**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Uraian Tumbuhan Karamunting**

**2.1.1 Taksonomi Tumbuhan Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**



**Gambar 2.1 Tumbuhan Karamunting**

Tumbuhan karamunting termasuk salah satu tumbuhan berbunga yang termasuk dalam famili *myrtaceae* suku yang sama dengan jambu kelutuk *(psidiumguajava)* (Ernawati *et al*., 2019). Adapun Klasifikasi karamuntig tersusun sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo :*Myrtales*

Family : *myrtaceae*

Genus : *Rhodomyrtus*

Spesies : (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)

**2.1.2 Nama Ilmiah Dan Nama Lain Tumbuhan Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Nama ilmiah : (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)

Nama daerah : di Indonesia tumbuhan ini dikenal dengan nama lain karamunting (sumatera utara, sumatera selatan), harimonting (batak), karaunting (sumatera barat), kalimuntiong (riau), karaduduk (Bangka), masisin (kalimantan).

Nama asing : sim (Vietnam), rosemyrtle (inggris) (Ernawati *et al*., 2019).

**2.1.3 Morfologi Tumbuhan Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Karamunting merupakan tumbuhan yang tumbuh cepat umumnya memiliki tinggi sekitar 1-1,5 meter dapat juga mencapai tinggi 4 meter. Daunnya berwarna hijau, letaknya berhadapan. Helai daun berbentuk oval, tepi rata, dan tulang daun berjumlah tiga dari pangkal. Permukaan atas daun berwarna hijau mengkilap, bagian bawah daun berwarna hijau abu-abu dan berbulu.

 Bunganya merupakan bunga tunggal dan berkelompok 2-3 bunga, memiliki diameter 2,5-3 cm, berwarna merah muda (pink) sampai ungu dengan benang sari banyak dan tidak beraroma. Kelopak bunga berlekatan, jumlah mahkota bunga lima dan putik satu.

 Buah karamunting merupakan buah beri berbentuk lonjong panjang sekitar 1-1,5 cm dengan lebarnya sekitar 1 cm. Buah yang masih muda berwarna hijau dan rasanya kelat (getir), sedangkan yang masak berwarna merah ungu sampai hitam dan rasanya manis. Kulit buah berbulu, Pada bagian atas buah terdapat kaliks yang persisten. Bagian dalam buah memiliki empat sampai enam ruang yang dipisahkan oleh septa semu, berdaging lunak dan ber air, serta mengandung banyak biji kecil-kecil tipis berukuran sekitar 1,5 mm. buah karamunting yang sudah tua memiliki rasa manis segar, mengandung banyak vitamin dan mineral. Walaupun kulit buahnya tebal, namun ketika buah sudah tua, kulit buah menjadi sangat lunak dan dapat dimakan bersama pulp atau bagian dalam buahnya yang terdiri dari daging buah dan biji. Buah yang sudah tua dapat dikonsumsi langsung atau diolah menjadi jus (Ernawati *et al.*, 2019).

**2.1.4 Manfaat Tumbuhan Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit, seperti bagian bunga pada tanaman ini dapat digunakan sebagai obat diare, bagian buahnya digunakan untuk anti bisa dan obat diare. Akar karamunting juga digunakan sebagai obat yaitu untuk sakit jantung, mengurangi rasa sakit setelah melahirkan, dan untuk perawatan bekas luka sedangkan daun karamunting digunakan untuk mengobati luka, kudis, diare, sakit kepala, mencegah infeksi, antibakteri dan pendarahan setelah melahirkan (Sianturi *et al*., 2022). Selain itu menurut (Marwati *et al*., 2021) Karamunting merupakan tanaman obat yang berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker.

**2.1.5 Kandungan Senyawa Kimia Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Kandungan senyawa kimia metabolit sekunder yang terkandung dalam daun karamunting antara lain flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan steroid (Ramadhanty *et al*., 2023).

**2.2 Simplisia**

 Simplisia merupakan bahan alami yang digunakan untuk pengobat dan belum mengalami pengolahan apapun kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi tiga yaitu simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral).

1. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanamna atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanaman dan belum berupa zat kimia murni.
2. Simplisia hewani merupakan simplisia yang berupa hewan untuk bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni.
3. Simplisia pelikan (mineral) adalah simplisia berupa bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah secara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Depkes, 1985).

**2.2.1 Tahapan Pembuatan Simplisia**

Pada umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan sebagai berikut: pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan.

a. Pengumpulan Bahan Baku

Kadar senyawa aktiif dalam suatu simplisia berbeda-beda tergantung pada:

1. Bagian tanaman yang digunakan
2. Umur tanaman atau bagian tanaman pada saat panen
3. Waktu panen
4. Lingkungan tempat tumbuh

Waktu panen erat kaitannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat ialah pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah yang besar. Panen dapat dilakukan dengan menggunakan tangan atau alat khusus atau mesin.

b. Sortasi Basah

 Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari akar suatu tanaman obat. Bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, akar yang telah rusak, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisa dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal

c. Pencucian

 Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotoran lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. pencucian dilakukan harus sesingkat mungkin untuk menghindari terlarutnya zat aktif pada simplisia (Depkes, 1985).

Simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air mengalir, dicuci dalam waktu sesingkat mungkin. dalam satu kali pencucian dapat menghilangkan lebih kurang 25% jumlah mikroba awal. Pencucian tidak dapat membersihkan simplisia dari semua mikroba karena air pencucian yang digunakan biasanya mengandung juga sejumlah mikroba. Pada simplisia akar, batang atau buah, untuk mengurangi jumlah mikroba awal dapat dilakukan dengan pengupasan kulit luar terlebih dahulu. Hal ini dilakukan untuk mengurangi jumlah mikroba awal karena sebagian besar mikroba biasanya terdapat pada permukaan bahan simplisia. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah mikroba awal simplisia. Jika air yang dipakai untuk pencucian kotor, maka jumlah mikroba pada permukaan bahan simplisia dapat bertambah dan air yang terdapat pada permukaan bahan tersebut dapat mempercepat pertumbuhan mikroba. Penting sekali untuk memperhatikan kualitas air pencucian yang digunakan untuk mencuci. Pencucian sebaiknya dilakukan dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang terlepas tidak menempel kembali (Parfati,2018).

d. Perajangan

 Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengemasan dan penggilingan. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau dan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang diinginkan. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, maka semakin cepat air menguap sehingga mempercepat waktu pengeringan. Namun jika irisannya terlalu tipis dapat menyebabkan hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehinngga akan mempengaruhi aroma dan rasa yang diinginkan. Oleh karena itu, untuk bahan-bahan simplisia tertentu dihindari perajangan yang terlalu tipis untuk mecegah berkurangnya zat berkhasiat pada simplisia tersebut (Depkes, 1985).

e. Pengeringan

Tujuan pengeringan adalah untuk memperoleh simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik pada simplisia akan mencegah penurunan mutu dan kerusakan simplisia. Pengeringan simplisia dapat dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembapan udara, aliran udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan. Suhu pengeringan tergantung pada bahan simplisia yang akan dikeringkan dan bagaimana cara pengeringannya. Bahan simplisia dapat dikeringkan pada suhu 30ºC sampai dengan 90ºC, tetapi suhu yang terbaik yaitu tidak melebihi dari 60ºC. untuk bahan simplisia yang mengandung senyawa aktif yang tidak tahan akan panas dikeringan pada suhu rendah seperti 30ºC sampai 45ºC. Kelembapan juga tergantung pada bahan simplisia dan proses selama pengeringan, kelembapan akan menurun selama berlangsungnya proses pengeringan (Depkes, 1985).

f. Sortasi Kering

 Sortasi setelah pengeringa dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia disimpan. Pada sortasi ini dapat dilakukan dengan atau secara mekanik. Sortasi ini dilakukan untuk membuang partikel-partikel seperti pasir, atau benda-benda tanah lainnya yang masih ada tertinggal dalam simplisia sebelum simplisia dibungkus.

g. Pengepakan Dan Penyimpanan

 Simplisia dapat rusak ataupun menurunnya mutu pada simplisia dapat disebabkan beberapa faktor diantaranya cahaya, oksigen udara, reaksi kimia intern, dehidrasi, pengotoran, penyerapan air, serangga, dan kapang. Oleh karena itu saat penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mengakibatkan kerusakan simplisia yaitu cara pengepakan , pembungkusan dan wadahnya. Simplisia disimpan didalam wadah yang tidak bersifat racun, dan tidak bereaksi dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadina reaksi serta penyimpangan warna, bau, dan rasa pada simplisia. Selain dari itu wadah harus dapat melindungi simplisia dari cemaran mikroba, kotoran maupun serangga, serta dapat mempertahankan senyawa aktif (Depkes, 1985).

Simplisia disimpan di tempat-tempat yang memiliki suhu kamar (15- 30°C) tergantung pada sifat dan ketahanan simplisia.Simplisia yang tidak tahan panas dikemas dalam wadah yang melindungi simplisia terhadap cahaya. Bahan kemas yang dapat digunakan antara lain alumunium foil, plastik atau botol yang berwarna gelap, kaleng dan sebagainya (Parfati,2018).

h. Pemeriksaan Mutu

 pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada saat penerimaan simplisia, simplisia yang diterima berupa simplisia murni dan memenuhi persyaratan umum untuk simplisia. Pada pemeriksaan mutu simplisia pemeriksaan dapat dilakukan dengan cara makroskopik. Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan panca indra dengan mengamati bentuk, ciri-ciri luar, warna dan bau simplisia, akan tetapi ada kalanya pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat optik berupa kaca pembesar (Depkes, 1985).

Secara umum pemeriksaan mutu simplisia meliputi beberapa parameter seperti yang terdapat pada farmakope herbal yaitu pemeriksaan identitas simplisia pola kromatografi, susut pengeringan, abu total, abu tidak larut asam, kadar sari, dan kandungan kimia simplisia (Parfati,2018).

**2.2.2 Karakterisasi Simplisia**

Karakterisasi merupakan langkah awal untuk mengetahui kualitas mutu suatu ekstrak sesuai dengan monografi ekstrak yang telah ditentukan. Hal ini sangat penting dilakukan untuk memanfaatkan ekstrak sebagai bahan pengobatan dan peningkatan imunitas tubuh.

Karakterisasi ekstrak terdiri dari dua proses yaitu parameter spesifik dan nonspesifik. Parameter spesifik merupakan aspek analisis kimia secara kualitatif maupun kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif yang berkaitan dengan aktivitas farmakologis dari suatu ekstrak. Parameter ini terdiri dari uji makroskopik dan mikroskopik, penentuan kadar sari larut dalam etanol dan larut dalam air. Sedangkan parameter nonspesifik adalah analisis secara fisik, kimia, dan mikrobiologi yang berkaitan dengan keamanan dan stabilitas suatu ekstrak. Parameter ini terdiri dari kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam (Marpaung & Septiyani, 2020).

a. Karakteristik Spesifik

1. Makroskopik

Identifikasi makroskopik dilakukan dengan cara melihat habitus dari tumbuhan, yang dapat menunjukkan bahwa suatu tumbuhan termasuk semak, pohon berkayu atau tidak. Pengamatan dilakukan pada bagia- bagian tumbuhan seperti bentuk batang, bentuk daun, tata letak daun, sistem perakaran, sifat-sifat bunga, buah dan bjinya. Pada umumnya Pengamatan makroskopik ini tidak memerlukan alat khusus, tetapi jika ingin mengetahui secara seksama dapat dilakukan dengan menggunakan lup sebagai alat bantu.

1. Mikroskopik

Identifikasi mikroskopik dilakukan bertujuan untuk melihat struktur dari

bagian-bagian tumbuhan, dan kemungkinan lokasi dari zat-zat yang berkhasiat dalam tumbuhan yang dapat dikenali karena terdapat warna atau bentuk-bentuk sel-sel yang berbeda dengan sekitarnya, serta adanya benda-benda argestik dalam tumbuhan tersebut. Dala pengamatan mikroskopik ini selain mengamati bentuk juga mengidentifikasi komponen-komponen penyusun dari tumbuhan tersebut. Identifikasi mikroskopik ini juga dapat dilakukan guna mengetahui suatu keaslian bahan obat (Murwani & Iswarin. 2017).

b. Karakteristik Nonspesifik

1. Kadar Abu Total

Abu merupakan residu anorganik dari hasil pembakaran atau hasil oksidasi komponen organik bahan pangan. Kadar abu ialah campuran dari komponen anorganik atau mineral yang terdapat pada suatu bahan pangan. Kadar abu tersebut dapat menunjukkan total mineral dalam suatu bahan pangan. Mineral yang terdapat dalam suatu bahan terbagi menjadi dua macam garam yaitu garam organik dan garam anorganik yang termasuk dalam garam organik ialah garam-garam asam mallat, oksalat, asetat, pektat. Sedangkan garam anorganik adalah dalam bentuk garam fosfat, karbonat, khlorida, sulfat, dan nitrat.

Penentuan kadar abu total dapat digunakan untuk menentukan baik atau tidaknya suatu pengolahan, mengetahui jenis bahan-bahan yang untuk menentukan parameter nilai gizi suatu bahan makanan. Kandungan abu dapat digunakan untuk memperkirakan kandungan dan keaslian bahan yang digunakan.

1. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Kadar abu tidak larut asam merupakan zat yang tertinggal bila suatu sampel bahan makanan dibakar sempurna di dalam suatu tungku pengabuan,kemudian dilarutkan dalam asam (HCl) dan sebagian zat tidak dapat larut dalam asam. Penentuan kadar abu tak larut asam berhubungan erat dengan kandungan mineral yang terdapat dalam suatu bahan, kemurnian serta kebersihan bahan tersebut.

1. Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan bertujuan untuk mengetahui persentase kandungan air dalam bahan setelah proses pengeringan atau pengentalan melalui metode yang sesuai seperti titrasi, destilasi atau gravimetri. Kadar air yang tinggi juga dapat menyebabkan terjadinya dekomposisi senyawa aktif dalam ekstrak akibat dari adanya aktivitas reaksi enzimatis. Oleh sebab itu, kadar air sangat menentukan kualitas dan stabilitas suatu ekstrak maupun pembentukan suatu sediaan ekstrak tersebut (Marpaung & Septiyani, 2020).

**2.3 Ekstraksi**

Ekstraksi ialah pemisahan zat target dimana teknik pemisahan berdasarkan perbedaan zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang saling bercampur. Selain itu ekstraksi adalah proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dalam standar prosedur ekstraksi. Proses ekstraksi akan berhenti jika kesetimbangan telah tercapai antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam simplisia. Setelah proses ekstraksi selesai, residu padat dan pelarut dipisahkan dengan cara penyarian (Sudarwati & Fernanda, 2019). Selain itu ekstrasi adalah proses yang dilakukan oleh cairan penyari untuk menarik keluar zat aktif yang terdapat pada tanaman obat. Zat aktif berada didalam sel, sehingga untuk dapat memperoleh zat aktif dari dalam sel tersebut diperlukannya suatu cairan penyari atau pelarut tertentu. Cairan penyari yang biasa digunakan adalah methanol, etanol, kloroform, heksana, eter, aseton, benzene dan etil asetat. Zat aktif yang bersifat polar harus mengunakan penyari yang bersifat polar juga agar komponen tersebut dapat membentuk larutan. Berdasarkan dari sifat larutan penyari yang digunakan harus sesuai dengan sifat komponen kimia yang akan disari (Ahmad, 2018).

**2.3.1 Ekstraksi Cara Dingin**

 Ekstraksi cara dingin dalah ekstraksi tanpa adanya pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung. Tujuannya untuk menghindari rusaknya senyawa, yang dimaksud rusak karena pemanasan. Jenis ekstraksi dingin adalah maserasi dan perkolasi.

a. Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi simplisia yang dilakukan untuk bahan atau simplisia yang tidak tahan panas dengan cara merendam di dalam pelarut tertentu selama waktu tertentu. Maserasi dilakukan pada suhu ruang 20-30 °C agar mencegah penguapan pelarut secara berlebihan karena faktor suhu dan melakukan pengadukan selama 15 menit agar bahan dan juga pelarut tercampur (Hujjatusnaini.N,dkk.2021).

Maserasi merupakan salah satu cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Hal ini terus berulang sehingga terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Sudarwati & Fernanda, 2019).

 Metode maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, dan lilin. Keuntungan dari metode ini adalah cara pengerjaan dan pelarutan yang digunakan sederhana dan mudah digunakan (Ahmad, 2018).

b. Perkolasi

 Perkolasi merupakan proses penyarian simplisia yang dilakukan pada temperatur kamar dengan mengunakan pelarut yang selalu baru. Perkolasi dilakukan dalam wadah berbentuk silindris atau kerucut (perkolator), yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Bahan pengekstraksi yang dialirkan secara terus menerus dari atas akan mengalir turun secara lambat melintasi simplisia yang ummumya berupa serbuk kasar. Proses penyaria pada perkolasi memiliki beberapa tahap, yaitu tahap pelembapan bahan, tahap perendaman antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstraksi) terus- menerus hingga diperoleh perkolat (Ahmad, 2018).

 Parameter berhentinya penambahan pelarut adalah perkolat sudah tidak mengandung komponen yang akan diambil. Pengamatan secara fisik pada ekstraksi bahan alam terlihat tetesan perkolat sudah tidak berwarna. Caranya, serbuk bahan dibasahi dengan pelarut yang sesuai dan ditempatkan pada bejana perkolator. Bagian bawah bejana diberi sekat berpori untuk menahan serbuk. Cairan pelarut dialirkan dari atas kebawah melalui serbuk tersebut. Cairan pelarut akan melarutkan zat aktif dalam sel-sel yang dilalui sampai keadaan jenuh (Heliawati,2018).

**2.3.2 Ekstraksi Cara Panas**

 Ektraksi cara panas merupakan ekstraksi yang melibatkan panas dalam prosesnya. Dengan adanya panas secara otomatis akan mempercepat proses penyarian dibandingkan cara dingin.

a. Reflux

 Metode reflux digunakanakan apabila dalam sintesis tersebut menggunaka pelarut volatil. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasn biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi berjalan hingga selesai. Prinsip dari metode refluks ini yaitu pelarut volatile yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang semula dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan akan turun lagi ke dalam wadah reaksi shingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsug. Sedangkan aliran gas N2 diberikan agar tidak ada uap air atau gas oksigen yang masuk terutama pada senyawa organik logam untuk sintesis senyawa anorganik karena sifatnya reaktif.

b. Soxhlet

 Sokletasi merupakan metode atau proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang-ulang dengan meggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terisolasi. Sokletasi digunakan pada pelarut organik tertentu. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel, secara teratur pelarut tersebut dimasukkan kembali kedalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut. Pelarut yang telah membawa senyawa kimia pada labu destilasi dapat diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga pelaut tersebut dapat diangkat lagi jika suatu campuran organik berbentuk cair atau padat ditemui pada suatu zat padat, maka dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut yang diingiinkan (Sudarwati & Fernanda, 2019).

c. Infusa

 Infusa adalah metode ekstraksi menggunkan pelarut air. Pada waktu proses infusdasi berlangsung temperatur pelarut air harus mencapai suhu 90ºC selama 15 menit. Perbandingan antara bahan dan air adalah 1:10. Cara yang biasa dilakukan ialah serbuk bahan dipanaskan dalam panci dengan air secukupnya selama 15 menit terhitung mulai dari suhu mencapai 90ºC sambil sesekali diaduk. Saring dengan kain flannel selagi masih panas, dan tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang diinginkan. Jika bahan mengandung minyak atsiri maka penyarian dilakukan setelah dingin (Sudarwati & Fernanda, 2019).

d. Dekosi

Dekoksi merupakan proses ekstraksi yang mirip dengan proses infusdasi, hanya saja infus yang dibuat membutuhkan waktu lebih lama (≤30 menit) dan suhu pelarut sama dengan titik didih air. Caranya, serbuk bahan ditambah air dengan rasio 1 : 10, panaskan dalam pancenamel atau panci stainles steel selama 30 menit. Kemudan bahan sesekali diaduk, lalu di saring pada kondisi panas melalui kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang diinginkan (Heliawati,2018).

e. Destilasi

 Pada metode ini, bahan yang akan disuling bersentuhan langsung dengan air mendidih. Bahan tersebut menampung di atas air atau terendam secara sempurna tergantung pada berat jenis dan jumlah bahan yang disuling. Air dipanaskan menggunakan metode pemanasan yang biasa dilakukan , yaitu dengan panas langsung, mantel uap, pipa uap melingkar tertutup atau dengan memakai pipa uap berlingkar terbuka atau berlubang. Ciri khas dari metode ini ialah ditandai dengan kontak langsung antara bahan denangan air mendidih.

f. Digesti

 Digesti merupakan cara maserasi dengan menggunakan pemanasan lemah, yaitu pada suhu 40-50ºC, hanya untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan. Proses pemanasan pada sistem penyarian dimaksudkan untuk meningkatkan efisiensi dari pelarut dalam menyari sampel (Sudarwati & Fernanda, 2019).

**2.4 Fraksinasi**

Fraksinasi berasal dari kata *fraction* atau bagian, secara harfiah dapat diartikan sebagai mekanisme untuk memilah-milah atau memisah-misahkan suatu kumpulan atau kesatuan menjadi beberapa bagian (*fraction* atau *part*) atau dengan kata lain dapat dikatakan sebagai proses pembagian kelompok. Sebuah ekstrak dari suatu bahan tanaman dapat mengandung puluhan atau ratusan senyawa (Nugroho, 2017).

Fraksinasi merupakan proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi). Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas (Dewi,dkk.2022).

Fraksinasi dilakukan untuk memperoleh fraksi (bagian) tertentu dari suatu ekstrak, dimana bagian itulah yang merupakan fraksi aktif, dan perlu dipisahkan dari fraksi lainnya yang kurang aktif. Adapun Tujuan lainnya ialah dalam rangka mendapatkan ekstrak yang lebih murni, sehingga perlu dihilangkan senyawa-senyawa lain yang mengotori atau mengganggu. Fraksinasi juga diperlukan ketika akan melakukan isolasi atau pemisahan satu senyawa metabolit sekunder tunggal. Dengan demikian maka proses pemisahan senyawanya menjadi lebih mudah.

Fraksinasi dapat dilakukan dengan beberapa teknik, di antaranya yaitu dengan *liquid-iquid extraction* (ekstraksi cair-cair) atau menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam dan fase gerak tertentu (Nugroho, 2017).

**2.4.1 *Liquid-Iquid Extraction***

*Liquid-iquid extraction* atau ekstraksi cair-cair sering juga disebut dengan fraksinasi cair-cair atau disebut juga corong pisah. Fraksinasi corong pisah adalah apabila suatu cairan ditambahkan ke dalam ekstrak yang telah dilarutkan dengan caian lain yang tidak dapat bercampur dengan yang pertama, maka akan terbentuk dua lapisan dimana pencampuran keduanya dilakukan dalam corong pisah (Sudarwati & Fernanda, 2019).

Prinsip yang digunakan dalam proses ekstraksi cair-cair adalah pada perbedaan koefisien distribusi zat terlarut dalam dua larutan yang berbeda fase dan tidak saling bercampur. Peristiwa ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen suatu campuran cair dengan mengontakkan pada cairan lain. Sehingga disebut juga ekstraksi cair atau ekstraksi pelarut (*solvent extract*). Prinsip kerjanya adalah pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan (Dewi,dkk.2022).

**2.4.2 Fraksinasi Dengan Kolom Kromatografi**

Pada fraksinasi dengan kromatografi kolom, maka proses pembagian fraksinya dilakukan pada sebuah kolom dengan menggunakan prinsip-prinsip kromatografi di mana sama-sama mengaplikasikan prinsip tingkat kepolaran atau polaritas, prinsip yang sama seperti pada *liquid-liquid extraction*. Pada kromatografi kolom dikenal fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*) (Nugroho, 2017).

Kromatografi adalah teknik pemisahan zat dari campuran berdasarkan perbedaan migrasi komponen-komponen tersebut dari fase diam oleh fase gerak. pemisahan ini dilakukan berdasarkan sifat fisika-kimia umum dari molekul seperti:

1. kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan)
2. kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorbsi/penjerapan)
3. kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (keatsirian) (Dewi,dkk.2022).

**2.5 Metabolit Sekunder**

Kandungan zat metabolit sekunder merupakan penentu utama dari akivitas farmakologis suatu bahan alam. Beragamnya kandunngan zat metabolit sekunder antara spesies tumbuhan menyebabkan aktivitas farmakologis yang beragam pada tumbuhan. Zat metabolit sekunder adalah molekul organik kecil yang dihasilkan dari metabolisme sekunder tumbuhan (Irawan *et al*., 2023).

**2.5.1 Alkaloid**

Alkaloid merupakan salah satu kelompok metabolit sekunder terpenting yang ditemukan pada tumbuhan. Alkaloid khas yang berasal dari suatu tumbuhan umumnya senyawa ini besifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam cincin heterosiklik) dan biasanya memiliki aktivitas fisiologis. Kebanyakan alkaloid memiliki rasa pahit, bersifat basa lemah dan sedikit larut dalam air serta dapat larut dalam pelarut organik non polar seperti dietil eter, kloroform dan lainnya. Alkaloid pada dasarnya merupakan senyawa yang bersifat basa dengan keberadaan atom nitrogen dalam strukturnya. Asam amino berperan sebagai senyawa pembangun dalam biosintesis alkaloid. Alkaloid memiliki kelarutan yang khas dalam pelarut organik. Golongan senyawa ini mudah larut dalam alkohol dan sedikit larut dalam air. Garam alkaloid biasanya larut dalam air. Di alam, alkaloid umumnya banyak di temukan pada tumbuhan (Julianto, 2019).

**2.5.2 Flavonoid**

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenolik yang paling beragam dan dapat diperoleh hampir pada semua tanaman, yang pada umumnya terdapat pada jaringan epidermis pada daun dan kulit buah. Secara alamiah bagi tumbuhan sendiri, flavonoid dapat berperan sebagai pelinung dari sinar UV dan sebagai zat pewarna. Adapun manfaat flavonoid bagi kesehatan manusia ialah sebagai antikanker, antiinflamator, antioksidan, antialergi dan lain lain (Nugroho, 2017).

Senyawa flavanoid termasuk kelompok senyawa fenol terbesar yang di-temukan di alam. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah dan biji. Klasifikasi flavonoid sangat beragam, diantaranya ada yang mengklasifikasikan flavonoid menjadi flavon, flavonon, isoflavon, flavanol, flavanon, antosianin, dan kalkon. (Heliawati 2018).

**2.5.3 Triterpenoid atau Steroid**

Senyawa terpena adalah kelompok senyawa organik hidrokarbon yang banyak dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan. Terpenoid juga dihasilkan oleh serangga. Senyawa ini pada umumnya memberikan bau yang kuat dan dapat melindungi tumbuhan dari herbivora dan predator. Terpenoid juga ialah komponen utama dari minyak atsiri dari beberapa jenis tumbuhan dan bunga. Sebagian besar tetrpenoid tidak berwarna, merupakan cairan yang memiliki bau, mudah menguap dengan adanya uap air panas. Struktur senyawa terpenoid merupakan alil siklik, dimana beberapa dintaranya adalah senyawa tak jenuh dengan satu atau lebih ikatan rangkap (Julianto, 2019).

Fungsi dari terpenoid adalah sebagai antiseptik, ekspektoran, spasmolitik, anestetik dan sedative, sebagai bahan pemberi aroma makan dan parfum (monoterpenoid). Sebagai tumbuhan obat untuk penyakit diabetes, gangguan menstruasi, patukan ular, gangguan kulit, kerusakan hati dan malaria (triterpenoid) inhibitor tumor dan senyawa pemanis (Heliawati 2018).

Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan melalui reaksi penurunan dari terpena atau skualena. Steroid merupakan suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Steroid merupakan kelompok senyawa yang penting dengan struktur dasar sterana jenuh. Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa dan pengelompo-kan ini berdasarkan pada efek fisiologis yang diberikan oleh masing-masing senyawa. Kelompok-kelompok itu adalah sterol, asam-asam empedu, hormon seks, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak dan sapogenin.

Manfaat steroid pada mausia adalah bertindak dalam perkembangan fungsi reproduksi, mengatur metabolisme karbohidrat dan memiliki efek anti-inflamasi pada tubuh serta membantu menjaga tekanan darah dan mengatur keseimbangan garam dan air dalam tubuh (Heliawati 2018).

**2.5.4 Tanin**

Tanin merupakan suatu senyawa fenolik yang memiliki rasa pahit dan sepat atau kelat, dapat bereaksi dan mengumpulkan protein atau senyawa organik lainnya yang mengandung asam amino dan alkaloid. Senyawa senyawa tanin ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini berperan penting untuk melindungi tumbuhan dari pemangsaan oleh herbivora dan hama serta sebagai agen pengatur dalam metabolisme tumbuhan (Julianto, 2019).

**2.5.5 Saponin**

Ciri utama dari saponin ialah terbentuknya busa ketika dimasukkan ke dalam air. Pada dasarnya saponin ditemukan dalam bentuk *glycoside*, yaitu glikosida yang memiliki sifat hidrofilik (suka air) serta lifofilik (suka minyak), seperti sifat pada sabun maupun sampo. Saponin mudah terlarut dalam air dan bersifat racun terhadap ikan atu hewan berdarah dingin lainnya. Tidak hanya itu saponin memiliki manfaat lain seperti sebagai senyawa antiinflamatori, sebagai bahan dalam pembuatan sampo, digunakan juga dalam industri farmasi, dan agen pembentuk busa pada pemadam kebakaran (Nugroho, 2017).

**2.5.6 Glikosida**

Glikosida merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang berikatan dengan senyawa gula melalui ikatan glikosida. Glikosida memiliki fungsi penting dalam system hidup suatu organisme. Sebagian tumbuhan menyimpan senyawa-senyawa kimia dalam bentuk glikosida yang tidak aktif. Senyawa-senyawa kimia tersebut akan dapat kembali aktif dengan adanya bantuan enzim hydrolase yang menyebabkan bagian gula putus, dan menghasilkan senyawa kimia yang siap untuk digunakan. Beberapa glikosida dalam tumbuhan digunakan dalam pengobatan (Julianto, 2019).

**2.6 Uji Toksisitas**

Toksisitas adalah salah satu zat kimia atau alami yang memberikan efek yang merugikan yang dapat menyebabkan penyakit atau bahkan kematian. Uji toksisitas perlu dilakukan bertujuan untuk mengukur efek toksik suatu senyawa, memastikan perkiraan dosis yang menyebabkan toksik yang akan berkaitan dengan nilai keamanan atau resiko toksik pada manusia. Selain itu sifat toksik pada suatu tanaman dapat dimanfaatkan untuk pengembangan obat antikanker (Fikayuniar *et al*., 2022). Menurut Budiman & Hidayat, (2021) Uji toksisitas ialah uji pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui efek toksik dan rentang batas suatu tumbuhan sebagai obat.

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui adanya efek toksik dan menilai batas keamanan dalam penggunaan suatu senyawa. Uji toksisitas merupakan uji untuk mengetahui kemampuan racun yang dapat menimbulkan kerusakan ketika masuk kedalam tubuh dan organ yang rentan terhadapnya (Saragih *et al.*, 2022).

**2.6.1 Uji Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

 *Brine shrimp lethalty test* (BSLT) merupakan suatu metode pengujian menggunakan hewan uji *artemia salina leach*, yang dapat digunakan sebagai penelitian awal yang sederhana untuk meneliti toksisitas akut suatu senyawa dengan cara menentukan nilai LC50 yang dinyatakan dari komponen aktif suatu simplisia maupun bentuk sediaan ekstrak dari suatu tanaman (Adriana, 2023). Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode uji toksisitas yang sering digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini digunakan karena mudah, cepat, murah, dan cukup *reproducible*. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT ini adalah uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu yang relatif singkat, yaitu dengan rentang waktu 24 jam setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya ialah dengan menentukan nilai LC50 dari aktivitas komponen zat aktif tanaman terhadap hewan uji yaitu larva *artemia salina* leach. Nilai LC50 dapat dipakai untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa (Kunsah, 2019).

**2.6.2 Penentuan LC50**

Parameter yang digunakan untuk uji toksisitas yaitu nilai LC50. Nilai LC50 menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan poliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Semakin besar harga LC50 maka senyawa tersebut semkin tidak toksik.

**Tabel 2.1** **Kategori sitotoksisitas berdasarkan nilai LC50 (Adriana, 2023)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| N0. | Kategori | LC50 |
| 1. | Sangat Toksik | < 30 ppm |
| 2. | Toksik | 30-1000 ppm |
| 3. | Tidak Toksik | > 1000 ppm |

 Untuk pengukuran uji toksisitas menggunakan metode BSLT menggunakan Larva *Artemia Salina* L dihitung dan diolah menggunakan metode anlisis probit untuk memperoleh nilai LC50. Pengukuran dengan cara menghitung jumlah larva *Artemia Salina* L yang mati 50% dari total larva uji (10 ekor). Untuk data hasil uji toksisitas dapat mengguakan rumus dari efek toksisitas kematian larva *Artemia Salina* L sebagai berikut :

$\% kematian =\frac{jumlah larva yang mati}{jumlah larva uji}$ x 100%

 Dengan mengetahui kematian larva *artemia salina* L, kemudian dicari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan garis :

Y= a+bx

Keterangan :

Y = nilai probit

x = log konsentrasi

a = intercept/ garis potong

b = slope (Fikayuniar *et al*., 2022).

 Dari persentase tersebut kemudian dihitung LC50 dengan memasukkan nilai probit (50% kematian). Apabila pada kontrol terdapat larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus :

$$\% mortalitas=\frac{jumlah larva uji mati - jumlah larva contoh mati }{10 larva }x 100\%$$

(V. Dewi et al., 2023)**.**

**2.7 *Artemia Salin*a Leach**

****

**Gambar 2.2 *Artemia Salina* Leach (fathiyati,2008)**

 Larva udang *artemia salina* leach merupakan salah satu hewan uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dalam metode ini biasa digunakan hewan uji larva *artemia salina* leach yang berusia 48 jam. Hal ini karena *artemia salina* leach memiliki saluran pencernaan yang sudah terbentuk lengkap sehingga sensitif terhadap suatu zat yang dimasukkan dan larva *artemia salina* leach identik dengan sel kanker yang membelah secara mitosis. apabila suatu bahan yang diuji memberikan efek toksik terhadap larva udang, maka hal ini merupakan indikasi awal dari efek farmakologi yang terkandung dalam bahan tersebut (Budiman & Hidayat, 2021).

**2.7.1 Klasifikasi *Artemia Salina Leach***

 Artemia yang berkembang secara alami di suatu lokasi atau kawasan mempunyai karakteristik morfologi dan taksonomi. Adapun Klasifikasinya ialah sebagai berikut :

Filum : Arthropoda

Sub Filum : Branchiata

Kelas : Crustacea

Sub Kelas : Branchiopoda

Ordo : Anostraca

Famili : Artemiidae (Grochowski,1895)

Genus : Artemia (Leach,1819)

Spesies : *Artemia* Sp (Singgih *et al.*, 2013).

**2.7.2 Fase Pertumbuhan Dan Morfologi *Artemia Salina* Leach**

 *Artemia* berkembang biak (reproduksi) dengan cara yang istimewa yaitu melalui dua cara yakni dapat dengan cara ovovivipar ataupun ovipar, hal ini tergantung kondisinya. Cara reproduksi ovovivipar dan ovipar ini dapat ditemukan pada semua jenis *Artemia.*

**Gambar 2.3 siklus pertumbuhan *Artemia Salina* Leach**

 Sel telur artemia berkembang dengan dua saluran ovarium di abdomen artemia betina. Setelah ovarium matang maka akan menjadi bentuk bulat dan bergerak melalui dua saluran ovarium menuju ke uterus untuk dibuahi. Dalam kondisi biasa, reproduksi berjalan secara ovovivipar, tetapi dalam kondisi (salinitas tinggi, oksigen rendah, dan suhu tinggi) repsoduksi aka berjalan secara ovipar. Pada cara reproduksi ovovivipar, sel telur yang telah dibuahi akan berkembang dalam uterus dan dilepaskan oleh induknya dalam bentuk naupili yang berenang dengan bebas. Dalam reproduksi ovovivipar ini artemia tidak melepaskan telur, akan tetapi telur tersebut berkembang di dalam tubuh induk betina dan akan dikeluarkan dalam bentuk naupili. Akan tetapi pada saat kondisi ekstrim seperti kandungan oksigen dalam air rendah atau suhu tinggi maka reproduksi artemia akan menjadi ovipar. Alam reproduksi ini , sel telur didalam tubuh induk artemia berkembang hanya sampai dengan tahap gastrula saja dan akan dilindung atau di bungkus oleh cangkang berwarna orange hingga berwarna coklat tua. Cangkang ini keras dan mengandung hematin, lipoprotein, dan kitin. Kemudian telur yang bercangkan coklat dan keras ini selanjutnya akan dikeluarkan dalam bentuk telur atau yang sering dikenal dengan kista artemia. Kista artemia yang dilepaskan oleh induk betina biasanya akan mengambang di permukaan air. Kista ini dapat diambil dan disimpan selama beberapa bulan dalam larutan garam jenuh dan dapat ditetaskan kembali jika kondisi lingkugannya sesuai. Dalam penetasan ini sangat dipengaruhi oleh salinitas, suhu, ph, dan ketersediaan oksigen.

 Artemia yang telah dewasa memiliki panjang berkisar 8-10 mm dan memiliki tubuh yang memanjang dengan bola mata yang bertangkai pada dua sisi kepala, saluran pencernaan yang linear, antena yang berfungsi sebagai sensor dan 11 pasang kaki renang (orakopoda) yang fungisional dibagian dada. Pada artemia jantan terdapat sepasang alat kelamin di bagian depan dari pangkal ekornya sedangkan pada artemia betina terdapat uterus yang menonjol terdapat tepat pada ujung terakhir kaki renang. Artemia memiliki tubuh yang berbuku-buku. Ciri khas yang terdapat pada artemia yaitu cara bernafas dengan menggunakan insang dan sisitem peredaran darah terbuka. Tubuh artemia terdiri dari dua bagian yaitu kepala dan dada yang menyatu disebut juga sefalotoraks dan perut atau badan disebut abdomen.

Kehidupan artemia dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain suhu, kandungan ion, oksigen terlarut serta pH. Secara umum artemia tumbuh dengan baik pada kisaran suhu 20-30° C (Singgih *et al*., 2013).

**2.7.3 Pengggunaan Larva Udang Artemia Sebagai Hewan Uji Toksisitas**

 Pengujian dengan menggunakan hewan uji larva *artemia salina* leach ini memiliki sensitivitas yang sangat tinggi terhadap senyawa sitotoksik. Larva *artemia salina* leach sangat mirip dengan sel kanker manusia dan memiiki kesamaan DNA-dependent dan RNA-polymerase dengan mamalia. Hasil uji ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva udang *artemia salina* leach karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam tumbuhan tertentu dari dosis yang telah ditentukan.

a. Penetasan Telur Udang

 Telur udang ditetaskan dalam wadah berisi air laut. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang, yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah kearah yang terang. Wadah diisi dengan 1 liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelapnya dimasukkan satu sendok telur. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampu agar suhu penetasan 25-30°C tetap terjaga. Telur dibiarkan terendam selama 48 jam sampai telur menetas, telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan akan bergerak secara alamiah kearah yang terang (Rani *et al*., 2022).

b. Uji Toksisitas

 Disiapkan vial untuk tiap kelompok sesuai tingkat konsentrasi, masing-masing disediakan vial untuk 3 kali replikasi. Vial berisi sampel yang telah dilarutkan dengan air laut buatan sebanyak 10 ml. sebanyak 10 ekor larva *Artemia Salina* leach dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang telah berisi senyawa uji. Kontrol negatife diberi perlakuan yang sama seperti larutan uji tetapi tidak ditambahkan dengan ekstrak. Jumlah larva yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati (Arianta & Datu, 2022).

**2.8 Bakteri**

Bakteri adalah salah satu jenis mikroorganisme yang tidak dapat dilihat secara langsung oleh pancaindra. Bakteri merupakan organisme yang jumlahnya paling banyak dibandingkan dengan makhluk hidup lain dan tersebar luas didunia. Morfologi sel bakteri berdasarkan bentuknya dapat digolongkan menjadi tiga bentuk yaitu bakteri bentuk batang, bakteri bentuk bulat, dan bakteri bentuk spiral. Berdasarkan strukturnya terbagi menjadi dua yaitu struktur dasar meliputi dinding sel, membrane plasma, sitoplasma, ribosom, granula dan DNA. Struktur tambahan meliputi kapsul, flagellum, pili, fimbria, klorosom, vakuola, endospore.

Berdasarkan komponen penyusun dinding sel, maka bakteri dapat dikelompokkan menjadi bakteri gram positif yang memiliki satu lapisan tunggal peptidoglikan dan bakteri gram negatif yang memiiki tiga lapisan yaitu membrane luar, dinding sel dan membrane plasma. Peptidoglikan merupakan komponen utama dari bakteri gram positif sedangkan lipid merupakan komponen terbesar penyusun bakteri gram negatif (Setiyo & Rohmah, 2020).

**2.8.1 Klasifikasi Bakteri**

Bakteri memiliki bentuk yang khas. Morfologi mikroskopis yang umum adalah cocci (sel bulat atau ellipsoidal), batang dan sel berbentuk koma dan spiral, seperti.

1. Sel Bakteri Berbentuk Bola Atau Kokus

Sel bakteri berbentuk bola dikenal sebagai coccus dan cenderung sangat kecil, hanya berdiameter 0,5 μm hingga 1,0 μm. Meskipun umumnya berbentuk bulat, terkadang juga dapat berbentuk oval, memanjang, atau berlekuk di satu sisi. Berdasarkan pengelompokkan sel, bentuk kokus dikelompokkan menjadi:

1. *Diplococcus,* adalah bakteri kokus yang membentuk dalam kelompok dua-dua sel.
2. *Streptococcus,* yaitu susunan bakteri coccus membentuk rantai panjang atau pendek.
3. *Tetrad*, merupakan penataan sel bakteri kokus dalam kelompok empat-empat sel, membentuk persegi empat.
4. *Staphylococcus,* yaitu kumpulan sel-sel bakteri kokus yang tidak beraturan (bergerombol) membentuk seperti buah anggur.
5. *Sarcina,* merupakan kumpulan sel-sel bakteri kokus membentuk kubus, yang terdiri dari delapan sel atau lebih.
6. Sel Bakteri Berbentuk Batang Atau Basil (*Bacillus*)

Sel bakteri dengan bentuk batang disebut bacillus. Dalam berbagai spesies bakteri berbentuk batang, sel silinder sepanjang 20 µm atau sesingkat 0,5 µm. Basil tertentu ramping. Bentuk bakteri basil terbagi menjadi beberapa kelompok yaitu:

1. *Diplobasil*, yaitu bakteri yang terjadi secara tunggal, kemudian menyatu menjadi berpasangan disebut diplobacillus.
2. *Streptobasil,* yaitu bakteri basil yang membentuk rantai panjang yang disebut streptobacillus.
3. Bakteri Berbentuk Spiral

Bakteri bentuk spiral ini, tidak berkelompok seperti bentuk bakteri lainnya atau saling menempel dinding sel dengan dinding sel bakteri lainnya. Bentuk spiral lain yang disebut spirillum memiliki bentuk heliks dengan dinding sel yang tebal dan kaku. Bentuk bakteri lain yang berukuran sama dengan bakteri spiral dikenal juga sebagai spirochete memiliki dinding sel yang tipis dan fleksibel tetapi tidak memiliki flagela. Pergerakan organisme ini terjadi melalui kontraksi endoflagella yang berjalan di sepanjang sel. Sel bakteri berbentuk spiral dapat berukuran 1 µm hingga 100 µm (Ridhwan,dkk.2023).

* + 1. **Struktur Bakteri**

Secara umum, struktur bakteri dibagi menjadi 2 yaitu Struktur dasar (dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri) meliputi; dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, dan DNA dan Struktur tambahan (dimiliki oleh jenis bakteri tertentu) meliputi; kapsul, flagellum, pilus, fimbria, volutin dan endospore.

1. Dinding Sel

Dinding sel berfungsi dalam memberi bentuk dan melindungi bagian luar sel bakteri. Secara umum dinding sel terletak diantara kapsul dan membran sitoplasma, tersusun atas peptidoglikan, yaitu gabungan polisakarida dan protein. Karena sifatnya yang elastis, selain melindungi sel juga berpengaruh terhadap bentuk sel.

Dinding sel bakteri Gram positif meliputi dinding sel berlapis tunggal. Peptidoglikan lebih tebal (15-80 nm), lebih kuat dan kandungan lipidnya rendah (1-4 %). Dinding sel bakteri Gram Positif juga mengandung asam teikoat. Apabila diberi pewarnaan gram, dinding selnya dapat menyerap warna violet (ungu).

Dinding sel bakteri Gram negatif terdiri atas komponen peptidoglikan, lipoprotein, membrane luar, dan lipopolisakarida. Peptidoglikan nya lebih tipis dibanding Gram positif dan kandungan lipidnya tinggi (11-22%). Lapisan peptidoglikan terikat pada lipoprotein secara kovalen di membran luar dan membrane plasma. Periplasma terdiri dari enzim degradasi dengan konsentrasi tinggi dan protein transport. Lipoprotein terikat ke peptidoglikan. Membrane luar melekat dengan lipoprotein. Apabila diberi pewarnaan gram, dinding selnya dapat menyerap warna merah.

b. Membran Plasma

Membran plasma pada bakteri memiliki sifat permeable selektif yang berperan dalam mengatur pertukaran zat antara sel dan lingkungannya. Secara umum membrane plasma disusun atas fosfolipid dan protein. Membran plasma bakteri terletak dibagian bawah dinding sel tetapi tidak terikat.

c. Sitoplasma

sitoplasma merupakan suatu cairan sel tempat berlangsungnya reaksi metabolisme sel untuk mendapatkan energi. Didalamnya terdapat ribosom, granula, spora dan DNA (Apriani.dkk,2023).

1. Ribosom

Ribosom ialah tempat biosintesis protein. Ribosom terdapat baik pada sel prokariotik maupun sel eukariotik, yang berfungsi sebagai tempat sintesis protein. Ribosom disusun oleh dua sub unit, setiap sub unit mengandung protein dan sebuah tipe dari RNA disebut ribosomal RNA (rRNA). Ribosom prokariotik berbeda dari ribosom eukariotik dalam kandungan jumlah protein dan molekul rRNA, ribosom prokariotik juga lebih kecil dan kurang padat jika dibandingkan dengan ribosom sel eukariotik.

1. Granul

Granula berfungsi sebagai tempat menyimpan cadangan makanan karena bakteri akan menyimpan cadangan makanan yang dibutuhkan. Granula-granula tersebut mengandung bermacam-macam substansi seperti glikogen, metafosfat anorganik, asam polihidroksibutirat, belerang atau senyawa yang mengandung nitrogen yang berperan sebagai cadangan nutrisi untuk sel yang di kenal dengan nama badan inklusi. Beberapa macam inklusi tertentu terdapat pada satu spesies bakteri, sedangkan pada spesies lain tidak memilikinya. Oleh sebab itu, jenis-jenis inklusi dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri (Setiyo & Rohmah, 2020).

d. DNA (*deoxyribonucleic acid*)

Asam deoksiribonukleat yang berperan sebagai pembawa informasi genetik (Apriani.dkk,2023).

e. Flagellum

Flagella (flagellum) merupakan filamen yang memanjang ke arah luar sel. Flagel ialah alat gerak bakteri sehingga bakteri dapat bergerak dan berputar. Flagel disusun oleh sub unit-sub unit protein disebut flagelin. Ukuran flagel berdiameter 12-18 nm dengan panjangnya lebih dari 20 nm (Setiyo & Rohmah, 2020).

f. Kapsul

kapsul adalah lapisan luar dinding sel yang melindungi sel, baik dari fagositosis maupun dari kondisi lingkungan seperti radiasi, kekeringan, maupun senyawa kimia. Selain itu berperan juga dalam upaya pertahanan diri dari antitoksin yang dihasilkan sel inang. Kapsul pada bakteri tersusun atas polisakarida dan protein dengan komposisi yang berbeda. Secara khusus, keberadaan kapsul pada bakteri mempunyai arti penting karena sangat erat hubungannya dengan sifat patogenitas (keganasan) suatu jenis. Pada bakteri patogen tertentu, keganasannya akan turun bila kapsul nya dihilangkan. Hal ini berkaitan dengan adanya bahan-bahan pembentuk kapsul yang memiliki sifat fatositik pada bakteri tersebut (Apriani.dkk,2023).

g. Fimbriae

Fimbriae atau disebut juga dengan pili merupakan benang-benang halus yang keluar dari dinding sel. Fimbriae berperan lebih ke perlekatan antara satu sel dengan sel bakteri lain, dan ke suatu permukaan. Pada umumnya pili lebih panjang dari fimbriae dan jumlahnya hanya satu atau dua buah per sel bakteri. Pili dilibatkan dalam hal motilitas dan transfer DNA pada sel bakteri. Beberapa pili digunakan untuk membawa bakteri bersama-sama yang memungkinkan transfer DNA dari satu sel ke sel lain, yang mana proses ini dinamakan konjugasi.

h. Endospora (Spora)

Endospora merupakan fase dimana bakteri tertentu menebalkan dinding selnya sebagai bentuk pertahanan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Endospora memiliki dinding yang amat tebal jika dibandingkan dengan sel vegetatifnya, sehingga Endospora sangat sukar diwarnai dengan pewarna biasa, dan harus menggunakan pewarnaan spesifik (Setiyo & Rohmah, 2020).

**2.8.3 Faktor - Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri**

Pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yang meliputi:

1. Suhu atau temperatur

Kelangsungan hidup sel bakteri akan tergantung pada kemampuannya beradaptasi dengan variasi suhu lingkungan habitat alaminya. Kisaran suhu untuk pertumbuhan bakteri dapat dinyatakan kedalam tiga suhu kardinal yaitu minimum,

maksimum dan optimum. Suhu minimum ialah suhu terendah dimana masih memungkinkan bagi bakteri untuk melakukan metabolisme. Suhu maksimum adalah suhu tertinggi dimana pertumbuhan dan metabolisme dapat dilanjutkan. Sedangkan suhu optimum ialah kisaran suhu yang paling tepat bagi bakteri untuk melakukan metabolisme secara optimal. Suhu dibawah minimum dapat menyebabkan inaktivasi enzim bakteri. Sedangkan pada suhu diatas maksimum dapat menyebabkan denaturasi enzim dan asam nukleat bakteri yang menyebabkan kematian. Pada sebagian besar bakteri, pertumbuhan optimal berlangsung pada kisaran suhu 20-45°C. Bakteri patogen khususnya pada manusia memiliki kisaran suhu optimum yang sama dengan suhu tubuh manusia yaitu 37°C.

1. Cahaya

Cahaya digunakan pada bakteri fotoautotrof untuk proses fotosintesis. Bakteri umumnya adalah mikroorganisme *chemotrophs* yang memperoleh energi dari oksidasi donor elektron dalam lingkungannya. Cahaya sebagian besar memiliki sifat merusak sel bakteri yang tidak memiliki pigmen fotosintesa. Sehingga di laboratorium dibutuhkan cahaya dengan panjang gelombang yang sesuai untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat terhambat oleh sinar atau cahaya ultraviolet, infrared, sinar-X dan sinar gamma yang merusak sel bakteri.

1. Derajat keasaman (pH)

Enzim dan zat seluler bakteri sangat dipengaruhi oleh pH sehingga pertumbuhannya dalam media tertentu dapat dihambat jika pH tidak sesuai. Secara umum pH asam dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sebagian besar bakteri memiliki kisaran pH netral (pH 7,0) atau sedikit basa (pH 7,2 – 7,4). Namun ada beberapa mikroorganisme yang hidup pada pH ekstrim. Berdasarkan pH pertumbuhannya, bakteri dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu:

1. Asidofilik yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada kisaran pH 1,0 – 6,5.
2. Neutrofilik yaitu bakteri yang dapat dtumbuh pada kisaran pH 6,9 – 7,4.
3. Alkalifilik yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada kisaran pH 7,5 – 14 (Apriani dkk,2023).
4. Air

Pertumbuhan bakteri tergantung dari tersediannya air. Bahan-bahan yang terlarut dalam air, yang digunakan oleh bakteri untuk membentuk bahan sel dan memperoleh energi. Selain sebagai bahan nutrisi, air juga digutan untuk mengkatalis proses metabolism yang berlangsung didalam sel bakteri (Harmoko.dkk,2022).

1. Oksigen

Oksigen untuk sel bakteri tersedia dalam oksigen molekul (O2), bentuk air atau dalam CO2 maupun senyawa organik lainnya. Fungsi utama oksigen bagi sel adalah sebagai aseptor elektron terminal pada respirasi aerob dimana pada prosesnya oksigen akan direduksi menjadi air.

1. Nutrisi

Dalam pertumbuhannya setiap makhluk hidup membutuhkan nutrisi yang mencukupi serta kondisi lingkungan yang mendukung demi proses pertumbuhan tersebut, termasuk juga bakteri. Meskipun media pertumbuhan yang digunakan amat beragam, namun sebagai makhluk hidup bakteri mempunyai kebutuhan dasar yang sama, yaitu meliputi air, karbon, dan mineral. Mikroba sama dengan makhluk hidup lainnya, memerlukan suplai nutrisi sebagai sumber energi dan pertumbuhan selnya. Unsur-unsur dasar tersebut adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, sulfur, fosfor, zat besi dan sejumlah kecil logam lainnya (Harmoko.dkk,2022).

**2.9 Bakteri *Staphylococcus aureus***

******

**Gambar 2.9 bakteri staphylococcus aureus**

 *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu jenis bakteri gram positif dengan bentuk kokus, yang merupakan agen pathogen bagi manusia. *Staphylococcus aureus* mampu menginduksi infeksi secara invasive pada kulit dan jaringan lunak (Nasution.A.W.2023). Sebagian bakteri *staphylococcus aureus* adalah flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga dapat ditemukan di udara dan dilingkungan sekitar. *Staphylococcus aureus* menyebabkan sindrom infeksi yang luas. Infeksi kulit dapat terjadi pada kondisi hangat yang lembab atau pada saat kulit terbuka akibat penyakit seperti ekskrim, luka pembedahan atau akibat alat intravena. Infeksi *staphylococcus aureus* juga berasal dari kontaminasi langsung dari luka, atau infeksi yang menyertai trauma. Jika *staphylococcus aureus* menyebar dan terjadi bakterimia, maka dapat terjadi endokarditis, osteomyelitis hematogenous akut, meningitis atau infeksi paru-paru. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat terinfeksi oleh bakteri *staphylococcus aureus* dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses (Hidayatullah & Mourisa, 2023).

**2.9.1 Klasifikasi *Staphylococcus aureus***

Kingdom : Monera

Divisi : Firmicutes

Kelas : Firmibacteria

Ordo : Eubacteriales

Famili : Micrococcaceae

Genus : Stapylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Rollando, 2019)**.**

**2.9.2 Morfologi *staphylococcus aureus***

 *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif yang memiliki bentuk bulat dengan diameter 0,8-1,0 µm dan tersusun bergerombol tidak beraturan, kadang-kadang seperti untaian buah anggur, tidak dapat bergerak dan tergolong bakteri aerob sampai anaerob fakultatif. *Staphylococcus aureus* adalah mikroorganisme yang normal terdapat di kulit, hidung, tenggorokan dan saluran pencernaan manusia. Bakteri ini banyak dijumpai pada selaput hidung kulit dan kantung rambut. Bakteri ini adalah kelompok bakteri yang dapat meragi karbohidrat (antara lain manitol) dan menghasilkan asam laktat sehigga dapat diidentifikasi salah satunya dengan media *manitol salt agar* dan tumbuh dengan cepat pada suhu 37ºC. *Staphylococcus aureus* dapat bertahan pada kondisi kering, panas pada suhu 50ºC selama 30 menit dan dalam larutan NaCl 0,9 %. Koloni yang terbentuk pada media sederhana padat berbetuk bulat dengan diameter 1-2 mm, warna putih hingga kuning emas, tepi utuh, kenaikan permukaan melengkung dan tekstrur halus, basah dan opaque (Rollando, 2019).

**2.10 Bakteri *Escherichia coli***

******

**Gambar 2.10 bakteri *Escherichia coli***

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang tergolong dalam famili Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae adalah bakteri yang dapat hidup dan bertahan didalam saluran pencernaan. *Escherichia coli* adalah bakteri batang gram negatif yang tidak membentuk spora dan merupakan flora alami yang terdapat pada usus manusia. Bakteri ini dikenal juga dengan bakteri indikator sanitasi dan hygiene dimana keberadaannya dalam suatu produk pangan menunjukkan rendahnya tinggkat sanitasi yang diterapkan. Keberadaan bakteri ini umumnya dikaitkan dengan adanya kontaminasi yang berasal dari kotoran. *Escherichia coli* merupakan bakteri penyebab utama penyakit diare (Rahayu *et al*., 2018).

**2.10.1 klsifikasi *Escherichia coli***

Klasifikasi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Monera

Divisi : Schizomycota

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : Escherichia

Spesies : *Escherichia coli* (Rollando, 2019).

**2.10.2 Morfologi *Escherichia coli***

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang memiliki bentuk batang dengan ukuran berkisar antara 1.0-1.5 µm x 2.0-6.0 µm, tidak motil atau motil dengan flagella, dan dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerobic serta dapat tahan pada media yang rendah nutrisi. *Escherichia coli* umumnya hidup dalam salulran pencernaan dan dapat bertumbuh dengan baik pada air tawar, air laut, ataupun ditanah. *Eschetichia coli* dapat hidup dan bertahan pasa tingkat keasaman yang tinggi di dalam tubuh, dan dapat bertahan di luar tubuh yang penyebarannya melalui fases. Bakteri ini bergenerasi dengan waktu sekitar 30 sampai dengan 87 menit tergantung pada suhu. Waktu ini merupakan waktu yang dibutuhkan *Eschertichia coli* untuk dapat membelah diri menjadi dua kali lipat. Suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 37 ºC *(Rahayu et al*., 2018).

**2.11 Uji Aktivtas Antibaktri**

Atibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya adalah menghambat sintesis dinding sel, menghambat keutuhan permebilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Pertiwi,dkk.2022).

 Antibakteri terbagi menjadi dua berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu bakteriostatika yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisida yang bersifat membunuh bakteri. Antibakteri dapat memiliki aktivitas bakteriostatika menjadi aktivitas bakterisida apabila kadarnya ditingkatkan melebihi kadar hambar minimal (Rollando, 2019).

**2.11.1 Metode Uji Aktivitas Antibakteri**

Aktivitas antibakteri senyawa dapat diuji dengan menggunakn metode dilusi dan difusi.

a. Metode Dilusi

 pada metode ini pengujian daya antibakteri berdasarkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme pada media cair setelah diberi zat antimikroba atau pada media padat yang dicairkan setelah dicampur dengan zat antimikroba dengan pengamatan pada dilusi cair dilihat kekeruhannya dan pada dilusi padat dengan pengamatan pada konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Biasanya metode ini digunakan untuk zat antimikroba yang dapat larut sempurna (Rollando, 2019).

Tujuan dari penggunaan metode dilusi adalah untuk menentukan aktivitas antimikroba secara kuantitatif. Seacar umum, cara kerjanya yaitu dengan mela- rutkan antimikroba ke dalam media agar atau kaldu kemudian ditanami bakteri yang akan dites. Setelah dilakukan proses inkubasi selama satu malam, maka konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan MIC *(minimal inhibitory concentration)*. Nilai dari MIC dapat dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapatkan di serum serta cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respons klinik (Rahmawati.D.2020).

1. Dilusi Perbenihan Cair

Dilusi perbenihan cair terbagi menjadi dua jenis yaitu makrodilusi dan mikrodilusi. Pada dasarnya, kedua jenis tersebut mempunyai proses pengerjaan yang sama hanya berbeda dalam jumlah volume. Untuk makrodilusi volume yang digunakan ialah lebih dari 1 mL, sedangkan dalam mikrodilusi volume yang digunakan ialah 0,05 mL sampai 0,1 mL. Antimikroba yang digunakan disediakan pada berbagai macam pengenceran yang jumlahnya biasanya dalam satuan µg/mL. Konsentrasinya bervariasi bergantung dari jenis dan sifat antibiotik.Konsentrasi terendah yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan dengan jelas baik dilihat secara visual atau dengan alat semiotomats maupun otomatis maka disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum atau MIC (*minimal inhibitory concentration*).

1. Dilusi Agar

Pada teknik dilusi agar, antibiotik yang sesuai dengan pengenceran akan ditambahkan ke dalam agar. Oleh karena itu, diperlukan perbenihan agar sesuai jumlah pengeceran ditambah satu perbenihan agar untuk kontrol tanpa penambahan antibiotik. Konsentrasi terendah dari antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri merupakan MIC antibiotik yang di uji. Salah satu kelebihan dari metode dilusi agar ini ialah dapat digunakan untuk menetukan MIC dari *Neisseria gonorrhoeae* yang tidak dapat tumbuh pada teknik dilusi perbenihan cair. Dasar dari penentuan antimikroba secara invitro adalah dengan nilai MIC dan MBC (*minimum bactericidal concentration*). MIC merupakan nilai konsentrasi terendah antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan. Sedangkan MBC merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang dapat membunuh sebanyak 99,9% pada biakan dalam waktu yang telah ditentukan. Agar anti mikroba dapat efektif pada MIC atau MBC maka sedapat mungkin harus mencapai tempat infeksi. Absorpsi dari obat serta distribusi antimikroba akan mempengaruhi dosis, rute dan frekuensi pemberian antimikroba untuk memperoleh dosis yang efektif di tempat terjadinya infeksi.

Penentuan konsentrasi minimum antibiotik yang dapat membunuh bakteri atau *minimum bactericidal concentration* (MBC) dilakukan dengan cara menanam bakteri pada perbenihan cair yang digunakan untuk MIC ke dalam agar kemudian dilakukan inkubasi selama satu malam pada suhu 37°C. MBC adalah kondisi ketika tidak lagi terjadi pertumbuhan pada agar (Rahmawati.D.2020).

b. Metode Difusi

 metode difusi adalah suatu metode untuk menguji daya antibakteri berdasarkan berdifusinya zat antimikroba dalam media padat dengan pengamatan pada daerah pertumbuhan. Umumnya metode ini dapat digunakan untuk zat antimikroba yag larut dan tidak larut. Metode difusi berdasarkan pencadangannya terdiri atas metode difusi dengan sumuran, metode difusi dengan slinder atau cakram dan metode dengan parit (Rollando, 2019).

Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode cakram kertas, silinder dan metode sumuran.

1. Difusi Cakram Kertas

Cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan dari suatu organisme terhadap antibiotik adalah dengan cara menginokulasi media agar dengan biakan, kemudian membiarkan antibiotik terdifusi ke media agar. Cara kerjanya adalah cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan media agar yang mengandung organisme yang diuji. Dalam jarak tertentu, pada masing-masing cakram, antibiotik akan terdifusi sampai titik antibiotik tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan dari mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh adanya zona hambatan disekitar cakram. Zona hambatan dapat terlihat sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter dari zona dapat diukur menggunakan penggaris atau jangka sorong. Hasil dari eksperimen ini merupakan satu antibiogram. Ukuran dari zona hambatan dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti kepadatan media biakan, kecepatan difusi antibiotik, konsentrasi antibiotik pada cakram filter, sensitivitas organisme terhadap antibiotik, serta interaksi antibiotik terhadap media. Suatu zat yang memiliki efek samping yang signifikan tidak boleh digunakan.

1. Silinder Plat

Metode difusi dengan cara ini yaitu menggunakan alat pencadang berupa silinder kawat. Cara kerjanya yaitu pada permukaan media pembenihan dibiakkan mikroba secara merata, kemudian diletakkan pencadang silinder. Pencadang silinder tersebut harus benar-benar melekat pada media. Kemudian, proses selanjutnya adalah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Setelah dilakukannya inkubasi, pencadang silinder diangkat kemudian diukur daerah hambat pertumbuhan mikroba.

1. Sumuran

Metode lubang atau sumuran merupakan metode yang dilakukan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pada lempeng agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang kemudian diisi dengan zat antimikroba uji, kemudian dilakukan proses inkubasi. Jumlah serta letak lubang harus disesuaikan dengan tujuan penelitian. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, maka dapat dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Rahmawati.D.2020).

**Tabel 2.2** **Kategori daya hambat bakteri (Sukadiasa *et al*., 2023)**

|  |  |
| --- | --- |
| Diameter zona hambat (mm) | Kategori hambatan |
| >20 | Sangat kuat |
| 10 – 20 | Kuat |
| 5 - 10  | Sedang |
| <5 | Lemah |

* + 1. **Sterilisasi**

Sterilisasi merupakan salah satu usaha untuk membebaskan alat, bahan dan medium dari segala macam bentuk mikroorganisme baik berupa bakteri maupun spora. Adapun jenis sterilisasi meliputi :

1. Sterilisasi Pemanasan Kering

Sterilisasi dengan pemanasan kering pada umumnya digunakan untuk peralatan laboratorium yang tidak akan meleleh, terbakar dan berubah bentuk jika terkena suhu tinggi.

1. Pemijaran

Metode memaniskan ose di atas api bunsen hingga memijar berwarna merah pada ose. Metode pemijaran berfungsi untuk membunuh mikroorganisme yang terdapat pada ose sehingga ose bersifat steril atau bebas dari mikroorganisme.

1. Pembakaran

Cara yang digunakan sederhana hanya dilewatkan diatas api bunsen namun tidak sampai memijar. Pada metode sterilisasi pembakaran hanya digunakan pada alat tertentu seperti mulut cawan petri, pinset, mulut tabung reaksi, mulut erlenmeyer. Aplikasi sterilisasi menggunakan pembakaran Sterilisasi hanya dilakukan dengan melewatkan mulut tabung yang berisi medium atau isolat bakteri di api bunsen. Selain itu, pembakaran pinset sebelum mengambil dist cakram yang diletakkan pada medium pada uji kepekaan antibiotik.

1. Oven

Sterilisasi menggunakan Oven hanya berlaku untuk benda dari kaca atau gelas misalnya, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, namun tidak direkomendasikan bahan yang berasal dari karet dan plastik. Proses sterilisasi menggunakan oven cukup lama karena daya penetrasi panas kering tidak sebaik panas basah sehingga waktu yang dibutuhkan sekitar 1-2 jam.

1. Sterilisasi Dengan Pemanasan Basah

Sterilisasi dengan pemanasan basah ialah pemanasan bertekanan tinggi seperti menggunakan autoklaf. Sterilisasi pemanasan basah digunakan untuk sterilisasi biohazard atau bakteri limbah hasil praktikum, instrumen yang tahan terhadap panas, pembuatan media, dan sterilisasi cairan. Sterilisasi pemanasan basah dilakukan pada suhu 121°C selama15 menit.

1. Autoklaf

Sterilisasi menggunakan autoklaf memberikan hasil optimal untuk peralatan ataupun bahan-bahan yang disterilkan. Sterilisasi basah ialah proses sterilisasi menggunakan hasil penguapan air dengan memanaskan air. Aturan sterilisasi mengubah energi listrik menjadi energi panas. Pertukaran energi ini membutuhkan kawat pemanas untuk memanaskan air. oleh karena itu, setelah air dalam tangki mendidih dan terbentuk uap air. Uap air akan mengalir keruang pensteril akan mendesak keluar udara didalam. Bila masih ada udara yang tersisa yang akan mengganggu naiknya suhu dalam ruang tersebut (Ridhwan,dkk.2023).

* + 1. **Media Kultur**

Media kultur bakteri merupakan substansi yang mengandung bahan nutrisi untuk menumbuhkan bakteri secara in vitro di laboratorium. Media kultur bakteri berdasarkan bentuknya dikategorikan menjadi tiga yaitu media cair (broth) dan media padat (solid) dan media semi padat.

1. Media cair

Pada media ini tidak ditambahkan dengan zat pemadat (agar) sehingga berbentuk cair atau encer. Media cair pada umumnya digunakan untuk menumbuhkan kultur biomassa, uji metabolisme atau inokulasi jenis bakteri tertentu. Beberapa jenis media cair diantaranya *nutrient broth, tryptic soy broth, thioglycolate broth dan lysogeny broth.*

1. Media padat

Pada media ini ditambahkan zat pemadat (agar) kurang lebih 15% sehingga menjadi padat. Media padat merupakan jenis yang paling banyak digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri di laboratorium. Inokulasi bakteri pada media padat memungkinkan bakteri tumbuh membentuk koloni dengan ciri yang khas pada masing-masing spesies. Beberapa jenis media padat diantaranya *Muller Hinton Agar, Nutrient Agar, Eosin Methylene Blue Agar dan MacConkey agar.*

1. Media semi padat

 Media ini mengandung agar kurang lebih 0,3 – 0,4% sehingga media menjadi semi padat. Media semi padat digunakan untuk uji motilitas atau transport spesimen. Beberapa jenis media semi padat diantaranya *Sulfide Indole Motility (SIM), Mannitol Motility Medium dan Amies Medium* (Apriani.dkk,2023).

**2.12 Antibiotik Kloramfenikol**

Kloramfenikol merupakan salah satu antibiotik dengan spektrum luas. Kloramfenikol dapat digunakan untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh beberapa jenis bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Antibiotik ini memiliki khasiat bakteriostatik terhadap beberapa spesies, pada keadaan tertentu kloramfenikol mempunyai khasiat bakterisid (Damin, 2009).

Adapun pemerian dan kelarutan kloramfenikol sebagai berikut :

Pemerian : hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, putih sampai putih kelabu, atau putih kekuningan, tidak berbau, rasa sangat pahit.

Kelarutan : larut dalam lebih kurang 400 bagian air, dalam 2,5 bagian etanol (95%) p dan dalam 7 bagian propilenglikol P. sukar larut dalam kloroform P dan dalam eter P (Depkes,1979).

**BAB III**

**METODE PENELITUAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian yang dilakukan secara eksperimental. Data yang dikumpulkan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Urutan tahapan pelaksanaan penelitian meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, pembuatan ekstrak, pembuatan fraksi, skrining fitokimia, uji totoksitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach dan uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1. **Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting dan variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting. Variabel terikat yang digunakan adalah karakteristik simplisia, metabolit sekunder , uji toksisitas dan uji antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting.

1. **Parameter Penelitian**

 Parameter dalam penelitian ini adalah makroskopik, mikroskipik, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, alkaloid, flavonoid, triterpenoid atau steroid, tanin, saponin, glikosida, nilai LC50 dan diameter zona hambat (mm)..

**3.2 Jadwal Dan Lokasi Penelitian**

1. **Jadwal Penelitian**

Penelitian ini di mulai pada bulan Januari 2024 sapai dengan bulan Juni 2024.

1. **Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan dilaboratorium Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan, yaitu laboratorium botani, mikrobiologi, farmakologi dan toksikologi.

**3.3 Bahan Dan Peralatan**

1. **Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karamunting, larva udang *artemia saina leach*, aquadest, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, DMSO 5%, nutrient agar (NA), MHA, garam (NaCl), kertas cakram, bakteri *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan antibiotik kloramfenikol.

1. **Peralatan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotary evaporatr, timbangan digital, blender, kertas saring, wadah uji, toples kaca, beker glas, glas ukur, lampu, tabung reaksi, rak tabung, vortex, Bunsen, jarum ose, cawan petri, autoklaf, kapas swab, inkubator, dan jangka sorong.

**3.4 Persiapan Bahan**

1. **Determinasi Sampel**

Determinasi atau identifikasi pada tumbuhan dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara. Determinasi dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

1. **Pengambilan Sampel**

Pengamilan sampel daun karamunting(*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di ambil di dusun IV Meranti Kecamatan Meranti Kabupaten Asahan Provinsi Sumatera Utara.

1. **Pengumpulan Sampel**

 Proses pengumpulan sampel daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dilakukan secara purposive sampling, yaitu tanpa membandingkan dengan tanaman yang sama dari daerah lain.

1. **Pengolahan Sampel**

 Sampel daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) yang telah dikumpulkan disortasi basah dengan tujuan untuk memisahan kotoran-kotoran atau bahan asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dari kotoran lain yang masih tertinggal. Selanjutnya sampel dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk memisahkan sampel dari sisa-sisa tanah atau kotoran yang masih melekat. Kemudan ditiriskan dan ditimbang sebagai berat basah lalu dirajang. Selanjutnya sampel yang telah dirajang dikeringkan. Sampel dikeringkan dengan suhu 40-50ºC terlindung dari sinar matahari. Proses pengeringan dilakukan sampai sampel bahan baku benar benar kering. Selanjutnya sampel disortasi kering untuk memisahkan bahan-bahan asing yang melekat pada sampel. Setelah itu sampel yang sudah kering diserbukkan dengan menggunakan blender, kemudian diayak dan ditimbang. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan pada suhu kamar dalam wadah tertutup rapi.

**3.5 Pembuatan Pereaksi**

**3.5.1 Larutan Pereaksi Mayer**

Raksa (II) klorida sebanyak 1,35 g dilarutkan dengan 60 ml aquadest di dalam gelas ukur 100 mL. kemudian pada wadah lain dilarutkan 5 g kalium iodida dalam 10 mL aquadest. Kedua larutan dicampur dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

**3.5.2 Larutan Preaksi Dragendorff**

 Sebanyak 0,8 g bismuth (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 mL lalu dicampurkan dengan kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam 50 mL air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dienceran dengan air secukupnya hingga 100 mL (Depked RI,1995).

**3.5.3 Larutan Preaksi Bouchardat**

 Kalium iodida ditimbang sebanyak 4 g, kemudian dilarutkan dalam air suling, lalu ditambahkan iodium sebanyak 2 g dan ditambahkan dengan air suling sehingga mencapai volume 100 mL (depkes RI,1995).

**3.5.4 Larutan Preaksi Besi (III) Klorida 1%**

 Besi (III) klorida diambil sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 100 mL akuadest (Depkes RI,1995).

**3.5.5 Larutan Preaksi Asam Klorida 2N**

 Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.6 Larutan Preaksi Lieberman Bouchard**

 Sebanyak 5 mL asam, asetat anhidrida dicampurkan dengan 5 mL asam sulfat pekat kemudian ditambahkan etanol hingga 50 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.7 Larutan Pereaksi Molish**

 Sebanyak 3 g α-naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.8 Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N**

 Asam nitrat pekat sebanyak 3,4 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**3.5.9 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 N**

 Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dalam aquadest bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

**3.5.10 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N**

 Asam sulfat pekat sebanya 5,5 mL dipipet lalu dimasukkkan ke dalam gelas kimia 100 mL lalu diencerkan dengan aquaest samai garis tanda ( Depkes RI,1995).

**3.5.11 Larutan Preaksi Natrium Hidroksida 2N**

 Sebanyak 8,002 g kristal natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml (Deokes RI,1995)

**3.5.12 Larutan Pereaksi Kloral Hidrat**

 Sebanyak 70 g kloralhidrat dilarutkan dalam 100 ml air (Depkes RI,1995)

**3.6 Krakterisasi Simplisia**

 Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi parameter spesifik (pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik srbuk simplisia, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol) dan parameter non spesifik (penetapan susut pengeringan, kadar air, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam).

**3.6.1 Parameter Spesifik**

**3.6.1.1 Pemeriksaan Makroskopik**

 Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara memperhatikan bentuk, warna, rasa dan bau terhadap simplisia daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.). Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin.

**3.6.1.2 Pemeriksaan Mikroskopik**

 Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dengan cara serbuk simplisia ditaburkan di atas objek glass dan ditetesi dengan kloral hidrat sebanyak 1 tetes kemudian ditutup dengan deck glass dan difiksasi kemudian diamati dibawah mikroskop.

**3.6.1.3 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

 Maserasi selama 24 jam 5g serbuk dengan campuran air kloroform P ad 100 mL menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan selanjutnya dibiarkan selama 18 jam. Di saring, uapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihihtung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI,1995).

**3.6.1.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

 Maserasi selama 24 jam 5 g sebuk dengan 100 ml etanol, menggunakan labu bersumbat sambil seklai-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, uapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI.1995).

**3.6.2 Parameter Nonspesifik**

**3.6.2.1 Penetapan Kadar Air**

 Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotrope. Alatnya terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

a. Penjenuhan Toluene

 sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat dipasang alat penampung dan pendingin, selanjutnya didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan selama 30 menit, lalu volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

b. Penetapan Kadar Air Simplisia

 sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu yang telah berisi toluene jenuh, selanjutnya labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit. Setelah toluene mulai mendidih atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes per detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersulig bagian dalam pendingain dicuci dengan toluene jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi degan toluene jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene jenuh air hingga air turun. Baca volume air setelah air dan toluene memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % (DepkesRI,1995).

**3.6.2.2 Penetapan Kadar Abu Total**

 Ditimbang seksama 2 g zat yang telah digerus dan ditimbang seksama bahan uji yang telah dihalusan dan masukkan kedalam krus silika yang telah dipijarkan dan ditara, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Pijaran pada tanur dilakukan dengan suhu 600ºC kenudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas diadik kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyarian dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap pada suhu 800±25 ºC. kadar abu total dihihtung berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Depkes RI,1995).

**3.6.2.3 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut asam, kemudian disaring melaui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan dipijarkan hingga bobot tetap kemudian ditimbang. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI,1995).

**3.7 Ekstraksi Sampel**

**3.7.1 Maserasi**

 Sebanyak 700 gram serbuk simplisia daun karamunting *(rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)dimasukkan kedalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan 75 bagian etanol 96%, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambal berulang ulang diaduk. Setelah 5 hari, diserkai, ampas diperas sehingga diperoleh hasil maserat I. selanjutnya ampas dibilas dengan cairan penyari 25 bagian segingga deperoleh maserat II. Kemudian maserat I dan maserat II digabungkan selanjutnya dipindahkan ke dalam bejana tertutup dan dibiarkan ditempat sejuk terindung dari pengaruh langsung cahaya selama 2 hari. Setelah itu, di enap tuangkan sehingga diperoleh hasil ekstrak cair. Selanjutnya hasil ekstrak dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu tidak lebih ari 50ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

**3.7.2 Fraksinasi ekstrak etanol daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

40 gram ekstrak pekat daun karamunting di larutkan dengan 80 ml etanol 96% hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 80 ml aquades, dan campuran ini dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian tambahkan 200 ml n-heksan lalu campuran ini dikocok dan diamkan hingga terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan n-heksan, yang merupakan lapisan bagian atas. Proses fraksinasi dilakukan berulang hingga lapisan n-heksan memberikan hasil yang netral atau tidak berwarna. Lapisan n-heksan ini dikumpulkan untuk mendapatkan fraksi n-heksan. selanjutnya, lapisan bawah (residu) diambahan 200 ml etil asetat, dikocok, dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan etil asetat, yang berada di lapisan atas. proses fraksinasi dilakukan berulang hingga lapisan etil asetat memberikan hasil yang negatif atau tidak berwarna. Lapisan n-heksana dan lapisan etil asetat yang telah dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan selanjutnya diuapkan di atas waterbath pada suhu yang sama hingga diperoleh fraksi pekat n-heksan dan etil asetat (Nasution.A.W. *et al*.2023).

**3.8 Skrining Fitokimia**

 Skrining fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid atau steroid, tannin, saponin dan glikosida

**3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid**

 Ekstra etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling , dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu didinginkan dan disaring. Filtrate dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

a. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning

b. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam

c. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pakai Dragondorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reasi dari 3 percobaan di atas (Depkes RI,1995).

**3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid**

 Sebanyak 10 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang, kemudian masing-masing ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan diaring dalam keadaan panas. Filtrate yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok selanjutnya dibiarkan memisah. Flavonoid positif juka terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Depkes RI,1995)

**3.8.3 Pemeriksaan Triterpenoid Atau Steroid**

 Sebanyak 1 g ekstrak etanol , fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di maserasi dengan 20 mL eter selama 2 Jam, lalu disaring. Filtrate diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman burchard). Terbentuknya warna unggu sampai merah ungu menunjukkan adanya riterpenoid da terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid.

**3.8.4 Pemeriksaan Tanin**

 0,5 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di masukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL auadest, dikocok dan disaring filtrate diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1 samapi 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI,1995).

**3.8.5 Pemeriksaan Saponin**

 0,5 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak berkurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI,1995).

**3.8.6 Pemeriksaan Glikosida**

 Sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang sebanyak 3g lalu disaring dengan 30 ml campuran etanol 96% da akuades (7:3) dan 10 ml asam klorida 2N, direfluks selama 10 menit, kemudian ditimbang dan disaring. Ambil 20 ml filtrate ditambahkan 25 ml akuadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M dikocok, kemudian diamkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrate disari dengan 20 ml campuran isopropanol : kloroform (2:3) sebanyak 3 kali. Kumpulan sari air diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50ºC. residu dilarutkan dalam 2 ml methanol, diambil filtrate sebanyak 0,1 ml di dalam tabung reaksi diuapkan diatas penangas air, ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes preaksi molish. Kemudian ditambahkan asam sulfat pekat 2 ml perlahan- lahan melalui dinding tabung, jika terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida ( Depkes RI, 1995).

**3.9. Pengujian Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

**3.9.1 Pembuatan Air Laut Buatan**

 Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium, dimsukkan ke dalam labu 1000 mL, lalu volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas lalu diaduk sampai homogeny. Kemudian disaring dengan kertas whatman (Saragih *et al*., 2022).

**3.9.2 Penetasan Telur *Artemia Salina Leach***

 Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening dengan menggunakan media air laut. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas umtuk bergerak secara alamiah kearah terang, wadah diisi dengan saru liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok (sendok teh) telur yang sebelumnya telah dicuci dengan cara direndam dengan aquadest selama 1 jam. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan aluminium foil atau lakban hitam. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampr neon 40 watt agar suhu penetasan 25-30 ºC tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam smpai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Fadli *et al*., 2019).

**3.9.3 Pembuatan Konsentrasi Larutan Ekstrak**

 Ekstrak etnol, fraksinasi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dibuat arutan induknya 2000 /mL dengan menimbang 0,2 g ektrak lalu dicukupkan dengan air laut hingga 100 mL. larutan ekstrak etanl, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dibuat menjadi 10 konsentrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi yaitu konsentrasi 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, 700 µg/mL, 800 µg/mL, µg/mL dan 1000 µg/mL, dan 1 tabung digunakan untuk kontrol negative, masing-masing dengan tiga kali pengulangan (Putri & Nasution, 2022). untuk membuat konsentrasi 100 µg/mL dipipet 0,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 200 µg/mL dipipet 1 ml larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk konsentrasi 300 µg/mL dipipet 1,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 400 µg/mL dipipet 2 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk. 500 µg/ml dipipet 2,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 600 µg/mL dipipet 3 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk 700 µg/mL dipipet 3,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 800 µg/mL dipipet 4ml larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk 900 µg/mL dipipet 4,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL dan untuk 1000 µg/mL dipipet 5 mL larutan inuk baku dicukupkan volumenya 10 mL.

**3.9.4 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Menggunakan Metode BSLT**

 Uji toksisitas dilakukan dengan cara masing-masing konsentrasi dilakukan 3 duplikasi dimana tiap kelompok terdapat sebanyak 10 ekor larva artemia salina leach. Disiapkan wadah untuk pengujian, yang mana masing-masing konsentrasi ekstrak sampel membutuhan 3 wadah dan 3 wadah sebagai kontrol untuk masing-masing duplikasi, kemudian pada masing-masing konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor larva *artemia slina leach*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *artemia salina leach* dimana, setiap konsentrasi dilakukan 3 duplikasi dan dibandingkan dengan kontrol. Kriteria standar untuk menilai kematian *artemia salina leach* yaitu jika larva *artemia salina leach* tidak menunjukka adanya pergerakan selama beberapa detik observasi. Selanjutnya dihitung persentasi kematian dan dianalisiss menggunakan analisis probit (Arianta & Datu, 2022).

**3.10 Pengujian Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli***

**3.10.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan**

Alat-alat gelas yang berskala dan tidak tahan pemanasan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit dan untuk alat-alat yang tidak berskla dan tahan pemanasan disterilkan pada oven dengan suhu 170ºC selama 2 jam (Arina *et al.*, 2023).

**3.10.2 Pesiapan Media Nutrient Agar (NA)**

 Media Nutrient Agar (NA) digunakan untuk peremajaan bakteri, sebanyak 23 gr NA dilarutkan dalam 1000 mL air suling dalam erlenmeyer lalu dipanaskan menggunakan hotplate sampai larut sempurna. Media disterilkan kedalam autoklaf dengan suhu 121 ̊C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. kemudian dituangkan sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi steril dan ditutup. setelah itu dibiarkan selama kurang lebih 30 menit pada suhu ruang sampai media memadat pada kemiringan 30 ̊ (Safitri, L. N., Ulfa, A. M., & Marcellia, S.2023).

**3.10.3 Media Mueller Hinton Agar (MHA)**

Ditimbang sebanyak 3,8 gram MHA dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL, dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan sampai mendidih diatas api bunsen, diangkat kemudian ditutup dengan kapas, dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah media steril dikeluarkan dari autoklaf dan dibirkan dingin, kemudian tuangkan media sebanyak 10 mL kedalam tiga buah cawan petri steril dan biarkan membeku (Dewi.A.P, dkk2023).

**3.10.4 Pembuatan Larutan Nacl Fisiologis 0,9%**

 Sebanyak 0,9 g Natrium klorida dilarutkan dalam aquadest sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL sampai terlarut sempurna. Kemudian ditambhakan kembali aquadest sampai garis tanda, larutan tersebut dimasukkan dalam labu Erlenmeyer steril yag tertutup dan larutan di sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit (Depkes RI,1979).

**3.10.5 Pembuatan Larutan Standar Mc.Farland 0,5**

Larutan BaCl₂ 1% w/v sebanyak 0,054 mL dicampur dengan H₂SO 1% v/v sebanyak 9,946 mL di dalam tabung reaksi, kemudian divortex sampai campuran tersuspensi secara homogen. Setelah itu, hasil suspensi dimasukkan ke dalam screw cap tube dan ditutup menggunakan alumunium foil untuk mencegah penguapan. Larutan Mc Farland disimpan pada suhu 2-4°C dengan posisi tegak (Khafipah, N., Saula, L. S., & Kasasiah, A.2022).

**3.10.6 Pembuatan Inokulasi Bakteri (Peremajaan)**

Inokulasi bakteri adalah penumbuhan bakteri dilakukan dalam tabung reaksi agar yang telah dibuat. Cara yang dilakukan adalah diambil 1 ose bakteri *staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* digoreskan dimedia agar miring lalu diinkubasi selama 24 jam (Marliza *et al*.,2023).

**3.10.7 Pembuatan Suspensi Bakteri**

 Biakan bakteri *staphylococcus aureus* dan *esccherichia coli* diambil menggunakan jarum ose dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9%. Selanjutnya dibandingkan kekeruhannya dengan larutan Mc.Farland (Sukadiasa *et al*., 2023).

**3.10.8 Pembuatan Larutan Kontrol Dan Larutan Uji**

a. Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg. kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya lalu ditimbang serbuk dalam kapsul tersebut sebanyak 30 µg. Kemudian serbuk dilarutkan dalam etanol 5 ml untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 30 µg/50 µL (Putu Saraswati Kristina *et al*., 2023)

b Kontrol Negatif

 kontrol negatif menggunakan DMSO 5% dibuat dengan cara ambil 5 ml DMSO masukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

c. Larutan Uji

 Larutan uji dibuat 10%; 20%; 30%; b/v dengan cara:

1. Konsentrasi 10 %

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml.

1. Konsentrasi 20 %

Ditimbang sebanyak 1 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml.

1. Konsentrasi 30 %

Ditimbang sebanyak 1,5 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml. (Norhaliza.S,dkk,2022).

**3.10.9 Pembuatan Cakram Atau Diks**

 Pembuatan cakram atau diks dilakukan dengangan menggunakan kertas cakram steril yang kemudian dijenuhkan dengan larutan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun karamunting dengan konsentrasi 30%; 20%; dan 10% cakram dengan DMSO sebagai kontrol negatife dan cakram kloramfenikol sebagai kontrol positif (Sukadiasa *et al.*, 2023).

**3.10.10 Uji Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Daun Karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan kertas cakram yang melibatkan sejumlah kondisi eksperimen. Ini melibatka ekstrak etanol, fraksi n- heksan dan etil asetat dengan variasi konsentrasi (30%, 20%, 10%) serta kontrol positif dan negatif. Alat-alat yang digunakan telah di sterilkan terlebih dahulu dalam oven. Langkah selanjutnya menuangkan media MHA steril ke dalam cawan petri dan menunggu hingga mengeras. Setelah itu, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil menggunakan cotton swab steril dan ditebarkan pada permukaan media MHA. Ekstrak etanol, Fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting dengan konsentrasi (30%, 20%, 10%) dijatuhkan di atas kertas cakram. Sebagai kontrol, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif. Kertas cakram tersebut dengan hati- hati ditempelkan pada permukaan media MHA yang sudah diinokulasi dengan bakteri, menggunakan pinset. Percobaan ini diulang tiga kali untuk memastikan konsistensi hasil.kemudian, media yang telah siap dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan dibiarkan menginkubasi selama 18-24 jam. Setelah periode inkubasi selesai, zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Nasition.A.W,dkk,2023).

**3.11 Analisis Data**

**3.11.1 Uji Toksisitas**

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji toksisitas akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan Microsoft office excel utuk mencari regresi linier dengan hubugan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai LC50 dapat dihitung dengan memasukkan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC50 (Putri & Nasution, 2022).

**3.11.2 Uji Antibakteri**

 Data yang diperoleh pada penelitian ini yaitu dari diameter zona hambat , pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dan data yang diperoleh dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan diagram batang (Azlin *et al.*, 2023).