**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Tanaman Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Karamunting atau (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) adalah tanaman perdu yang tumbuh cepat. Karamunting banyak ditemukan di berbagai daerah di Indonesia, antara lain Pulau Sumatera (Sumatera Utara, Sumatera Barat, Sumatera Selatan), Pulau Bangka, Pulau Belitung dan Pulau Kalimantan (Kalimantan Tengah, Kalimantan Barat). Di Indonesia tanaman karamunting dikenal dengan berbagai nama, antara lain kemunting (Sumatera Utara, Sumatera Selatan), harimonting (Batak), karamunting (Sumatera Barat), kalimuntiong (Riau), karaduduk (Bangka), masisin (Kalimantan) dan lain sebagainya (Ernawati *et al*., 2019).

**2.1.1 Klasifikasi Tanaman Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Menurut Herbarium Medanense (MEDA) klasifikasi batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo : Myrtales

Famili : Myrtaceae

Genus : Rhodomyrtus

Spesies : *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.

**2.1.2 Morfologi Tanaman Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Tanaman karamunting merupakan perdu yang tumbuh cepat, umumnya batang karamunting tingginya sekitar 1-1,5 meter, namun dapat mencapai tinggi 4 meter. Daunnya berwarna hijau, panjangnya sekitar 5-7 cm dan lebarnya 2-3 cm. bunganya merupakan bunga tunggal atau berkelompok 2-3 bunga, berdiameter 2,5-3 cm, berwarna merah muda sampai ungu dengan benang sari banyak dan tidak beraroma. Kelopak bunga berlekatan, jumlah mahkota bunga lima dan putik satu (Ernawati *et al*., 2019).

Buah karamunting berbentuk lonjong, panjang sekitar 1-1,5 cm dan lebarnya sekitar 1 cm. buah yang masih muda berwarna hijau dan rasanya kelat (getir), sedangkan buah yang sudah matang berwarna ungu sampai hitam rasanya manis (Ernawati *et al*., 2019).



**Gambar 2.1 Tumbuhan Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

**2.1.3 Manfaat Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Khasiat batang karamunting digunakan untuk meredakan sakit perut (Ernawati *et al*., 2019). Dalam penelitian (Safitri *et al.*, 2022) menyatakan bahwa batang karamunting memiliki aktivitas analgetik, tetapi kemampuannya tidak sebanding dengan tramadol. Dalam penelitian (Yazidah *et al*., 2022) menyatakan bahwa batang karamunting memiliki aktivitas analgesik dan dalam penelitian (Safitri *et al.*, 2023) menyatakan bahwa batang karamunting memiliki ativitas antiinflamasi.

**2.1.4 Kandungan Kimia Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Kandungan utama batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk) adalah flavonoid, steroid, tanin, saponin dan triterpenoid (Ernawati *et al.*, 2019)

**2.2 Simplisia**

Simplisia merupakan bahan alami yang digunakan sebagai obat dan tidak diolah dengan cara apapun kecuali ditentukan lain. Simplisia merupakan bahan kering. Untuk menjamin konsistensi, keamanan dan manfaat bahan aktif, simplisia harus memenuhi persyaratan minimum. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi pemenuhan persyaratan minimum tersebut (Alqamari *et al.*, 2017), antara lain:

1. Bahan baku simplisia
2. Proses pembuatan simplisia, termasuk penyimpanan bahan baku simplisia
3. Cara mengemas dan menyimpan simplisia

**2.2.1 Pengolahan Simplisia**

Zat dari simplisia yang dapat dimanfaatkan sebagai obat biasanya merupakan metabolit sekunder. Tumbuhan secara alami dapat menghasilkan metabolit sekunder atau primer. Sebelum bahan-bahan simplisia dapat dipasarkan atau dimanfaatkan menjadi produk olahan alami, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan terlebih dahulu. Untuk mencapai kesederhanaan dengan kualitas yang diharapkan, penting untuk mengetahui langkah-langkah berikut (Alqamari *et al.*, 2017) yaitu:

1. Pengumpulan bahan baku

Penentuan bagian tanaman yang dipanen menjadi hal yang utama. Tidak semua bagian tanaman dapat dipanen dalam waktu yang bersamaan. Dalam pemanenan simplisia ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, antara lain:

1. Bagian tanaman yang akan dipanen
2. Memanen daun. Pemanenan daun sebaiknya dilakukan pada cuaca kering (tidak hujan atau mendung). Pemanenan pada cuaca hujan atau mendung dapat menyebabkan daun simplisia rusak atau turunnya mutunya.
3. Bagian rimpang, dipanen pada awal musim kemarau. Hal ini disebebakan kadar air mulai berkurang pada awal musim kemarau.
4. Bagian dari bunga,. Tergantung jenis bunga dan bagian bunga yang digunakan, dipanen pada saat bunga sudah mekar atau masih dalam kuncup. Kelopak bunga biasanya dipanen pada saat bunga masih dalam keadaan kuncup, sedangkan pada mahkota bunga biasanya pada saat bunga mekar. Pemanenan bunga dilakukan pada saat cuaca bagus, bukan pada saat hujan atau mendung. Jika pemanenan pada saat hujan, kemungkinan besar bunga akan ditumbuhi jamur dan kehilangan warna saat mengering.
5. Bagian buah dipanen setelah matang.
6. Bagian biji dan bagian buahnya sama. Pemanenan biji dilakukan setelah buah matang kemudian biji akan terhempas.
7. Bagian akar, setelah tanaman sudah dewasa.
8. Bagian batang, dipanen setelah tanaman sudah mencapai kematangan kulit kayu, umumnya setelah tercapai pertumbuhan sekunder. Kulit batang biasanya diambil pada musim kemarau pada saat kambium masih aktif dan mengandung senyawa penting.
9. Waktu panen

Beberapa bagian tumbuhan yang dapat dipanen berulang kali selama siklus hidupnya antara lain daun, bunga, buah dan kulit kayu. Pemanenan dapat dilakukan pada waktu-waktu tertentu, misalnya untuk memunculkan kembali daun tanaman setelah muncul tunas baru. Tanaman tertentu hanya dipanen pada waktu-waktu tertentu. Contoh teh sering dipanen pada pagi hari karena mengandung metabolit seperti senyawa katekat dan epigalokatekin galat.

1. Metode pemanenan

Metode pemanenan bervariasi tergantung pada metabolit yang terlibat. Tanaman yang mengandung senyawa fenolik biasanya dipanen dengan pisau atau alat besi. Tanaman seperti ini biasanya dipanen dengan tangan atau dengan alat yang terbuat dari stainless stel.

1. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran dari simplisia yang baru dipanen. Penyarian ini dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikroba.

1. Pembersihan

Pembersihan dilakukan dengan air bersih (air sumur, PDAM, mata air). Pencucian secara signifikan mengurangi mikroorganisme yang ada dalam simplisia. Mikroorganisme yang banyak ditemukan di air antara lain *Pseudomonas, Proteus, Mikrococcus Bacillus, Sterptococcus, Enterobacter* dan *Escherichia coli* yang terdapat pada akar, batang atau buah. Untuk mengurangi jumlah mikroorganisme awal, pertama-tama buang kulit luarnya.

1. Perajangan

Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengemasan dan penggilingan. Saat merajang kita harus berhati-hati dengan senyawa yang terkandung dalam simplisia. Untuk keamanan, gunakan pisau atau pemotong baja tahan karat atau stainless steel.

1. Pengeringan

Setelah simplisia dipanen dan tidak digunakan dalam keadaan segar, biasanya simplisia dikeringkan. Fungsi pengeringan adalah untuk menurunkan kadar air sampai tingkat tertentu (biasanya di bawah 10%). Mengurangi kadar air diharapkan dapat meningkatkan ketahanan terhadap pemtumbuhan jamur dan menigkatkan potensi reaksi kimia yang terbawa air seperti redoks dan enzimatik. Ada beberapa metode pengeringan:

1. Pengeringan secara langsung di bawah sinar matahari

Pengeringan dengan metode ini dilakukan pada tanaman yang tidak sensitif terhadap cahaya matahari. Pengeringan terhadap sinar matahari sangat umum untuk bagian daun, batang, biji serta akar. Bagian tanaman yang mengandung flavonoid, kuinon, kurkuminoid, karotenoid serta beberapa alkaloid yang cukup mudah terpengaruh cahaya langsung. Kadangkala suatu simplisia dijemur terlebih dahulu untuk mengurangi sebagian besar kadar air, baru kemudian dikeringkan dengan panas atau digantung di dalam ruangan. Pengeringan dengan sinar matahari secara langsung memiliki keuntungan yaitu ekonomis. Namun lama pengeringan sangat tergantung pada kondisi cuaca.

1. Pengeringan di ruangan kering

Biasanya digunakan untuk simplisia yang tidak tahan terhadap sinar matahari. Saat mengeringkan dengan cara ini, harus diperhatikan untuk memastikan sirkulasi udara di dalam ruangan. Sirkulasi yang baik mendukung proses pengeringan yang optimal. Pengeringan dengan cara ini mempunyai keuntungan yaitu ekonomis dan cenderung lebih aman untuk bahan yang tidak tahan terhadap panas atau sinar matahari, namun cara pengeringan ini biasanya memakan waktu lama dan dapat memicu tumbuhnya jamur jika tidak dilakukan dengan benar.

1. Pengeringan dengan oven

Saat mengeringkan dengan oven, biasanya digunakan pada suhu 30o-90oC. Ada berbagai jenis oven tergantung dari sumber panasnya. Keuntungan pengeringan dengan oven adalah relatif cepat dan menghasilkan panas yang relatif konstan. Kerugian dari teknik ini adalah biayanya mahal.

1. Pengeringan oven vakum

Pengeringan oven vakum adalah metode pengeringan terbaik. Hal ini dikarenakan tidak memerlukan suhu tinggi dan senyawa yang tidak tahan panas dapat bertahan. Namun cara ini paling mahal dibandingkan cara pengeringan lainnya.

1. Pengeringan kertas/kanvas

Pengeringan untuk daun dan bunga. Pengeringan ini baik untuk menjaga bentuk dan warna daun/bunga simplisia. Pengeringan dengan metode ini dilakukan dengan cara menempelkan bahan simplisia diantara kertas/kanvas. Meskipun pengeringan ini relatif ekonomis dan memberikan kualitas yang baik, namun kurang ekonomis untuk kapasitas produksi skala besar.

1. Sortasi kering

Tahapan sebelum simplisia dikemas. Hal ini dilakukan untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak perlu atau terkotaminasi. Proses ini juga dilakukan untuk memisahkan simplisia-simplisia menurut kualitasnya.

1. Pengemasan

Pengemasan dilakukan sebaik-baiknya agar simplisia tidak terkena beberapa faktor yang dapat mempengaruhi mutu simplisia, seperti:

1. Sinar matahari
2. Oksigen/udara
3. Gejala dehidrasi
4. Jumlah asupan air
5. Polusi
6. Serangga
7. Kapang

Hal yang harus diperhatikan saat pengepakan dan penyimpanan adalah suhu dan kelembapan udara. Suhu yang baik untuk simplisia umumnya adalah suhu kamar (15°-30°C). Untuk simplisia yang membutuhkan suhu sejuk dapat disimpan pada suhu (5°-15°C) atau simplisia yang perlu disimpan pada suhu dingin (0°-5°C).

Pembuatan Simplisia Secara Khusus (Alqamari *et al.*, 2017):

* 1. Simplisia dari jamur, lumut kerak, dan spora paku-pakuan

Simplisia dijemur di bawah sinar matahari sebab materialnya halus dan berbentuk lapisan tipis. Dikemas dalam kemasan plastik atau kaleng, bila perlu diberi bahan pengering.

* 1. Akar

Dicuci bersih, diiris tipis, atau dipotong pendek sesuai dengan ukuran akar, kemudian dijemur. Pengeringan dilakukan dengan sinar matahari atau lemari pengering. Akar sebagai produk tanaman obat dapat dibedakan dalam dua golongan menurut asal dan jenis tanamannya, yaitu akar lunak dan akar keras. Akar lunak biasanya banyak mengandung air (lebih dari 60%), misalnya akar pacar air (Impatiens balsamina L.), sementara akar yang bersifat keras biasanya memiliki kandungan serat yang tinggi, misalnya akar cempaka (Michelia champaka) dan akar trengguli (Cassia fistula). Melihat perbedaan sifat akar tersebut tentu dibutuhkan penanganan dan pengelolaan yang berbeda. Akar-akar yang banyak mengandung air, pengeringannya dilakukan secara perlahan untuk menghindari proses pembusukan dan fermentasi. Pada akar-akar keras penanganannya hampir sama dengan penanganan simplisia batang dan kulit batang.

* 1. Buah

Buah berbentuk kecil atau sudah agak kering, sewaktu dipanen seperti lada dan adas langsung dikeringkan. Buah yang agak besar, seperti cabe merah, sebaiknya dibelah menjadi dua atau menjadi beberapa bagian kemudian dijemur. Buah juga memiliki kandungan air yang cukup tinggi, yaitu antara 70-80%. Namun, ada beberapa jenis buah yang memiliki kandungan air kurang dari 70%. Selain mengandung air, buah-buah yang lunak juga mengandung lemak, protein, atau zat-zat lain sehingga membutuhkan tindakan khusus dalam proses pengeringan agar kandungan zat yang dimiliki tidak hilang. Jaringan buah tersusun dari sel-sel parenkim yang menyebabkan buah menjadi lunak. Beberapa jenis buah ada yang hanya dimanfaatkan kulit buahnya (perikarpium) untuk simplisia. Buah dipanen ketika masak karena diperkirakan memiliki kandungan senyawa aktif maksimal. Penanganan dan pengelolaan buah harus dilakukan secara tepat, khususnya pada buah yang memiliki kandungan minyak atsiri. Hal ini penting dilakukan agar kandungan minyak atsiri dalam buah tidak hilang. Buah-buah yang akan diambil minyak atsirinya biasanya diolah pada saat buah dalam keadaan segar.

* 1. Bunga

Pengeringan bunga sebaiknya tidak menggunakan matahari secara langsung karena akan mengakibatkan warna menjadi lebih gelap. Namun perlu diperhatikan kelembapan bunga harus serendah mungkin karena jika masih tinggi, saat penyimpanan akan berubah warna. Bunga memiliki kandungan air lebih dari 70%, bersifat lunak, dan mudah rusak. Setelah melewati proses pengeringan atau didiamkan agak lama maka zat warna bunga akan mengalami perubahan karena reaksi oksidasi dan fermentasi. Dengan demikian, bunga-bunga yang memiliki aroma atau mengandung minyak atsiri perlu segera ditangani sehingga diperoleh kestabilan aroma dan minyaknya. Cara pengeringan bunga pada prinsipnya hampir sama dengan penanganan dan pengelolaan daun. Pengeringan dilakukan dengan hati-hati karena sifat dan keadaan bunga yang terdiri dari bagian- bagian yang rapuh serta mudah rontok.

* 1. Biji

Bila biji hanya tercemar oleh bahan organik asing, langsung dijemur. Selama proses pengeringan, jika ada biji yang pecah langsung dibuang untuk menghindari dari kapang. Biji diambil dari buah yang telah masak sehingga umumnya sangat keras. Bentuk dan ukuran simplisia biji pun bermacam-macam tergantung dari jenis tanaman.

* 1. Daun

Perlakuan seperti bunga, atau untuk beberapa yang masih tahan dengan sinar matahari dapat menggunakan pengeringan dengan sinar matahari kemudian setelah lebih kering diangin-anginkan. Simplisia daun (folium) merupakan jenis simplisia yan paling umum digunakan sebagai bahan baku ramuan obat tradisional atau minyak atsiri. Simplisia ini dapat berupa lembaran daun tunggal atau majemuk. Simplisia daun biasanya dipakai dalam bentuk segar atau dikeringkan. Sebagian simplisia daun terkadang berupa pucuk tanaman yang terdiri dari beberapa daun muda.

* 1. Batang

Diserut tipis, pengeringan dilakukan di dalam lemari pengering. Simplisia batang (caulis) dan kulit batang (cortex) merupakan bagian batang atau kulit yang digunakan sebagai ramuan obat. Simplisia batang dapat diperoleh dari bagian batang tumbuhan tahunan atau tumbuhan semusim. Sedangkan simplisia kulit batang umumnya diambil dari bagian kulit terluar tanaman tingkat tinggi yang berkayu. Bagian yang sering digunakan sebagai bahan ramuan meliputi kulit batang, cabang atau kulit akar sampai ke lapisan epidermis.

* 1. Herba

Pengeringan seperti pada kayu atau daun. Simplisia herba khususnya merujuk kepada bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan obat, seperti daun, bunga, atau batang, yang telah dipanen, dikeringkan, dan disiapkan untuk digunakan dalam pengobatan tradisional atau dalam industri farmasi untuk membuat produk obat-obatan. Simplisia herba merupakan bentuk baku sebelum proses ekstraksi atau formulasi lebih lanjut dilakukan.

* 1. Kulit batang

Pengeringan seperti pada kayu. Batang dan kulit batang memiliki sifat yang hampir sama, yaitu kaku, keras, dan ulet. Hal ini karena keduanya memiliki kandungan serat selulosa, hemiselulosa, serta lignin yang tinggi. Penanganan dan pengelolaan terhadap kedua jenis produk tersebut harus sesuai anjuran dengan memperhatikan sifat yang dimiliki oleh simplisia tersebut.

* 1. Rimpang

Rimpang dicuci bersih, yang berukuran kecil dibiarkan utuh, sedangkan rimpang yang besar diiris tipis memanjang atau melintang bergantung pada permintaan pasar. Istilah empon-empon berasal dari bahasa jawa. Asal katanya adalah empu yang berarti rimpang induk atau akar tinggal. Kata ini digunakan untuk menyebut kelompok tanaman yang mempunyai rimpang atau akar tinggal tanaman yang termasuk kelompok ini umumnya adalah tanaman yang bisa dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional dan bumbu-bumbu masakan. Sehubungan dengan kemajuan zaman, kini penggunaan empon- empon meluas dalam industri makanan, minuman, kosmetika, bahan warna, dan untuk diambil minyak atsirinya. Penggolongan nama empon-empon tidak dilakukan berdasarkan klasifikasi ilmiah tertentu, melainkan merujuk kepada penggolongan tanaman tertentu yang dilakukan oleh masyarakat Jawa, meskipun jenisnya didominasi oleh tanaman famili Zingiberaceae. Masih banyak tanaman lain dari Zingiberaceae yang tergolong dalam empon-empon, misalnya bunga kana yang tidak dimanfaatkan rimpangnya. Dari sekitar 283 jenis tanaman obat, ada 12 jenis tanaman yang paling sering dipakai. Dua belas jenis tanaman itu ialah temulawak, jahe, lempuyang gajah, cabe jawa, kedawung, lengkuas, lempuyang wangi, kencur, pula sari, kunyit, bangle dan adas. Temu-temuan dan empon-empon mendominasi jenis-jenis tanaman obat di atas.

* 1. Umbi

Umbi dicuci bersih, diiris tipis, jika perlu irisan tipis bagian tengah yang besar dipotong menjadi dua atau beberapa bagian. Perlakuan selanjutnya seperti pada kayu. Bila dalam keadaan utuh seperti bawang merah, setelah dicuci lalu dijemur.

* 1. Umbi lapis

Bila dalam keadaan utuh, seperti bawang merah, setelah dicuci lalu dijemur. Umbi lapis, dan umbi akar umumnya memiliki sifat yang hampir sama, yakni keras dan agak rapuh. Ini disebabkan adanya zat pati, protein yang tinggi, dan kandungan air yang tinggi pula. Beberapa jenis umbi lapis memiliki sifat agak lunak misalnya bawang putih (*Allium sativum*). Penanganan dan pengelolaan untuk produk tanaman obat berupa rimpang dan umbi-umbian ini harus sesuai dengan sifat-sifat umum yang dimiliki.

* 1. Balsam, malam, dan gom

Lazimnya tidak membutuhkan proses pengeringan. Bila perlu, berbagai jenis gom dapat dijemur agar lebih kering.

* 1. Getah

Getah, jadam, dan sebagainya. Disimpan seperti apa adanya, wadah disesuaikan dengan bentuk. Penyimpanan hendaknya disertai dengan bahan pengering karena beberapa bahan olahan higroskopis.

* 1. Minyak atsiri

Penyimpanan dalam wadah terisi penuh, tertutup baik, terlindung dari cahaya, pada suhu kamar.

* 1. Minyak nabati padat

Perlakuan seperti pada lemak cokelat, lemak pala. Penyimpanan dalam wadah tertutup baik.

**2.3 Ekstraksi**

Ekstraksi adalah pemisahan senyawa menggunakan pelarut sederhana dan sesuai. Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat dan kimia senyawa yang diekstraksi. Pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang diekstraksi, mulai dari non polar hingga polar. Pelarut yang digunakan awalnya dimulai dari heksana, petroleum eter, kemudian kloroform atau diklorometana, kemudian alkohol, methanol dan terakhir air jika diperlukan. Simplisia dikumpulkan dan dicuci untuk menghilangkan kotoran. Saat mengekstraksi simplisia, gunakan simpliisa segar. Metode pengeringan dipilih, yang tidak menyebabkan perubahan kuantitatif atau kualitataif pada metabolit sekundernya. Pengeringan dilakukan sesegera mungkin, hindari pengaruh sinar matahari dan suhu tidak terlalu tinggi. Contoh umum pengeringan adalah aliran udara. Sebelum melakukan ekstraksi simplisia, jangan menyimpan simplisia kering dalam wadah tertutup terlalu lama untuk mencegah masuknya hama dan kutu yang dapat merusak kandungan kimianya. Untuk mempercepat proses ekstraksi maka perlu dilakukan pengurangan ukuran simplisia (Hanani, 2017).

**2.3.1 Metode Ekstraksi**

**2.3.1.1 Ekstraksi Cara Dingin**

**a. Maserasi**

Maserasi merupakan proses ekstraksi dingin yang menggunakan pelarut dengan cara perendaman tanpa perlakuan suhu. Metode maserasi ini yang paling umum digunakan karena memiliki beberapa kelebihan tetapi juga beberapa kelemahan. Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi (Saidi *et al*., 2018) adalah:

1. Senyawa yang sensitif lebih awet karena tidak digunakan suhu tinggi selama ekstraksi
2. Wadah maserasi dapat diubah sesuai dengan jumlah sampel, maka sampel dalam jumlah besar dapat diekstraksi secara maserasi
3. Tidak menggunakan peralatan khusus. Wadah apapun dapat digunakan untuk maserasi, asalkan tidak bereaksi atau larut dalam pelarut yang digunakan.

Kelemahan ekstraksi dengan cara maserasi (Saidi *et al.*, 2018) adalah:

1. Pelarut yang digunakan lebih banyak karena perendaman dilakukan berulang, hingga seluruh senyawa diharapkan dapat terekstraksi
2. Biasanya maserasi berlangsung dalam waktu 3 hari. Jika pengulangan sebanyak tiga kali, maka maserasi berlangsung selama 9 hari
3. Jika waktu yang digunakan tidak maksimum, maka ekstraksi tidak mencapai nilai maksimal.

**b. Perkolasi**

Proses ekstraksi perkolasi menggunakan pelarut segar yang terus menerus mengalir hingga ekstraksi selesai. Proses ekstraksi ini dilakukan pada suhu kamar, mirip dengan proses ekstraksi maserasi. Ekstraksi berakhir ketika sampel tidak lagi mengandung senyawa yang akan diekstraksi. Meskipun banyak senyawa yang seringkali tidak berwarna, osmosis dapat dihentikan ketika tetesan osmotis sudah mencapai seratus bagian simplisia. Proses ekstraksi perkolasi ini dilakukan dengan merendam sampel dalam labu perkolasi dengan pelarut yang sesuai, kemudian hasil ekstraksi dipisahkan dengan membuka katup labu. Kecepatan tetesan ekstraksi sama dengan kecepatan tetesan pelarut segar yang ditempatkan dalam botol yang dimodifikasi dengan sumbat terpasang (Saidi *et al*., 2018). Kelebihan ekstraksi perkolasi (Saidi *et al*., 2018) adalah:

1. Proses ekstraksi dilakukan pada suhu kamar, sehingga kandungan senyawa dalam sampel tidak terpengaruh
2. Wadah dapat diganti sesuai jumlah sampel, sehingga sampel dapat diekstraksi dalam jumah banyak
3. Proses ekstraksi lebih cepat dengan pelarut yang digunakan selalu segar
4. Tidak menyebabkan penjenuhan pada pelarut, karena pelarut diteteskan melewati sampel.

Kelemahan ekstraksi perkolasi (Saidi *et al*., 2018) adalah:

1. Membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak

**2.3.1.2 Ekstraksi Cara Panas**

**a. Sokletasi**

Teknik ekstraksi ini menggunakan pelarut dengan titik didih yang sesuai sebagai ektraktornya. Metode ini dapat digunakan bila menggunakan pelarut dengan titik didih rendah. Karena titik didih rendah, senyawa yang diekstraksi tetap tidak rusak. Ekstraksi beberapa senyawa metabolit sekunder juga dapat dilakukan dengen metode ini. Kelebihan ekstraksi sokletasi (Saidi *et al*., 2018) adalah:

1. Sokletasi tester beroperasi dengan mengembalikan pelarut ke labu soklet sehingga mengurangi jumlah pelarut yang digunakan
2. Ekstraksi dapat dilakukan dengan cepat sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama untuk memperoleh ekstraknya
3. Siklus perendalam terjadi lebih sering dan cepat, sehingga lebih banyak senyawa yang terekstraksi

Kelemahan ekstraksi sokletasi (Saidi *et al*., 2018) adalah:

1. Terdapat kekhawatiran bahwa senyawa yang diektraksi dapat rusak, terutama bila menggunakan senyawa peka terhadap panas dan titik didih pelarut tinggi
2. Peralatan sokletasi hanya mampu menangani sampel yang kecil, sehingga terhadap sampel yang jumlahnya banyak memerlukan beberapa kali ekstraksi sokletasi, yang dapat memakan waktu cukup lama.

Cara kerja alat sokletasi dengan menempatkan sampel pada tempat sampel dan tambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengurangi atau menghilangkan air yang ada dalam sampel. Pelarut organik yang digunakan dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dipanaskan dengan mantel pemanas. Pelarut diuapkan dengan uap langsung dan terjadi kondensasi di kondensor. Kondensor harus dihubungkan ke sistem pendingin (radiator) untuk memastikan kondensasi uap pelarut yang tepat. Setelah pelarut mengembun menjadi cairan, sampel direndam hingga batas ketinggian pada lengan samping dan pelarut dikembalikan ke labu alas bulat. Proses ini berlangsung terus menerus hingga senyawa terekstraksi sempurna (Saidi *et al.,* 2018).

**b. Infusa**

Infusa merupakan proses yang menggunakan air sebagai pelarut dan filtrasi pada suhu 90°C selama 15-20 menit. Infusa dibuat dengan cara merendam sampel dalam wadah dan merendam wadah infusa dalam penangas air. Perlakuan ini dapat dilakukan pada sampel segar atau dalam bentuk penyederhanaan lunak seperti bunga dan daun (Saidi *et al*., 2018).

**c. Dekokta**

Dekokta merupakan proses yang menggunakan air sebagai pelarut dan disaring pada suhu 90°C selama 30 menit. Proses ini dilakukan saat memproses sampel Ayurveda yang dibuat selama penyaringan dan disebut *quath* atau *kawath*. Cara ekstraksinya mirip dengan infusa, namun waktu ekstraksinya lebih lama (Najib, 2018).

**d. Destilasi (penyulingan)**

Pada metode ini, bahan yang akan dimurnikan bersentuhan langsung dengan air mendidih. Tergantung pada berat jenis dan jumlah zat yang disuling, zat tersebut dapat mengapung di atas air atau tenggelam seluruhnya. Air dipanaskan menggunakan metode pemanasan biasa seperti api terbuka, ketel uap, pipa uap melingkar tertutup, atau pipa uap terbuka berbentuk lingkaran atau berlubang. Metode ini ditandai dengan kontak langsung bahan dengan air mendidih. Metode ini biasa digunakan untuk mengekstraksi minyak atsiri dari tumbuhan (Najib, 2018).

**e. Digesti**

Metode digesti merupakan metode maserasi dengan menggunakan pemanasan suhu 40℃ hingga 50℃ yang menjadi ciri khas simplisia yang bahan aktifnya tahan terhadap panas. Proses pemanasan pada sistem filter dimaksudkan untuk meningkatkan efisiensi pelarut dalam menyaring sampel (Najib, 2018).

**f. Refluks**

Metode ini merupakan metode ekstraksi kontinyu. Zat yang akan diekstraksi direndam dalam cairan penyari dalam labu alas bulat dengan kondensor vertikal dan dipanaskan sampai mendidih. Cairan filter menguap dan uapnya terkondensasi dalam pendingin vertikal dan turun kembali untuk mengekstrak bahan aktif simplisia. Simplisia yang biasa diekstraksi dengan cara ini adalah simplisia seperti akar, batang, biji, dan herba yang tahan panas dan bertekstur keras. Cara esktraksi ini dengan menimbang serbuk simplisia atau bahan yang akan diekstraksi secara refluks, masukkan ke dalam labu alas bulat, lalu tambahkan pelarut organik sampai serbuk simplisia terendam kurang dari 2 cm dari permukaan simplisia atau kurang dari 2/3 bagian volume labu. Selanjutnya, pasangkan labu alas bulat dengan aman ke dudukannya. Panaskan mantel*/heating mantle* dan pasang kondensor ke labu alas bulat yang diikat dengan braket dan dudukan. Kontrol aliran air dan pemanasan tergantung pada suhu pelarut yang digunakan. Metode ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan panas (Nugroho, 2017).

**2.4 Fraksinasi**

Fraksinasi berasal dari kata *fraction* atau bagian dan secara harfiah dapat diartikan sebagai mekanisme pengelompokan atau pemisahan suatu kumpulan/satuan menjadi beberapa bagian (pecahan/bagian) atau lebih sederhananya adalah proses pembagian kelompok. Ekstrak dari bahan tumbuhan mungkin mengandung puluhan atau ratusan senyawa. Misalnya suatu proses fraksinasi dapat memisahkan suatu ekstrak yang mengandung 100 senyawa menjadi 4 fraksi/golongan (fraksi A, B, C, dan D), yang masing-masing anggotanya mengandung kurang lebih 25 senyawa. Pemisahan kelompok tahap kedua selanjutnya dapat dilakukan dengan membagi kelompok sasaran/kelompok terpilih. Pemisahan memiliki berbagai tujuan. Fraksinasi bertujuan untuk memperoleh fraksi (bagian) tertentu dari ekstrak, yaitu fraksi aktif dan harus dipisahkan dari fraksi lain yang kurang aktif. Tujuan lainnya adalah untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni, sehingga senyawa lain yang dapat mengkontaminasi atau merusak ekstrak harus dihilangkan. Fraksinasi juga diperlukan ketika mengisolasi atau memisahkan senyawa metabolit sekunder tunggal (Saifudin, 2014).

**2.4.1 Fraksinasi dengan liquid-iquid extraction.**

Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair adalah pemisahan gugus senyawa dari kumpulan senyawa dalam suatu ekstrak yang dilarutkan dalam suatu pelarut dengan menambahkan jenis pelarut lain yang mempunyai kepolaran berbeda dan tidak dapat bercampur satu sama lain. Umumnya pemisahan dengan metode ini dilakukan dengan menggunakan separoskop. Terdapat dua pelarut (pelarut asli dan pelarut tambahan) yang berbeda dalam sifat polaritas dan densitasnya dalam sistem di bagian atas dan bawah labu pemisah. Kedua fase ini dihasilkan setelah mencampurkan kedua pelarut dan ekstrak yang dikandungnya dengan cara digojrok dan didiamkan selama beberapa menit. Fase atas mengandung pelarut dengan kepadatan lebih rendah dan fase bawah berisi pelarut dengan kepadatan lebih tinggi. Senyawa dari ekstrak bermigrasi dan terpisah dalam dua kecenderungan karena kesamaan sifat senyawa dan pelarut. Banyak koneksi yang terhubung ke fase atas dan banyak koneksi lainnya yang terhubung ke fase bawah. Dengan menggunakan proses pemisah, kedua fasa/fraksi dapat dipisahkan dengan mudah. Dengan cara ini, diperoleh dua patahan yang berbeda, masing-masing dengan jenis komponen struktur komposit yang berbeda. Oleh karena itu, proses ini akan menghasilkan fraksi yang terpisah. Setelah masing-masing fraksi dipisahkan, langkah selanjutnya adalah memekatkan atau mengeringkan fraksi dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator (Nugroho, 2017).

**2.4.2 Fraksinasi dengan kolom kromatografi**

Teknik fraksinasi lainnya adalah metode kromatografi kolom. Prinsip operasinya pada dasarnya sama dengan ekstraksi cair-cair, namun perbedaannya terletak pada media yang digunakan. Pada fraksinasi menggunakan kromatografi kolom, fraksi-fraksi pada kolom dipisahkan menurut prinsip kromatografi. Kedua prinsip tersebut menerapkan prinsip tingkat polaritas, yaitu prinsip yang sama seperti pada ekstraksi cair-cair (Nugroho, 2017).

**2.5 Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder**

Metabolisme merupakan seluruh perubahan kimia yang terjadi dalam sel hidup yang meliputi pembentukan dan penguraian senyawaan kimia. Metabolime primer dalam suatu tumbuhan meliputi seluruh jalur metabolisme yang sangat penting kemampuan tumbuhan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Metabolit primer merupakan senyawa yang secara langsung terlibat dalam pertumbuhan suatu tumbuhan sedangkan metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan dalam jalur metabolisme lain yang walaupun dibutuhkan tapi dianggap tidak penting peranannya dalam pertumbuhan suatu tumbuhan.

Semua makhluk hidup mengubah dan membentuk jaringan berbagai senyawa organik untuk mempertahankan kehidupan, tumbuh dan bereproduksi. Makhluk hidup mempunyai kemampuan menyediakan energi dalam bentuk ATP dan bahan pembangun jaringan tubuh. Organisme hidup umumnya berbeda dalam kemampuannya untuk mensintesis dan mengubah senyawa. Misalnya, tumbuhan sangat efisien dalam mensintesis senyawa organik dari bahan anorganik di lingkungan melalui fotosintesis, sedangkan organisme lain seperti hewan dan mikroorganisme lain memperoleh bahan makanannya dengan memakan tumbuhan. Beberapa jalur metabolisme berhubungan dengan senyawa dasar yang terbentuk ketika makanan dipecah, sementara jalur lainnya memerlukan sintesis molekul spesifik dari senyawa dasar yang dihasilkan. Meskipun sifat-sifat organisme hidup sangat bervariasi, jalur modifikasi dan sintesis karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat pada dasarnya sama di semua organisme. Senyawa yang terlibat dalam jalur metabolisme ini adalah metabolit primer. Metabolisme mengacu pada semua perubahan kimia yang terjadi pada sel hidup, termasuk pembentukan dan pemecahan senyawa.

Metabolisme primer tanaman mencakup semua jalur metabolisme yang penting untuk kelangsungan hidup tanaman. Metabolit primer merupakan senyawa yang berperan langsung dalam pertumbuhan tanaman, sedangkan metabolit sekunder merupakan senyawa yang timbul dari jalur metabolisme lain dan dianggap perlu tetapi tidak berperan penting dalam pertumbuhan tanaman. Metabolit sekunder juga digunakan sebagai penanda dan pengatur jalur metabolisme primer. Metabolisme sekunder membantu tumbuhan mengelola sistem kompleks yang menjaga keseimbangan dengan lingkungan dan beradaptasi dengan kebutuhan lingkungan. Metabolisme primer menggambarkan semua proses fisiologis yang memungkinkan pertumbuhan tanaman dengan menerjemahkan kode genetik untuk menghasilkan protein, karbohidrat, dan asam amino. Senyawa khusus metabolit sekunder antara lain alkaloid, polifenol seperti flavonoid dan terpenoid, yang digunakan manusia sebagai obat dan nutrisi (Julianto, 2019).

**2.5.1 Skrining Fitokimia**

Perkembangan obat-obatan yang menggunakan bahan alam semakin meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah senyawa organik yang mempunyai sifat terapeutik. Skrining fitokimia merupakan uji pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan secara akurat dan menyeluruh golongan senyawa yang terdapat pada tumbuhan yang biasanya menunjukkan aktivitas biologis. Penapisan fitokimia memerlukan beberapa persyaratan yang harus dipenuhi sebelum pengujian, antara lain:

1. Langkah-langkah yang dilakukan sederhana

2. Langkah-langkah pekerjaan dapat diselesaikan dengan cepat

3. Peralatan yang digunakan sederhana

4. Metode harus spesifik untuk kelompok metabolit sekunder

5. Metode memiliki batas deteksi yang besar dan dapat mendeteksi konsentrasi senyawa yang sangat rendah (Nasyanka *et al*., 2020).

Penapisan fitokimia sampel basah meliputi pengujian kandungan alkaloid, flavonoid, terpenoid/steroid, tanin, saponin, dan glikosida.

1. Alkaloid

Penapisan fitokimia gugus alkaloid dapat dilakukan pada kondisi larutan netral atau sedikit asam. Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder terpenting yang ditemukan pada tumbuhan. Alkaloid khas yang berasal dari tumbuhan ini bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam heterosiklik), dan biasanya aktif secara biologis pada manusia atau hewan lain. Kebanyakan alkaloid memiliki rasa pahit, bersifat basa lemah, dan sedikit larut dalam air dan dapat larut dalam pelarut organik non polar seperti dietil eter, kloroform dan lain-lain. Beberapa alkaloid memliki warna seperti berberin yang berwarna kuning dan garam sanguinarine dengan tembaga berwarna merah. Alkaloid akan terdekomposisi oleh panas kecuali strychnine dan caffeine. Secara wujud kebanyakan alkaloid berbentuk padatan Kristal dan sedikit diantaranya merupakan padatan amorf (Julianto, 2019). Alkaloid umumnya memberikan rasa pahit pada bahan alami. Alkaloid dikenal sebagai senyawa fitokimia yang mempunyai berbagai efek farmakologis seperti antibakteri, anti kanker, anti hiperglikemik, anti asma, dll (Nugroho, 2017).

1. Flavonoid

Flavonoid adalah polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon dan dua cincin aromatik (cincin A dan cincin B). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang paling beragam dan ditemukan di jaringan epidermis hampir semua tumbuhan, umumnya daun dan kulit buah. Manfaat flavonoid bagi kesehatan manusia antara lain bersifat antikanker, antiinflamasi, antioksidan, antialergi, antivirus, dan antimelanogenik (Nugroho, 2017). Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, buah dan biji. Flavonoid bersifat asam, sehingga dapat larut dalam basa. Memiliki sifat antibakteri karena flavonoid sebagai derivat dari fenol dapat menyebabkan rusaknya susunan dan perubahan mekanisme permeabilitas dari dinding sel bakteri. Flavonoid juga sebagai antioksidan memiliki gugus hidroksil dalam peranan antioksidan dan aktivitas menyingkirkan radikal bebas. Pemisahan senyawa flavonoid berdasarkan sifat kelarutan dalam berbagai macam pelarut dengan polaritas yang meningkat yaitu flavonoid bebas dan aglikon dalam eter, O-Glikosida dalam dietil eter dan C-Glikosida dan leukoantosianin dalam butanol dan amil alcohol. Oleh karena itu banyak keuntungan jika dilakukan ekstraksi dengan polaritas yang meningkat (Heliawati, 2018).

c. Terpenoid/Steroid

Terpenoid merupakan senyawa fitokimia yang paling banyak tersebar luas. Dilihat dari strukturnya, mulai dari linier hingga polisiklik (struktur cincin). Terpenoid merupakan golongan metabolit sekunder yang mempunyai sifat umumnya tidak larut dalam air. Senyawa terpenoid mempunyai sifat antibakteri, antijamur, antivirus, antiparasit, antihiperglikemik, antialergi, antiinflamasi, antispasmodik, imunomodulator dan kemoterapi yang berbeda-beda tergantung jenisnya. Steroid adalah senyawa organik yang terdiri dari empat cincin yang tersusun dalam susunan unik. Contoh steroid adalah kolesterol (Nugroho, 2017). Senyawa terpena merupakan kelompok senyawa organik hidrokarbon yang melimpah yang 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 merupakan komponen utama dalam minyak atsiri dari beberapa jenis tumbuhan dan bunga. Minyak atsiri digunakan secara luas untuk wangi-wangian parfum, dan digunakan dalam pengobatan seperti aromaterapi. Secara umum, terpenoid cenderung memiliki kelarutan yang lebih baik dalam pelarut non-polar seperti n-heksan, kloroform, atau eter dibandingkan dengan etanol dan air, karena banyak terpenoid bersifat hidrofobik. Namun, ada pengecualian tergantung pada gugus fungsional dan struktur molekulnya. Misalnya, terpenoid yang mengandung gugus hidroksil (-OH) seperti beberapa jenis terpenol (misalnya mentol dalam minyak mint) dapat lebih mudah larut dalam air karena kemampuan mereka untuk membentuk ikatan hydrogen dengan air (Julianto, 2019). Lemak sterol adalah bentuk khusus dari steroid dengan rumus bangun yang diturunkan dari kolestana dilengkapi gugushidroksil pada atom C-3, banyak ditemukan pada tanaman dan hewan. Semua steroid dibuat di dalam sel dengan bahan baku berupa lemak sterol, baik berupa lanosterol pada hewan, maupun berupa sikloartenol pada tumbuhan. Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa dan pengelompokan 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 (Heliawati, 2018).

d. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki banyak gugus hidroksil atau gugus lain seperti karboksil sehingga membentuk ikatan kompleks yang kuat dengan beberapa makromolekul seperti protein, pati, selulosa dan mineral. Terlalu banyak tanin dapat menyebabkan anemia karena tanin mengikat zat besi dalam darah. Tanin mempunyai kemampuan sebagai astringent, yaitu senyawa yang dapat mengencangkan jaringan tubuh, sehingga dapat digunakan untuk mengencangkan kulit (Nugroho, 2017). Tanin adalah suatu senyawa fenolik yang memberikan rasa pahit dan sepat/kelat, dapat bereaksi dan menggumpalkan protein atau senyawa organik lainnya yang mengandung asam amino dan alkaloid. Senyawa-senyawa Tanin ditemukan pada banyak jenis tumbuhan. Senyawa ini berperan penting untuk melindungi tumbuhan dari pemangsaan oleh herbivora dan hama, serta sebagai agen pengatur dalam metabolisme tumbuhan (Julianto, 2019).

e. Saponin

Ciri utama saponin adalah bila ditambahkan air akan membentuk busa. Saponin ada dalam bentuk glikosida amfifilik, yaitu glikosida yang mempunyai sifat hidrofilik (suka air) atau lipofilik (suka minyak), seperti sabun dan sampo. Saponin mudah larut dalam air. Saponin memiliki efek anti inflamasi dan dapat digunakan sebagai bahan pembuatan sampo, industri farmasi, sebagai bahan pembusa pada alat pemadam kebakaran, bahkan sebagai bahan pengendalian hama udang (Nugroho, 2017). Senyawa ini memberikan efek pembentukan gelembung yang permanen pada saat digojrok bersama air. Senyawa ini juga menyebabkan terjadinya hemolysis pada sel darah merah (Julianto, 2019).

f. Glikosida

Glikosida merupakan metabolit sekunder yang menempel pada senyawa gula melalui ikatan glikosidik. Bagian gula dari glikosida menempel pada atom karbon anomerik, membentuk ikatan glikosidik. Bagian gula dari glikosida disebut glikon dan bagian non-gula disebut aglikon atau genin. Beberapa glikosida yang ditemukan pada tumbuhan digunakan dalam pengobatan. Glikosida mempunyai efek analgesik, antipiretik dan antiinflamasi (Julianto, 2019).

**2.6 Toksisitas**

Toksikologi adalah ilmu yang mempelajari dampak berbahaya bahan kimia terhadap organisme hidup. Toksisitas adalah tingkat merusaknya suatu zat bila terkena organisme hidup. Secara umum, toksikologi sangat penting bagi lingkungan dan kesehatan masyarakat. Pengujian toksisitas adalah pengujian untuk mengetahui potensi toksik suatu senyawa, mengidentifikasi kondisi biologis/lingkungan dimana efek toksik terjadi dan mengkarakterisasi efek/akibatnya. Tidak semua senyawa beracun di dalam tubuh berpengaruh. Hal ini karena suatu zat beracun dapat menimbulkan bahaya, zat tersebut harus berinteraksi terlebih dahulu dengan target biologisnya. Baik zat beracun endogen maupun eksogen didistribusikan ke organ atau sel tertentu, namun hanya sedikit dari racun ini yang menyebabkan efek global. Dampaknya biasanya bersifat lokal, artinya hanya organ atau sel tertentu yang terkena keracunan. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan jumlah toksin yang didistribusikan ke seluruh tubuh. Artinya, jika toksin ada di suatu organ, maka otak dan testis merupakan organ yang kecil kemungkinannya terkontaminasi toksin karena terdapat pembatas antara jaringan dan darah (Berniyanti, 2018).

**2.7 Metode-metode Pengujian Toksisitas**

**a. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Metode BSLT merupakan salah satu metode yang digunakan untuk penyaringan awal terhadap senyawa yang diduga mengandung bahan aktif. Artemia salina digunakan sebagai hewan uji. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas biologis suatu senyawa adalah jumlah kematian yang disebabkan oleh Artemia salina. Dalam metode ini, LC50 diukur selama periode 24 jam. Ekstrak tumbuhan atau fraksi ekstrak tumbuhan dengan nilai LC50 di bawah 1000 μg/ml diduga mempunyai efek toksik, sitotoksik, antibakteri, dan insektisida (Erawaty *et al*., 2016).

1. ***Acute Toxic Class Method***

Uji toksisitas akut menggunakan sediaan uji dalam beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis perkelompok, kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik dan kematian. Selanjutnya penentuan *Lethal Doses* 50 (LD50). Metode *Acute toxic class method* ini dilakukan selama 1 minggu, mencit diaklimasi dengan tujuan adaptasi terhadap lingkungan kandang percobaan dan diberikan makan dan minum. Dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis perkelompok, kemudian dilakukan pengematan (Handayani *et al*., 2022).

1. ***Trompson*-*Weil***

Uji toksisitas untuk memperoleh informasi bahaya setelah terpapar suatu zat, mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menentukan organ sasaran, memperoleh nilai LD50 dari suatu bahan atau sediaan, serta penentuan penggolongan dan pelabelan keamanan suatu bahan zat yang di uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relative dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (Parwanty *et al.,* 2023).

**2.8 Penentuan LC50**

Parameter yang digunakan untuk uji toksisitas yaitu nilai *lethal concentration* (LC50). Nilai LC50 yaitu kadar atau konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam ppm yang mempunyai peluang 50% menyebabkan kematian pada hewan uji laboratorium setelah 24 jam terpapar ekstrak berbagai konsentrasi.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **No** | **Kategori** | **LC50** |
| 1 | Sangat Toksik | <30 ppm |
| 2 | Toksik | 30-1000 ppm |
| 3 | Tidak Toksik | **>**1000 ppm |

**Tabel 2.1 Kategori Toksisitas Berdasarkan Nilai LC50**

Untuk pengolahan data hasil pengujian sitotoksisitas, atau untuk menentukan nilai LC50 digunakan metode analisis probit. Analisis probit merupakan suatu metode yang telah digunakan secara luas untuk menghitung sitotoksisitas dengan cara membandingkan setiap konsentrasi ataupun dosis. Menurut (Nurhayati *et al*., 2006) efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian.

Rata-rata kematian larva

Jumlah larva uji

%Mortalitas = x 100%

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

Y = ax + b

Keterangan :

Y= nilai probit/ variabel terikat

a= slope/koefisien kemiringan (pengaruh positif/negatif)

b= intersep/titik potong dengan sumbu Y

X= logaritma konsentrasi uji/variabel bebas (Sepvina *et al*., 2022).

**2.9 *Artemia Salina* Leach**

Artemia salina atau dikenal juga dengan sebutan udang air asin merupakan salah satu jenis udang primitif yang sudah dikenal cukup lama. Pada tahun 1778 Linnaeus memberinya nama Cancer salina, dan pada tahun 1819 Leach mengubahnya menjadi Artemia salina Leach. Artemia Salina adalah Hewan yang hidup tersuspensi di perairan dengan salinitas tinggi (15-300 permil). Suhunya 25O–30O C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH 7,3–8,4.



**Gambar 2.2 Artemia salina Leach**

Artemia salina merupakan salah satu komponen ekosistem laut dan keberadaannya sangat penting bagi siklus energi dalam rantai makanan. Artemia salina toleran terhadap garam dalam jumlah besar dan bahkan dapat hidup dalam larutan air laut buatan. Iodin, yang biasa ditemukan dalam garam yang digunakan manusia, berbahaya bagi udang air asin (Dumitrasu, 2011).

**2.9.1 Klasifikasi *Artemia salina* Leach**

Menurut (Dumitrasu, 2011) klasifikasi Artemia dilakukan berdasarkan lokasi berkembangnya. Artemia yang berkembang secara alami di suatu lokasi mempunyai karakteristik morfologi dan taksonomi yang berbeda, klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Sub Filum : Crustacea

Kelas : Branchiopoda

Ordo : Anostraca

Famili : Artemiidae

Genus : Artemia

Spesies : Artemia salina Leach (Linnaeus,1758)

**2.9.2 Fase Pertumbuhan dan Morfologi Artemia**

Artemia salina berkembang biak dengan cara yang khusus. Artinya, mereka berkembang biak dengan dua cara, baik ovovivipar atau ovipar, tergantung kondisi. Cara reproduksi ovovivipar dan ovipar terjadi pada semua jenis artemia dan udang air asin betina dapat mengubah cara reproduksinya dari ovovivipar menjadi ovipar atau sebaliknya.



**Gambar 2.3 Siklus Pertumbuhan Artemia (Wibowo *et al.*, 2013)**

Telur Artemia berkembang di dua ovarium di perut Artemia betina. Ketika ovarium matang, mereka menjadi bulat dan melewati dua saluran tuba menuju rahim, tempat mereka dibuahi. Pada kondisi normal, reproduksi bersifat ovovivipar, namun pada kondisi ekstrim (salinitas tinggi, oksigen rendah, suhu tinggi), reproduksi menjadi ovipar. Dalam ovovivipar, sel telur yang telah dibuahi berkembang di dalam rahim dan dilepaskan oleh induknya dalam bentuk nauplius yang berenang bebas. Jika ovovivipar, udang air asin tidak bertelur, tetapi telurnya berkembang di dalam tubuh betina dan dikeluarkan dalam bentuk nauplius. Namun pada kondisi ekstrim seperti salinitas air yang tinggi (150-200 ppt), kadar oksigen yang rendah dalam air dan suhu yang tinggi, reproduksi Artemia terjadi melalui ovarium. Selama reproduksi bertelur ini, telur di dalam induk Artemia hanya berkembang sampai tahap gastrula dan dilindungi atau terbungkus dalam cangkang keras berwarna oranye hingga coklat tua yang mengandung hematin, lipoporotein, dan kitin. Telur keras dengan cangkang berwarna coklat ini keluar dalam bentuk telur atau biasa disebut kista Artemia. Kista artemia memiliki diameter 225–350 μm dan berat kering sekitar 3,65 μg per kista. Secara morfologi, kista Artemia dilapisi oleh tiga lapisan membran: lapisan alveolar, membran kutikula dan kutikula embrionik. Kista artemia dapat disimpan hingga 2 tahun bila dikemas tanpa oksigen. Ketika kista Artemia ditempatkan di air asin atau air laut biasa pada suhu kamar, mereka akan segera menetas dalam beberapa jam dan berkembang menjadi larva yang disebut naprius, yang berukuran sekitar 0,4 mm. Dalam waktu 15 sampai 20 jam, kista Artemia menyerap air, tekanan osmotik meningkat dan membran kista Artemia pecah. Setelah sekitar 20 jam, selaput luar pecah dan embrio menetas. Embrio keluar dari cangkang dan menjadi larva yang disebut nauplius, yang berenang kesana kemari. Nauplius tersebut kemudian tumbuh menjadi udang air asin dewasa. Nauplius mengalami beberapa kali perubahan cangkang dan 15 perubahan bentuk selama pertumbuhannya, setiap perubahan mewakili tahap yang disebut instar. Artemia dewasa memiliki panjang kurang lebih 8 hingga 10 mm dan memiliki tubuh memanjang dengan mata bertangkai di setiap sisi kepala, saluran pencernaan lurus, antena yang berfungsi sebagai sensor dan 11 pasang kaki renang yang berfungsi di dada (Wibowo *et al.*, 2013).

* 1. **Penggunaan Larva *Artemia* Sebagai Hewan Uji Toksisitas**

Pengujian menggunakan larva udang Artemia salina sebagai hewan laboratorium menunjukkan sensitivitas yang sangat tinggi terhadap senyawa toksik. Larva Artemia salina sangat mirip dengan sel kanker manusia dan memiliki RNA polimerase bergantung DNA yang sama dengan mamalia. Hasil penelitian terlihat banyaknya kematian pada udang Artemia salina muda akibat pengaruh ekstrak atau senyawa tumbuhan alami tertentu pada dosis tertentu.

1. Penetasan telur udang. Penetasan telur udang dalam wadah berisi air laut. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian, bagian gelap dan bagian terang, dengan sekat yang berlubang. Septum yang berlubang memberikan kesempatan bagi larva yang menetas untuk bergerak secara alami menuju cahaya. Wadah tersebut berisi 1 liter air laut buatan. Kemudian tambahkan sesendok telur ke bagian hitamnya. Bagian wadah yang terang disinari oleh cahaya lampu. Telur direndam selama 48 jam hingga menetas (Rani *et al*., 2022)
2. Botol uji toksisitas disiapkan untuk setiap kelompok sesuai dengan tingkat konsentrasi dan setiap botol dimaksudkan untuk tiga pengulangan. Botol diisi dengan sampel yang dilarutkan dalam 10 ml air laut buatan. Sebanyak 10 larva Artemia salina ditambahkan ke dalam setiap vial yang berisi senyawa uji. Kontrol negatif mendapat perlakuan yang sama dengan larutan uji, namun tidak ditambahkan ekstrak. Jumlah larva yang mati pada setiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati (Rani *et al*., 2022).

**2.11 Bakteri**

Bakteri adalah organisme yang mempunyai dinding sel. Oleh karena itu, bakteri diklasifikasikan sebagai tumbuhan jika diperiksa berdasarkan struktur selulernya (kandungan dinding sel). Kemampuan beberapa sel bakteri untuk berpindah dari satu tempat ke tempat lain mengklasifikasikan bakteri sebagai hewan. Namun, dalam klasifikasi organisme hidup Whittaker tahun 1969 menurut sistem lima dunia , bakteri diklasifikasikan dalam dunia Monera (Boleng, 2015).

Berdasarkan struktur dinding selnya bakteri dibedakan menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Untuk mengetahui perbedaannya dapat lihat dengan pewarnaan dan diamati dibawah mikroskop. Teknik pewarnaan yang digunakan yaitu pewarnaan Gram sesuai dengan nama penemunya yaitu Hans Christian Gram (1884). Bakteri yang diwarnai dengan zat warna violet dan yodium, dicuci dengan alkohol, diwarna dengan safranin. Bila dalam pengamatan secara mikroskopis bakteri menunjukkan warna ungu maka dikelompokkan pada jenis bakteri Gram positif, bila pengamatan secara mikroskopis bakteri menunjukkan warna merah maka dikelompokkan pada jenis bakteri Gram negatif. Ada kelompok bakteri dari famili Bacillicea yang pada usia tertentu berubah dari Gram positif menjadi Gram negatif disebut Gram variabel (Rini & Jamilatur, 2020).

Ciri-ciri Bakteri Gram Positif (Rini & Jamilatur, 2020).

* 1. Struktur dinding sel tebal sekitar 15-80 nm, berlapis tunggal (monolayer)
  2. Dinding sel sebagian besar tersusun dari peptidoglikan dan sebagian lagian terdiri dari polisakarida dan asam teikoat
  3. Bersifat lebih rentan terhadap penisilin, tidak peka terhadap streptomisin
  4. Lebih resisten terhadap gangguan fisik
  5. Toksin yang dibentuk berupa eksotoksin dan endotoksin

Ciri-ciri Bakteri Gram Negatif (Rini & Jamilatur, 2020).

* 1. Komposisi dinding sel yang tipis sekitar 10-15 nm terdiri dari kandungan lipid yang tinggi dan peptidoglikan

1. Memiliki membrane plasma ganda yang diselimuti oleh membrane luar permeabel
2. Lebih tahan atau kuat terhadap antibiotik
3. Tidak memilliki asam teikoat
4. Toksin yang dibentuk endotoksin

Persamaan Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif (Rini & Jamilatur, 2020).

1. Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif memiliki organisasi seluler yang serupa merupakan mikroorganisme uniseluler prokariotik yang memiliki kapsul.
2. Memiliki kromosom tunggal.
3. Mengandung plasmid sebagai DNA ekstrachromosomalnya.
4. Bereproduksi secara aseksual dengan pembelahan biner.
5. Bereproduksi juga dengan transformasi, transduksi dan konjugasi.
6. Dapat dihambat oleh antibiotik.
7. Dinding sel mengandung peptidoglikan.
8. Dapat merespons prosedur pewarnaan gram
9. Dapat menyebabkan penyakit pada manusia, tumbuhan dan hewan.

Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari pertambahan jumlah koloni, ukuran koloni yang semakin besar, massa mikroba dalam koloni semakin banyak. Defenisi dari pertumbuhan bakeri yaitu pertambahan jumlah sel pada mikroba tersebut. Defenisi koloni yaitu kumpulan dari beberapa mikroba yang mempunyai persamaan sifat seperti bentuk dan susunan permukaan. Faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba (Rini & Jamilatur, 2020) yaitu:

* + 1. Suhu/temperatur

Suhu merupakan salah satu faktor penting di dalam mempengaruhi dan pertumbuhan mikroorganisme. Setiap bakteri memiliki temperatur optimal dimana mereka dapat tumbuh sangat cepat dan memiliki rentang temperatur dimana mereka dapat tumbuh. Suhu untuk pertumbuhan terdiri atas suhu minimum, suhu optimum, dan suhu maksimum. Suhu minimum yaitu suhu terendah tetapi mikroba masih dapat hidup. Suhu optimum yaitu suhu paling baik untuk pertumbuhan mikroba. Suhu maksimum yaitu suhu tertinggi untuk kehidupan mikroba. Berdasarkan rentang temperatur dimana dapat terjadi pertumbuhan, bakteri dikelompokkan menjadi tiga:

* 1. Psikrofilik, mikroba yang dapat hidup pada suhu dingin -5o sampai 30o C dan dapat tumbuh paling baik pada suhu optimum 10o-20o C;
  2. Mesofilik, mikroba dapat hidup maksimal pada suhu 10o-45o C, dan suhu optimum pada 20o-40o C
  3. Termofilik mikroba yang tumbuh dengan baik pada suhu 25o-80o C, tumbuh optimum pada 50o-60o C.

Suhu optimal merupakan suhu yang biasanya menggambarkan lingkungan normal mikroorganisme. Bakteri patogen/berbahaya pada manusia akan tumbuh baik pada temperatur 37o C.

2. pH

pH medium biakan mempengaruhi kecepatan pertumbuhan, untuk pertumbuhan bakteri juga terdapat rentang pH dan pH optimal. Pada bakteri patogen pH optimalnya 7,2 – 7,6. Meskipun medium pada awalnya dikondisikan dengan pH yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tetapi, secara bertahap besarnya pertumbuhan akan dibatasi oleh produk metabolit yang dihasilkan mikroorganisme tersebut.

a. Asidofil, tumbuh pada kisaran pH 2-5

b. Neutrofil, tumbuh pada kisaran pH 5,5-8

c. alkalofil, tumbuh pada kisaran pH 8,4-9,5

3. Kelembaban

Mikroorganisme mempunyai nilai kelembaban optimum. Mikroba dapat tumbuh pada media yang basah dan udara lembab. Nilai kadar air bebas didalam larutan untuk bakteri pada umumnya antara 0,90 sampai 0, 999.

4. Ketersediaan Oksigen

Berdasarkan kebutuhan oksigennya mikroba dikelompokkan menjadi:

1. Aerobik : hanya dapat tumbuh apabila ada oksigen bebas.
2. Anaerob : hanya dapat tumbuh apabila tidak ada oksigen bebas.
3. Anaerob fakultatif : dapat tumbuh baik dengan atau tanpa oksigen bebas.
4. Mikroaerofilik : dapat tumbuh apabila ada oksigen dalam jumlah kecil.

5. Tekanan Osmosis

Tekanan osmosis sangat mempengaruhi bakteri. Jika tekanan osmosis lingkungan lebih besar (hipertonis) sel akan mengalami plasmolisis (keluarnya cairan dari sel bakteri melalui membran sitoplasma). Jika tekanan osmosis lingkungan hipotonis akan menyebabkan sel membengkak serta mengakibatkan rusaknya sel. Oleh karena itu, dalam mempertahankan hidupnya sel bakteri harus berada pada tingkat tekanan osmosis yang sesuai walaupun sel bakteri memiliki daya adaptasi, perbedaan tekanan osmosis dengan lingkungannya tidak boleh terlalu besar. Berdasarkan tekanan osmosis yang dibutuhkan dapat dikelompokkan menjadi:

1. mikroba osmofil adalah mikroba yang dapat tumbuh pada kadar gula tinggi
2. mikroba halofil adalah mikroba yang dapat tumbuh pada kadar garam halogen yang tinggi
3. mikroba halodurik adalah kelompok mikroba yang dapat tahan (tidak mati) tetapi tidak dapat tumbuh pada kadar garam tinggi, kadar garamnya dapat mencapai 30 %.

6. Nutrisi

Nutrisi diperlukan oleh mikroba untuk sebagai sumber energi dan pertumbuhan selnya. Unsur-unsur dasar tersebut adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, sulfur, fosfor, zat besi dan sejumlah kecil logam lainnya. Kekurangan sumber-sumber nutrisi ini dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba hingga pada akhirnya dapat menyebabkan kematian. Berdasarkan sumber karbon dan energi yang diperlukan bakteri digolongkan menjadi :

* 1. Khemoheterotrof: bakteri yang memerlukan bahan-bahan organik seperti protein, karbohidrat dan lipid.

1. Khemoautotrof: Golongan bakteri yang sebagian sumber karbonnya berasal dari CO2.
2. Fototrof: Golongan bakteri yang memerlukan sumber karbon yang seluruhnya dari CO2.

Berdasarkan Sumber Nitrogen, Sulfur dan Fosfor. Untuk menyusun bagian-bagian sel, misalnya untuk mensintesis protein diperlukan nitrogen dan sulfur sedangkan untuk mensintesis DNA dan RNA diperlukan nitrogen dan fosfor.

7. Ion-Ion lain

Untuk pertumbuhannya bakteri membutuhkan unsur-unsur kimia seperti C, H, N, S, dan P. selain itu juga membutuhkan unsur mikro seperti, Zn, Fe, dan Cu. Sedangkan logam berat seperti Hg, Ag, Cu, Au, dan Pb pada kadar rendah dapat bersifat meracun (toksin). Logam berat memiliki daya oligodinamik yaitu daya bunuh logam berat pada kadar rendah. Selain logam berat ada juga ion-ion lain yang dapat mempengaruhi kegiatan fisiologi mikroba antara lain ion sulfat, tartrat, klorida, nitrat, dan benzoat. Ion-ion ini dapat mengurangi pertumbuhan mikroba tertentu. Oleh sebab itu ion-ion ini dapat digunakan untuk mengawetkan suatu bahan. Ada senyawa lain yang dapat mempengaruhi fisiologi mikroba, misalnya asam benzoat, asam asetat, dan asam sorbat.

8. Radiasi

Radiasi yang berbahaya bagi mikroorganisme yaitu radiasi pengionisasi yang memiliki arti radiasi dari gelombang panjang yang sangat pendek dan berenergi sehingga atom kehilangan elektron (ionisasi). Ditingkat rendah radiasi pengionisasi dapat menyebabkan mutasi dan lama-kelamaan dapat menyebabkan kematian.

**2.11.1 *Staphylococcus aureus***

Menurut (Tammi, 2015) klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

Kingdom : Eubacteriae

Ordo : Eubacteriales

Famili : Micrococcaceae

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus*



**Gambar 2.4** Bakteri *Staphylococcus aureus*

**2.11.1.1 Sifat dan Morfologi *Staphylococcus aureus***

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri berbentuk bulat dengan diameter 1 μm yang biasanya hidup dalam kelompok mirip anggur. Dalam media cair, mereka dapat membentuk pasangan tunggal, rangkap empat, atau rantai. *Staphylococcus aureus* terdapat dalam jumlah besar di udara, debu, pakaian, dan popok bayi. Saat ditemukan di popok bayi baru lahir. Salah satu *Staphylococcus* terpenting yang umumnya hidup pada manusia adalah *Staphylococcus aureus.* Bakteri ini dapat memfermentasi laktosa, bersifat proteolitik, menghasilkan koagulase, menghasilkan pigmen dan lipase, membentuk zona hemolitik aerobik pada pelat agar darah dan tumbuh pada media yang mengandung natrium klorida 0,9%. *Staphylococcus aureus* biasanya berada di selaput kulit dan menyebabkan penyakit tertentu. Bakteri ini dapat menyebabkan bisul dan luka bernanah. Sumber infeksinya adalah kulit dan saluran cerna (Mustapa, 2014).

**2.11.1.2 Patogenesis *Staphylococcus aureus***

Bakteri *Staphylococcus aureus* disebut sebagai bakteri “berwajah janus” organisme komensal dan patogen yang melemahkan. Di Amerika Serikat 20% populasi orang dewasa membawa *Staphylococcus aureus* di lubang hidung secara terus-menerus. *Staphylococcus aureus* dapat menurunkan pertahanan tubuh dan mendapatkan akses ke jaringan tubuh yang paling dalam, menyebabkan infeksi superfisial dan invasif. Pada individu yang sehat di masyarakat, *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi ringan pada kulit dan jaringan lunak seperti impetigo, folikulitis dan abses kulit. Infeksi nosokominal, *Staphylococcus aureus* memicu infeksi pada alat-alat pembedahan atau perangkat medis yang ditanamkan termasuk katup jantung buatan, kateter, sendi prostetik dan implant ortopedi. Selama *Staphylococcus aureus* dalam darah, hal tersebut dapat menyemai organ-organ vital, mengakibatkan infeksi dan saluran kemih menurun. Kemampuan patogen ini untuk bertahan dalam berbagai macam relung inang mulai dari kulit ke perangkat abiotik dan jaringan yang terletak dalam pemberantasan, sehingga menyebabkan infeksi berulang (Balasubramanian *et al*., 2017). Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan dan sindroma syok toksik (Warsa, 1994).

**2.11.2 *Escherichia coli***

Menurut Songer dan Post (2005) dalam (Widyaningsih *et al*., 2016) klasifikasi *Escherichia coli* sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : Escherichia

Spesies : *Escherichia coli*



**Gambar 2.5 Bakteri *Escherichia coli* (Mahariesti, 2009)*.***

**2.11.2.1 Sifat dan Morfologi *Escherichia coli***

Bakteri *Escheria coli* umumnya hidup di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Secara fisiologi *Escherichia coli* memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang sulit. *Escherichia coli* tumbuh dengan baik di air tawar, air laut atau di tanah. *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dengan ukuran berkisar antara 1-1,5 μm x 2-6 μm, tidak motilitas atau motilitas dengan flagella serta dapat tumbuh dengan oksigen atau tanpa oksigen, bersifat fakultatif anareobik dan dapat tahan pada media yang minim nutrisi. Dapat bertahan dalam kondisi lingkungan asam (pH rendah) seperti pada saluran pencernaan manusia, perubahan suhu dan tekanan osmotik. *Escherichia coli* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37OC dengan minimal pH 4,5 (Rahayu *et al*., 2018).

**2.11.2.2 Patogenesis *Escherichia coli***

Bakteri *Escherichia coli* umumnya tidak berbahaya dan hidup dalam pencernaan manusia. Patogenesis merupakan kemampuan suatu organisme untuk menimbulkan penyakit. *Escherichia coli* dapat menimbulkan suatu gejala penyakit bila mampu masuk ke tubuh inangnya dan mampu beradaptasi serta bertahan di dalam tubuh manusia, kemudian menyerang sistem imun dan akhirnya menimbulkan penyakit, seperti infeksi pada salauran pencernaan yang mengakibatkan diare, infeksi saluran kemih dan meningitis neonatal. Patogenitas *Escherichia coli* ditentukan berdasarkan faktor atau gen virulensi spesifik yang dimiliki bakteri tersebut (Rahayu *et al*., 2018).

**2.12 Antibakteri**

**2.12.1 Definisi Antibakteri**

Antibakteri adalah zat yang membunuh bakteri atau menghambat pertumbuhan dan reproduksinya. Agen antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja bahan aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah bahan aktif yang merusak dinding sel, mengubah permeabilitas sel, mengubah molekul protein dan asam nukleat, serta menghambat fungsi enzim, sehingga dapat menghambat sintesis bakteri, protein asam nukleat bakteri (Septiani *et al*., 2017).

Kloramfenikol adalah antibiotik dengan spektrum luas yang dapat melawan bakteri gram positif dan gram negatif. Pemerian hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, warna putih sampai putih kelabu atau putih kekuningan, tidak berbau dan rasanya sangat pahit. Kelarutan larut dalam lebih kurang 400 bagian air, dalam 2,5 bagian etanol, dan larut dalam 7 bagian popilenglikol, sukar larut dalam kloroform dan eter (Depkes, 1979).

**2.12.2 Mekanisme Kerja Antibakteri**

Mekanisme kerja antibakteri (Rollando, 2019) sebagai berikut:

1. Penghancuran dinding sel. Bakteri memiliki lapisan luar yang keras yang disebut dinding sel yang memungkinkan mereka mempertahankan bentuknya dan melindungi membran plasma di bawahnya.
2. Perubahan permeabilitas sel. Membran sitoplasma menampung zat-zat tertentu di dalam sel dan mengatur masuk dan keluarnya zat-zat lain. Membran menjaga integritas komponen seluler. Kerusakan pada membran ini menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel atau kematian sel. Polimiksin bekerja dengan merusak struktur internal dinding sel. Selanjutnya, antibiotik berikatan dengan membran sel, menyebabkan disorientasi komponen lipoprotein dan mencegah membran berfungsi sebagai penghalang osmotik.
3. Perubahan molekul protein dan asam nukleat. Umur sel bergantung pada pemeliharaan molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alaminya. Antibiotik dapat mengubah situasi ini dengan mendenaturasi protein dan asam nukleat, sehingga menyebabkan kerusakan sel yang tidak dapat diperbaiki. Fenol dan senyawa fenolik termasuk di antara 15 agen antimikroba yang bertindak dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel.
4. Penghambatan kerja enzim. Enzim apapun di dalam sel merupakan target potensial untuk kerja inhibitor. Penghambatan ini dapat menyebabkan gangguan metabolisme dan kematian sel. Sulfonamida adalah contoh antibiotik yang bekerja dengan menghambat kerja enzim.
5. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein: DNA, RNA, dan protein memainkan peran yang sangat penting dalam proses kehidupan normal sel. Artinya terganggunya pembentukan atau fungsi zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Tetrasiklin merupakan antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein.

**2.12.3 Metode Uji Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode *Disc-Diffusion,* Dilusi, Spektrofotometri UV-Vis (Tarigan & Muadifah, 2020).

a. Metode *Disc-Diffusion*

Metode ini banyak digunakan dibandingkan metode lainnya. Piringan yang berisi zat antibakteri diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah disemai mikroorganisme dan zat antibakteri tersebut disebarkan ke dalam media agar. Cara difusi yang diamati adalah diameter area dimana difusi obat ke dalam area difusi menghambat pertumbuhan bakteri pada titik awal pemberian. Pada metode ini, bakteri ditanam pada media agar padat tertentu, kemudian ditempatkan kertas samir atau cakram yang berisi sampel uji dan diamati hasilnya. Area bening menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri dihambat oleh zat antimikroba pada permukaan agar. Metode ini digunakan untuk memperkirakan nilai hambatan minimum (MIC). Konsentrasi minimum agen antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Kertas cakram (berdiameter sekitar 6 mm), yang mengandung senyawa uji pada konsentrasi yang dinginkan, ditempatkan pada permukaan agar. Cawan Petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Secara umum, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat perkecambahan dan pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diameter zona pertumbuhan penghambatan diukur.



**Gambar 2.6 Metode *Disc-Diffusion* (Tarigan & Muadifah, 2020)**

b. Metode Dilusi

Cara lain yang bisa digunakan adalah metode dilusi. Untuk menilai aktivitas antimikroba secara kuantitatif, pengenceran antimikroba ditambahkan ke dalam kaldu atau cawan agar, yang kemudian diinokulasi dengan organisme uji. Konsentrasi terendah yang mencegah pertumbuhan setelah inkubasi semalaman disebut konsentrasi penghambatan minimum obat (MIC). Metode pengenceran menggunakan prinsip pengenceran antimikroba untuk memperoleh beberapa konsentrasi bahan aktif dan menambahkannya ke suspensi bakteri dalam media kultur. Metode ini yang diamati adalah ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, jika diamati ada tingkat kesuburan dari pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni. Tujuan untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yang diuji. Metode ini digunakan untuk mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penanaman mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi umumnya selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM Metode yang merupakan suatu pengamatan ada tidaknya pertumbuhan bakteri dengan mengamati fekunditas pertumbuhan bakteri dengan menghitung jumlah koloni. Beberapa metode dilusi:



**Gambar 2.7 Metode Dilusi (Tarigan & Muadifah, 2020)**

1. Metode dilusi cair (*Broth Dilusion Test*)

Prosedur kerjanya melibatkan serangkaian pengenceran zat antimikroba dalam media cair yang ditambahkan bakteri uji. Larutan uji yang mengandung zat antibakteri konsentrasi terendah yang tampak transparan tanpa tumbuhnya bakteri uji disebut MIC. Larutan yang disebut MIC ini kemudian diinkubasi kembali dalam medium cair tanpa penambahan bakteri uji atau zat antimikroba dan diinkubasi selama 18 hingga 24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah inkubasi disebut uji pengenceran padat KBM.

1. Metode dilusi padat (*Solid Dilusion Test*)

Cara ini sama dengan cara pengenceran kaldu, namun menggunakan media padat. Metode pengenceran tetap setiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar dan bakteri diinokulasi dan dibiakkan. Keuntungan metode ini adalah beberapa bakteri uji dapat diuji pada satu konsentrasi zat antimikroba yang diuji.

1. Metode Spektrofotometri UV-Vis

Metode spektrofotometri UV-visibel dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada media cair. Pengukuran ditampilkan secara grafis untuk menunjukkan hubungan antara biomassa pada sumbu x. Kurva pertumbuhan pada sejumlah media terbatas melewati tahapan sebagai berikut: fase lag (penyesuaian), fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Selain fase pertumbuhan, waktu produksi, yaitu waktu yang diperlukan agar jumlah sel menjadi dua kali lipat dibandingkan jumlah yang diinokulasi pada awalnya, juga dapat dihitung. Perpotongan dua sumbu horizontal menunjukkan interval waktu yang diperlukan populasi sel untuk melipatgandakan populasinya, yang disebut “waktu generasi”. Membuat kurva pertumbuhan sangatlah penting, terutama untuk menentukan kapan suatu tanaman sebaiknya dipanen. Hal ini tergantung pada tujuan pemanenan. Pemanenan dilakukan pada fase log untuk mendapatkan inokulum aktif.

**Tabel 2.2 Klasifikasi Hambatan Pertumbuhan Bakteri (Tarigan & Muadifah, 2020)**

