

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Belimbing Wuluh

1. Klasifikasi dan morfologi

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) diklasifikasikan sebagai berikut (Qorik'ah, 2022) :

Kingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Sub Kingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Divisi	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Roside</i>
Ordo	: <i>Geraniales</i>
Famili	: <i>Oxalidaceae</i>
Genus	: <i>Averrhoa</i>
Spesies	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.



Gambar 1. (a) Pohon Belimbing Wuluh ; (b) Daun Belimbing Wuluh

Sumber : Radar Banten, 2024

Belimbing wuluh merupakan salah satu spesies dari keluarga belimbing (*Averrhoa*). Diperkirakan tanaman ini berasal dari daerah Amerika tropik. Tanaman ini tumbuh baik di negara asalnya sedangkan di Indonesia banyak dipelihara di pekarangan dan kadang-kadang tumbuh secara liar di ladang atau tepi hutan (Yanti & Vera, 2019).

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tanaman tropis yang hidup menahun, dengan tinggi pohon mencapai 5–10 meter dan batang yang relatif kecil. Batangnya bertekstur kasar dan tampak berbenjol, dengan percabangan yang sedikit serta arah tumbuh ke atas. Cabang muda memiliki rambut halus seperti beludru dan berwarna coklat muda. Daunnya tersusun sebagai daun majemuk menyirip ganjil dengan jumlah anak daun antara 21–45 pasang. Anak daun berukuran kecil dengan tangkai pendek, berbentuk bulat telur hingga lonjong, berujung runcing, pangkal membulat, tepian rata, panjang 2–10 cm, lebar 1–3 cm, berwarna hijau dengan bagian bawah yang lebih muda. Bunganya tersusun dalam bentuk malai, muncul dari batang atau cabang besar, berukuran kecil, berkelopak, dan menyerupai bintang dengan warna ungu kemerahan. Buahnya termasuk buah buni, berbentuk lonjong bersegi dengan panjang 4–6,5 cm, berwarna hijau kekuningan, memiliki kandungan air yang tinggi saat masak, dan berasa asam. Biji buahnya berbentuk bulat telur dan pipih (Sasmi, 2017).

2. Kandungan metabolit daun belimbing wuluh

Tanaman belimbing wuluh mengandung beragam senyawa, khususnya pada bagian daunnya. Adapun beberapa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam belimbing wuluh yaitu saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, dan terpenoid (Simanullang, 2021).

1) Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenolik yang mampu mendaturasi protein, yaitu komponen penting dalam struktur sel bakteri. Ketika protein sel mengalami denaturasi, aktivitas metabolisme bakteri akan terganggu, diikuti kerusakan membran hingga lisis yang berujung pada kematian bakteri. Flavonoid juga dapat menghambat kerja enzim DNA gyrase serta enzim ATPase, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa ini dikenal memiliki aktivitas antimikroba yang efektif terhadap virus, bakteri, maupun jamur (Fajriyah, 2017).

2) Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang terdapat dalam tanaman dan memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerjanya adalah dengan merusak struktur peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga dinding sel tidak dapat terbentuk dengan sempurna dan menyisakan membran saja. Ketidaksempurnaan dinding sel tersebut menghambat pertumbuhan bakteri dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Nor, 2018).

3) Tannin

Tannin adalah senyawa organik golongan polifenol yang larut dalam air dan mampu mengendapkan protein dengan membentuk kompleks. Cara kerjanya yaitu dengan mengikat protein pada dinding sel bakteri sehingga mengganggu proses pembentukan struktur sel. Gangguan ini menyebabkan kelemahan pada dinding sel dan dapat memicu terjadinya lisis pada bakteri (Agastia, 2021).

4) Saponin

Saponin merupakan kelompok glikosida yang bersifat larut dalam air. Mekanisme antibakterinya dilakukan dengan mengganggu permeabilitas dinding

sel bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan membran dan keluarnya komponen penting seperti protein dan asam nukleat dari dalam sel. Akibat kerusakan tersebut, bakteri tidak dapat berkembang biak dengan baik dan berakhir mengalami lisis (Agastia, 2021).

5) Terpenoid

Terpenoid mempunyai manfaat sebagai antibakteri, dan anti jamur. Mekanisme kerja terpenoid yaitu dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Kurniawan dan Aryana, 2015).

3. Kegunaan daun belimbing wuluh

Selain digunakan sebagai obat tradisional, belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) juga kerap dimanfaatkan sebagai bahan penyedap masakan, bumbu, pengawet alami, hingga pembersih noda. Buah belimbing wuluh diketahui bermanfaat untuk menangani batuk rejan, jerawat, hipertensi, gusi berdarah, sariawan, kerusakan gigi, serta gangguan maupun peradangan saluran pencernaan (Aseptianova & Yuliany, 2020).

Bagian daunnya dapat digunakan untuk mengatasi sakit perut, rematik, parotitis, dan sebagai obat batuk. Daun belimbing wuluh juga diketahui memiliki kemampuan antibakteri, menurunkan kadar gula darah, melancarkan aliran empedu, bersifat anti-inflamasi, meredakan nyeri, dan bertindak sebagai astringen (Agastia, 2021).

B. Simplisia

1. Definisi dan jenis – jenis simplisia

Simplisia adalah bahan baku obat tradisional atau herbal yang berasal dari alam dan digunakan tanpa melalui proses pengolahan, kecuali pengeringan (Lutfiah, 2022). Simplisia terbagi menjadi tiga kelompok, yakni simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral (pelikan) (Endarini, 2016).

a) Simplisia nabati

Simplisia nabati adalah jenis simplisia yang diperoleh dari tumbuhan, baik berupa seluruh bagian tanaman, bagian tertentu, maupun getah atau eksudatnya. Secara umum, simplisia nabati merupakan hasil pertanian tanaman obat yang telah melalui proses pascapanen dan preparasi sederhana sehingga siap digunakan sebagai bahan obat herbal. Simplisia jenis ini dapat digunakan sebagai serbuk yang diseduh seperti jamu, dicacah atau direbus untuk diminum, atau diproses lebih lanjut menjadi sediaan farmasi seperti ekstrak, hasil separasi, maupun produk yang telah dimurnikan (Endarini, 2016).

b) Simplisia hewani

Simplisia hewani adalah jenis simplisia yang diperoleh dari hewan, baik berupa hewan utuh, bagian tubuhnya, maupun zat yang dihasilkan oleh hewan, selama masih dalam bentuk alami dan belum diproses menjadi senyawa kimia murni.

c) Simplisia pelikan (mineral)

Simplisia pelikan (mineral) merupakan jenis simplisia yang berasal dari mineral yang belum diolah atau hanya diolah secara sederhana dan belum dalam bentuk zat kimia murni.

2. Persyaratan baku dan standarisasi simplisia

Standarisasi simplisia merupakan persyaratan yang harus dipenuhi sebagai bahan baku obat herbal. Menurut BPOM RI (2014) persyaratan baku simplisia terdiri dari:

- a. Kadar air : kurang dari 10%
- b. Angka lempeng total : kurang dari 5×10^7 koloni/g
- c. Angka kapang dan khamis : kurang dari 5×10^5 koloni/g
- d. Mikroba patogen : negatif
- e. Alfatoksin : kurang dari 30 bagian per juta

Proses panen serta penyiapan simplisia dapat memengaruhi mutu simplisia, termasuk kandungan senyawa kimia, tingkat kontaminasi, dan kestabilan bahannya (Endarini, 2016). Berdasarkan pedoman Materia Medika Indonesia, standar mutu simplisia mencakup beberapa aspek, antara lain:

- a. Kebenaran jenis (identifikasi spesies tumbuhan) mencakup parameter makroskopis seperti deskripsi morfologis simplisia, dan parameter mikroskopis meliputi pengamatan terhadap penampang melintang simplisia atau bagian simplisia terhadap fragmen pengental serbuk simplisia dan reaksi identifikasi seperti reaksi warna dan kemurnian simplisia.
- b. Kemurnian (terbebas dari kontaminasi kimia maupun biologis) pada simplisia biasanya sulit mencapai kondisi benar-benar murni. Hal ini karena hampir selalu ada kontaminan meskipun jumlahnya kecil dan tidak membahayakan. Simplisia harus dipastikan bebas dari serangga, sisa atau kotoran hewan, serta tidak boleh mengandung bahan lain yang berbahaya (Khorani, 2014).

- c. Aturan penstabilan (pengaturan wadah, penyimpanan, dan transportasi) untuk menjaga kualitas fisik serta kestabilan kandungan senyawa aktif. Wadah yang digunakan harus aman, tidak beracun, tidak bereaksi dengan isi, serta mampu melindungi simplisia dari cemaran mikroba, kotoran, serangga, cahaya, kelembapan, dan gangguan suhu. Penyimpanan simplisia kering umumnya dilakukan pada suhu kamar berkisar 15–30°C untuk mencegah kerusakan dan penurunan mutu. Selama transportasi, simplisia harus dikemas dengan baik dalam wadah tertutup agar terlindung dari kerusakan fisik dan pengaruh lingkungan, sehingga mutu simplisia tetap terjaga hingga digunakan.

C. Ekstraksi

Ekstrak adalah produk yang diperoleh dengan menarik kandungan zat aktif dari suatu bahan melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut, kemudian pelarut tersebut diuapkan hingga tersisa komponen aktif yang lebih pekat (Marjoni, 2016). Proses ekstraksi sendiri merupakan metode pemisahan komponen kimia dari bahan alam, khususnya tumbuhan obat. Pada prinsipnya, ekstraksi melibatkan perpindahan massa dari bahan padat menuju fase cair berupa pelarut. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam ruang sel yang menyimpan zat aktif (Marjoni, 2016). Zat aktif kemudian larut dalam pelarut, bergerak keluar sel, dan selanjutnya berdifusi ke dalam pelarut. Proses ini berlangsung berulang hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara bagian dalam dan luar sel. Dalam pelaksanaan ekstraksi, terdapat beberapa faktor penting yang harus diperhatikan (Marjoni, 2016).

1. Jumlah simplisia yang diekstraksi

Banyaknya simplisia yang digunakan sangat berhubungan dengan volume pelarut yang dibutuhkan. Semakin besar jumlah bahan simplisia, maka semakin besar pula jumlah pelarut yang diperlukan untuk proses ekstraksi.

2. Tingkat kehalusan simplisia

Kehalusan partikel simplisia menentukan luas permukaan yang bersentuhan dengan pelarut. Simplisia yang lebih halus menyediakan permukaan kontak lebih luas sehingga proses penarikan senyawa berlangsung lebih efektif.

3. Jenis pelarut ekstraksi

Pemilihan pelarut sangat dipengaruhi oleh sifat kepolarannya. Senyawa kimia akan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran serupa dengan senyawa tersebut.

4. Lama waktu ekstraksi

Durasi ekstraksi memengaruhi jumlah komponen yang dapat tertarik ke dalam pelarut. Semakin lama waktu ekstraksi, semakin banyak senyawa yang dapat diperoleh hingga mencapai kondisi optimum.

5. Metode ekstraksi

Terdapat dua kelompok metode ekstraksi, yaitu metode panas dan metode dingin.

- Metode panas digunakan ketika senyawa dalam simplisia tahan terhadap pemanasan, seperti pada proses penyeduhan, penggodokan (dekokta), infusa, digesti, refluks, dan soxhletasi.
- Metode dingin dipilih untuk senyawa yang tidak stabil terhadap panas (termolabil), biasanya dilakukan dengan maserasi atau perkolasi.

6. Kondisi khusus selama ekstraksi

Beberapa ekstraksi memerlukan kondisi tertentu, seperti bahan yang mengandung kumarin dan kuinon yang harus diekstraksi dengan menghindari paparan cahaya. Dalam skala industri proses biasanya dilakukan secara kontinu, sedangkan pada skala laboratorium dapat dilakukan dengan atau tanpa pengadukan sesuai kebutuhan.

D. Pelarut

Pelarut memiliki peran penting dalam proses ekstraksi senyawa yang terdapat dalam simplisia. Pelarut dapat menarik zat kimia yang terkandung dalam simplisia untuk larut bersama pelarut. Dalam proses ekstraksi, pemilihan jenis pelarut dapat memengaruhi beberapa aspek, seperti:

1. Pemilihan pelarut dapat memengaruhi jenis senyawa yang akan diisolasi. Hal ini dikarenakan setiap pelarut memiliki tingkat polaritas yang berbeda-beda sehingga harus disesuaikan dengan jenis senyawa metabolit yang akan diisolasi (Purwaningdyah, Widyaningsih dan Wijayanti, 2015). Sesuai dengan konsep *like dissolves like* dimana senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non-polar akan larut dalam pelarut non-polar.
2. Jenis pelarut dapat memengaruhi jumlah rendemen ekstrak. Jumlah rendemen ekstrak menunjukkan seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dari simplisia yang digunakan. Jumlah rendemen berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung dalam sebuah ekstrak. Rendemen dikatakan baik apabila memiliki nilai lebih dari 10%. Tingkat polaritas pelarut perlu

diperhatikan sebab tinggi rendahnya tingkat polaritas sebuah pelarut akan menentukan jumlah rendemen ekstrak yang dihasilkan. Semakin polar sebuah pelarut dan semakin sama kepolaran senyawa pada ekstrak dengan pelarut maka jumlah rendemen ekstrak yang dihasilkan akan semakin tinggi (Savitri, 2017).

3. Jenis senyawa yang diisolasi dengan pelarut yang sesuai dapat memengaruhi kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri suatu ekstrak. Karena adanya interaksi antara pelarut dan senyawa dalam ekstrak yang dapat dijadikan alternatif antibakteri alami (Aisy, Pultri dan Yulliana, 2022).

Jenis pelarut yang umumnya digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi seperti metanol, etanol, air, kloroform, etil asetat, n-heksana dan sebagainya.

a. Metanol

Metanol adalah pelarut organik yang bersifat polar protik dan sering digunakan dalam ekstraksi fitokimia karena kemampuannya mengekstrak senyawa polar dari bahan tumbuhan. Menurut penelitian Savitri *et al.* (2017), metanol merupakan pelarut yang efektif untuk mengekstraksi senyawa polar seperti flavonoid, alkaloid, saponin, dan fenolik, sehingga sering digunakan dalam skrining fitokimia dan uji bioaktivitas berbagai tanaman karena mampu menarik kelompok senyawa utama yang berkontribusi pada aktivitas biologis ekstrak. Studi lain juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki kandungan fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak dengan pelarut lain seperti etil asetat atau n-heksana, yang mengindikasikan bahwa metanol dapat menarik senyawa fitokimia polar secara efektif.

Penggunaan metanol sebagai pelarut dalam ekstraksi bahan alam banyak dilakukan karena metanol bersifat polar dan memiliki kemampuan yang baik dalam melarutkan berbagai senyawa metabolit sekunder. Menurut jurnal Harborne (1996),

metanol efektif mengekstraksi senyawa polar seperti flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan senyawa fenolik, karena ukurannya yang kecil memungkinkan penetrasi yang optimal ke dalam jaringan sel tanaman. Hal ini didukung oleh penelitian Cowan (1999) yang menyatakan bahwa senyawa fenolik dan flavonoid yang terekstraksi dengan metanol berperan penting dalam aktivitas antibakteri. Secara khusus pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), menurut jurnal Rahmawati *et al.* (2018), ekstrak metanol diketahui mengandung flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid, yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri melalui mekanisme gangguan membran sel dan penghambatan enzim bakteri.

b. Etanol 70%

Etanol 70% merupakan salah satu bentuk etanol yang paling banyak digunakan dalam bidang kesehatan, farmasi, dan penelitian laboratorium karena efektivitasnya sebagai antiseptik dan kemampuan penembusan membrannya yang optimal. Dibandingkan etanol dengan konsentrasi lebih tinggi, etanol 70% lebih efektif dalam merusak struktur dinding sel mikroorganisme karena adanya kandungan air yang meningkatkan difusi etanol ke dalam sitoplasma. Kehadiran air sebesar 30% memperlambat proses pengeringan dan koagulasi protein, sehingga denaturasi berlangsung lebih sempurna dan menyebabkan kematian mikroba secara efisien (Rahmawati *et al.*, 2020). Oleh karena itu, etanol 70% banyak digunakan sebagai desinfektan dalam prosedur laboratorium mikrobiologi, fasilitas kesehatan, serta proses sterilisasi instrumen dan permukaan kerja.

Selain sebagai antiseptik, etanol 70% juga berfungsi sebagai pelarut polar–semi-polar yang efektif dalam ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari bahan alam. Kandungan air dalam etanol 70% meningkatkan kelarutan senyawa seperti

flavonoid, tanin, dan beberapa glikosida yang tidak sepenuhnya larut dalam etanol murni, sehingga pelarut ini sering dipilih pada proses ekstraksi tumbuhan yang bertujuan untuk memperoleh kandungan bioaktif yang lebih beragam (Sari & Adnyana, 2019). Keunggulan tambahan seperti harga yang relatif terjangkau, ketersediaan yang mudah, serta stabilitas yang baik selama penyimpanan menjadikan etanol 70% sebagai pelarut serbaguna dalam penelitian fitokimia modern maupun industri berbasis bahan alam.

c. Air

Menurut jurnal ilmiah tentang ekstraksi fitokimia, air merupakan pelarut yang memiliki tingkat polaritas sangat tinggi dan digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif polar dari jaringan tanaman karena kemampuannya melarutkan senyawa-senyawa dengan gugus fungsional hidrofilik secara efektif. Air dipandang sebagai pelarut yang relatif murah, aman, dan tidak toksik, serta sangat polar sehingga cocok untuk menarik metabolit sekunder polar seperti tanin, saponin, glikosida, dan senyawa polifenolik lainnya, yang larut dengan baik dalam fase air sesuai prinsip “like dissolves like”. Water extraction dapat membantu difusi komponen bioaktif melalui jaringan tanaman dan sering digunakan dalam penelitian fitokimia untuk memperoleh ekstrak awal yang mencakup senyawa polar sebelum dilakukan pemisahan lebih lanjut (Mohammed dan Shnawa, 2022).

Menurut penelitian Mohammed dan Shnawa (2022), uji fitokimia terhadap ekstrak air daun *Averrhoa bilimbi*, pelarut air mampu mengekstraksi berbagai senyawa metabolit sekunder polar dari daun belimbing wuluh, antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, glikosida, dan karbohidrat, sebagaimana terdeteksi dalam skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri yang diisolasi

dari rongga mulut; meskipun tanin tidak terdeteksi dalam ekstrak air pada kondisi tertentu, senyawa-senyawa lain tersebut menunjukkan bahwa pelarut air dapat menarik banyak kelas senyawa polar yang berpotensi memberikan aktivitas biologis pada ekstrak daun belimbing wuluh.

d. Kloroform

Kloroform merupakan pelarut organik yang bersifat semi-non-polar dan banyak digunakan dalam ekstraksi fitokimia untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang kurang larut dalam pelarut polar. Menurut Ramadhan *et al.* (2024), kloroform memiliki kemampuan melarutkan senyawa non-polar hingga semi-polar seperti steroid, terpenoid, dan alkaloid non-polar, sehingga sering digunakan pada tahap fraksinasi setelah ekstraksi awal dengan pelarut polar. Sifat polaritas kloroform yang lebih rendah dibandingkan etanol atau metanol menyebabkan pelarut ini efektif dalam menarik senyawa lipofilik dari matriks tanaman, yang umumnya berkontribusi terhadap aktivitas biologis tertentu seperti antibakteri dan antiinflamasi.

Penggunaan pelarut kloroform dalam ekstraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) bertujuan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang bersifat non-polar hingga semi-polar. Menurut penelitian fitokimia yang dilakukan oleh Ramadhan *et al.* (2024), fraksi kloroform dari ekstrak daun atau bagian tanaman mampu mengekstraksi senyawa seperti steroid dan terpenoid, yang tidak terekstraksi secara optimal oleh pelarut polar. Sifat kloroform yang memiliki polaritas rendah memungkinkan pelarut ini melarutkan senyawa lipofilik dari jaringan daun belimbing wuluh, sehingga fraksi kloroform umumnya memiliki

komposisi senyawa yang berbeda dibandingkan fraksi air atau etanol dan berpotensi menunjukkan aktivitas biologis tertentu, seperti aktivitas antibakteri.

e. Etil asetat

Etil asetat adalah senyawa organik yang memiliki rumus kimia $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ dan termasuk ester yang terbentuk dari etanol serta asam asetat. Zat ini berwujud cairan bening tanpa warna dengan bau yang khas. Dalam industri, etil asetat banyak digunakan sebagai pelarut pada proses ekstraksi. Sebagai pelarut semi-polar, etil asetat memiliki sifat mudah menguap (volatil), tidak beracun, dan tidak menyerap kelembapan (non-higroskopis). Karakteristik tersebut membuat etil asetat efektif dalam menarik senyawa-senyawa semi-polar, seperti yang terdapat pada daun belimbing wuluh, ketika digunakan sebagai pelarut ekstraksi.

Penggunaan pelarut etil asetat yang bersifat semi-polar memungkinkan ekstraksi berbagai senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan yang tidak diekstraksi secara optimal oleh pelarut yang sangat polar atau non-polar. Menurut penelitian Putra *et al.* (2024) pada ekstrak etil asetat daun simpur, pelarut ini mampu mengekstraksi senyawa golongan tanin, polifenol, dan triterpenoid yang terdeteksi melalui skrining fitokimia. Selain itu, menurut studi pada kulit buah manggis oleh Putri *et al.* (2025), ekstrak etil asetat juga mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid, yang menunjukkan bahwa etil asetat dapat menarik senyawa bioaktif polar hingga semi-polar. Kombinasi hasil ini mengindikasikan bahwa pelarut etil asetat efektif mengekstraksi fenolik, flavonoid, tanin, triterpenoid, saponin, dan alkaloid dari bahan tanaman, sehingga sering dipilih dalam penelitian fitokimia untuk memperoleh profil metabolit yang beragam dan potensi aktivitas biologisnya.

f. N-heksana

N-heksana adalah senyawa hidrokarbon golongan alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Pada kondisi standar, n-heksana berbentuk cairan bening yang tidak dapat bercampur dengan air. Sebagai pelarut non-polar, n-heksana sering digunakan dalam proses ekstraksi karena dianggap cukup aman, tidak mudah bereaksi, mudah menguap, serta memiliki biaya yang terjangkau.

Penggunaan pelarut n-heksana bertujuan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat non-polar. Menurut jurnal Tiwari *et al.* (2011), n-heksana efektif dalam menarik senyawa seperti lipid, minyak atsiri, asam lemak, lilin (wax), dan pigmen non-polar, karena kesesuaian tingkat kepolaran antara pelarut dan senyawa target. Selain itu, menurut Cowan (1999), senyawa non-polar seperti terpenoid non-polar dan steroid tertentu yang terekstraksi dengan n-heksana juga memiliki potensi aktivitas antibakteri melalui mekanisme gangguan integritas membran sel bakteri. Oleh karena itu, ekstraksi menggunakan n-heksana menghasilkan profil senyawa aktif yang berbeda dibandingkan pelarut polar dan semi-polar, sehingga dapat memengaruhi variasi aktivitas biologis ekstrak.

E. Bakteri *Staphylococcus aureus*

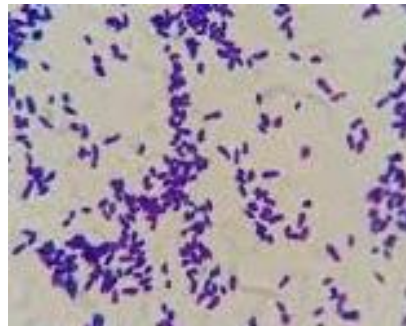
1. Klasifikasi bakteri

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Soedarto (2015), dijabarkan sebagai berikut :

Domain : *Bacteria*
Kingdom : *Eubacteria*
Phylum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacili*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

2. Morfologi



Gambar 2. Morfologi *Staphylococcus aureus* dengan Pewarnaan Gram

Sumber : Wijaya, 2019

Staphylococcus aureus adalah bakteri berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter sekitar 0,8–0,9 μm . Bakteri ini bersifat tidak bergerak (nonmotil) serta tidak memiliki kapsul maupun spora (Gupte, 1990). Pada pewarnaan Gram, *Staphylococcus aureus* tampak sebagai bakteri gram positif dan di bawah mikroskop terlihat tersusun berkelompok menyerupai buah anggur (Soedarto, 2015).

Koloni *Staphylococcus aureus* pada media agar nutrien setelah inkubasi 24 jam berukuran 2–4 mm, berbentuk bulat, cembung, permukaannya halus dan mengkilap, tampak keruh, memiliki tepi rata, serta mudah diemulsikan. Koloni ini menghasilkan pigmen kuning keemasan, dan produksinya dapat meningkat dengan penambahan susu atau 1% gliserol monoasetat (Gupte, 1990). Warna kuning pada

koloni berasal dari pigmen staphyloxanthin yang berperan sebagai faktor virulensi (Soedarto, 2015).

Staphylococcus aureus mampu tumbuh dalam kondisi aerob maupun anaerob fakultatif, bersifat katalase positif, dan dapat bertahan pada lingkungan berkadar garam tinggi (halofilik), seperti pada media dengan 10% NaCl (FK UNIBRAW, 2003). Bakteri ini juga cukup tahan terhadap kekeringan dan panas hingga suhu 50°C (Soedarto, 2015), meskipun pertumbuhan optimalnya terjadi pada suhu 37°C dan pH 7,4 (Gupte, 1990).

Secara umum, *Staphylococcus sp.* menunjukkan hasil katalase positif, yang menjadi pembeda utama dengan *Streptococcus sp.* Bakteri ini dapat memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat tanpa menghasilkan gas (Brooks dkk., 2005).

Pada uji koagulase, *Staphylococcus aureus* memberikan hasil positif. Bakteri ini mampu menghindari fagositosis dan respon imun hospes dengan cara menggumpalkan fibrinogen dalam plasma melalui enzim koagulase yang dimilikinya, sehingga menjadi salah satu faktor virulensinya. Selain itu, *Staphylococcus aureus* menghasilkan berbagai eksotoksin seperti sitolisin, leukosidin, dan eksfoliatif yang dapat merusak sel-sel hospes (Soedarto, 2015).

3. Infeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus yang umumnya hidup sebagai flora normal pada permukaan kulit manusia, dapat menjadi penyebab infeksi apabila kondisi tertentu mendukung perkembangannya. Bakteri ini mampu menimbulkan penyakit melalui invasi jaringan maupun melalui toksin yang dihasilkannya. Akibat sifat destruktif lokalnya, *S. aureus* sering menimbulkan peradangan piogenik khas pada berbagai bagian tubuh, termasuk kulit, tulang, dan katup jantung (Komala, 2023). Infeksi

dapat terjadi melalui paparan udara, air, debu, limbah, makanan, minuman, atau peralatan yang terkontaminasi (Salim & Soleha, 2017). Penularan ke dalam tubuh bisa berlangsung melalui tangan yang menyentuh area luka, luka operasi, lokasi pemasangan kateter, atau bagian tubuh dengan pertahanan kulit yang lemah, misalnya pada area eksim atau lecet (Soedarto, 2015).

Pada infeksi kulit akibat *Staphylococcus aureus* akan terjadi abses sebagai awal penyebaran organisme secara patogen. Pada manusia dengan gangguan sistem imun seperti penderita kanker dengan neutropeni, terapi intravena dapat memicu timbulnya infeksi hingga komplikasi berat akibat *Staphylococcus aureus*. Pada penderita fibrosis kistik, keberadaan bakteri ini dapat menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. Kandungan enzim proteolitik pada bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, infeksi tulang dan sendi, maupun endocarditis (Soedarto, 2015).

Prevalensi bakteri *Staphylococcus aureus* ditemukan sangat tinggi pada penderita dermatitis atopik, terutama pada bagian ketiak, rambut dan kulit kepala. Bisul besar yang mengalami lecet akan menimbulkan infeksi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Ketika infeksi *Staphylococcus aureus* menginfeksi bagian dalam jaringan dapat mengakibatkan penyakit berat seperti artritis septic, endocarditis dan pneumonia (Soedarto, 2015)

F. Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi

mikroorganisme pada inang yang terinfeksi dan mencegah pembusukan serta merusak bahan oleh mikroorganisme (Safitri, 2017).

Resistensi antibiotik merupakan kondisi ketika bakteri mengalami perubahan yang membuatnya mampu bertahan terhadap kerja antibiotik tertentu. Hal ini menyebabkan bakteri resisten sulit diberantas dengan terapi antibiotik dan dapat terus berkembang sehingga menimbulkan ancaman serius bagi kesehatan (Seko, Sabuna, & Ngginak, 2021). Salah satu bakteri yang diketahui telah mengalami resistensi terhadap sistem imun maupun berbagai obat adalah *Staphylococcus aureus* (Herlina, 2015).

Untuk mengatasi masalah resistensi, penggunaan antibiotik perlu diimbangi dengan terapi yang tepat, termasuk pemanfaatan agen antibakteri (Seko, Sabuna, & Ngginak, 2021). Antibakteri sendiri didefinisikan sebagai senyawa yang berfungsi membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Septiani, 2017). Zat ini termasuk dalam kelompok antimikroba yang berperan dalam menekan proliferasi mikroorganisme patogen.

Senyawa aktif antibakteri bekerja melalui berbagai mekanisme, antara lain merusak dinding sel, mengubah permeabilitas membran, merusak molekul protein maupun asam nukleat, menghambat kerja enzim, serta mengganggu proses sintesis protein dan asam nukleat pada bakteri. Salah satu pendekatan yang dapat diterapkan untuk mencegah maupun mengatasi resistensi bakteri adalah dengan memanfaatkan tanaman herbal yang mengandung senyawa aktif antibakteri.

Tanaman obat memiliki potensi besar sebagai alternatif pengganti antibiotik kimia karena kandungan metabolit sekundernya mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Seko, Sabuna, & Ngginak, 2021). Beberapa kelompok senyawa fitokimia

yang diketahui berperan sebagai antibakteri alami adalah fenol, flavonoid, dan alkaloid. Senyawa tersebut bekerja dengan merusak struktur dinding sel bakteri sehingga berpotensi digunakan sebagai agen antibakteri alami terhadap mikroorganisme patogen (Septiani, Dewi, & Wijayanti, 2017).

G. Antibiotik Kloramfenikol

1. Kloramfenikol (Kontrol positif)

Kloramfenikol merupakan antibiotik dengan mekanisme kerja menghambat enzim peptidyl transferase yang memiliki peran pada proses pembentukan ikatan peptida saat proses sintesis protein bakteri. Pembentukan ikatan peptida akan dihambat selama obat tetap terikat pada ribosom (Jamilah, 2015). Kloramfenikol dapat digunakan sebagai pengobatan dan pencegahan infeksi pada manusia maupun hewan.

Penggunaan kloramfenikol sebagai zat antibakteri dilakukan dengan pertimbangan terhadap sifat kloramfenikol yang memiliki spektrum luas (*broad spectrum*) sehingga kloramfenikol memiliki potensi untuk melawan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif (Asni dan Sianita, 2020).

Kloramfenikol merupakan antibiotik yang memiliki sifat bakteristatik namun dapat menjadi bakteriosidal pada konsentrasi tinggi. Dalam menghambat pertumbuhan bakteri, kloramfenikol bekerja dengan menghambat sintesis protein dari bakteri yang berikatan dengan sub unit 50s ribosom bakteri secara reversible sehingga dapat menghambat peptid bakteri.

Kloramfenikol dipilih sebagai pengobatan konjungtivitis bakteri sebab memiliki harga yang terjangkau namun tetap efektif untuk digunakan. Menurut Nabila,

Yusran dan Oktarlina (2021), penggunaan kloramfenikol terbukti sensitif mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Karakteristik kloramfenikol

Karakteristik kloramfenikol menurut Farmakope Indonesia edisi V (Depkes RI, 2014) adalah sebagai berikut :

Nama Umum : Kloramfenikol

Nama Lain : *Chloramphenicolum*

Nama Kimia : D (-) treo-2-diklorasetamido-1-p-nitrofenilpropana-1,3-diol

BM : 323,13 g/mol

Rumus Kimia : $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Suhu Lebur : 149°C-153°C

Pemerian : Hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang; putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan; larutan praktis netral terhadap lakmus P; stabil dalam larutan netral atau larutan agak asam. :

Kelarutan : Sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, dalam propilen glikol, dalam aseton dan dalam etil asetat.

Persyaratan : Pada sediaan kapsul kloramfenikol mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat, terlindungi dari cahaya.

H. Pengukuran Aktivitas Antibakteri

Dalam uji aktivitas antibakteri digunakan metode baku yang mampu mengendalikan seluruh variabel yang dapat memengaruhi hasil pengujian. Di Amerika Serikat, pengujian antimikroba mengikuti pedoman Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dengan menggunakan organisme uji standar

serta sampel obat pembanding yang telah ditetapkan. Berbagai metode ini berfungsi untuk menilai potensi antibiotik dalam suatu sampel maupun menilai tingkat kerentanan mikroorganisme. Penentuan aktivitas antibakteri umumnya dilakukan melalui dua pendekatan, yaitu metode dilusi dan metode difusi.

1. Metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk memastikan kembali aktivitas antimikroba dari suatu sampel yang sebelumnya telah diuji dengan metode difusi namun menghasilkan zona hambat yang tidak konsisten. Kelebihan metode ini yaitu satu konsentrasi senyawa antimikroba dapat dipakai untuk menguji beberapa jenis mikroorganisme. Parameter utama yang dinilai dalam metode ini meliputi Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (Sari, 2022).

Metode dilusi terbagi menjadi dua jenis, yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Pada dilusi cair, pengujian dilakukan dalam media cair seperti Nutrient Broth (NB) dengan cara membuat seri pengenceran senyawa antimikroba di dalam media, kemudian memasukkan mikroba uji. Teknik ini umumnya digunakan untuk menentukan nilai KHM. Sementara itu, dilusi padat dilakukan dengan menambahkan mikroorganisme ke media agar yang telah dicampur dengan agen antimikroba dan digunakan untuk menetapkan nilai KBM (Fitriana, Fatimah, dan Fitri, 2020).

2. Metode difusi

Metode difusi merupakan teknik untuk menilai tingkat kepekaan mikroorganisme terhadap senyawa antimikroba. Pada metode ini, cara yang paling sering digunakan adalah metode cakram kertas. Media agar yang telah ditanami

mikroba uji diletakkan cakram kertas yang berisi bahan antimikroba. Daerah jernih yang terbentuk di sekitar cakram merupakan indikator adanya aktivitas penghambatan. Keunggulan metode difusi yaitu prosedurnya sederhana, tidak memerlukan peralatan khusus, serta memberikan keleluasaan dalam memilih jenis obat yang akan diuji (Fitriana, Fatimah dan Fitri, 2020).

Metode difusi dapat dilaksanakan melalui tiga teknik, yaitu:

- a. Metode silinder dilakukan dengan meletakkan silinder gelas steril di atas permukaan agar yang sudah berisi suspensi mikroba dan dibiarkan mengeras. Silinder kemudian diisi dengan bahan uji dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 18–24 jam. Setelah inkubasi, diameter zona hambat diukur. Kelebihan teknik ini adalah volume zat uji yang masuk ke media dapat diketahui dengan pasti, namun kelemahannya adalah risiko silinder mudah terguling atau jatuh.
- b. Metode perforasi dilakukan dengan mencampurkan media agar cair pada suhu 45–50°C dengan suspensi mikroba dalam cawan petri steril, kemudian dibiarkan hingga memadat. Setelah mengeras, dibuat lubang menggunakan perforator, lalu ke dalam lubang tersebut diteteskan zat yang akan diuji aktivitas antimikrobanya. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam dan diameter zona hambat diukur. Kelebihan metode ini adalah ketebalan media tidak terlalu besar, namun kekurangannya lubang yang terbentuk kadang tidak seragam.
- c. Metode cakram kertas menggunakan cakram kertas saring yang telah diimpregnasi dengan zat antimikroba dalam konsentrasi tertentu. Cakram tersebut diletakkan di atas permukaan agar yang sudah diinokulasi mikroba uji, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. Setelah itu, diameter zona

hambat diukur. Keunggulan metode ini adalah jumlah zat uji dapat dikendalikan, tetapi kelemahannya bersifat tidak sepenuhnya kuantitatif karena tidak semua zat aktif meresap secara merata ke dalam agar.

Tabel 1.
Kategori Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat	Respons hambat bakteri
≤ 5 mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat Kuat

(Sumber : Davis and Stout, 1971 dikutip dalam sumilat, 2019)

I. Faktor yang Memengaruhi Aktivitas Antimikroba

Aktivitas antimikroba diuji secara in vitro untuk menilai kemampuan suatu agen antimikroba di dalam larutan, kadar efektifnya dalam jaringan atau cairan tubuh, serta tingkat sensitivitas mikroorganisme terhadap konsentrasi tertentu dari obat. Terdapat sejumlah faktor yang dapat memengaruhi hasil uji antimikroba sehingga perlu diperhatikan, antara lain:

1. pH lingkungan

Nilai pH sangat menentukan pertumbuhan bakteri karena aktivitas enzim yang berperan dalam berbagai proses metabolik untuk pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH. Ketidaksesuaian pH dapat menghambat kerja enzim dan pada akhirnya mengganggu pertumbuhan bakteri (Fajar, Yudha Perwira & Made Ernawati, 2022).

2. Komponen medium

Kandungan dalam media dapat memengaruhi besar kecilnya zona hambat melalui pengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan mikroba, laju difusi obat

antimikroba, serta aktivitas obat tersebut. Misalnya, sodium polyanetholsulfonate pada media kultur darah dan deterjen anionik dapat menghambat kerja aminoglikosida. Selain itu, protein serum dapat mengikat penisilin dengan tingkat berbeda-beda, mulai dari sekitar 40% pada metisilin hingga 98% pada dikloksasilin.

3. Kestabilan obat

Beberapa antimikroba dapat menurun efektivitasnya pada suhu inkubasi. Sebagai contoh, penisilin mengalami inaktivasi secara perlahan, sedangkan aminoglikosida dan siprofloksasin tetap stabil dalam jangka waktu yang lebih lama.

4. Lama inkubasi

Inkubasi yang lebih panjang meningkatkan peluang munculnya mutan resisten atau memungkinkan mikroba yang kurang sensitif mulai berkembang ketika konsentrasi obat menurun.

5. Aktivitas metabolisme organisme

Mikroorganisme yang aktif dan tumbuh cepat umumnya lebih peka terhadap obat dibandingkan mikroorganisme dalam fase istirahat. Mikroba yang tidak aktif secara metabolisme namun mampu bertahan terhadap paparan obat yang lama mungkin tetap menghasilkan keturunan yang sensitif terhadap obat yang sama.

6. Kekeruhan suspensi bakteri

Suspensi bakteri yang kurang keruh cenderung menghasilkan zona hambat yang lebih luas. Sebaliknya, semakin pekat atau keruh suspensi, semakin kecil diameter zona hambat yang terbentuk (Kuswiyanto, 2016).

7. Ketebalan media

Ketebalan agar idealnya sekitar 4 mm; jika lebih tipis, difusi obat akan berlangsung lebih cepat, sedangkan jika lebih tebal, proses difusi menjadi lebih lambat (Kuswiyanto, 2016).

J. Kajian Pustaka

1. Penelitian menurut Wijayanti (2018)

Penelitian ini menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh terhadap *Staphylococcus aureus*, bakteri yang dikenal sebagai salah satu penyebab infeksi nifas, melalui pengamatan terbentuknya diameter zona hambat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada seluruh konsentrasi yang diuji, dengan diameter zona hambat masing-masing sebesar 7 mm pada konsentrasi 2,5%, 9,67 mm pada konsentrasi 5%, dan 14,67 mm pada konsentrasi 10%. Temuan ini memperlihatkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri yang efektif dan berpotensi digunakan sebagai alternatif pengobatan infeksi nifas yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*.

2. Penelitian menurut Aisy, Putri dan Yuliana (2022)

Pada penelitian ini digunakan ekstrak daun pinus dengan variasi pelarut yaitu air, etanol 96% dan n-heksana dengan konsentrasi masing-masing 100%. Perbedaan jenis pelarut yang digunakan memengaruhi luas zona hambat antibakteri ekstrak daun pinus terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pada pelarut air sebesar 19,39 mm (kuat), etanol 96% sebesar 11,44 mm (kuat) dan n-heksana 0 mm (tidak ada). Pada penelitian ini digunakan kontrol positif yaitu kloramfenikol 1% dan

akuades steril sebagai kontrol negatif dengan masing-masing luas zona hambat yaitu 15,17 mm dan 0 mm (tidak ada).

3. Penelitian menurut Wahyuni (2024)

Pada penelitian ini membandingkan pelarut etanol dengan etil asetat antibakteri ekstrak kulit buah salak pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini menghasilkan bahwa ekstrak etanol dan etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ekstrak etanol menunjukkan diameter zona hambat yang lebih luas dibandingkan dengan ekstrak etil asetat yaitu 15mm, 16,2mm, 17,2mm, pada konsentrasi 20%, 30%, dan 40%, sedangkan diameter zona hambat ekstrak etil asetat yaitu 12,4 mm, 13,4mm, dan 14,8 pada konsentrasi 20%, 30%, dan 40%.