II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Morfologi dan Taksonomi Tanaman Patah Tulang

Patah tulang merupakan salah satu dari 8000 tumbuhan yang berasal dari suku Euphorbiaceae. Patah tulang merupakan tanaman yang hidup di daerah tropis seperti Afrika, menyukai tempat terbuka dan banyak sinar matahari langsung. Indonesia merupakan negara tropis, sehingga tanaman patah tulang dapat tumbuh dengan subur di Indonesia. Tanaman patah tulang di Indonesia biasanya ditanam di halaman rumah, di pot, atau sebagai tanaman pagar (Absor, 2006). Patah tulang yang memiliki nama lain atau nama daerah kayu urip dalam bahasa Jawa, kayu tabar dalam bahasa Madura, dan susuru pada bahasa Sunda dan di luar negeri seperti Tiongkok disebut sebagai *Lu San Hu* (Dalimartha, 2007).

Pengelompokan tanaman patah tulang dalam sistem binomial, adalah sebagai berikut menurut Mwine dan Damme (2011):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Malpighiales
Suku : Euphorbiaceae
Marga : *Euphorbia*
Jenis : *Euphorbia tirucalli*

Tanaman patah tulang berbentuk perdu yang tumbuh tegak, mempunyai tinggi 2-6 meter dengan pangkal berkayu, bercabang banyak, dan bergetah seperti susu tetapi bersifat toksik terhadap kulit, mata, dan beberapa hama/serangga (Gambar 1). Patah tulang mempunyai ranting yang bulat silindris berbentuk pensil, beralur halus

membujur, dan berwarna hijau. Ranting patah tulang setelah tumbuh sekitar satu jengkal akan segera bercabang dua yang letaknya melintang demikian seterusnya, sehingga tampak seperti percabangan yang terpatah-patah (Tabel 1) (Dalimartha, 2007).

Daunnya jarang, terdapat pada ujung ranting yang masih muda, kecil-kecil, bentuknya lanset, panjang 7 – 25 mm, dan cepat rontok. Patah tulang memiliki bunga dan buah, tetapi di Indonesia patah tulang jarang berbunga dan berbuah, karena penyinaran dan faktor tanah yang berbeda (Absor, 2006). Perbanyakan patah tulang dilakukan dengan stek batang (Dalimartha, 2007).

Gambar 1. Tanaman Patah Tulang
(sumber: Dokumentasi pribadi, 2014)

Tabel 1. Deskripsi bagian tanaman patah tulang

Bagian tumbuhan	Keterangan
1. Ranting	Ranting berwarna hijau berbentuk silinder menyerupai pensil dengan diameter 5-7 mm dan bercabang-cabang melingkar. Ranting mudanya berwarna hijau muda dan lunak, ranting tua berwarna hijau tua dan lebih keras. Mengelurkan getah berwarna putih susu apabila dipotong.
2. Daun	Daunnya memiliki panjang 1-1,5 cm berbentuk oblanceolate dan mudah rontok. Tumbuh disetiap percabangan ranting muda.
3. Bunga	Bunga tumbuh di ujung ranting muda, berupa bunga majemuk yang tersusun dari 3-5 bunga majemuk berwarna kuning atau hijau. Hanya mengeluarkan bunga pada bulan tertentu, bunga ini ditemukan pada bulan Mei.

Lanjutan Tabel 1.

4. Batang	Batang berdiameter 7-10 cm berwarna gradasi hijau-hijau tua-coklat-coklat tua. Kulit luarnya kasar dan berlubang-lubang, apabila disayat mengeluarkan getah berwarna kuning muda hingga putih.
5. Akar	Akar tanaman patah tulang adalah akar serabut yang akan memanjang dan berkayu ketika dewasa.
6. Buah	Buahnya terdiri dari 3 bagian/belahan berbentuk bulat/lobus berwarna hijau kekuningan. Ketika masak akan melemparkan biji-bijinya. Buah terdapat diujung ranting.

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014 ; Dalimartha, 2003

B. Kegunaan Tanaman Patah Tulang

Bagian tanaman yang digunakan sebagai obat adalah akar, batang kayu, ranting, dan getahnya. Akar dan ranting dapat digunakan untuk mengobati nyeri lambung, tukak rongga hidung, rematik, tulang terasa sakit, nyeri syaraf, wasir, dan sifilis (Dalimartha, 2003). Batang kayu digunakan untuk mengobati sakit kulit, kusta, dan kaki dan tangan mati rasa (Dalimartha, 2007). Akar dari tanaman ini juga dapat digunakan sebagai antimikrobia (Parekh, dan kawan-kawan., 2005), *nephro-protective*, antiarthritic, purgative, carminative dan *anti-leprosy* (Bani, dan kawan-kawan., 2007).

Tanaman patah tulang memiliki aktivitas farmakologi, antara lain aktivitas *oxytoxic*, aktivitas *anti-arthritic*, aktivitas *molluscicide*, aktivitas antimikrobia, aktivitas antiherpetik, aktivitas antioksidan, aktivitas hepatoprotektif, aktivitas imunomodulator, aktivitas sitotoksik, dan antivirus (Wal dan kawan-kawan, 2013). Tanaman patah tulang juga memiliki kegunaan lain, yaitu sebagai obat tradisional, ornament ruangan, penghasil energi, sumber karet, konservasi dan *agroforestry*, serta pestisida (Wal dan kawan-kawan, 2013).

Tanaman patah tulang tidak memiliki hama atau penyakit dikarenakan tanaman ini memiliki getah yang bersifat karsinogenik (Mwine dan Damme, 2011). Banyak orang yang menggunakan tanaman patah tulang sebagai pestisida botani yang aman, tapi juga mematikan bagi hama (Toana dan Nasir, 2010). Tanaman ini juga memiliki kemampuan hepatoprotektif (pelindung hati) (Jyothi, dan kawan-kawan. 2008). Menurut Sanjesh, dan kawan-kawan., (2012), Absor (2006), Prasad dan

kawan-kawan (2011), Upadhyay, dan kawan-kawan. (2010) tanaman patah tulang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi. Senyawa kimia yang berperan penting dalam aktivitas antimikrobia tanaman patah tulang adalah flavonoida dan tanin (Upadhyay, dan kawan-kawan., 2010).

Ekstrak ranting patah tulang mengandung senyawa flavonoida yang dapat mengganggu aktivitas transpeptidase peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel terganggu dan menyebabkan lisis sel. Senyawa lain yang terkandung pada ekstrak adalah senyawa tanin yang merupakan senyawa fenolik, yang mekanismenya dapat mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan dinding tidak sempurna pada bakteri (Parahita, 2013).

Senyawa fenolik (flavonoida dan tanin) dan saponin bersifat larut dalam air dan mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH), sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel dan membentuk kompleks dengan protein membran sel. Senyawa fenolik berinteraksi dengan protein membran sel melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen dengan cara terikat pada bagian hidrofilik dari membran sel. Kompleks protein-senyawa fenolik terbentuk dengan ikatan yang lemah, sehingga akan segera mengalami peruraian kemudian diikuti penetrasi senyawa fenolik ke dalam membran sel yang menyebabkan presipitasi dan terdenaturasinya protein membran sel. Kerusakan pada membran sel menyebabkan perubahan permeabilitas pada membran, sehingga mengakibatkan lisisnya membran sel jamur (Setyowati, dan kawan-kawan., 2014).

Menurut penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa alkaloida dapat menghambat pertumbuhan *C.albicans*. Alkaloida bekerja dengan menghambat biosistesa asam nukleat (Mc Charty dan kawan-kawan., 1992). Komponen lain adalah saponin yang dapat membentuk komplek dengan sterol dan memengaruhi perubahan permeabilitas membran kapang dan khamir (Simons dan kawan-kawan., 2006), sedangkan flavonoida mempunyai aktivitas anti kapang dan khamir pada *C. albicans* dengan mengganggu pembentukan pseudohifa selama proses patogenesis (Cushnie dan Lamb, 2005).

C. Metode Ekstraksi

Penggunaan tanaman patah tulang sebagai obat tradisional dapat digunakan secara langsung atau tidak langsung (melalui pengolahan). Menurut penelitian Supriyanto dan Luviana (2010) mengatakan, bahwa zat aktif yang terdapat di dalam getah tanaman patah tulang dapat menyebabkan hiperplasia (peningkatan ketebalan lapisan keratin pada epidermis), sehingga salah satu cara untuk menggunakan tanaman patah tulang dengan cara diolah menggunakan metode ekstraksi (penyarian). Hal ini dilakukan untuk memisahkan metabolit sekunder yang dibutuhkan dari tanaman patah tulang sehingga zat-zat yang menyebabkan toksik dapat dihindari (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986).

Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1986), penyarian adalah kegiatan menarik zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair yang sesuai. Hasil ekstraksi disebut ekstrak, yang diekstraksi sampai ukuran partikel tertentu dan menggunakan medium pengekstraksi yang tertentu juga

(Agoes, 2007). Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan, massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

Faktor yang dapat memengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut. Zat aktif yang berbeda-beda dalam tumbuhan akan memengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa terhadap perlakuan. Oleh karena itu, perlu diketahui terlebih dahulu zat aktif yang dikandung simplisia, sehingga dapat ditentukan pelarut dan cara penyarian yang benar (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986 dan Harborne, 1987).

Ekstraksi mula-mula dilakukan dengan cara mengeringkan atau menghaluskan bahan segar kemudian direndam dengan cairan pengekstraksi (pelarut). Ranting kering disebut simplisia. Menurut PERKBPOM (Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan) No 12 Tahun 2014, simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60 °C (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014).

Proses penyarian dapat dikategorikan menjadi 4 tahap (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986):

1. Penyerbukan

Pada umumnya proses penyarian akan berjalan dengan baik apabila permukaan simplisia yang akan bersentuhan dengan penyari diperluas. Oleh karena itu, semakin halus serbuk simplisia makin baik penyariannya. Serbuk simplisia tidak boleh terlalu halus karena menyebabkan kesulitan pada saat proses penyarian, karena ruang antarsel berkurang. Terlalu halusnya serbuk simplisia juga berpengaruh pada kesulitan saat proses penyaringan. Ekstrak akan bercampur dengan partikel halus serbuk simplisia. Dinding sel merupakan penyaring dari zat yang tidak diinginkan, apabila terlalu halus serbuk simplisia maka dinding sel akan banyak pecah, sehingga zat yang tidak diinginkan juga akan masuk ke dalam ekstrak tersebut.

Menurut PERKBPOM (Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan) No 12 Tahun 2014, serbuk simplisia adalah sediaan obat tradisional berupa butiran homogen dengan derajat halus yang sesuai. Sesuai dengan Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2008), derajat kehalusan untuk herba tanaman adalah rajangan kasar dengan ukuran ± 4 mm atau 5 mesh menurut U.S Sieve Series and Tyler Equivalents dalam Distantina (2009). Serbuk simplisia tidak diayak agar kadar rendemen yang dihasilkan tidak berkurang sehingga komponen yang terlarut akan lebih besar (Suksmasari, 2003).

2. Pembasahan

Pembasahan ini bertujuan untuk memberikan kesempatan sebesar-besarnya kepada pelarut untuk mengisi pori-pori simplisia, sehingga mempermudah saat

penarikan zat aktif. Dinding sel tumbuhan yang terdiri dari selulosa. Pada tanaman segar selulosa tersebut terisi oleh air, sedangkan pada serbuk simplisia yang dikeringkan lapisan air tersebut menguap lalu membentuk pori-pori. Pada saat serbuk simplisia yang telah dikeringkan tersebut dikelilingi oleh pelarut maka pori-pori simplisia akan membengkak kembali.

3. Penyarian

   Pada proses penyarian, zat aktif yang sudah ditarik oleh pelarut harus melewati dinding sel untuk dikeluarkan dari sel tersebut. Proses difusi lebih berpengaruh daripada proses osmosis, karena pada proses difusi pelarut akan melewati pori-pori luar membran ke dalam sel untuk menarik zat aktif. Penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk simplisia dan perbedaan konsentrasi dari pusat sel simplisia sampai ke permukaannya. Semakin kasar serbuk simplisia konsentrasi zat aktif yang terlarut dan tertinggal akan semakin banyak, sehingga serbuk simplisia harus dijaga sehalus mungkin tanpa merusak selnya.

4. Pemekatan (Penguapan)

   Setelah semua zat aktif terpisah dari zat yang tidak diinginkan, dilakukan pemekatan dengan cara penguapan supaya dapat menjadi ekstrak. Pelarut yang digunakan dapat diuapkan sebagian ataupun seluruhnya. Harus diperhatikan stabilitas dari zat aktif yang diinginkan. Faktor yang memengaruhi pemekatan, yaitu suhu, kelembapan, waktu, metode penguapan, dan konsentrasi.

Terdapat berbagai jenis ekstraksi, hal ini tergantung dari kelarutan bahan yang terkandung dalam tanaman serta stabilitasnya (Voigt, 1995). Ada beberapa metode ekstraksi menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2000), yaitu:

a. Cara dingin

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruangan (kamar). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

b. Cara panas

1. Refluks

Refluks adalah ektraksi dengan pelarut pada suhu titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2. Digesti

Digesti adalah maserasi dengan pengadukan berkesinambungan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar, yaitu pada 40-50^{o}C.

3. Infus

Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, suhu terukur 90^{o}C) selama 15 menit.

4. Dekok

Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada suhu 90 ^{o}C selama 30 menit.

5. Penyarian menggunakan Soxhlet

Penyarian menggunakan Soxhlet adalah metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantung ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja berkesinambungan (Voigt, 1995). Uap pelarut akan naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung melalui tabung yang berisi serbuk simplisia. Pelarut yang turun akan melarutkan zat aktif. Lalu, cairan akan kembali lagi turun ke labu lalu diuapkan kembali, begitu seterusnya. Cara ini lebih menguntungkan karena uap panas tidak melalui serbuk simplisia tetapi melalui pipa samping (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986).

Kusumaningtyas dan kawan-kawan., (2008), memiliki ekstrak kental yang sudah tidak mengandung pelarut untuk penelitian daya hambat krim antimikrobia daun sirih. Pada penelitian Prasad dan kawan-kawan (2011), ekstrak yang dibuat diencerkan ke dalam pelarut yang sama untuk mempermudah difusi pada saat pengujian aktivitas antimikrobia.

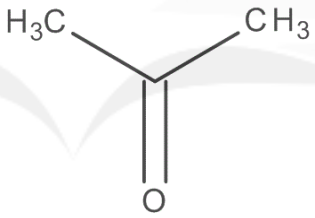
D. Pelarut

Tanaman yang ingin diambil kandungan bahan aktifnya akan diekstrak dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus memiliki kemampuan melarutkan zat aktif dalam jumlah yang maksimal dan meminimalisir unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989). Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektrikumnya dapat dibedakan menjadi dua, yaitu pelarut polar dan non-polar (Sudarmadji dan kawan-kawan., 1989). Polaritas ini ditentukan oleh konstanta dielektrikumnya, semakin besar konstanta dielektrikumnya semakin besar pemisahan muatannya, menjadikannya semakin polar (Lide, 2004). Kostanta dielektrikum aseton sebesar 20,7 dan DMSO (Dimetil Sulfoksida) sebesar 46,7 (Anonim, 2013).

Pemilihan pelarut harus mempertimbangkan berbagai faktor. Pelarut yang baik memenuhi kriteria seperti (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986) murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif, yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak memengaruhi zat aktif, dan diperbolehkan oleh

peraturan. Aseton dan Dimetil Sulfoksida atau yang disingkat DMSO sudah memenuhi persyaratan tersebut.

Aseton (CH_3COCH_3) merupakan keton sederhana yang berbentuk cairan tak berwarna, memiliki bau yang khas, dan mudah terbakar, memiliki titik didih 56°C yang digunakan untuk membuat plastik, serat, obat-obatan dan senyawa kimia lain. Aseton memiliki polaritas menengah, sehingga dapat melarutkan berbagai senyawa, bersifat menguap dan memiliki daya hambat (Pringgodigdo, 1977). Berdasarkan penelitian Prasad dan kawan-kawan., (2011), ekstrak aseton ranting patah tulang memiliki reaksi daya hambat yang lebih baik daripada pelarut lainnya. Struktur kimia aseton dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini:

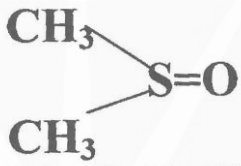


Gambar 2. Rumus bangun aseton
(Sumber: Merck, 2013)

Obat-obatan topikal terdiri atas kandungan bahan aktif dan pelarut yang melarutkannya, ini merupakan bahan dasar pembuatan obat topikal. Komponen bahan dasar harus sesuai satu dengan yang lainnya. Pelarut tidak boleh menginaktivasi secara penuh semua bahan yang terlarut di dalamnya. Ekstrak murni yang akan dibuat sebagai bahan obat harus dilarutkan terlebih dahulu dengan pelarut yang cepat

meresap ke dalam stratum korneum, salah satunya dengan pelarut DMSO (Graham-Brown dan Burns, 2005).

Dimetil Sulfoksida ($(CH_3)_2SO$) atau DMSO yang memiliki rumus bangun seperti pada Gambar 5, merupakan cairannya tak berwarna, tak berbau, dan agak higroskopik, merupakan pelarut yang dapat melakukan penetrasi pada kulit dengan sangat cepat dan merupakan asam lemah. Kemampuannya menembus jaringan hewan dan tumbuhan serta mengawetkan sel hidup selama pembekuan (DMSO, 2012).



dimethylsulfoxide (DMSO)

Gambar 3. Rumus bangun DMSO
(Sumber: DMSO, 2012)

DMSO mempunyai efek anti radang analgestik, radioprotektif, fibrin olitik, vasodilatasi, dan menghambat kolinesterase serta granilasi. Pelarut DMSO merupakan pelarut aman dibandingkan dengan pelarut di kelasnya, tetapi memiliki sifat toksik apabila menjadi campuran obat. Pelarut ini tidak memiliki daya hambat (Sumartono dan Prastowo, 1997 ; Pudjaatmaka, 2002).

E. Fitokimia Tanaman Patah Tulang

Tumbuhan menghasilkan berbagai macam senyawa aktif yang memberikan efek farmakologi. Umumnya, senyawa aktif tersebut tidak berperan penting dalam metabolisme tumbuhan, sehingga sering disebut sebagai metabolit sekunder (Stepp dan Moerman, 2001; Liu dan kawan-kawan., 1998). Metabolit sekunder adalah

senyawa hasil biosintetik turunan dari metabolit primer yang umumnya diproduksi oleh organisme, yang berguna untuk pertahanan diri dari lingkungan maupun dari serangan organisme lain. Metabolit sekunder diproduksi oleh tanaman dalam keadaan yang terdesak, misalnya dalam menghadapi serangan organisme lain, ada pula yang diproduksi hanya untuk menjadi *coloring agent* yang berguna untuk menarik mangsa. Metabolit sekunder tidak memegang peranan penting dalam pertumbuhan tanaman, tetapi metabolit sekunder menyediakan produk zat aktif yang bersifat farmakologis bagi manusia (Dewick, 2002).

Fitokimia dari semua bagian tanaman patah tulang telah diuji dalam berbagai penelitian. Tanaman patah tulang merupakan sumber triterpenoida dan steroida (Wal dan kawan-kawan, 2013). Getahnya mengandung lebih banyak triterpenoida, sedangkan rantingnya mengandung steroida. Menurut Absor (2006), tanaman patah tulang memiliki 2 bagian tanamannya yang sangat bermanfaat, yaitu getah dan ranting. Kandungan fitokimia pada 2 bagian tersebut, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Fitokimia Tanaman Patah Tulang

Bagian Tanaman	Nama Zat aktif
Getah	Taraksasterol
	Euphol
	Phorbol ester
	Ingenol ester
	Euphorbin
Ranting	Glikosida
	Sapogenin
	Asam elagat

Sumber: Dalimartha, 2007

Getah tanaman patah tulang yang bersifat asam mengandung senyawa tambahan, seperti senyawa damar, zat karet dan zat pahit. Ranting tanaman patah tulang yang dilarutkan menggunakan aseton memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti yang terlihat pada Tabel 3 berikut ini:

Tabel 3. Kandungan Senyawa Fitokimia dengan Pelarut Aseton

Senyawa metabolit	Absor, 2006	Toana dan Nasir, 2010	Madane, dan kawan-kawan., 2013
Alkaloida	+	+	+
Tanin	+	+	-
Saponin	+	-	-
Flavonoida	-	+	+
Steroida	-	+	-
Triterpenoida	-	+	-
Hidroquinon	-	+	-

Sumber: Absor, 2006 ; Toana dan Nasir, 2010 ; Madane, dan kawan-kawan., 2013.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa dengan pelarut etanol senyawa metabolit yang terdapat pada ranting tanaman patah tulang adalah alkaloida, steroida, flavonoida, triterpenoida, saponin dan hidroquinon. Pelarut aseton memperlihatkan senyawa metabolit yang lebih banyak, yaitu alkaloida, tanin, steroida, flavonoida, triterpenoida, dan hidroquinon. Perbedaan fitokimia pada setiap penelitian dapat disebabkan oleh faktor klimatik dan faktor edafik yang bervariasi disetiap wilayah geografi (Ganguly, 2014). Faktor klimatik, misalnya intensitas cahaya, suhu, kelembapan, panjang hari, sedangkan faktor edafik adalah komposisi kimia dari tanah (salinitas) dan zat hara pada tanah (Waksmundzka-Hajnos dan Sherma, 2011).

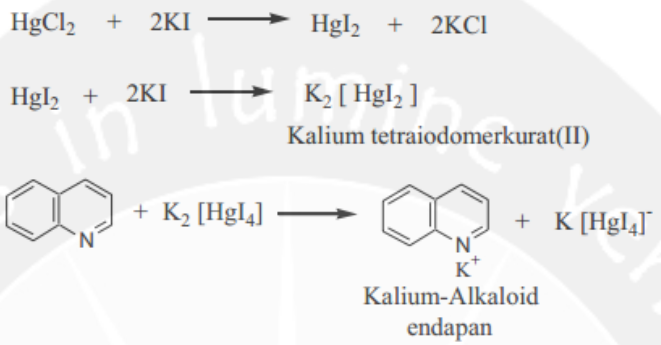
Berikut ini akan dibahas beberapa senyawa fitokimia yang terdapat pada ranting patah tulang:

1. Alkaloida

Alkaloida merupakan senyawa yang memiliki aktivitas fisiologi yang menonjol, dan digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Harborne, 1987). Alkaloida adalah senyawa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, yang biasanya berbentuk gabungan sebagai bagian dari sistem siklik, bersifat basa dan memiliki aktivitas farmakologis. Alkaloida merupakan senyawa padat berbentuk kritstal atau amorf, tidak berwarna, dan rasanya pahit. Alkaloida dalam bentuk bebas merupakan basa lemah yang sukar larut air tetapi mudah larut dalam pelarut organik. Identifikasi alkaloida biasanya menggunakan larutan pereaksi yang dapat membentuk endapan dengan alkaloida, misalnya pereaksi Meyer, Dragendorff, Wagner dan lain-lain (Lumbanraja, 2009).

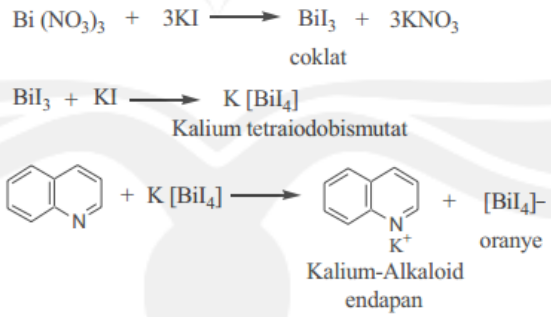
Pada pengujian alkaloida dengan menggunakan pereaksi Meyer, Dragendorff, dan Wagner akan terjadi reaksi pengendapan karena adanya penggantian ligan. Alkaloida mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas, sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam (McMurry dan Fay, 2004). Pada uji alkaloida dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloida akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloida yang mengendap (Marliana, dan kawan-kawan.,

2005). Reaksi pada uji alkaloida dengan pereaksi reagen Meyer ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi pada Uji Meyer
(Sumber: Marliana, dan kawan-kawan., 2005)

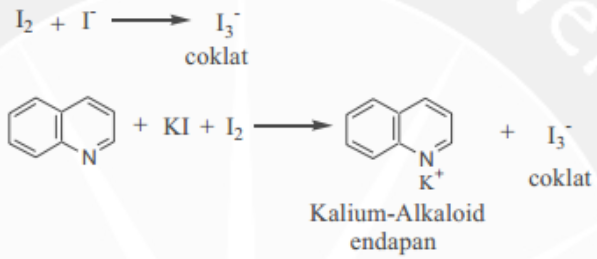
Pada uji alkaloida dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Marliana, dan kawan-kawan., 2005). Reaksi pada uji alkaloida dengan pereaksi reagen Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi pada Uji Dragendorff
(Sumber: Marliana, dan kawan-kawan., 2005)

Hasil positif alkaloida pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloida. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion

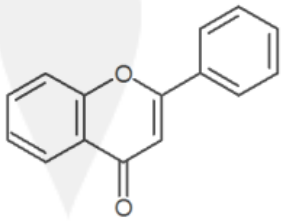
Iod dari kalium iodida menghasilkan ion triodida yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan nitrogen pada alkaloida membentuk kompleks kalium-alkaloida yang mengendap (Marliana, dan kawan-kawan., 2005). Reaksi pada uji alkaloida dengan pereaksi reagen Wagner ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi pada Uji Wagner
(Sumber: Marliana, dan kawan-kawan., 2005)

2. Flavonoida

Flavonoida adalah salah satu dari golongan fenol alam yang paling besar. Flavonoida mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, rumus kimia C_6-C_3-C_6 yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzene tersubtitusi) yang dihubungkan secara alifatis oleh tiga karbon seperti pada Gambar 7 (Lumbanraja, 2009).

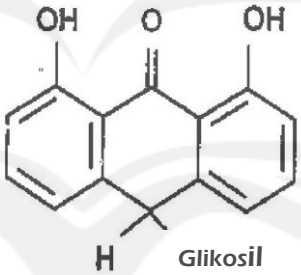


Gambar 7. Struktur Flavonoida
(Sumber : Anonim a, 2014)

Flavonoida umumnya terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoida. Hal ini menyebabkan banyaknya bentuk kombinasi yang terjadi di dalam tumbuhan, sehingga jarang sekali flavonoida ditemukan dalam keadaan tunggal (Harborne, 1987). Flavonoida dibagi menjadi 3 bentuk dasar, yaitu flavonoida, isoflavonoida, dan neoflavonoida (Grotewold, 2006). Flavonoida memiliki kemampuan antimikrobia yang sangat efektif (Upadhyay, dan kawan-kawan., 2010).

3. Glikosida

Glikosida merupakan senyawa yang terbentuk dari kondensasi antara gugus hidroksil pada karbon anomerik monosakarida atau residu monosakarida dengan senyawa kedua yang dapat bukan monosakarida lain (aglikon). Struktur kimia dari glikosida dapat dilihat pada Gambar 8 berikut ini:

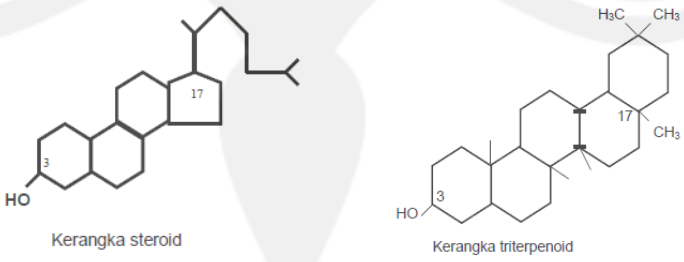


Gambar 8. Glikosida
(Sumber: Anonim, 2010)

Semua glikosida alam dapat terhidrolisis menjadi gula dan bukan gula dengan cara mendidihkannya bersama asam mineral. Biasanya, glikosida juga dapat terhidrolisis dengan mudah oleh enzim yang terdapat dalam jaringan tumbuhan yang sama (Nurhanifah, 2009). Glikosida terdiri dari C-Glikosida, N-Glikosida, S-Glikosida, O-Glikosida (Robinson, 1995).

4. Steroida/triterpenoida

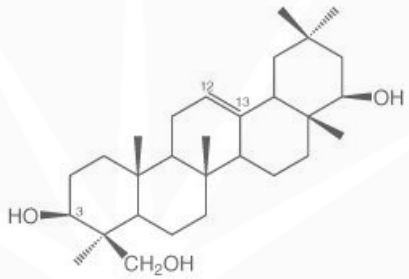
Steroida dalam tumbuhan biasanya dinamakan dengan sterol, karena praktis semua steroida tumbuhan berupa alkohol. Sterol adalah terpena yang kerangka dasarnya adalah cincin siklopentana perhidrofenantrena (Gambar 9) (Harborne, 1987). Triterpenoida (Gambar 9) adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik, kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Senyawa ini tidak berwarna, berbentuk kristal dan bersifat optis aktif. Identifikasi kedua senyawa ini menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard (Asetat anhidrid + asam sulfat pekat). Kebanyakan getah tanaman patah tulang mengandung banyak triterpenoida, sedangkan ranting patah tulang mengandung banyak steroida (Wal dan kawan-kawan, 2013). Pengujian steroida/triterpenoida didasarkan pada kemampuan senyawa untuk membentuk warna dengan asam sulfat pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (Sangi dan kawan-kawan., 2008).



Gambar 9. Steroida dan Triterpenoida
(Sumber: Amirt, 2002)

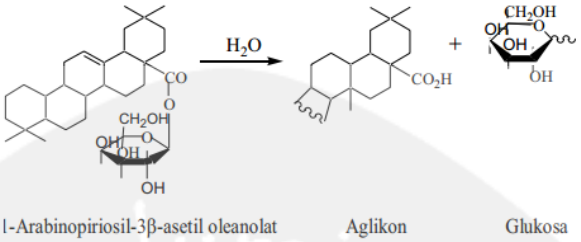
5. Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Beberapa saponin berfungsi sebagai antimikrobia. Sifat antimikrobia berasal dari aglikon saponin, yaitu sapogenin, misalnya steroid dan triterpenoida. Sapogenin dapat diperoleh dengan cara hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis menggunakan enzim. Sapogenin terdiri atas struktur terpen atau steroida (Robinson, 1995). Struktur kimia saponin seperti pada Gambar 10 berikut ini:



Gambar 10. Saponin
(Sumber: Absor, 2006)

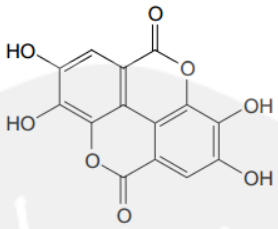
Saponin merupakan senyawa yang mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofobik. Pada saat digojok gugus hidrofilik akan berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofob akan berikatan dengan udara, sehingga membentuk buih (Kumalasari dan Sulistyani, 2011). Reaksi pembentukan busa pada uji Forth ini ditunjukan pada Gambar 11.



Gambar 11. Reaksi pada Uji Saponin
(Sumber: Marliana, dan kawan-kawan., 2005)

6. Tanin

Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas, yaitu tanin terkondensasi (*condensed tanins*) dan tanin-terhidrolisis (*hydrolysable tanins*) (Hagerman dan kawan-kawan., 1992 ; Harborne, 1987). Tanin-terhidrolisiskan merupakan derivat dari asam galat yang teresterkan (Xu dan kawan-kawan, 1991). Berdasarkan strukturnya, tanin ini dibedakan menjadi dua kelas, yaitu gallotanin dan ellagitanin. Perbedaan struktur keduanya adalah adanya ester asam galat pada gallotanin dan ester asam heksahidroksidifenat (HHDP) pada ellagitanin. Kedua ester asam tersebut berikatan dengan glukosa. Ellagitanin yang dihidrolisis akan menghasilkan asam elagat (Gambar 12) (Harborne, 1987).



Gambar 12. Asam elagat
(Sumber: Hernawan dan Setyawan, 2003)

Asam elagat adalah hasil peruraian glikosida tanin yang dapat digunakan sebagai antibakteri dan antifungi dengan adanya gugus –OH. Tanin merupakan senyawa yang tidak dapat dikristalkan dan membentuk senyawa tidak larut yang berwarna biru gelap atau hitam kehijauan dengan garam besi (Nurhanifah, 2009). Pengujian tanin dilakukan dengan melakukan penambahan besi (III) klorida. Perubahan warna ini terjadi ketika penambahan besi (III) klorida yang bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Pada penambahan besi (III) klorida pada ekstrak ranting patah tulang menghasilkan warna hijau kehitaman yang menunjukkan mengandung senyawa tanin terkondensasi (Sangi dan kawan-kawan., 2008).

F. Antimikrobia

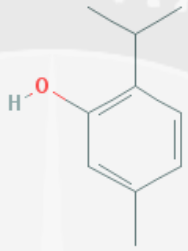
Antimikrobia meliputi antibakteri, antiprotozoa, antifungal, dan antivirus. Zat antimikrobia dalam pengobatan bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme infektif atau mencegah terjadinya infeksi. Antibakteri termasuk ke dalam antimikrobia yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Antifungal merupakan senyawa antimikrobia yang menghambat pertumbuhan jamur (Schunack dan kawan-kawan., 1990). Antibiotik mewakili kelompok terbesar dari zat

antimikrobia. Antimikrobia adalah zat biokimia yang diproduksi oleh mikroorganisme atau herba yang dalam jumlah kecil dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Antimikrobia memiliki suatu sifat toksisitas selektif, karena kelompok obat ini diproduksi oleh suatu mikroorganisme dan memiliki derajat toksisitas yang berbeda-beda terhadap mikroorganisme lain (Campbell, 2003).

Antimikrobia dapat ditemukan dalam berbagai sediaan, dan penggunaanya dapat melalui jalur topikal, oral, maupun intravena. Antimikrobia dari tumbuhan mengandung zat aktif yang dapat menimbulkan efek farmakologi, misalnya flavonoida, saponin, tanin, alkaloida, dll. Suatu tanaman dikatakan memiliki potensi yang tinggi sebagai antimikrobia jika pada konsentrasi rendah mempunyai daya hambat yang besar (Absor, 2006), sebagai contoh pada penelitian Anasta, dan kawan-kawan., (2014), daun binahong memiliki daya hambat 8,4 mm pada konsentrasi 0,2%; sedangkan Kusumaningtyas,dan kawan-kawan (2008) menyatakan, daun sirih memiliki daya hambat sebesar daun binahong baru pada konsentrasi 5%, pada konsentrasi yang sama Parahita (2013) meneliti daya hambat tanaman kemangi memperoleh hasil yang lebih rendah yaitu 7,7 mm. Dalam hal ini daun binahong dikatakan efektif karena dengan konsentrasi paling kecil dapat menghambat pertumbuhan mikrobia sebesar tanaman lain. Begitu pula dengan antimikrobia lain, salah satunya adalah timol yang berasal dari tumbuhan *Thymus sp*.

Timol ($C_{10}H_{14}O$) merupakan golongan fenol yang diperoleh dari minyak *Thyme* atau minyak atsiri lain yang digunakan sebagai antiseptik (antibakteri atau

antijamur). Nama lain dari timol adalah *2-Isopropyl-5-methylphenol, 5-Methyl-2-isopropylphenol, 6-Isopropyl-m-cresol, 3-p-Cymenol*. Kandungan timol berada ditanaman *Thymus serpyllum* L. *dan Thymus vulgaris* L (Tabel 4). Struktur kimia timol dapat dilihat pada Gambar 13 berikut ini:



Gambar 13. Bentuk 2 dimensi timol
(Sumber: Anonim, 2012)

Tabel 4. Konsentrasi Senyawa Timol pada Tanaman *Thymus sp*

Komponen	Konsentrasi
α- thujene	2.84
α- pinen	2.97
β pinen	0.71
Octan-1-en-0-o1	0.48
Mycrene	3.45
α- phellandrene	0.42
α- terpinene	2.69
p-cymene	9.91
Limonene	1.23
1,8-cincole	1.96
γ- terpinene	14.08
Cis-sabinen hidrat	0.19
Terpinolene	0.13
Linalool	3.99
Terpinen-4-ol	0.25
Timol metil eter	1.78
Timol	**46.21**
Carvacrol	2.44
Terpinil asetat	0.68
Eugenol	0.1
β- caryophilin	1.64
β- copaene	0.16
Metil eugenol	0.21

Lanjutan Tabel 4.

β- bourbonene	0.09
β- elemen	0.14
α- humulene	0.17
Germacrene D	0.4

Sumber: Shabnum dan Wagay, 2011

Pada Tabel 4 kandungan timol pada ekstrak *Thymus vulgaris* adalah 46,21 % dan ini merupakan komponen terbesar dari seluruh komponen ekstrak *Thymus vulgaris.* Menurut PubChem (2014), timol merupakan antibakteri dan antifungal. Timol saat ini sedang diuji cobakan untuk perawatan jerawat dan timol sudah terbukti dapat menghambat pertumbuhan jamur (PubChem, 2014). Cara kerja timol terhadap bakteri adalah menghancurkan dan mengendapkan dinding sel bakteri, sedangkan pada jamur timol menghambat kemampuan sel jamur untuk bertumbuh (Anonim b, 2014 ; PubChem, 2014). Menurut Shabnum dan Wagay (2011), daya hambat dari timol 0,5 % pada konsentrasi 50 µl memiliki daya hambat paling besar terhadap berbagai bakteri dan jamur. Kandungan antiseptik tersebut membuat timol sintetik menjadi alternatif pembanding dalam menghambat bakteri uji, karena sama-sama antimikrobia yang berasal dari tanaman.

G. Mikrobia Uji

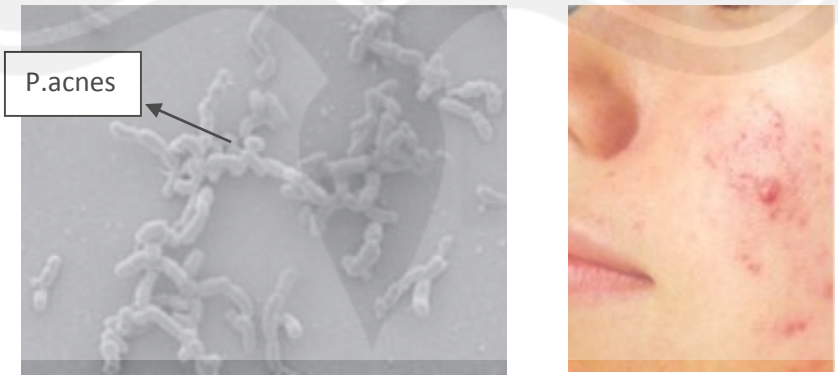
Mikrobia uji yang digunakan adalah *Propionibacterium acnes* dan *Candida albicans*. *Propionibacterium acnes* yang setelah ini disebut *P.acnes*, merupakan flora normal kelenjar philosebasea yang termasuk dalam genus bakteri *Corynebacterium* (dahulu)/*Propionibacterium* (sekarang) (Breed dan kawan-kawan, 1957). Bakteri penyebab jerawat ini merupakan Gram positif dan bersifat anaerob. *Propionibacterium acnes* termasuk flora normal kulit. Bakteri ini sebelumnya dikenal

dengan nama *Corynebacterium parvum*, yang berperan pada patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase yang memecah asam lemak bebas dari lipida kulit (NCBI, 2004).

Klasifikasi *Propionibacterium acnes* menurut (NCBI, 2004):

Kerajaan : Bacteria
Filum : Actinobacteria
Kelas : Actinobacteridae
Bangsa : Actinomycetales
Suku : Propionibacteriaceae
Marga : *Propionibacterium*
Jenis : *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes merupakan bakteri yang tumbuh di dalam pori-pori wajah, yang akan memakan sebum yang diproduksi oleh kelenjar sebaceous di pangkal rambut. Peranan *P.acnes* pada patogenesis jerawat adalah memecah trigliserida, salah satu komponen sebum, menjadi asam lemak bebas sehingga terjadi kolonisasi *P. acnes* yang memicu inflamasi. Selain itu, antibodi terhadap antigen dinding sel *P. acnes* meningkatkan respons inflamasi melalui aktivasi komplemen (Harper, 2004).



A B

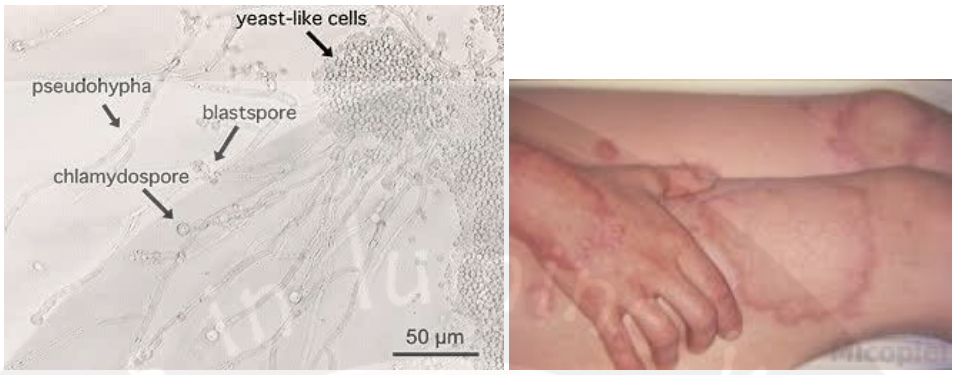
Gambar 14. A. Koloni bakteri *P.acnes* ; B. Jerawat
(Sumber: Holmberg dan kawan-kawan, 2009 ; Anonim a, 2014)

Propionibacterium acnes adalah anggota dari Gram positif. Ciri-ciri penting dari bakteri *P. acnes* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan Gram positif. Bakteri ini memiliki dinding sel yang tebal kaya akan peptidoglikan dan lipopolisakarida. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini suka tumbuh dalam lingkungan oksigen rendah. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang/filamen dengan bentuk kokoid (Breed dan kawan-kawan., 1957). Antibiotik yang biasa digunakan untuk membunuh *P.acnes* adalah tetrasiklin, Penisilin G, amoxsilin, eritromisin, kloramphenikol, clindamisin (Oprica, 2006).

Mikrobia uji kedua yaitu *Candida albicans* yang selanjutnya akan disebut *C.albicans*. *Candida albicans* adalah fungi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai penyakit pada manusia. *Candida albicans* dikenal sebagai fungi dimorfik (dapat berbentuk kapang/yeast) yang secara normal ada pada saluran pencernaan, saluran pernafasan bagian atas dan mukosa genital pada mamalia. *Candida albicans* sulit untuk diobati karena memiliki dinding sel yang kuat, terdiri dari 5 lapisan, sehingga sulit untuk ditembus oleh antimikrobia (Maharani, 2012).

Klasifikasi *C. albicans*: (Brown dan kawan-kawan., 2005)

Kerajaan : Fungi
Filum : Ascomycota
Subfilum : Saccharomycotina
Kelas : Saccharomycetes
Bangsa : Saccharomycetales
Suku : Saccharomycetaceae
Marga : *Candida*
Jenis : *Candida albicans*



A B

Gambar 15. A. Mikroskopis *C.albicans* ; B. Kandidiasis
(Sumber: Anonim, 2005 ; Anonim b, 2013)

Beberapa spesies *Candida* yang dikenal banyak menimbulkan penyakit baik pada manusia maupun hewan adalah *Candida albicans*. *Candida albicans* merupakan fungi opportunistik penyebab sariawan (Kumamoto dan Vinces, 2004), lesi pada kulit (Bae dan kawan-kawan., 2005), vulvavaginistis (Wilson, 2005), Candida pada urin (candiduria) (Kobayashi dan kawan-kawan., 2004), gastrointestinal kandidiasis yang dapat menyebabkan *gastric ulcer* (Brzozowski dan kawan-kawan., 2005), atau bahkan dapat menjadi komplikasi kanker (Dinubile dan kawan-kawan., 2005).

Diagnosis laboratorium dan pengobatan terhadap penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* belum memberikan hasil yang memuaskan (Ellepola dan Morrison, 2005). Resistensi terhadap antifungi juga sering terjadi (Ha dan White, 1999). Beberapa usaha dilakukan untuk memperbaiki perangkat diagnosis dan metode pengobatan. Salah satu pendekatan yang dilakukan adalah dengan memahami mekanisme infeksi *C. albicans.*

Candida albicans dapat tumbuh pada suhu 37^{o}C dalam kondisi aerob atau anaerob. Pada kondisi anaerob, *C. albicans* mempunyai waktu generasi yang lebih

panjang, yaitu 248 menit dibandingkan kondisi pertumbuhan aerob yang hanya 98 menit. Walaupun *C. albicans* tumbuh baik pada medium padat tetapi kecepatan pertumbuhan lebih tinggi pada medium cair dengan perlakuan penggojokkan pada suhu 37^{o}C. Pertumbuhan juga lebih cepat pada kondisi asam daripada pH normal atau alkali (Biswas dan Chaffin, 2005).

Pada medium *Sabaroud dextrose agar* atau *glucose-yeast extract-peptone water C. albicans* berbentuk bulat atau oval dengan ukuran (3,5-6) x (6-10) µm. Koloni berwarna krem, agak mengkilat dan halus (Lodder, 1970). Kemampunan *C. albicans* untuk tumbuh baik pada suhu 37^{o}C memungkinkannya untuk tumbuh pada sel hewan dan manusia, sedangkan bentuknya yang dapat berubah, bentuk khamir dan filamen, sangat berperan dalam proses infeksi ke tubuh inang.

H. Uji Potensi Antimikrobia

Potensi antimikrobia adalah ukuran kekuatan/daya hambat atau daya bunuh zat aktif terhadap mikrobia tertentu. Prinsip uji potensi antimikrobia berdasarkan Farmakope Indonesia edisi IV 1995 adalah estimasi dari potensi antimikrobia melalui perbandingan langsung antara sampel dengan antimikrobia standar yang telah disahkan penggunaannya (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Menurut Cappucino and Sherman (2011), metode yang digunakan untuk mengetahui potensi antimikrobia terhadap mikrobia uji disebut dengan metode Kirby-Baurer. Metode ini menggunakan metode difusi standar. Prinsip metode ini adalah menentukan keampuhan obat dengan mengukur diameter zona yang dihasilkan dari kekuatan antimikrobia menghambat bahkan membunuh mikrobia uji. Kriteria

kekuatan antimikrobia metode David Stout dalam Suryawiria (1978), adalah sebagai berikut:

1. Diameter zona hambat 10-20 mm: Antimikrobia kuat, misalnya ekstrak daun binahong (Anasta dan kawan-kawan., 2014) terhadap *Aeromonas hydrophilia* menghasilkan diameter 11,9 mm pada konsentrasi 0,8%, yang berarti antimikrobia kuat.
2. Diameter zona hambat 5-10 mm: Antimikrobia sedang, misalnya krim patah tulang (Absor, 2006) terhadap *Escherechia coli* menghasilkan diameter 9,56 mm, yang berarti antimikrobia sedang.
3. Diameter zona hambat 0-5 mm : Antimikrobia lemah, misalnya gel daun kemangi (Parahita, 2013) terhadap *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 2.5% menghasilkan daya hambat 4 mm yang berarti antimikrobia lemah.

Uji sensitivitas antimikrobia dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu:

1. Metode difusi agar

   Prinsip metode difusi agar adalah mengukur potensi antimikrobia berdasarkan pengamatan diameter daerah hambatan mikrobia sebagai akibat dari berdifusinya ekstrak dari titik awal pemberian ke daerah difusi. Metode difusi agar menggunakan lubang sumuran yang mengandung antimikrobia. Inkubasi yang dilakukan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Akibat sensitifnya ekstrak obat terhadap mikrobia maka setelah penginkubasian akan didapatkan

diameter hambat jernih sebagai daya antimikrobia (Jawetz dan kawan-kawan., 1996).

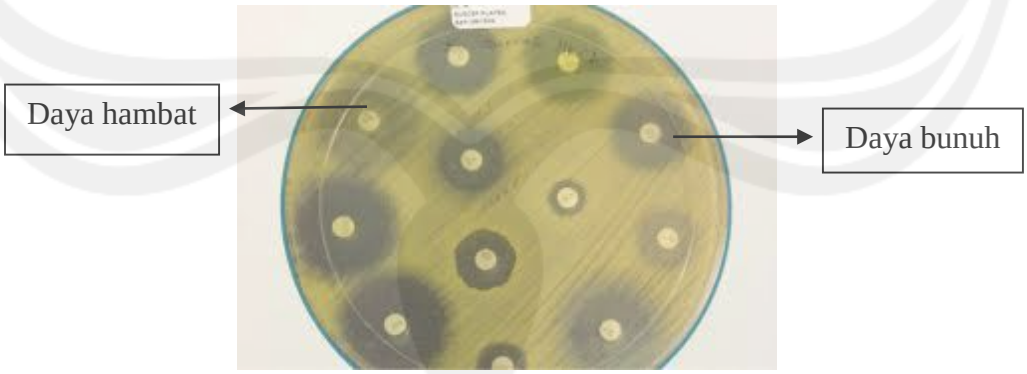
2. Metode dilusi agar

   Konsentrasi larutan uji yang sudah disiapkan ditambahkan suspensi mikrobia dalam medium cair. Campuran tersebut diinkubasi dan diamati pertumbuhan mikrobia uji berdasarkan kekeruhan medium. Medium yang kekeruhannya paling tipis merupakan medium dengan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan mikrobia. Potensi antimikrobia dapat ditentukan dengan melihat konsentrasi terendah yang dapat menghambat mikrobia (McKane dan Kandel, 1996).

Faktor-faktor yang memengaruhi metode difusi agar (Rostinawati, 2009), yaitu :

a. Pradifusi, perbedaan waktu pradifusi memengaruhi jarak difusi dari zat uji
b. Ketebalan medium agar adalah penting untuk memperoleh sensitivitas yang optimal. Perbedaan ketebalan medium agar memengaruhi difusi dari zat uji ke dalam agar, sehingga akan memengaruhi diameter hambat. Makin tebal medium yang digunakan akan makin kecil diameter hambat yang terjadi.
c. Kerapatan inokulum, ukuran inokulum merupakan faktor terpenting yang memengaruhi lebar daerah hambat, jumlah inokulum yang lebih sedikit menyebabkan obat dapat berdifusi lebih jauh, sehingga daerah yang dihasilkan lebih besar, daripada jumlah inokulum lebih besar maka akan dihasilkan daerah hambat yang kecil.

d. Komposisi medium agar, perubahan komposisi medium dapat mengubah sifat medium, sehingga jarak difusi berubah. Medium agar berpengaruh terhadap ukuran daerah hambat dalam hal memengaruhi aktivitas beberapa bakteri, memengaruhi kecepatan difusi antibakteri dan memengaruhi kecepatan pertumbuhan antibakteri.
e. Suhu inkubasi, kebanyakan bakteri tumbuh baik pada suhu 37°C.
f. Waktu inkubasi disesuaikan dengan pertumbuhan bakteri, karena luas daerah hambat ditentukan beberapa jam pertama, setelah diinokulasikan pada medium agar, maka daerah hambat dapat diamati segera setelah adanya pertumbuhan bakteri.
g. Pengaruh pH, adanya perbedaan pH medium yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan jumlah zat uji yang berdifusi, pH juga menentukan jumlah molekul zat uji yang mengion. Selain itu pH berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri.



Gambar 16. Hasil Uji Potensi Antimikorbia
(Sumber: Anonim, 2004)

I. Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah senyawa antimikrobia yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan mikrobia uji (Cappuccino dan Sherman, 2011). Menurut Wattimena dan kawan-kawan, (1991), suatu bakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi bila KHM terjadi pada kadar antimikrobia yang rendah tetapi mempunyai daya hambat yang tinggi. Penetapan konsentrasi daya hambat minimum dapat dilakukan dengan melakukan pengenceran terhadap konsentrasi paling efektif yang dihasilkan dari uji potensi antimikrobia, yang kemudian diturunkan konsentrasinya menjadi deretan konsentrasi antimikrobia untuk mendapatkan konsentrasi paling kecil dengan daya hambat tetap tinggi (Wattimena dan kawan-kawan, 1991).

KHM yang dilakukan pada penelitian Kusumaningtyas dan kawan-kawan, (2008) dan Absor (2006) menggunakan metode Kirby-Baurer. Hasil yang diperoleh dari KHM ekstrak patah tulang terhadap bakteri *Bacillus substillis* dengan metode tersebut adalah 10 mg/ml (Absor, 2006), sedangkan untuk ekstrak daun sirih terhadap *C.albicans* dengan metode tersebut adalah 10% (Kusumaningtyas, dan kawan-kawan., 2008). Aktivitas antimikrobia ditentukan oleh diameter daya hambat, metode uji dan ditentukan pula oleh KHM. Menurut Rostinawati (2009), penetapan KHM dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu :

a. Cara cair

Pada cara ini digunakan medium cair yang telah ditambahkan zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau jamur dengan pengenceran tertentu kemudian diinokulasikan biakan bakteri atau jamur dalam jumlah yang sama. Respon zat uji ditandai dengan kejernihan atau kekeruhan pada tabung setelah diinkubasi.

b. Cara padat

Pada cara ini digunakan medium padat yang telah dicampur dengan larutan zat uji dengan berbagai konsentrasi. Dengan cara ini satu cawan petri dapat digores lebih dari satu jenis mikrobia untuk memperoleh nilai KHM.

J. Sediaan Krim

Krim (*cremores*) adalah bentuk sediaan setengah padat berupa emulsi yang mengandung satu atau lebih bahan obat yang terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai dan mengandung air tidak kurang dari 60% (Syamsuni, 2005). Krim digunakan sebagai bahan pembawa obat untuk pengobatan kulit, bahan pelembut kulit, dan pelindung kulit, yaitu mencegah kontak permukaan kulit dengan larutan berair dan rangsang kulit (Anief, 2000).

Krim mempunyai 2 tipe, yaitu krim tipe minyak dalam air (M/A) dan tipe air dalam minyak (A/M). Krim yang dapat dicuci dengan air ditujukan untuk penggunakaan kosmetik dan estetika. Menurut Manurung (2012), terdapat perbedaan signifikan dari krim M/A dan A/M, yaitu daya lekat yang dimiliki tipe M/A lebih lama jika dibandingkan dengan krim tipe A/M. Nilai pH pada krim

tipe M/A hampir mendekati pH kulit sedangkan krim tipe A/M memiliki pH yang cukup basa. Krim dengan tipe M/A memiliki kemampuan proteksi dan daya sebar yang baik, namun tidak demikian dengan krim tipe A/M. Dalam pembuatan krim dari formula dengan tipe emulsi minyak dalam air (M/A), metode pembuatan secara umum meliputi proses peleburan, emulsifikasi, dan saponifikasi (Syamsuni, 2005 dan Ansel, 1989).

Stabilitas krim akan rusak apabila sistem campurannya terganggu oleh perubahan suhu dan komposisi, misalnya penambahan salah satu fase secara berlebihan. Pengenceran krim hanya dapat dilakukan jika sesuai dengan pengenceran yang cocok dan dilakukan dengan teknik aseptis. Krim yang sudah diencerkan harus digunakan dalam waktu satu bulan (Syamsuni, 2005).

Bahan pengemulsi krim harus disesuaikan dengan jenis dan sifat dari krim yang akan dibuat. Bahan pengemulsi yang dapat digunakan adalah emulgid, lemak bulu domba, setasium, setilalkohol, stearilalkohol, golongan sorbitan, polisorbat, PEG, dan sabun. Bahan pengawet yang sering digunakan adalah metilparaben (nipagin 0,12-0,18% dan propilparaben (nipasol) 0,02-0,05% (Syamsuni, 2005).

K. Hipotesis

1. Ekstrak dan krim ekstrak aseton ranting patah tulang memiliki sifat antimikrobia terhadap *P.acnes* dan *C.albicans*.
2. Konsentrasi antimikrobia ekstrak dan krim ekstrak aseton ranting patah tulang yang efektif menghambat pertumbuhan *P.acnes* dan *C.albicans* adalah 10%.