentu hingga pelarut akan masuk ke dalam dinding sel tanaman sehingga rongga sel tanaman mengandung zat

aktif, dengan demikian zat aktif di dalamnya akan ikut tertarik bersama dengan keluarnya pelarut (Izza dkk., 2016).

Kekurangan dari metode maserasi yaitu ekstraksi membutuhkan waktu yang cukup lama, beberapa senyawa sulit untuk diekstraksi pada suhu 27 °C, ekstraksi dapat menghabiskan pelarut dengan volume yang banyak dan dapat berpotensi menghilangkan metabolit. Ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan pada suhu 27 °C, agar metabolit yang tidak tahan panas tidak terdegradasi. Keuntungan menggunakan metode ini yaitu dapat dilakukan secara sederhana, metode paling baik digunakan untuk skala kecil maupun industri, dan dapat menghindari kerusakan senyawa yang memiliki sifat termolabil (Mukhriani, 2014).

2. Sonikasi

Sonikasi adalah metode non termal dengan pemanfaatan gelombang ultrasonik untuk meningkatkan jumlah rendemen. Tujuan sonikasi adalah untuk memecahkan dinding sel agar ekstraksi dapat berlangsung cepat. Prinsip sonikasi yaitu dengan menggunakan gelombang ultrasonik di atas 20 kHz agar dinding sel dapat dipecah (Hidayat dkk., 2018).

Prinsip kerja metode sonikasi yaitu dengan melarutkan sampel dalam pelarut yang diberi gelombang ultrasonik dalam waktu tertentu lalu disaring dan dipekatkan (Maulidiani dkk., 2015). Kelebihan sonikasi yaitu efisien dan waktu ekstraksi yang cepat. Kekurangan sonikasi yaitu alat yang mahal (Hidayat dkk., 2018).

E. Pelarut Metanol

Pelarut adalah cairan yang digunakan untuk menentukan fase ekstraktan yang terkandung dalam senyawa organik. Fungsi pelarut yaitu untuk melarutkan senyawa yang akan diekstrak dari suatu sampel atau bahan (Rydberg, 2011). Ekstraksi suatu senyawa bergantung pada kelarutannya dalam pelarut. Prinsip *like dissolve like* merupakan suatu senyawa yang dapat terlarut pada pelarut dengan sifat yang sama. Metanol merupakan pelarut polar (Verdiana dkk., 2018).

Pelarut metanol mampu mengekstraksi senyawa aktif yang terlarut dalam cairan ekstraseluler dan intraseluler (Gazali dkk., 2019). Metanol memiliki *polarity index* sebesar 5,1 (Borhet dkk., 2016). Metanol sebagai pelarut mampu mengekstrak senyawa golongan alkaloid, flavonoid, steroid, polifenol, tanin dan saponin (Setiawan dkk., 2017). Metanol sebagai pelarut mampu untuk menghasilkan nilai rendemen yang tinggi dibandingkan etanol dan aseton (Liu dan Yao, 2007). Metanol menghasilkan rendemen tertinggi dibandingkan etanol pada konsentrasi yang sama (Mardawati dkk., 2008).

Pelarut metanol 70% memiliki tingkat kepolaran yang cukup tinggi dengan dapat menghasilkan rendemen sebesar 40,61%. Metanol memiliki nilai konstanta dielektrik sebesar 33. Prinsipnya yaitu semakin tinggi konstanta dielektrik, maka semakin polar suatu pelarut (Verdiana dkk., 2018).

Metanol 95% memiliki tingkat polaritas yang tinggi. Hasil rendemen akan berbanding lurus dengan konsentrasi pelarut yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi pelarut, maka semakin banyak rendemen yang didapatkan

(Widianingsih, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Putri dkk. (2013), menyebutkan bahwa metanol terbukti sebagai pelarut yang baik dalam mengekstrak senyawa yang berperan sebagai antibakteri dan antioksidan terhadap aktivitas antibakteri yang terdapat pada tanaman herbal yang umum dikonsumsi masyarakat Asia.

F. Deskripsi *Pseudomonas aeruginosa*

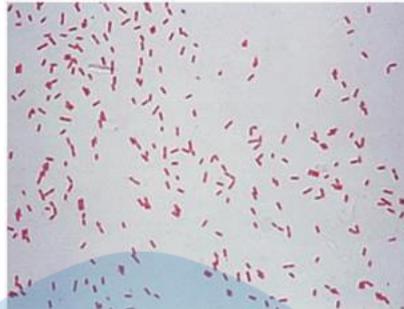
P. aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Bakteri ini dapat ditemukan pada tanah, air, flora, di kulit manusia dan sebagian besar lingkungan manusia di dunia. *P. aeruginosa* dapat bergerak karena mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal yang terletak pada kutub), bentuk batang dengan ukuran $0,6 \times 2 \mu\text{m}$, bersifat motil dan bersifat aerob obligat yang dapat tumbuh dengan cepat pada berbagai tipe media. *P. aeruginosa* tidak dapat memfermentasi karbohidrat, oksidase positif, memiliki bentuk rod, katalase positif, dan mampu mereduksi nitrat. Koloni *P. aeruginosa* pada medium agar berbentuk irregular, large, dan berwarna putih keabuan (Breed dkk., 1957).

P. aeruginosa dapat tumbuh baik pada suhu $37-42 \text{ }^\circ\text{C}$. Faktor yang dapat memengaruhi pertumbuhan bakteri ini yaitu tingkat pH. Tingkat keasaman (pH) optimum yang baik bagi pertumbuhan *P. aeruginosa* yaitu pada pH 6,6-7,0 (Jawetz dkk., 1995). *P. aeruginosa* membentuk koloni yang bundar dan licin dengan menghasilkan beberapa pigmen warna seperti pioverdin yaitu pigmen warna kehijauan yang berfluoresensi, piosianin yaitu pigmen kebiruan

tak berfluoresensi yang berdifusi dalam agar, beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap yaitu piorubin serta pigmen hitam yaitu piomelanin (Brooks dkk., 2010). Menurut Holt dkk. (1998), taksonomi *P. aeruginosa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Bangsa	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: <i>Pseudomonas</i>
Jenis	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

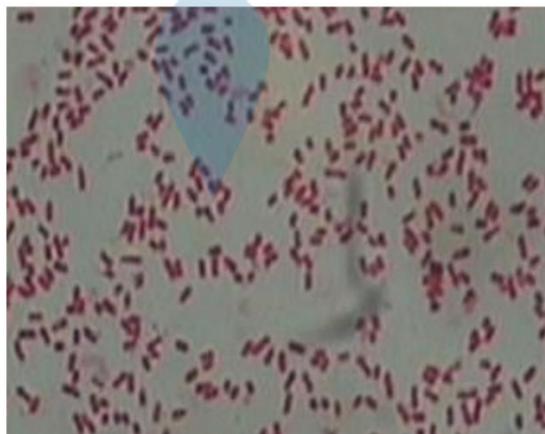
P. aeruginosa adalah bakteri patogen yang utama bagi manusia dan hewan, karena bakteri ini berkoloni dan dapat menimbulkan infeksi pada saat fungsi pertahanan tubuh dalam keadaan yang tidak normal. *P. aeruginosa* disebut patogen oportunistik (sifat bakteri yang dapat menyerang sistem imun yang rendah), karena bakteri ini memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai menginfeksi. Bakteri ini dapat tumbuh pada manusia sehat dan bersifat saprofit pada usus dan kulit manusia. Selain itu, bakteri ini dapat menyebabkan infeksi nosokomial, yaitu infeksi yang didapat selama dalam perawatan di rumah sakit (Mayasari, 2006). Infeksi sekunder oleh bakteri ini juga dapat terjadi pada pasien dengan dermatitis, tinea pedis, infeksi ini memiliki karakteristik eksudat berwarna biru-hijau dengan bau seperti aseton (Jawetz dkk., 2001). Kenampakan *P. aeruginosa* dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 2 (Brooks dkk., 2013).



Gambar 2. Bakteri *P. aeruginosa* dengan pengecatan Gram (Todar, 2012).

G. Deskripsi *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae dikenal juga sebagai bakteri Friedlander. Bakteri *K. pneumoniae* adalah bakteri Gram negatif yang bersifat patogen, berbentuk batang dan non motil atau tidak bergerak. Bakteri *K. pneumoniae* ini merupakan bakteri *coliform fecal* yang terdapat pada tanah, kotoran, air maupun udara (Mardiyantoro, 2018). Bakteri *K. pneumoniae* merupakan bakteri yang bersifat fakultatif anaerob (Kurniawan dan Indra, 2018). Kenampakan bakteri *K. pneumoniae* dapat dilihat pada Gambar 3 (Dita dkk., 2019).



Gambar 3. Bakteri *K. pneumoniae* dengan pengecatan Gram (Dita dkk., 2019).

Bakteri *K. pneumonia* merupakan bakteri yang tidak membentuk spora, memiliki kapsul atau selubung tebal, ukurannya 0,5-1,5 μ . Bakteri ini tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagel namun mampu dalam memfermentasikan karbohidrat membentuk asam dan gas. Pertumbuhan bakteri mukoid, memiliki kapsul polisakarida yang besar, memiliki selaput lendir dan mulut (Jawetz, 2008). Menurut Khotimah (2020), taksonomi *K. pneumoniae* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Bangsa	: Enterobacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Klebsiella</i>
Jenis	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Bakteri *K. pneumoniae* merupakan bakteri yang memanfaatkan kekebalan tubuh manusia untuk menginfeksi. Suhu yang baik untuk pertumbuhan *K. pneumoniae* yaitu 37 °C. Bakteri ini dapat ditumbuhkan dalam kondisi anaerob dengan meragikan karbohidrat, sedangkan kondisi aerob dengan menggunakan siklus asam trikarbositat dan transport elektron untuk mendapatkan energi. *K. pneumoniae* mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit, tidak dapat mencairkan alginat, hasil negatif pada oksidase dan menggunakan siklus *butanediol fermentative pathway* untuk meragikan glukosa (Khotimah, 2020).

H. Aktivitas Antibakteri dan Metode Pengukurannya

Antibakteri adalah zat yang mampu untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri patogen penyebab infeksi. Antibakteri terbagi menjadi dua yaitu bakteristatik yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dan bakterisidal yang mampu membunuh bakteri. Pengukuran antibakteri secara umum dilakukan dengan mengukur jari-jari yang terbentuk pada daerah zona bening di sekitar sumuran (Magani dkk., 2020).

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan tujuan untuk dapat melihat aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh sampel uji (Misna dan Diana, 2016). Pengujian kepekaan bakteri terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan dilusi atau difusi. Penelitian ini menggunakan difusi cara sumuran dengan lempeng yang diinokulasi dengan bakteri yang pada sumuran diisi oleh zat antimikroba. Inokulasi pada suhu dan waktu yang sesuai, kemudian diamati zona hambat yang terbentuk (Pratiwi, 2008).

Metode difusi agar atau sumuran ini dilakukan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian setiap atau masing-masing lubang sumuran diisi dengan larutan ekstrak tertentu atau sebagai senyawa antimikroba pada konsentrasi yang diinginkan. Medium diinkubasi dengan kondisi dan suhu yang diinginkan tergantung dengan mikroorganisme uji yang digunakan. Pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambat disekeliling lubang (Lay, 1994).

Metode ini memiliki prinsip yaitu aktivitas antimikrobia dapat dihambat dengan munculnya zona hambat di sekitar sumuran. Kelebihan dari metode ini yaitu ekstrak dapat langsung masuk di setiap lubang sehingga efek menghambat bakteri lebih baik atau kuat. Hal ini didasari prinsip osmolaritas dari konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi ke konsentrasi ekstrak yang lebih rendah sampai mencapai fase kesetimbangan, sehingga hasil lebih homogen dan menyeluruh (Misna dan Diana, 2016).

Zona hambat merupakan tempat dimana bakteri terhambat pertumbuhannya akibat antibakteri atau antimikrobia. Zona hambat adalah untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada medium agar oleh zat penghambat. Contohnya adalah larutan ekstrak yang mengandung senyawa antimikroba, dan berbagai macam antibiotik seperti tetrasiklin, eritromisin, dan streptomisin (Pelczar dan Chan, 1986).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terkecil dari suatu sampel yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang telah diinokulasi. Pengamatan KHM dilihat dengan terbentuknya zona bening (Mulyadi dkk., 2017). Kadar terkecil dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri dicatat sebagai KHM (Etikasari dkk., 2017).

I. Hipotesis

1. Metode ekstraksi sonikasi dengan pelarut metanol 95% memiliki total flavonoid paling tinggi dibandingkan sonikasi metanol 70% serta maserasi

metanol 70% dan 95% yaitu pada kisaran rentang 4,0488-4,8819 mg QE/g ekstrak.

2. Aktivitas antibakteri ekstrak sonikasi metanol 95% biji kluwih yang dapat menghambat *P. aeruginosa* berdasarkan diameter zona hambat tergolong kategori sedang yaitu 5-10 mm dan *K. pneumoniae* tergolong kategori kuat yaitu 10-20 mm.
3. Ekstrak metanol 95% biji kluwih dari sonikasi memiliki aktivitas hambat minimum terhadap *P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae* pada konsentrasi yang paling rendah dibandingkan dengan ekstrak lain.

