

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tahi Kotok (*Tagetes erecta* L.)

Tanaman tahi kotok sering ditanam di halaman rumah maupun taman sebagai tanaman hias. Tahi kotok dapat tumbuh pada tempat terbuka yang terkena sinar matahari langsung dan berudara lembap. Tahi kotok mempunyai nama daerah seperti ades, cocok botol, saes (Sunda); kenikir dan tembelekan (Jawa) (Dalimartha, 2003).

Meskipun tanaman tahi kotok dikenal dengan sebutan kenikir, namun perlu diingat bahwa kenikir merupakan jenis tanaman yang berbeda dan memiliki nama latin tersendiri yaitu *Cosmos caudatus* yang kerap dijadikan sebagai pelengkap sajian makanan tradisional pecel khas Jawa. Sebutan untuk bunga tahi kotok juga sering disamakan dengan *Lantana camara* (bunga tembelekan) karena keduanya memiliki aroma yang tidak sedap, padahal kedua tanaman tersebut merupakan dua spesies yang berbeda. Tahi kotok merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko dan Amerika Tengah, populer dengan sebutan *African Marigold*. Di Indonesia, tanaman ini dimanfaatkan secara umum sebagai tanaman obat. Warna bunga yang mencolok menjadikan tahi kotok sebagai tanaman hias pekarangan (Trubus, 2013).

2.1.1 Taksonomi *Tagetes erecta* L.

Kingdom	: Plantae
Superdivisio	: Spermatophyta
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida

Subkelas : Asteridae
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae
Genus : *Tagetes*
Spesies : *Tagetes erecta* L.

(Plantamor, 2012).

2.1.2 Morfologi dan Karakteristik Tahi Kotok (*Tagetes erecta* L.)

Tahi Kotok (*Tagetes erecta* L.) mempunyai beberapa karakteristik sebagai berikut :

- Tanaman herba ini merupakan jenis tanaman semusim dengan umur rata-rata 5—12 bulan (Ratnasari, 2007).
- Tinggi tanaman antara 0,5—1,3 meter. Batang berbentuk bulat, tegak, beralur, bercabang, berwarna putih kehijauan, dan berbau tidak enak (Dalimartha, 2003).
- Daun tunggal, tumbuh menyirip menyerupai daun majemuk menyirip gasal. Tajuk anak daun pada kedua sisi 5—9 buah, bentuk daun memanjang dengan bintik kelenjar bulat dekat tepinya, berwarna hijau dengan tepi daun bergerigi (Dalimartha, 2003).
- Bunga tunggal, berbentuk bonggol yang dikelilingi oleh daun pelindung, warnanya kuning atau oranye dan berbau khas. Kepala putik bercabang dua, benang sari berwarna kuning atau ungu (Utami, 2008).
- Buah berbentuk lonceng, keras, bertipe buah kurung dengan panjang 1—1,5 cm (Utami, 2008).
- Biji berbentuk jarum dan berwarna hitam (Utami, 2008).
- Berakar tunggang (Utami, 2008).



Gambar 2.1 Tumbuhan Tahi Kotok (*Tagetes erecta*) (Gopi, et al., 2012)

2.1.3 Habitat Persebaran dan Pemanfaatan Tahi Kotok

Tanaman tahi kotok terdistribusi secara luas di Asia Timur dan Asia Tenggara. Di Indonesia, tahi kotok merupakan tanaman yang mudah tumbuh sehingga sering dimanfaatkan sebagai tanaman pagar. Tahi kotok merupakan tumbuhan tahunan, dapat tumbuh pada tanah dengan pH netral di daerah panas, cukup sinar matahari, dan drainase yang baik. Di Filipina, *Tagetes erecta* digunakan untuk mengobati anemia, rematik, menstruasi tidak lancar, dan sakit pada tulang. Kandungan *karotenoid* pada bunga marigold di Kanada dan Meksiko dimanfaatkan sebagai pakan ternak untuk meningkatkan kandungan vitamin A dan antioksidan pada telur ayam (Winarto, 2011). Di India, ekstrak daunnya digunakan untuk mengatasi wasir (Patil, et al., 2011).

Menurut Sudarmo, dkk. (2014) *Tagetes erecta* mempunyai sifat sebagai *nematisida*, *insektisida*, *fungisida*, *antifeedant* dan *repellent* (penangkal) sehingga tanaman ini dapat dijadikan ramuan peptisida nabati untuk membunuh hama tanaman. Sifat kimiawi dari tanaman ini menimbulkan rasa pahit, berbau khas, sejuk, sehingga berkhasiat sebagai *antiinflamasi*, *ekspektorans*, dan

antitusif (Wijayakusuma, 2000). Kandungan *pyrethrin* dan minyak menguapnya secara *in vitro* berkhasiat sebagai bakterisidal dan fungisidal (Dalimartha, 2003).

2.1.4 Kandungan Kimia Bunga Tahi Kotok

Kandungan kimia yang terdapat pada bunga tahi kotok berdasarkan penelitian terdahulu bahwa bunga *Tagetes erecta* terbukti mengandung *flavonoid* sebanyak 9—22% (Vasudevan, *et al.*, 1997; Rhama, *et al.*, 2011), *karotenoid* 85—95%, *steroid*, *triterpenoid*, *protein*, *tanin* (Chivde, *et al.*, 2011), *terpenoid* sebanyak 4,4—15,8%, *saponin* (Vasudevan, *et al.*, 1997; Giri, *et al.*, 2011), *glikosida* (Nikken, *et al.*, 2009).

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa kelompok besar yang terdapat pada tanaman tinggi maupun pendek. *Flavonoid* menunjukkan pengaruhnya dalam berbagai fungsi biologis seperti: permeabilitas kapiler, proses sekresi seluler dalam respon inflamasi dan penghambatan enzim, sebagai reseptor dan karier. Aktivitas penghambat oleh *flavonoid* melawan bakteri dan ragi telah diselidiki oleh sejumlah peneliti, terutama di Amerika Latin (Sanches, *et al.*, 2005). Lebih dari empat ratus *flavonoid* telah diidentifikasi pada tumbuhan (Rhama, *et al.*, 2011).

Flavonoid merupakan turunan dari senyawa *fenol*. Aktivitas biologis senyawa *fenol* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan merusak dinding sel bakteri yang terdiri dari lipid dan asam amino yang akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa *fenol*. Rusaknya dinding sel mengakibatkan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri dan selanjutnya akan berinteraksi dengan DNA pada inti sel dan merusak struktur lipid DNA bakteri sehingga inti sel bakteri akan lisis.

Selain itu *fenol* juga dapat menyebabkan perubahan mekanisme permeabilitas *mikrosom*, *lisosom*, dan dinding sel yang kemudian menyebabkan kematian sel (Darwis, dkk., 2013). Kemungkinan lain adalah *flavonoid* berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi sel mikroorganisme dan penghambatan siklus sel mikroba (Putra, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Rhama, *et al.* (2011) melaporkan bahwa terdapat aktivitas antibakterial pada berbagai pelarut bunga *Tagetes erecta* yang berbeda melawan *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus mutans*, dan *Streptococcus pyogenes*. Peneliti menjelaskan bahwa kandungan *flavonoid* (10mg/100ml) yang diisolasi dan diidentifikasi sebagai *patulitrin*, memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap semua strain yang diuji dibandingkan dengan antibiotik *tetracycline*, dengan menunjukkan zona penghambatan maksimum pada *Klebsiella pneumoniae* (29,50mm) dan minimum pada *Pseudomonas aeruginosa* (21,00mm). *Flavonoid patulitrin* sangat efektif dalam membunuh patogen dan salah satu elemen potensial yang digunakan untuk teraputik.

b. Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa yang berasal dari tumbuhan, berasa pahit dan kelat, yang bereaksi dengan dan menggumpalkan protein, atau berbagai senyawa organik lainnya termasuk asam amino dan alkaloid. Oleh karena itu sifat pengelat atau pengerut (*astringensia*) itu sendiri banyak tumbuhan yang mengandung *tanin* dijadikan bahan sebagai obat-obatan (Ryzki, 2013).

Senyawa *tanin* adalah senyawa fenolik kompleks yang mengandung gugus hidroksil. Karena bersifat fenolik maka *tanin* mempunyai mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri yaitu dengan memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol dari senyawa *tanin*. *Tanin* mempunyai kemampuan mengikat protein sehingga membentuk ikatan kompleks *tanin*-protein. Hal ini menyebabkan mengerutnya dinding sel sehingga mengganggu permeabilitas sel yang diakibatkan terganggunya transport nutrisi sehingga pertumbuhan sel terhambat atau bahkan menyebabkan kematian sel (Darwis, dkk., 2013). Aktivitas antimikroba dari *tanin* yang lain adalah kemampuannya untuk menginaktivasi *adhesin* dan enzim serta menghambat pertumbuhan dan kerja enzim *protease* dari bakteri (Cowan, 1999).

c. Terpenoid

Terpena dan turunannya, yaitu *terpenoid*, merupakan komponen terpenting zat-zat mudah menguap yang terdapat dalam bunga, daun, akar, dan kayu dari berbagai jenis tanaman. Sebagian besar *terpenoid* dipergunakan dalam berbagai industri parfum dan makanan. Beberapa *terpenoid* merupakan prasad biologi untuk beberapa senyawa yang penting bagi tubuh kita. Dikenal pula beberapa *terpenoid* yang mempunyai khasiat sebagai obat (Sumardjo, 2008).

Minyak atsiri, minyak esensial, minyak terpenen, atau minyak etiris, merupakan golongan senyawa *terpenoid* yang berperan sebagai antibakteri dengan cara senyawa ini berikatan dengan *lipid* dan protein yang terdapat pada dinding sel. Reaksi ini dapat mengganggu proses terbentuknya

dinding sel sehingga mengakibatkan terganggunya transport nutrisi yang penting bagi pertumbuhan bakteri (Darwis, *dkk.*, 2013). Terpenoid dapat terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel bakteri dan menyebabkan terganggunya struktur dan fungsi dari membran sel karena terjadinya ekspansi atau pembengkakan di dalam sel dan perubahan permeabilitas pada membran sel mikroba (Cowan, 1999)

d. Saponin

Saponin adalah senyawa turunan glikosida yang banyak terdapat di spesies tumbuhan pada hampir 100 *family* (Sarker, *et al.*, 2006). Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa jika dikocok dalam air dan menghemolisis sel darah (Robinson, 1995). Saponin telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti insektisida (toksik untuk serangga, parasit, cacing, moluska, dan ikan), antijamur, antivirus, dan antibakteri. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri meliputi penghambatan kolonisasi bakteri, penurunan tegangan permukaan medium ekstraseluler, atau dengan cara melisis membran sel bakteri (Zahro, *dkk.*, 2013).

Cara kerja *saponin* dalam mengganggu permeabilitas membran sel bakteri adalah dengan cara menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, dan nukleotida (Ganiswara, 1995). Membran sitoplasma bekerja untuk mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar-masuknya bahan-bahan lain. Kerusakan pada membran akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Sifat *saponin* dengan

cara menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri karena saponin memiliki komponen aktif *aglycone* yang bersifat membranolitik. Setelah tegangan permukaan dinding sel bakteri menurun, *saponin* membentuk ikatan kompleks dengan sterol yang menyebabkan pembentukan *single ion channel*. Adanya ion tersebut menyebabkan ketidakstabilan membran sel sehingga menghambat aktivitas enzim, terutama enzim yang berperan dalam transpor ion yang sangat berperan dalam kehidupan bakteri (Zahro, dkk., 2013).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus spp adalah sel sferis gram positif, biasanya tersusun dalam kelompok seperti anggur yang tidak teratur. Beberapa tipe *staphylococcus* merupakan flora normal kulit dan membran mukosa manusia, tipe lainnya dapat menimbulkan supurasi, membentuk abses, berbagai infeksi piogenik, dan bahkan septikemia yang fatal. *Staphylococcus aureus* bersifat koagulase-positif dan merupakan patogen utama pada manusia. Hampir semua orang pernah mengalami infeksi *Staphylococcus aureus* selama hidupnya, dengan derajat keparahan yang beragam, dari keracunan makanan atau infeksi kulit yang ringan hingga infeksi berat yang mengancam jiwa (Brooks, et al., 2007).

2.2.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

Kingdom	: Procaryotes
Division	: Bacteria
Part 14	: Gram positif, kokus, aerob, dan aerob fakultatif
Ordo	: Eubacteriales
Family I	: Micrococcaceae

Genus II : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus aureus*

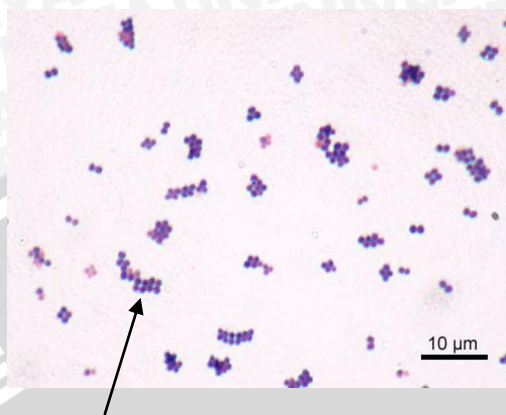
(Dzen, dkk., 2003; Warsa, 1994).

2.2.2 Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, non-motil, berbentuk kokus, dan tidak membentuk spora. Suhu pertumbuhannya berkisar antara 7—48°C dengan pertumbuhan optimal terjadi pada suhu 37°C. Bakteri ini tumbuh pada kisaran pH 4,0—9,3 dengan pH optimalnya 7,0—7,5 kisaran nilai pH untuk mengetahui pembentukan enterotoksin dan toksin yang diproduksi akan lebih sedikit pada pH di bawah 6,0 (WHO, 2005). Pertumbuhan terbaik dan khas ialah pada suasana aerob, *staphylococcus* pun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen saja (Warsa, 1994).

Warna khas dari *Staphylococcus aureus* ialah kuning keemasan, hanya intensitas warnanya dapat bervariasi. Diameter kuman antara 0,8—1,0 mikron. Pada persediaan langsung yang berasal dari nanah, koloni terlihat berpasangan, menggerombol, dan tersusun seperti rantai pendek. Susunan gerombolan yang tidak teratur biasanya ditemukan pada sediaan dari perbenihan padat, sedangkan dari perbenihan kaldu koloni ditemukan tersendiri atau tersusun sebagai rantai pendek. Pada lempeng agar, koloninya berbentuk bulat dengan diameter 1—2 mm, cembung, buram, mengkilat, konsistensinya lunak, dan dalam suasana anaerob dengan suhu 37°C tidak terdapat pembentukan pigmen namun apabila diatur pada suhu kamar (20—25°C) maka pembentukan pigmennya sangat baik. Pada lempeng agar darah, umumnya koloni lebih besar

namun pembentukan pigmennya kurang subur. Koloni yang masih sangat muda tidak berwarna, pigmen ini termasuk dalam golongan lipokhrom (Warsa, 1994).



Gambar 2.2 Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus* yang Dilihat dari Mikroskop dengan Pembesaran 1000x (Hale, 2013). Keterangan : Hasil menunjukkan bakteri gram positif yang ditandai dengan terlihatnya warna ungu pada koloni dan koloni berbentuk bulat, bergerombol seperti buah anggur.

2.2.3 Perbenihan *Staphylococcus aureus*

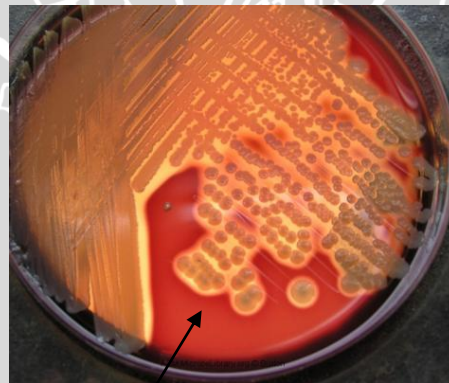
Pada umumnya untuk membiakkan *Staphylococcus aureus* memerlukan medium yang mengandung asam amino dan vitamin-vitamin, misalnya: *threonin*, asam *nikotinat*, dan *biotin* (Dzen, dkk., 2003). Medium-medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi, misalnya:

a. *Blood Agar Plate (BAP)*

Perbenihan dengan cara ini digunakan untuk mengisolasi dan membedakan antara bakteri dengan kemampuannya untuk melisis sel darah merah (hemolisis). *Blood Agar* adalah media yang berlimpah nutrisi digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri yang diteliti pada spesimen klinis, termasuk yang diambil dari kulit, hidung, tenggorokan, cairan serebrospinal, dan darah. *Blood Agar* dapat membedakan kemampuan bakteri dalam melisis sel darah merah. Pada β -hemolisis, bakteri mengeluarkan enzim yang dapat membongkar sel darah merah, sebuah zona yang jelas muncul disekitar koloni bakteri. Pada α -hemolisis,

gangguan parsial sel darah merah dari hasil bakteri membentuk warna kehijauan di sekitar koloni. Bakteri non-hemolitik tidak dapat merusak sel darah merah dan terkadang disebut sebagai γ -hemolisis (Lammert, 2007).

Bahan yang ditanam pada lempeng agar darah akan menghasilkan koloni yang khas setelah pengamatan selama 18 jam pada suhu 37°C, tetapi hemolisis dan pembentukan pigmen baru terlihat setelah beberapa hari dibiarkan pada suhu kamar yang optimal. Jika bahan mengandung bermacam-macam kuman, dapat dipakai suatu perbenihan yang mengandung NaCl 10%. Pada suatu perbenihan yang mengandung telurit, *Staphylococcus koagulosa* positif membentuk koloni yang berwarna hitam karena dapat mereduksi telurit (Warsa, 1994).



Gambar 2.3 Kultur *Staphylococcus aureus* pada Blood Agar Plate (Buxton, 2005). Keterangan: Hasil menunjukkan koloni terlihat besar dan subur.

b. Medium selektif *Manitol Salt Agar (MSA)*

Perbenihan dengan menggunakan cara ini digunakan untuk mengisolasi bakteri berdasarkan toleransinya terhadap garam dan membedakan antara isolat pada fermentasi monitol. *Manitol salt agar* merupakan media selektif karena hanya bakteri dengan NaCl 7,5% yang akan tumbuh di medium. *Staphylococcus* merupakan gram positif yang

toleran terhadap garam. Produksi asam dari fermentasi monitol dapat menurunkan indikator pH fenol merah ke kuning. *Staphylococcus* patogen tidak memiliki zona kuning yang mengelilingi koloni mereka (Lammert, 2007). Perbenihan *Monitol Salt Agar* digunakan untuk memindai *Staphylococcus aureus* yang berasal dari hidung (Brooks, et al., 2007).



Gambar 2.4 Perbenihan *Staphylococcus aureus* pada *Manitol Salt Agar* (Menunjukkan Medium Berwarna Kuning) (Ho and Chew, 2014).

c. *Nutrient Agar Plate (NAP)*

Nutrient Agar Plate merupakan media yang sering digunakan untuk isolasi dan pemurniaan kultur. *Nutrient Agar* mengandung banyak nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri pada budidaya mikroba. Bahan yang digunakan pada *Nutrient Agar* yaitu (Aryal, 2015):

1) 0,5% pepton

Pepton merupakan enzim pencernaan pada protein hewani. Pepton adalah sumber utama pembentukan nitrogen organik untuk mengontrol pH bakteri.

2) 0,3% ekstrak daging sapi

Ekstrak tersebut membantu menyediakan vitamin, karbohidrat, senyawa nitrogen organik, dan garam yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri.

3) 1,5% agar

Sebagai agen pemat.

4) Air suling

Agen pendistribusi bahan makanan untuk pertumbuhan bakteri.

Staphylococcus aureus akan membentuk pigmen berwarna kuning emas apabila dieramkan di medium NAP pada suhu kamar (20°C).

Pigmen tersebut mempunyai sifat-sifat (Dzen, dkk., 2003):

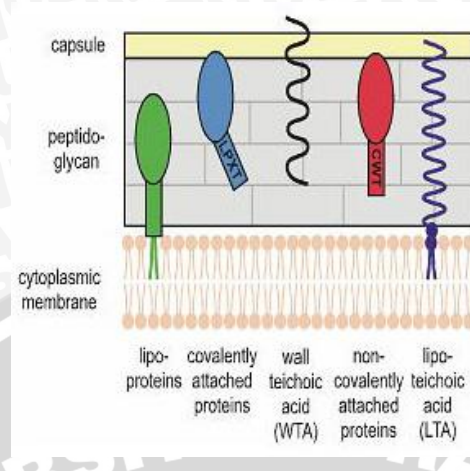
- 1) Mudah larut dalam alkohol, eter, dan benzen
- 2) Termasuk bahan yang bersifat lipokrom
- 3) Tetap tinggal dalam koloni bakteri
- 4) Tidak berdifusi kedalam medium



Gambar 2.5 Perbenihan *Staphylococcus aureus* pada NAP (Nutrient Agar Plate) (Aryal, 2015). Keterangan: Koloni berbentuk bulat, cembung, dan mengkilat.

2.2.4 Struktur Dinding Sel

Dinding sel *Staphylococcus aureus* terdiri dari tiga lapisan, yaitu: Kapsul luar polisakarida, lapisan peptidoglikan, dan lapisan terdalam yaitu membran sitoplasma. Pada struktur tersebut, protein dan asam *teichoic* tertanam dan menonjol dari dinding sel pada bagian luarnya, dan membentuk *fuzzy coat*. Kapsul bakteri *Staphylococcus aureus* sangat tipis dan hanya terlihat di bawah mikroskop elektron (Modric, 2011)

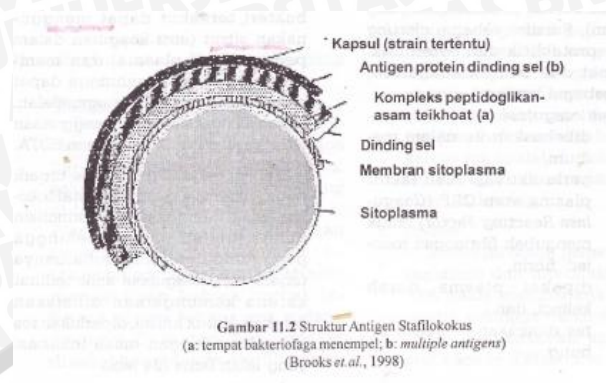


Gambar 2.6 Struktur Dinding Sel *Staphylococcus aureus* (Modric, 2011)

2.2.5 Struktur Antigen

Bakteri *staphylococcus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigen. Bahan-bahan ekstraseluler yang dibuat juga bersifat antigenik. Polisakarida yang ditemukan pada jenis yang virulen disebut polisakarida A, dan yang ditemukan pada jenis yang tidak patogen disebut polisakarida B (Warsa, 1994).

Protein A adalah komponen dinding sel pada strain *Staphylococcus aureus* yang berikatan dengan bagian Fc dari molekul IgG kecuali IgG3. Protein A menjadi reagen yang penting dalam imunologi dan teknologi laboratorium diagnostik, misalnya protein A yang berikatan dengan IgG yang berhadapan dengan antigen bakteri spesifik akan mengaglutinasi bakteri yang memiliki antigen tersebut “koaglutinasi”. Beberapa strain *Staphylococcus aureus* memiliki kapsul yang menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear kecuali terdapat antibiotik spesifik. Sebagian besar strain *Staphylococcus aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan dinding sel, koagulase terikat dengan fibrinogen secara nonenzimatik sehingga menyebabkan agregasi bakteri (Brooks, et al., 2007).



Gambar 2.7 Struktur Antigen *Staphylococcus* (Dzen, dkk., 2003)

2.2.6 Daya tahan

Staphylococcus merupakan bakteri yang paling tahan terhadap bahan-bahan kimia. Dalam suhu kamar pada agar miring atau keadaan beku, bakteri tersebut tahan hidup sampai beberapa bulan, sedangkan dalam keadaan kering pada pus dapat hidup 14—16 minggu. Bakteri ini juga relatif tahan terhadap pemanasan 60°C selama 30 menit. Daya tahan terhadap bahan kimia bervariasi, misalnya dalam fenol 2% mati dalam waktu 15 menit, sedangkan dalam hidrogen peroksida 3% mati dalam waktu 3 menit dan dalam *tinctura iodii* mati dalam waktu 1 menit (Dzen, dkk., 2003).

2.2.7 Metabolit *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus dapat menyebabkan penyakit baik melalui kemampuannya untuk berkembang biak dan menyebar luas di jaringan serta dengan cara menghasilkan berbagai substansi ekstraseluler. Berbagai substansi tersebut adalah enzim dan lainnya dianggap sebagai toksin, tetapi dapat berfungsi sebagai enzim (Brooks, et al., 2007), seperti:

1. Katalase

Enzim ini dibuat oleh *staphylococcus* dengan menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Adanya enzim ini dapat menaikkan ketahanan hidup intraseluler, untuk mengetahui jika pada koloni *staphylococcus* yang berumur 24 jam jika dituangi H_2O_2 3% dapat timbul gelembung-gelembung udara. Tes uji katalase untuk membedakan *staphylococcus* yang positif dengan *streptococcus* yang negatif (Warsa, 1994; Behrman, et al., 1999; Brooks, et al., 2007).

2. Koagulase dan Faktor Penggumpal

Koagulase adalah suatu antigen protein yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*, suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat atau sitrat. Koagulase berikatan dengan protrombin lalu menjadi aktif secara enzimatis dan menginisiasi polimerasi fibrin. Tes koagulase penting untuk menentukan patogenisitas *staphylococcus*. Memproduksi koagulase dianggap sama dengan memiliki potensi menjadi patogen invasif. Pada umumnya *Staphylococcus aureus* memberikan tes koagulase yang positif. Faktor penggumpal adalah kandungan permukaan *Staphylococcus aureus* yang berfungsi melekatkan organisme ke fibrin atau fibrinogen pada saat berada di dalam plasma. Faktor penggumpal berbeda dengan koagulase (Dzen, dkk., 2003; Brooks, et al., 2007).

3. Enzim lain

Enzim-enzim lain yang dihasilkan oleh *staphylococcus* antara lain adalah:

a. Hialuronidase

Enzim ini dihasilkan oleh 93,6% jenis koagulosa positif. Penyebaran kuman dipermudah dengan adanya enzim ini, dengan menghasilkan hialuronidase maka bakteri bersifat invasif. Enzim ini sering disebut sebagai *spreading factor*. Sifat ini terjadi pada fase awal infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan (Warsa, 1994; Dzen, dkk., 2003).

b. Stafilokinase atau Fibrinolisin

Metabolit tersebut 80% dihasilkan oleh galur koagulase positif dan koagulase negatif. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (*heat labile*). Enzim ini dapat melisiskan bekuan darah dalam pembuluh darah yang sedang meradang sehingga bagian-bagian dari bekuan yang penuh kuman terlepas dan menyebabkan terjadinya lesi metastatik di lain tempat (Warsa, 1994; Dzen, dkk., 2003).

c. Gelatinasa dan Proteasa

Gelatinasa merupakan suatu enzim yang dapat mencairkan gelatin. Proteasa dapat melunakkan serum yang telah diinspisasikan (diupkan airnya) dan menyebabkan nekrosis jaringan termasuk jaringan tulang (Warsa, 1994).

d. Lipase dan Tributirinase

Lipase terutama dihasilkan oleh jenis koagulosa positif tetapi tidak mempunyai peranan yang khas dan bersifat antigenik. Pada inokulasi *staphylococcus* pada *blood agar plate* ditemukan permukaan koloni dengan bercak-bercak lemak, ini terjadi karena lipase memutuskan ikatan asam *oktadekanoat* (susunan lemak) dengan lipid. Tributirinase (*egg-yolk factor*) merupakan suatu *lipase-like enzyme* yang menyebabkan terbentuknya *fatty droplets* dalam suatu perbenihan kaldu yang mengandung glukosa dan kuning telur (Warsa, 1994; Dzen, dkk., 2003).

e. Fosfatase, Lisosim, dan Penisilinase

Terdapat korelasi antara aktivitas asam fosfatase, patogenitas kuman, dan pembentukan koagulosa, tetapi pemeriksaan asam fosfatase jauh lebih sulit untuk dilakukan dan kurang khas jika dipakai sebagai petunjuk virulensi. Lisosim dibuat oleh koagulosa positif dan penting untuk menentukan patogenitas kuman (Warsa, 1994). Penisilinase atau β -laktamase digunakan untuk menginaktifkan penisilin pada tingkat molekuler (Behrman, *et al.*, 1999).

f. Antigen permukaan

Antigen ini berfungsi untuk mencegah serangan oleh faga, mencegah reaksi koagulosa dan mencegah fagositosis (Warsa, 1994).

4. Eksotoksin

a. α -toksin

Merupakan protein heterogen yang bekerja dengan spektrum luas pada membran sel eukariot. α -toksin merupakan hemolisin yang kuat (Brooks, *et al.*, 2007). Toksin ini dibuat oleh *staphylococcus* virulen dari jenis human dan bersifat:

- 1) Tidak melisiskan sel darah merah manusia
- 2) Menyebabkan nekrosis pada kulit manusia dan hewan
- 3) Dalam dosis yang cukup besar dapat membunuh manusia dan hewan
- 4) Tidak menghancurkan sel darah putih manusia
- 5) Bersifat sitotoksik terhadap biakan jaringan mamalia

Semua efek tersebut terjadi karena pelepasan anion dengan fosfolipid dalam membran sel kuman. Semua sifat tersebut dapat dinetralkan oleh IgG tetapi tidak oleh IgA atau IgM (Warsa, 1994). Pada manusia, α -toksin dapat menyebabkan jejas leukosit dan menyebabkan agregasi trombosit serta spasme otot polos (Behrman, *et al.*, 1999). Toksin alfa ini dapat dipakai untuk menentukan virulensi (Dzen, *dkk.*, 2003).

b. β -toksin

Toksin ini terutama dihasilkan oleh jenis yang berasal dari hewan. (Warsa, 1994). β -toksin dapat menguraikan sfingomielin sehingga toksik untuk berbagai sel, termasuk sel darah merah manusia (Brooks, *et al.*, 2007).

c. γ -toksin

Toksin ini dapat melisiskan sel darah merah manusia dan hewan (Brooks, *et al.*, 2007).

d. δ -toksin

Toksin ini bersifat nontoksik, heterogen dan terurai menjadi beberapa subunit pada detergen nonionik, serta dapat merusak sel eritrosit manusia dan kuda (Dzen, *dkk.*, 2003; Brooks, *et al.*, 2007). Cara kerja pemecahan membran sama seperti cara kerja detergen (Behrman, *et al.*, 1999).

Semua toksin tersebut dapat mengganggu membran biologik dan berperan pada penyakit diare akibat *Staphylococcus aureus* (Brooks, *et al.*, 2007).

5. Leukosidin

Toksin *Staphylococcus aureus* memiliki dua komponen. Leukosidin dapat membunuh sel darah putih manusia dan kelinci (Brooks, *et al.*, 2007). Terdapat tiga tipe leukosidin yang berbeda (Warsa, 1994):

- a) Alfa toksik
- b) Yang identik dengan Delta toksik, bersifat termostabil dan menyebabkan perubahan morfologik sel darah putih dari semua tipe kecuali yang berasal dari domba
- c) Yang terdapat pada 40—50% jenis *staphylococcus* dan hanya merusak sel darah putih manusia dan kelinci tanpa aktivitas hemolitik

Leukosidin dapat berkombinasi dengan fosfolipid membran sel fagosit sehingga dapat menyebabkan kenaikan permeabilitas, kebocoran protein, dan akhirnya menyebabkan kematian neutrofil dan makrofag (Behrman, *et al.*, 1999).

6. Toksin Eksfoliatif

Toksin *Staphylococcus aureus* ini memiliki dua protein (A dan B) yang secara serologis berbeda, yang menghasilkan komplikasi dermatologis lokal (misal, *impetigo bullosa*) atau menyeluruh (misal, sindrom kulit terbakar, erupsi *skarlatinoform*). Toksin epidermolitik A adalah produk gen kromosomal dan tahan panas (tahan dididihkan selama 20 menit). Toksin epidermolitik B merupakan produk gen plasmid dan tidak tahan panas. Toksin pengelupas menghasilkan pemisahan kulit dengan memecah desmosom dan mengubah matriks intraseluler pada stratum granulosum. Toksin–toksin tersebut merupakan superantigen (Behrman, *et al.*, 1999; Brooks, *et al.*, 2007).

7. Toksin Sindrom Syok Toksik (TSST)

Sebagian besar strain *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari pasien dengan sindrom syok toksik menghasilkan toksin yang disebut Toksin Sindrom-Syok-Toksik (TSST-1) yang serupa dengan enterotoksin F. TSST-1 merupakan superantigen prototipikal. TSST-1 dapat menginduksi produksi IL-1 dan faktor nekrosis tumor sehingga dapat menyebabkan demam, syok, hipotensi, dan melibatkan berbagai sistem tubuh, termasuk ruam kulit deskuamatif. Gen untuk TSST-1 ditemukan pada sekitar 20% isolasi *Staphylococcus aureus* (Behrman, *et al.*, 1999; Brooks, *et al.*, 2007).

8. Enterotoksin

Terdapat berbagai enterotoksin (A-E, G-I, K-M). Sekitar 50% strain *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan satu enterotoksin atau lebih.

Toksin ini terdiri dari protein yang bersifat:

- a) Nonhemolitik
- b) Nondermonekrotik
- c) Nonparalitik
- d) Termostabil, dalam air mendidih tahan selama 30 menit
- e) Tahan terhadap pepsin dan tripsin

Seperti yang telah disebutkan enterotoksin tahan terhadap panas dan resistan terhadap kerja enzim usus. *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh di makanan yang mengandung karbohidrat dan protein, dan menghasilkan enterotoksin yang merupakan penyebab penting keracunan makanan. Ingesti 25 μ g enterotoksin tipe B dapat menyebabkan muntah dan diare, efek muntah tersebut diakibatkan stimulasi sistem saraf pusat (pusat muntah) setelah toksin bekerja pada reseptor saraf di usus. Penyembuhan biasanya terjadi setelah 24—48 jam dan jarang terjadi fatal, kadang-kadang dapat terjadi kolaps sehingga dikira kolera (Warsa, 1994; Brooks, *et al.*, 2007).

2.2.8 Patogenesis

Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada manusia yang biasanya ditemukan pada kulit, hidung, dan tenggorokan. 25—40% *Staphylococcus aureus* dibawa oleh populasi orang yang sehat (WHO, 2005). Selain itu *Staphylococcus aureus* dapat juga ditemukan di hidung, liang telinga luar, dan mungkin di perinium. Kolonisasi yang transien *Staphylococcus aureus*

dapat terjadi di semua bagian kulit, hal itu terjadi karena kontak dengan dunia luar (Suharto, 1994). Pemindahan bakteri ini biasanya terjadi dengan kontak langsung atau dengan penyebaran partikel-partikel berat melebihi jarak enam kaki atau kurang. Penyebaran oleh bahan berpori jarang. Pada neonatus sangat rentan terhadap *staphylococcus* di nasofaring, kulit, perinium, dan ujung distal umbilikus. Neonatus dalam usia minggu pertama dapat dikolonisasi dan 20—30% membawa *Staphylococcus aureus* dalam nares anterior disegala waktu. Pada anak yang lebih tua dan orang dewasa lebih resisten terhadap kolonisasi daripada neonatus (Behrman, *et al.*, 1999).

Kemampuan patogenik *Staphylococcus aureus* tertentu merupakan gabungan efek faktor ekstraselular dan toksin serta sifat invasif strain tersebut. *Staphylococcus aureus* yang patogen dan invasif menghasilkan koagulasi dan cenderung menghasilkan pigmen kuning dan bersifat hemolitik (Brooks, *et al.*, 2007). Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses (Warsa, 1994).

2.2.9 Temuan Klinis

Berbagai infeksi piogenik (contohnya endokarditis, septik arthritis, dan osteomielitis), keracunan makanan, dan *Toxic Shock Syndrome* (TSS) selain itu *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab umum dari infeksi pneumonia di rumah sakit, septicemia, dan infeksi luka karena pembedahan (Levinson, 2006).

- a. *Staphylococcus aureus* menyebabkan berbagai infeksi kulit seperti:

Folikulitis merupakan infeksi pada bagian superfisial dari folikel rambut yang menimbulkan pustula kecil dengan dasar kemerahan pada

tengah-tengah folikel dan merupakan masalah yang umum diderita pasien eksema (Graham-Brown, *et al.*, 2005).

Furunkulosis (bisul) merupakan infeksi yang dalam pada folikel rambut sehingga timbul abses yang nyeri dan dalam beberapa hari terjadi fluktuasi serta timbul titik-titik yang merupakan pusat pustula pada tempat infeksi. Pada beberapa orang pasien bisul merupakan gangguan yang hilang-timbul. Orang mungkin merupakan penyebar *staphylococcus* pada daerah nasal dan kemudian organisme tersebut berpindah melalui jari-jemari ke tempat lain di tubuh (Graham-Brown, *et al.*, 2005).

Karbunkel merupakan infeksi yang dalam pada sekelompok folikel rambut yang berdekatan dan tempat yang sering terkena berada di tengkuk leher. Gejala awal lesi berbentuk kubah yang lunak dan kemerahan dan dalam beberapa hari terjadi supurasi serta keluar nanah (pus) dari muara-muara folikel. Karbunkel merupakan kelainan yang jarang terjadi, biasanya ditemukan pada orang dengan usia lanjut (Graham-Brown, *et al.*, 2005).

Impetigo merupakan suatu infeksi superfisial yang menular melalui luka-lukanya atau melalui jari tangan yang kotor dan mempunyai dua bentuk klinis, yaitu bulosa dan nonbulosa. Biasa terjadi di daerah dengan iklim hangat dan lembap. Impetigo sering terjadi pada wajah anak-anak, terutama di sekitar mulut. Gejala awal pada impetigo nonbulosa adanya lesi berupa pustula kecil sedangkan bulosa yaitu timbul lepuhan-lepuhan besar, dan kemudian pustul tersebut pecah

terjadi eksudasi dan membentuk krusta (kerak) pada bagian tepi lesi (Graham-Brown, *et al.*, 2005; Werner, *et al.*, 2010).

b. *Staphylococcus aureus* menyebabkan infeksi saluran pernapasan

Infeksi saluran pernapasan atas karena bakteri ini jarang terjadi, mengingat frekuensi kolonisasi di daerah ini jarang, contohnya otitis media, sinusitis, sinusitis *staphylococcus*, parotitis supuratif merupakan infeksi yang jarang namun *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab yang lazim, tonsilofaringitis *staphylococcus*, trakeitis (Behrman, *et al.*, 1999).

Pneumonia karena *Staphylococcus aureus* dapat merupakan infeksi primer (hematogen) atau sekunder sesudah infeksi virus influenza. *Staphylococcus* menyebabkan pneumonitis nekrotikans, sering kali terjadi empiema, pneumatokel, piopneumothoraks, dan fistula bronkopleura. Terkadang pneumonia *staphylococcus* menghasilkan penyakit interstisial difus yang ditandai dengan dispnea berat, takipnea, dan sianosis, jika terjadi batuk mungkin tidak produktif (Behrman, *et al.*, 1999).

c. *Staphylococcus aureus* menyebabkan keracunan makanan

Bentuk keracunan makanan yang lazim ini disebabkan oleh multiplikasi *staphylococcus* pembentuk toksin di dalam makanan sebelum disantap. Toksin tersebut relatif stabil terhadap panas dan dapat bertahan terhadap perebusan yang melebihi waktu satu jam. Karena itu, makanan yang sudah dimasak sampai matang masih dapat menyebabkan sakit walaupun sudah tidak mengandung sel-sel hidup *Staphylococcus aureus*. Gejala klinis rentang waktu antara makan dan

timbulnya penyakit cukup pendek sekitar 1—6 jam, ditandai dengan nyeri perut, muntah hebat yang berulang, dan diare yang bervariasi. Jika kondisi penyimpanan makanan tidak memadai, bakteri ini dapat memperbanyak diri untuk memproduksi toksinnya. Contoh makanan yang sudah diolah dan memerlukan penanganan dalam proses penyiapannya, seperti: ham, ayam, selada telur, krim, es krim, dan keju (WHO, 2005; Arisman, 2009).

2.2.10 Identifikasi Diagnosis Laboratorium

a) Spesimen

Bahan pemeriksaan yang diambil dalam bentuk usapan (*swabbing*) permukaan pus, darah, aspirat trakea, cairan spinal untuk biakan, tergantung pada lokalisasi proses (Brooks, *et al.*, 2007).

b) Pewarnaan Gram

Hapusan langsung dengan pewarnaan gram atau pada perbenihan medium koloni yang tumbuh dapat dilakukan pewarnaan gram (Dzen, *dkk.*, 2003).

c) Uji katalase

Setetes larutan hidrogen peroksida yang diteteskan di bakteri akan membentuk gelembung (pelepasan oksigen) yang menandakan uji bernilai positif (Brooks, *et al.*, 2007).

d) Uji koagulase

Terdapat dua cara yaitu cara *slide test* dan *tube test*. Pada *slide test* yang dicari ialah *bound coagulase* atau *clumping factor*, namun cara ini tidak dianjurkan sebagai pemeriksaan rutin karena diperlukan plasma manusia yang masih segar dan pemakaiannya untuk pemeriksaan

staphylococcus dalam jumlah besar (misal *screening test*). Pada *tube test* yang dicari ialah adanya koagulasi bebas dan cukup menggunakan plasma kelinci, hasilnya positif jika tabung test dibalik dan gumpalan plasma tidak terlepas serta tetap melekat pada dinding tabung (Warsa, 1994).

Cara lainnya yaitu plasma kelinci atau manusia yang mengandung sitrat, diencerkan dengan perbandingan 1:5, lalu dicampur dengan biakan kaldu atau pertumbuhan koloni pada agar dengan volume yang sama dan diinkubasi pada suhu 37°C. Jika terbentuk bekuan dalam 1—4 jam, tes ini positif (Brooks, *et al.*, 2007).

e) Uji sensitivitas

Uji sensitivitas dengan menggunakan pengenceran mikro kaldu atau uji sensitivitas lempeng difusi seharusnya rutin dilakukan pada isolat *staphylococcus* dari infeksi yang bermakna secara klinis. Resistensi terhadap penisilin G dapat dilihat dengan uji β -laktamase yang positif, sekitar 90% *Staphylococcus aureus* menghasilkan β -laktamase. Resistensi terhadap nefsilin (serta oksasilin dan metisilin) terjadi pada 20% isolat *Staphylococcus aureus* yang berkaitan dengan adanya *mecA*, gen yang mengkode protein pengikat penisilin (PBP 2a) tidak terpengaruh oleh obat-obatan tersebut. Gen tersebut dapat dideteksi dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), selain itu terdapat juga pemeriksaan untuk produk gen *mecA*, PBP 2a yang tersedia di pasaran dan lebih cepat untuk menentukan hasil (Brooks, *et al.*, 2007).

f) Uji serologi dan penentuan tipe

Uji serologi untuk mendiagnosis infeksi *Staphylococcus aureus* sangat tidak praktis. Pola sensitivitas antibiotik membantu menelusuri infeksi *Staphylococcus aureus*. Teknik penentuan tipe secara molekular telah digunakan untuk mendokumentasikan penyebaran penyakit epidemik akibat klon *Staphylococcus aureus* (Brooks, et al., 2007).

2.2.11 Pengobatan

Untuk infeksi kulit ringan akibat *Staphylococcus aureus* dapat diobati dengan obat antibakteri topikal seperti mupirosin; tambahan obat antibakteri untuk mandi misalnya triklosan 2%; tetapi bila meluas diperlukan antibiotik sistemik seperti fluklosasillin atau eritromisin (Graham-Brown, et al., 2005). Untuk kasus ringan di luar rumah sakit dapat diberikan penisilin G. Pada infeksi yang berat diduga tahan (resisten) terhadap penisilin dapat diberikan metisilin. Jika resisten terhadap metisilin dapat diberikan vankomisin, rifampisin atau *fusidic acid*. Pada penderita yang alergi terhadap penisilin dapat diberikan sefalosporin, eritromisin, linkomisin, atau klindamisin. Jenis yang resisten metisilin, biasanya juga resisten terhadap oksasilin, kloksasilin, dan cefalosporin (Warsa, 1994).

Penggunaan antibiotik yang sangat sering merupakan masalah utama di rumah sakit saat ini, yaitu adanya bakteri yang resisten terhadap antibiotik atau disebut juga “super bug”. Dua golongan bakteri, Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* Gram positif merupakan yang paling sering ditemukan. Pertumbuhan mikroorganisme yang resisten tidak dapat dihambat oleh konsentrasi biasa agen antimikroba. Resistensi obat dapat diperkirakan karena mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungannya. Adaptasi dapat terjadi melalui mutasi spontan DNA yang terjadi dengan cepat pada bakteri karena laju

pertumbuhannya juga cepat. Hal ini disebut juga resistensi intrinsik. Jenis resistensi intrinsik lainnya adalah jika mikroorganisme secara alami resisten terhadap banyak antibiotik. Resistensi intrinsik tidak menyebabkan penyebaran resistensi yang cepat pada populasi bakteri. Penyebaran resistensi bergantung dari transfer gen resisten antibiotik pada plasmid melalui proses konjugasi, transduksi, atau transformasi, dan yang jarang terjadi adalah resistensi didapatkan (*acquired resistance*) (James, *et al.*, 2006).

Sebaiknya dalam pengobatan galur *staphylococcus* dilakukan tes sensitivitas, kecuali pada penderita yang dalam keadaan kritis (Dzen, *dkk.*, 2003). Jika hasil tes telah ada dapat diberikan obat yang sesuai dengan hasil tes kepekaan tersebut. Yang penting pada pemberian antibiotika, juga harus disertai dengan tindakan bedah, baik berupa pengeringan abses ataupun nekrotomi. Pada septikemia, selain antibiotika yang diberikan dalam jangka panjang dapat pula diberikan antitoksin *staphylococcus* (Warsa, 1994).

2.2.12 Pencegahan

Penyebaran langsung dengan kontak fisik dapat dicegah dengan kebersihan kulit, mencegah pencemaran bakteri pada luka-luka dan lecet. *Air borne infection* di dalam kamar operasi dapat dicegah dengan pemakaian sinar ultraviolet. Cara penyebaran bahan-bahan infeksius dari nasofaring perlu lebih banyak diperhatikan dari *air borne infection* yang lainnya. Perlu diambil tindakan yang tepat terhadap para tenaga kesehatan yang bekerja di rumah sakit dan lain-lain bidang yang banyak berhubungan dengan masyarakat yang *carrier staphylococcus* dalam hidung dan tenggorokannya (Warsa, 1994).

2.3 Metode Ekstraksi

Proses ekstraksi merupakan cara pemisahan suatu zat dari campurannya dengan memanfaatkan pembagian sebuah zat terlarut dari dua pelarut yang tidak dapat tercampur digunakan untuk mengambil zat yang dibutuhkan tersebut (Oxtoby, *et al.*, 2001). Ekstraksi bertujuan untuk melarutkan kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam jaringan tanaman ke dalam pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi tersebut.

Pemilihan pelarut merupakan salah satu faktor penting dalam proses ekstraksi. Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi mempengaruhi jenis komponen aktif bahan yang terekstrak karena masing-masing pelarut mempunyai selektifitas yang berbeda. Jenis-jenis pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah (Sarker, *et al.*, 2006):

- a. Pelarut polar : air, etanol, metanol (MeOH)

Pelarut polar digunakan untuk senyawa yang lebih polar (seperti *flavonoid* glikosida, *tanin*, beberapa *alkaloid*). Air tidak digunakan untuk ekstraksi jika tujuan ekstrak adalah untuk melarutkan glikosida, *quaternary alkaloid*, dan *tanin*.

- b. Pelarut medium polar : *etil asetat* (EtOAc), *dichloromethane* (DCM)

Pelarut medium polar digunakan untuk ekstrak komponen dengan polaritas menengah (seperti beberapa *alkaloid*, *flavonoid*).

- c. Pelarut nonpolar : *n-hexane*, *pet-ether*, *chloroform* (CHCl₃)

Pelarut non polar digunakan untuk melarutkan senyawa seperti komponen *lipophilic* (alkane, asam lemak, pigmen, lilin, sterol, beberapa *terpenoid*, *alkaloid*, *coumarin*).

Metode ekstraksi menggunakan pelarut dapat dibagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi dingin dan ekstraksi panas (Alim, 2013).

2.3.1 Ekstraksi cara dingin

Pada metode ini tidak dilakukan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung dengan tujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak (Istiqomah, 2013). Beberapa jenis metode ekstraksi cara dingin, yaitu:

1) Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur suhu ruang (kamar). Metode ini dilakukan dengan cara merendam bahan dengan pelarut dalam sebuah wadah tertutup dan sekali-kali dilakukan pengadukan. Maserasi kinetik adalah dilakukannya pengadukan yang terus menerus. Kelebihan dari metode tersebut yaitu metodenya sederhana dengan peralatan yang murah dan mudah didapat, efektif untuk senyawa yang tidak tahan panas (terdegradasi karena panas). Namun metode ini juga memiliki beberapa kelemahan yaitu waktu yang dibutuhkan ekstraksi lebih lama, membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak, dan adanya kemungkinan bahwa senyawa tertentu tidak dapat diekstrak karena kelarutan yang rendah pada suhu ruang (Sarker, *et al.*, 2006; Alim, 2013).

2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan bahan direndam menggunakan pelarut yang selalu baru sampai prosesnya sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada suhu ruang (Alim, 2013). Prosedur metode ini yaitu bahan direndam dengan pelarut, kemudian

pelarut baru dialirkan secara terus menerus sampai warna pelarut tidak lagi berwarna atau tetap bening yang artinya sudah tidak ada lagi senyawa yang terlarut. Kelebihan dari metode ini adalah tidak diperlukan proses tambahan untuk memisahkan padatan dengan ekstrak. Namun kelemahan dari metode ini adalah membutuhkan jumlah pelarut yang banyak dan proses yang memerlukan waktu lama serta tidak meratanya kontak antara padatan dengan pelarut sehingga ekstraksi tidak akan sempurna (Sarker, *et al.*, 2006).

2.3.2 Ekstraksi Cara Panas

Metode ini melibatkan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung. Adanya panas secara otomatis akan mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan cara dingin. Beberapa jenis ekstraksi cara panas, yaitu:

1) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Alim, 2013).

2) Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinue dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Alim, 2013). Kelebihan dari metode soxhlet adalah waktu ekstraksinya yang lebih sebentar dan jumlah pelarut yang lebih sedikit dibandingkan metode maserasi dan perkolasi. Kelemahan dari metode ini adalah dapat menyebabkan rusaknya komponen yang tidak tahan panas

karena pemanasan ekstrak yang dilakukan secara terus menerus (Sarker, *et al.*, 2006).

3) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinue) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40—50 °C (Alim, 2013).

4) Infusa (Infus)

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi bahan nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Pembuatan infus merupakan cara yang paling sederhana untuk membuat sediaan herbal dari bahan lunak seperti daun dan bunga (BPOM RI, 2010).

5) Dekokta (Dekok)

Dekok adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi bahan tumbuhan dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit (BPOM RI, 2010).

2.4 Uji Kepekaan Antimikroba In Vitro

Uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara in vitro bertujuan untuk mengetahui apakah antimikroba yang diujikan dapat digunakan untuk mengatasi infeksi mikroba tersebut. Uji kepekaan tersebut pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu dengan metode dilusi dan metode difusi cakram (Dzen, *dkk.*, 2003).

2.4.1 Metode Dilusi

Metode ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari antimikroba yang diujikan. Prinsip metode ini adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan antimikroba yang akan diujikan setelah diencerkan secara serial. Selanjutnya seri tabung diinkubasi selama 18—24 jam pada suhu 37°C dan diamati kekeruhannya pada tabung. Konsentrasi terendah antimikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak terdapat pertumbuhan mikroba) adalah nilai KHM dari obat antimikroba yang diuji. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan, dan diamati keesokan harinya ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah antimikroba pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak terdapat pertumbuhan koloni mikroba disebut sebagai nilai KBM dari obat antimikroba yang diuji. Untuk menentukan KHM antimikroba dapat juga dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode *E-test* (Dzen, dkk., 2003).

2.4.2 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram adalah obat antimikroba dijenuhkan kedalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditranam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasi selama 18—24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Dzen, dkk., 2003).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat antimikroba), dapat dilakukan dengan dua cara berikut (Dzen, dkk., 2003):

- a. Cara Kirby Bauer, yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten.
- b. Cara Joan-Stokes, yaitu dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat antimikroba tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar.