

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Daun Parijata (*Medinilla Speciosa Blume*)

1. Definisi Daun Parijata

Tanaman parijata berasal dari genus *Medinilla* yang memiliki ciri khas pada bentuk daun dan bunganya yang sangat indah, sehingga dikenal sebagai salah satu marga tanaman hutan terindah di dunia. *Medinilla Speciosa Blume* (parijata) banyak dijumpai di daerah Colo, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Spesies ini tumbuh secara liar di area lereng gunung atau di dalam hutan, dan juga dikembangkan melalui budidaya untuk tujuan penghasil buah maupun tanaman hias. Lokasi pertumbuhannya salah satunya adalah Gunung Muria, pada ketinggian 1.602 mdpl (Hasriyani dkk., 2023).

Tanaman parijata, yang juga dikenal sebagai anggur asia, termasuk spesies dengan karakteristik khas serta memiliki beragam manfaat, khususnya dalam bidang kesehatan. Salah satu ciri unik tanaman ini terletak pada buahnya yang tersusun dalam bentuk gerombol, berbentuk bulat, dan berwarna merah muda keunguan, serta daunnya yang berwarna hijau dengan tekstur halus menyerupai permukaan kulit. Keunikan morfologis tersebut menjadikan tanaman parijata memiliki nilai estetika tinggi sehingga banyak diminati sebagai tanaman hias. Selain aspek ornamental, parijata juga memiliki kandungan bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Buah dan daunnya memiliki rasa masam dan pahit serta memberikan sensasi menyegarkan. Berdasarkan laporan, buah parijata memiliki kandungan senyawa seperti saponin, kardenolin, dan flavonoid. Sementara itu,

bagian daunnya mengandung saponin, kardenolin, serta tanin. Senyawa-senyawa tersebut memiliki peran penting dalam menciptakan efek farmakologis dari tanaman ini (Fadel dkk., 2024).

Tanaman *Medinilla Speciosa Blume* berbentuk perdu. Batang dan cabang tua tampak beruas semu dengan warna abu-abu keputihan dan kulit yang pecah secara longitudinal. Susunan daunnya tunggal dan berseling, kadang terlihat sebagai roset berisi 3-4 helai daun. Bentuk daunnya oblong atau lonjong, meruncing di ujung, tumpul di pangkal, serta memiliki tepi yang rata. Ukuran daun bervariasi dari panjang 14,5-32,5 cm dan lebar 6,5-14,5 cm, ditopang oleh tangkai pendek sepanjang 0,5-1 cm. Warna daun bervariasi sesuai umur: hijau tua mengkilap untuk daun dewasa, hijau muda kecekatan untuk daun muda, dan coklat tua untuk daun kuncup. Bagian atas daun yang hijau tua dan mengkilap tampak beralur, mengikuti pola tulang daun di bawahnya, sementara sisi bawah daun berwarna hijau muda keputihan dengan tujuh tulang daun yang sangat menonjol (Setyowati dkk., 2023).

2. Taksonomi Daun Parijata



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 1 Tanaman Parijata (*Medinilla Speciosa Blume*)

Kedudukan tanaman paku dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Sunkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Subkelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Myrtales</i>
Famili	: <i>Melastomaceae</i>
Genus	: <i>Medinilla</i>
Species	: <i>Medinilla Speciosa Blume</i>
Jenis	: <i>Medinilla Speciosa Blume</i>

Tanaman paku tumbuh sebagai perdu setinggi 1-2 meter. Batangnya bulat, berkulit kasar bergerigi berwarna putih kecokelatan yang akan menebal menyerupai gabus seiring penuaan. Daunnya tunggal dengan susunan bersilang, memiliki tangkai pendek berbentuk bulat yang lunak dan berwarna ungu kemerahan. Bentuk helaian daun lonjong dengan kedua ujung yang meruncing dan tepian rata, berukuran 10-20 cm x 5-15 cm, serta memiliki tulang yang melengkung. Bagian atas daun halus dan hijau, sedangkan bagian bawahnya kasar dan berwarna hijau kelabu. Bunga majemuknya tumbuh di ketiak daun, bersifat hermafrodit. Kelopaknya berjumlah lima, menyatu di pangkal dan meruncing di ujung, berwarna ungu tua (panjang 3-8 mm). Benang sarinya berjumlah ganda dari mahkota, dengan kepala sari berbentuk kuncup bengkok berwarna merah keunguan. Kepala putik bulat berwarna ungu terletak di atas bakal buah. Mahkota bunganya terpisah,

berbentuk seperti cakar dengan panjang 5-8 mm dan warna merah muda. Buahnya berbentuk buni bulat berdiameter 5-8 mm, berwarna merah keunguan dengan benjolan sisa kelopak di ujungnya. Bijinya banyak, kecil, bulat, dan putih. Sistem perakarannya serabut berwarna putih kotor (Hizkia Andrean Budiman, 2024) .

3. Kandungan Metabolit Sekunder Parijata

Daun Parijata menjadi salah satu tumbuhan tradisional yang mengandung senyawa fitokimia yaitu flavonoid, tanin dan saponin. Dalam sebuah kajian, dilaporkan bahwa daunnya mengandung senyawa flavonoid total sebanyak 2,65% b/b dan saponin 4,19% b/b. Penelitian yang sama juga mencatat kadar tanin sebesar 20,06 ppm, polifenol 12,68%, serta nilai antioksidan sebesar 11,70% (Muchlishoh, 2023).

Diketahui bahwa daun parijata mengandung senyawa bioaktif seperti saponin, flavonoid, serta tanin (Fairuzzahra, 2021).

a. Flavonoid

Senyawa flavonoid tersebar secara melimpah di alam, khususnya pada tumbuhan tingkat tinggi dan di area jaringan yang aktif tumbuh. Golongan senyawa ini menyusun sekitar 5% hingga 10% dari total metabolit sekunder yang diproduksi tumbuhan. Flavonoid memiliki sifat kelarutan yang tinggi dalam pelarut polar atau air, yang disebabkan adanya ikatan kimia dengan molekul gula. Beberapa jenis pelarut polar meliputi air, etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil sulfoksida, dan dimetilformamida. Dari sisi biologis, flavonoid juga diyakini memiliki beberapa fungsi potensial bagi tumbuhan, misalnya sebagai pengatur pertumbuhan, modulator fotosintesis, serta senyawa dengan aktivitas antimikroba, antivirus, anti serangga, dan antioksidan. Secara struktur, flavonoid dibangun dari 15 atom karbon

yang membentuk dua cincin benzena yang terhubung melalui suatu cincin heterosiklik piran (S. S. dan Giri, 2021). Aktivitas antibakteri flavonoid diketahui berasal dari sifat lipofiliknya, yang dapat mengacaukan fungsi membran sel bakteri (Othman dkk., 2019). Mekanisme kerja flavonoid memberikan efek bakteriolitik, menghambat sintesis protein, sintesis DNA, RNA dan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri (Saptowo, Supriningrum dan Supomo, 2021).

b. Saponin

Terdapat pada berbagai tanaman, saponin termasuk ke dalam golongan glikosida dengan struktur yang menggabungkan gula dan aglikon steroid atau triterpen. Pemanfaatannya dalam terapi didukung oleh sifat farmakologis yang luas, seperti antiinflamasi, antijamur, sitotoksik, antitumor, antirematik, antiparasit, dan antileishmanial. Senyawa ini juga menawarkan efek antimikroba dengan tingkat toksisitas yang rendah. Dalam melawan bakteri, mekanisme saponin menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari sel, berkat karakteristiknya yang seperti deterjen sehingga menurunkan tegangan permukaan dinding sel dan mengganggu permeabilitas membran sel sehingga sel bakteri menjadi hemolisis maka apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri, bakteri tersebut akan pecah atau lisis. Sebagai metabolit sekunder umum pada tanaman berkhasiat obat, strukturnya

terdiri atas rantai gula yang terikat secara glikosidik pada bagian non-gula berbasis steroid atau triterpenoid. Aktivitas biologis yang dihasilkan mencakup efek antimikroba, antiradang, antijamur, dan antivirus, yang sangat dipengaruhi oleh konfigurasi kimianya. Saponin dapat menghambat atau mematikan bakteri Gram positif, termasuk *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Bacillus cereus*. Prinsip kerjanya serupa dengan sefalosporin, terutama dalam hal pengaruhnya terhadap sistem membran sel bakteri (Muhammad Irfanuddin, 2020).

c. Tanin

Secara historis, “tanin” adalah istilah untuk bahan tumbuhan yang dapat menggumpalkan protein hewan pada penyamakan kulit. Saat ini, nilai tanin lebih ditekankan pada aktivitas sitotoksik, antikanker, dan antitumornya. Dilihat dari produk hidrolisisnya, tanin terbagi dua: (1) tanin terhidrolisis (pirogallol), yaitu senyawa fenolik berikatan ester dengan gula, dan (2) tanin terkondensasi (sering disebut katekol), yakni polimer senyawa fenolik yang berkaitan dengan pigmen flavonoid. Penambahan asam pada tanin terkondensasi akan menguraikannya menjadi senyawa merah tak larut yang dinamakan flobafen atau merah tanin.

Tanin sebagai senyawa metabolit sekunder, yang dapat menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri Gram positif dan negatif, jamur, serta ragi. Aktivitas antimikroba tanin cenderung bersifat bakteriostatik dibandingkan bakterisida. Sifat antibakteri tanin berasal dari struktur molekulnya sebagai makromolekul polifenol dengan banyak gugus hidroksil fenolik. Struktur tersebut memberikan kemampuan antibakteri yang signifikan pada tanin. Aktivitas antibakteri ekstrak yang mengandung tanin juga bergantung pada sifat kimia tanin (Faramayuda dkk., 2021). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu dengan

cara menyebabkan sellisis. Hal ini terjadi karena tanin memiliki target pada dinding polipeptida dinding sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna dan kemudian sel bakteri akan mati. Tanin juga memiliki kemampuan untuk menginaktifkan enzim bakteri serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Saptowo, Supriningrum dan Supomo, 2021).

4. Manfaat Daun Parijata

Secara turun-temurun, masyarakat di sekitar Gunung Merapi mempercayai bahwa tanaman parijata (*Medinilla Speciosa Blume*) bermanfaat untuk mendukung kesuburan janin serta menjaga kondisi kesehatan ibu. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa tanaman ini memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antioksidan, antidiabetes, dan antibakteri. Penduduk di kawasan Kudus biasanya menggunakan parijata untuk mengobati sariawan, diare, peradangan, infeksi bakteri, serta menurunkan kolesterol. Peran senyawa aktif di dalamnya, terutama dari kelompok tanin dan flavonoid, diduga bertanggung jawab atas efek antidiabetes dan antibakteri yang dimilikinya (Milanda dkk., 2021).

Senyawa flavonoid dalam tanaman parijata (*Medinilla Speciosa Blume*) memiliki efek antioksidan, antibakteri, dan antidiabetes melalui kemampuan menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen. Flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu fungsi DNA melalui interaksi langsung di inti sel bakteri, sehingga membatasi kemampuan reproduksi bakteri. Tanin sebagai senyawa bioaktif lain bersifat destruktif dengan merusak struktur sel bakteri yang menyebabkan kematian bakteri (Setyowati dkk., 2023). Untuk mengetahui adanya kandungan daun parijata (*Medinilla Speciosa Blume*) maka diperlukan uji skrining fitokimia dengan cara mengekstraksi sebagian sampel

dan memasukkan reagen tertentu berdasarkan komponen yang perlu diidentifikasi (Fadel dkk., 2024).

Berdasarkan studi Sugiarti (2018), aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun parijata diduga bersumber dari kandungan polifenolnya, seperti flavonoid, saponin, dan tanin. Flavonoid diketahui menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu fungsi DNA, sehingga reproduksi bakteri terhambat. Senyawa ini berinteraksi langsung dengan DNA di dalam inti sel bakteri. Interaksi ini terjadi karena adanya muatan berlawanan antara lipid penyusun DNA dan gugus alkohol pada struktur flavonoid, yang selanjutnya mengacaukan susunan lipid DNA bakteri, mengakibatkan kerusakan dan akhirnya kematian sel bakteri. Molekul tanin memiliki kemampuan bioaktif yang dapat membahayakan mekanisme pertahanan dan organ bakteri ketika diserang. Sementara itu, saponin bertindak sebagai agen antibakteri dengan menurunkan tegangan permukaan, yang pada gilirannya meningkatkan permeabilitas dan menyebabkan pelepasan komponen intraseluler (Fadel dkk., 2024).

B. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

1. Klasifikasi dan morfologi



Sumber : (Ariyani, 2020)

Gambar 2 Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Klasifikasi ilmiah bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah sebagai berikut :

Domain : *Bacteria*
Phylum : *Bacillota*
Class : *Bacilli*
Order : *Lactobacillales*
Family : *Streptococcaceae*
Genus : *Streptococcus*
Species : *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus β-hemolyticus Grup A adalah bakteri patogen utama pada manusia. Bakteri ini bersifat gram positif, negatif katalase dan oksidase, nonmotil, tidak berspora, dengan morfologi kokus berdiameter sekitar 0,5–1 µm yang tersusun dalam rantai. Panjang rantai bervariasi tergantung pada kondisi lingkungan. Pada media cair atau padat yang sesuai, bakteri patogen ini biasanya membentuk rantai panjang dengan delapan kokus atau lebih (Savitri dkk., 2019).

Streptococcus pyogenes termasuk bakteri hemolitik-β dengan ciri khas morfologi koloni pada media agar darah berupa koloni berwarna putih keabuan, permukaan halus, batas jelas, berdiameter lebih dari 0,5 mm, dan dikelilingi zona beta hemolisis. Pertumbuhan dan hemolisis bakteri ini meningkat dengan inkubasi pada kondisi 10% CO₂ (Yunita, 2020).

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditambahkan darah manusia 5% merupakan media kultur standar untuk *Streptococcus pyogenes* dalam uji antibakteri karena bakteri ini bersifat beta-hemolitik yang memerlukan nutrisi khusus dari darah untuk pertumbuhan optimal dan deteksi virulensi. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dipilih sebagai media dasar untuk *S. pyogenes* karena bakteri

fakultatif anaerob ini tumbuh optimal pada suhu 37°C dan pH 7,4–7,6 dalam kondisi aerob maupun anaerob, dengan ketebalan media 4 mm serta komposisi nutrisi rendah yang memberikan transparansi sempurna untuk membaca diameter zona hambat secara akurat sesuai pedoman CLSI. Penambahan darah manusia 5% menyediakan NAD (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*), hemoglobin, dan faktor V yang tidak dapat disintesis mandiri oleh *S. pyogenes* sehingga mendukung siklus glikolisis, produksi ATP, dan aktivitas hemolisin O dan S yang menghasilkan zona hemolisis beta jernih khas di sekitar koloni (Sujono dkk., 2019). Darah manusia lebih sensitif dibandingkan darah domba karena tidak mengandung faktor inhibitor alami seperti geranin yang menghambat aktivitas streptolisin O grup A dan deteksi hemolisis akurat yang membedakan *S. pyogenes* dari *S. agalactiae* yang bersifat alfa-hemolitik (Marsa dan Permana, 2021).

2. Virulensi *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes memiliki jangkauan inang yang terbatas, hampir secara eksklusif ditemukan pada manusia dan sangat jarang pada spesies lain. Bakteri ini sangat menular dan dapat menginfeksi individu dari segala usia yang tidak memiliki kekebalan spesifik. Infeksi pada neonatus jarang terjadi, kemungkinan karena antibodi dari ibu yang ditransfer melalui plasenta. Epidemiologi infeksi *S. pyogenes* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara infeksi tenggorokan dan infeksi kulit (Yunita, 2020).

Streptococcus pyogenes memiliki antigen karbohidrat grup A atau antigen *Lancefield*, serta dikelilingi oleh antigen protein M yang berperan dalam menghindari fagositosis oleh sel leukosit. Antibodi yang terbentuk terhadap protein M spesifik memberikan perlindungan terhadap infeksi ulang oleh tipe M yang

sama. Bakteri ini juga memproduksi berbagai toksin, termasuk toksin yang menyebabkan demam scarlet dan ekotoksin pirogenik tipe A, B, serta C. Adhesi bakteri pada sel inang terjadi melalui reseptor fibronectin, dan kemampuan untuk menginvasi dan bertahan di dalam sel menjelaskan kesulitan mengeliminasi bakteri ini pada pembawa faringeal meskipun telah diberi antibiotik tertentu (Yunita, 2020).

Streptococcus pyogenes menghasilkan berbagai komponen matriks ekstraseluler yang berikatan dengan protein seperti fibronectin, kolagen, atau protein matriks lainnya. Fibronectin berperan sebagai faktor virulensi kunci karena memfasilitasi perlekatan bakteri pada sel epitel manusia. Selain itu, protein M juga berkontribusi dalam proses adhesi bakteri ke sel inang. Bakteri ini juga mampu memproduksi beberapa toksin dan enzim, di antaranya Streptolisin O, Streptolisin S, streptokinase, DNase, serta eksotoksin pirogenik (eritrogenik). Perlekatan *S. pyogenes* terutama dimediasi oleh protein F, yang memiliki afinitas tinggi terhadap fibronectin, sehingga memungkinkan bakteri menempel kuat pada sel epitel dan memicu proses internalisasi ke dalam sel inang. Hal ini menyulitkan bakteri untuk dieliminasi oleh antibiotik (Pratama dkk., 2019).

3. Patogenesis *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pada dasarnya adalah anggota flora normal pada tubuh manusia, namun beberapa jenisnya bersifat patogen. *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*) merupakan bakteri yang menyebabkan berbagai infeksi. Dalam kondisi normal, bakteri ini juga menghuni nasofaring manusia. Jumlahnya biasanya dibatasi melalui kompetisi dengan mikroorganisme lain di nasofaring dan oleh sistem pertahanan tubuh non-spesifik. Ketika keseimbangan ini terganggu, infeksi

dapat terjadi. *S. pyogenes* (Grup A) dikenal sebagai penyebab utama faringitis bakteri tanpa komplikasi dan peradangan amandel (Anggraini, 2021).

Infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes* meliputi sinusitis, otitis, mastoiditis, pneumonia dengan empiema, serta infeksi pada sendi dan tulang. Infeksi ini juga dapat menyebabkan fasciitis nekrotikans, myositis, meningitis atau endokarditis. Infeksi kulit akibat bakteri ini dapat bersifat superfisial seperti impetigo atau lebih dalam seperti selulitis. *S. pyogenes* menimbulkan berbagai masalah klinis karena kemampuannya menyebabkan infeksi invasif berat, berkat keberadaan protein eksotoksin, superantigen, protein dinding sel, dan faktor virulensi lainnya yang memperkuat patogenitasnya (Sari, 2020).

C. Simplisia

Mengacu pada Materia Medika Indonesia, simplisia diartikan sebagai bahan alami yang dikeringkan, tanpa mengalami pengolahan lebih lanjut, untuk digunakan sebagai bahan dasar obat. Terdapat tiga kategori simplisia, yaitu simplisia nabati (berasal dari tumbuhan), simplisia hewani (berasal dari hewan), dan simplisia pelikan (berasal dari mineral). Simplisia nabati meliputi seluruh bagian tumbuhan, bagian spesifik tumbuhan, atau eksudat tumbuhan, yaitu zat yang dikeluarkan oleh sel tumbuhan dan belum berupa senyawa kimia murni (Endarini, 2016). Simplisia umumnya dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan obat tradisional. Agar memberikan manfaat dan aman untuk dikonsumsi, bahan baku obat tradisional ini harus memiliki kualitas yang terjamin. Proses standarisasi dilakukan untuk memenuhi persyaratan yang menjamin keamanan, keseragaman mutu, serta efektivitasnya. Standarisasi mencakup penerapan parameter spesifik dan nonspesifik. Parameter spesifik meliputi pemeriksaan organoleptik, analisis

mikroskopis penampang memanjang dan melintang, serta pengujian zat terlarut dalam pelarut tertentu. Sementara itu, parameter nonspesifik mencakup uji susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan kontaminasi logam (Sutomo dkk., 2021).

D. Ekstraksi dan Metode Ekstraksi

1. Definisi ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen aktif metabolit sekunder dari tanaman atau hewan menggunakan pelarut tertentu dan prosedur khusus. Pelarut masuk ke bahan padat tanaman atau hewan, menyebabkan struktur selulosa mengembang sehingga pori-pori dinding sel melebar dan memfasilitasi penetrasi pelarut ke dalam sel. Senyawa aktif dalam bahan alamiah dapat digunakan sebagai alternatif terapeutik untuk berbagai penyakit, termasuk antikanker, antitumor, antimikroba, dan antioksidan (Wahyuningsih dkk., 2024).

2. Metode ekstraksi

a. Ekstraksi padat – cair (*leaching*)

Ekstraksi padat-cair merupakan metode untuk memisahkan komponen terlarut dari bahan padat yang tidak larut. Prosesnya dimulai ketika pelarut bersinggungan dengan bahan padat inert sehingga seluruh permukaannya terlindungi oleh pelarut. Kemudian, pelarut berdifusi secara perlahan dari permukaan menuju ke bagian dalam pori-pori padatan. Kecepatan difusi ini cenderung rendah karena pelarut perlu menembus struktur dinding sel pada bahan padat. Setelah itu, zat terlarut yang ada di dalam pelarut akan berdifusi keluar dari permukaan padatan inert dan akhirnya bercampur dengan pelarut yang masih tersisa (Aji dkk., 2017).

b. Ekstraksi cara dingin

Metode ekstraksi cara dingin dilakukan tanpa pemanasan untuk menghindari kerusakan senyawa yang diinginkan. Beberapa metode ekstraksi cara dingin meliputi :

1) Maserasi

Sebagai teknik ekstraksi yang praktis dan umum, maserasi banyak dipakai di laboratorium dan industri. Metode ini diterapkan pada simplisia yang rentan terhadap panas, melalui perendaman dalam pelarut tertentu dalam durasi tertentu. Proses berjalan pada suhu kamar (20-30°C) untuk menghindari penguapan pelarut, dengan pengadukan selama 15 menit demi homogenitas campuran. Mekanisme maserasinya melibatkan penetrasi pelarut ke dalam dinding sel simplisia menuju rongga sel yang mengandung zat aktif. Adanya gradien konsentrasi antara larutan di dalam dan luar sel menyebabkan zat aktif larut dan larutan pekat terdorong keluar, yang terus berulang hingga konsentrasi setimbang. Ketika maserasi dikombinasikan dengan pengadukan, maka disebut ekstraksi kinetik. Sementara itu, variasi maserasi yang dijalankan pada suhu lebih tinggi (40-60°C) dikenal dengan istilah digesti (Hujjatusnaini dkk., 2021).

Pemilihan etanol 70% sebagai pelarut maserasi didasarkan pada kemampuan optimal mengekstrak flavonoid, tanin, dan saponin dari daun parijata (*Medinilla Speciosa Blume*) melalui ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil polar pada metabolit tersebut. Etanol 70% memiliki polaritas sedang yang efektif melarutkan senyawa semi-polar dengan rendemen 20-25%, 2-3 kali lebih tinggi dibandingkan air (10-12%) atau etanol absolut (15-18%). Pelarut ini juga steril, *food-grade*, dan minim residu toksik (<0,1%) sehingga aman untuk uji antibakteri *Kirby-Bauer* pada

MHA+5% darah manusia tanpa mengganggu pembacaan zonaambat (Muchlishoh, 2023).

2) Perlokasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi simplisia halus menggunakan pelarut yang dialirkan secara perlahan melalui sebuah kolom. Proses ini memakai pelarut baru dan biasanya dilakukan pada suhu ruang. Prinsip perkolasi meliputi penempatan serbuk simplisia dalam silinder yang bagian bawahnya dilengkapi sekat berpori. Metode ini memerlukan waktu lebih lama dan volume pelarut yang lebih besar. Ekstraksi dikonfirmasi selesai dengan menguji perkolat menggunakan pereaksi spesifik untuk mendeteksi metabolit aktif (Hujjatusnaini dkk., 2021).

c. Ekstraksi cara panas

Metode ekstraksi dengan cara panas melibatkan pemanasan selama proses berlangsung. Pemanasan ini mempercepat ekstraksi dibandingkan metode dingin. Berikut adalah beberapa metode ekstraksi cara panas :

1) Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi yang dilakukan pada suhu didih pelarut dengan waktu tertentu dan volume pelarut yang tetap, serta menggunakan alat pendingin balik. Metode ini bertujuan meningkatkan kualitas hasil ekstraksi. Proses refluks umumnya diulang 3 hingga 6 kali pada residu awal. Metode ini memungkinkan penguraian senyawa yang rentan terhadap panas (Hujjatusnaini dkk., 2021).

2) Ekstraksi soxhlet

Metode Soxhlet adalah teknik ekstraksi yang menggunakan pelarut segar secara berulang dengan alat khusus yang dilengkapi pendingin balik untuk menjaga kestabilan proses. Pemanasan menguapkan pelarut yang naik ke bagian atas alat

dan kemudian terkondensasi oleh pendingin, membentuk tetesan yang kembali ke ruang ekstraksi. Saat volume cairan mencapai lubang pada pipa samping, pelarut mengalir kembali ke labu pemanas, sehingga proses berlangsung secara siklik hingga senyawa target terekstraksi secara optimal. Keberhasilan metode ini tergantung pada pemilihan pelarut yang memiliki daya larut tinggi terhadap zat target, yang dipengaruhi oleh tingkat kepolaran pelarut dan senyawa yang diekstrak (Hujjatusnaini dkk., 2021).

d. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemisahan kimia-fisika di mana zat target dipisahkan dari fase air menggunakan pelarut organik tak larut dalam air melalui kontak langsung secara kontinu atau diskontinu. Keunggulan ekstraksi cair-cair terletak pada kemampuan pelarut organik untuk didaur ulang dan digunakan ulang, efektivitas dalam memisahkan asam karboksilat yang serupa, serta menghasilkan kemurnian tinggi, sehingga menjadikannya teknik pemisahan yang unggul. Larutan yang dipisahkan memiliki sifat fisika yang serupa, khususnya titik didih yang hampir sama. Prinsip ekstraksi cair-cair menyatakan bahwa larutan akan berinteraksi dengan pelarut lain yang tidak dapat bercampur (immiscible) dan berbeda densitas, sehingga setelah penambahan pelarut terbentuk dua fasa. Di dalam kolom tetesan, cairan bergerak naik dan mengalami proses perpecahan serta penggabungan tetesan. Perpecahan terjadi akibat tumbukan tetesan dengan isi kolom, yang meningkatkan luas bidang kontak antar cairan sekaligus memperpanjang waktu kontak kedua fasa dalam kolom (Wahyuningsih dkk., 2024).

E. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri umumnya menggunakan dua metode kunci, yakni metode dilusi dan metode difusi. Agar hasilnya konsisten dan dapat dipercaya, diperlukan penggunaan metode standar untuk mengontrol variabel-variabel yang berdampak pada efek antimikroba.

1. Metode dilusi

Terdapat dua bentuk metode dilusi, yaitu dilusi cair dan dilusi padat, yang bertujuan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pada dilusi cair, agen antimikroba diencerkan secara bertingkat dalam medium cair dan digabungkan dengan mikroba uji sehingga diperoleh berbagai konsentrasi. Kelebihan teknik seri dilusi meliputi peningkatan kontak antara sampel dan bakteri karena luas permukaan media yang besar serta kemudahan pengujian dalam satu titik, menjadikannya lebih hemat dan praktis. Namun, metode ini juga memiliki keterbatasan seperti rentang pengenceran yang terbatas, yang dapat menyebabkan konsentrasi rendah tetap menunjukkan aktivitas penghambatan, serta risiko kesalahan distribusi sampel yang berpotensi mengurangi akurasi hasil (Hardani dkk., 2020).

Pada metode dilusi padat, mikroba uji diinokulasikan ke dalam media agar yang telah dicampur dengan agen antimikroba. Keunggulannya adalah memungkinkan pengujian beberapa mikroba secara bersamaan dengan satu konsentrasi agen. Metode ini juga efisien dalam penggunaan media karena adanya *replicator inokulum* komersial yang mampu mentransfer 32–60 inokulum bakteri per cawan agar. Selain itu, metode ini dapat meningkatkan akurasi penentuan KHM dan memperluas rentang konsentrasi antibiotik. Namun, terdapat kelemahan seperti kesulitan mempertahankan suhu agar dan bakteri pada 45–50°C yang dapat

menurunkan efektivitas penghambatan serta kesulitan membaca titik akhir dan memverifikasi kemurnian inokulum. Tanpa otomatisasi, metode ini memerlukan sumber daya manusia, teknis, dan ekonomi yang besar (Nurul dkk., 2023).

2. Metode difusi

Metode difusi menilai aktivitas antibakteri dengan mengamati hambatan pertumbuhan akibat difusi zat antimikroba dalam media padat. Teknik ini dibagi menjadi difusi cakram dan difusi sumuran. Dalam difusi sumuran, lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba diberi lubang steril berdiameter 6-8 mm. Metode ini sering dipakai untuk menentukan KHM pada media padat, di mana antibiotik yang berdifusi akan menghambat pertumbuhan bakteri dan menghasilkan zona bening di sekitar sumuran. Semakin tinggi konsentrasi antibiotik, semakin besar diameter zona hambatnya. Namun, metode sumuran bersifat kualitatif dan tidak mengukur jumlah senyawa yang terdifus (Nurul dkk., 2023).

Sementara itu, metode difusi cakram adalah teknik yang paling lazim digunakan karena telah terstandarisasi, akurat, dan fleksibel untuk laboratorium diagnostik. Standar waktu inkubasi yang disarankan EUCAST dan CLSI adalah 16-18 jam untuk kebanyakan spesies dan kombinasi obat. Metode Kirby-Bauer yang terstandarisasi ini dianggap sebagai alternatif efektif terhadap metode cair (Nurul dkk., 2023).

Pada metode difusi cakram, cakram yang telah mengandung zat antimikroba diletakkan di permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan mikroba. Setelah diinkubasi, zat tersebut akan berdifusi ke dalam media. Laju difusi zat dalam media agar relatif lebih lambat dibandingkan laju pelepasan zat dari cakram. Hal ini menciptakan gradien konsentrasi, di mana konsentrasi zat tertinggi terdapat

di dekat cakram dan berkurang secara logaritmik seiring dengan peningkatan jarak. Efektivitas senyawa antimikroba terlihat dari pembentukan zona hambat di sekitar disk setelah inkubasi. Luas zona hambat menunjukkan tingkat sensitivitas senyawa. Diameter zona hambat diinterpretasikan sesuai pedoman dari *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Tabel 1

Kategori Diameter Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Daya Hambat Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat Kuat

Sumber : (Sumilat, 2019)

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri metode difusi cakram meliputi kondisi teknis yang harus distandarisasi agar hasil zona hambat akurat dan dapat direproduksi. Variasi pada faktor-faktor ini dapat menyebabkan perbedaan diameter zona hambat hingga $\pm 3-5$ mm antar replikasi. Pengendalian ketat dilakukan terhadap sterilisasi alat atau media, ketebalan dan pH media, suhu dan waktu inkubasi, jarak antar cakram, waktu pemasangan cakram, serta kondisi CO₂ untuk *Streptococcus pyogenes* (Schwalbe, Steele-Moore dan Goodwin, 2007).

- a. Terdapat dua cara sterilisasi yang digunakan dalam studi ini, yakni sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Media disterilkan dengan autoklaf, sedangkan alat-alat laboratorium disterilkan memakai oven.

- b. Salah satu faktor yang menentukan diameter zona hambat bakteri adalah ketebalan media. Media dengan ketebalan optimal 4 mm memberikan hasil terbaik; ketebalan kurang dari itu dapat memperlambat difusi ekstrak bahan alam. Untuk mendapatkan ketebalan 4 mm, dapat dituangkan kira-kira 25 ml media ke dalam cawan petri berukuran 90 mm.
- c. Salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap viabilitas suatu bakteri adalah pH. *S. pyogenes* tumbuh baik pada pH 7,4 – 7,6. Pengukuran pH media dilakukan dengan menggunakan alat pH meter yang diukur sebelum proses sterilisasi.
- d. Suhu dan waktu inkubasi dapat memengaruhi fase pertumbuhan bakteri, laju pertumbuhan, konsentrasi sel, kebutuhan nutrisi, aktivitas enzimatis, serta komposisi sel mikroorganisme. Suhu dan waktu inkubasi dapat digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan dan aktivitas bakteri. Suhu dan waktu inkubasi yang melebihi batas maksimal akan bersifat mematikan bagi pertumbuhannya. Sebaliknya, apabila suhu dan waktu inkubasi diturunkan di bawah batas maksimal, hal ini akan memperpanjang fase lag pertumbuhan. Suhu pertumbuhan optimum dan waktu inkubasi maksimum menjadi salah satu faktor kematian bakteri.
- e. Jarak antara cakram disk merupakan faktor penting dalam uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Penyesuaian jarak yang tepat antara cakram dan koloni bakteri, beserta konsentrasi ekstrak yang relevan, dapat meningkatkan akurasi pengukuran efektivitas antibakteri. Jarak antar cakram disk agar pengukuran dapat dilakukan dengan benar adalah minimal 15

mm dari tepi ke tepi cakram dengan memberi tanda pada cawan petri sebagai tempat meletakkan cakram.

- f. Waktu pemasangan cakram merupakan salah satu faktor penting dalam pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Setelah cakram yang telah diserap dengan bahan antimikroba diletakkan di atas media agar yang diinokulasi dengan bakteri, waktu inkubasi yang tepat sangat penting. Umumnya, cakram dibiarkan selama 18-24 jam pada suhu yang sesuai (biasanya 35-37°C) untuk memungkinkan difusi senyawa antibakteri ke dalam media agar dan interaksi dengan bakteri.
- g. Kondisi CO² 5% sebagai ketentuan untuk pertumbuhan bakteri *S. pyogenes* dikontrol dengan anaerobik jar menggunakan metode candle jar. Penggunaan lilin yang menyala membantu menciptakan lingkungan anaerobik dengan menghasilkan CO² dan mengurangi oksigen melalui proses pembakaran. Metode ini efektif dalam menurunkan kadar oksigen dalam tabung hingga mencapai 1–2%. Tingkat karbon dioksida yang dihasilkan akan berada di antara 4 - 5%.