

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.)

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.)

Taksonomi tumbuhan nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) menurut Zahrina (2020) sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Class	: <i>Liliopsida</i>
Ordo	: <i>Arecales</i>
Famili	: <i>Areaceae</i>
Genus	: <i>Nypa</i>
Spesies	: <i>Nypa fruticans</i> Wurmb.

Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) termasuk dalam famili *Areaceae* yang tumbuh di kawasan hutan bakau atau di daerah pasang surut dekat pantai. Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) mempunyai akar serabut yang menjalar dengan panjang mencapai 13 meter, memiliki batang menyerupai rimpang yang tertutup oleh lumpur dan kulit tangkai yang mengkilap serta keras, dengan bagian dalamnya berupa empulur atau gabus dan bunga berwarna kuning oranye. Bagian buah dan daun umumnya dimanfaatkan oleh masyarakat, baik untuk dikonsumsi langsung, sebagai obat alami, maupun sebagai bahan baku kerajinan (Imra *et al.*, 2016).

Lebar anak daun nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) sekitar 4-7 cm dengan panjang mencapai 1 meter. Daun yang tua berwarna kuning, sedangkan daun yang

muda berwarna hijau. Setiap pelepah daun umumnya memiliki 25 hingga 100 helai anak daun. Bunga majemuk muncul dari ketiak daun, dengan bunga betina yang berkumpul di bagian atas membentuk bulat, sementara bunga jantan terdiri dari filamen merah, oranye atau kuning yang muncul di pangkal cabang. Tangkai bunga dapat mencapai 100–170 cm dan sering disadap untuk diambil niranya. Buah nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) berbentuk seperti telur pipih, berwarna coklat kemerahan, dengan panjang sekitar 13 cm dan lebar 11 cm. Tandan buah membentuk bulat dengan diameter sekitar 30 cm dan dalam satu ikat bisa terdapat 30–50 buah (Amalia *et al.*, 2023).

Tabel 2.1. Morfologi Tumbuhan Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.)

Morfologi Nipah (<i>Nypa fruticans</i> Wurmb.)	Keterangan
	<p>Pohon Nipah (<i>Nypa fruticans</i> Wurmb.) (Prasetyo <i>et al.</i>, 2024)</p>
	<p>Buah Nipah (<i>Nypa fruticans</i> Wurmb.) (Prasetyo <i>et al.</i>, 2024)</p>

	<p>Bunga Nipah (<i>Nypa fruticans</i> Wurmmb.) (Valdes <i>et al.</i>, 2021)</p>
	<p>Akar Tumbuhan Nipah (<i>Nypa fruticans</i> Wurmmb.) (Numbere, 2018)</p>

2.1.2 Kandungan Kimia Tumbuhan Nipah (*Nypa fruticans* Wurmmb.)

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun tumbuhan nipah (*Nypa fruticans* Wurmmb.) terdiri dari alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan tanin. Senyawa yang terkandung dalam daun bervariasi tergantung pada usia daunnya. Pada daun muda, senyawa yang terkandung berupa alkaloid, triterpenoid, flavonoid, dan tanin. Sedangkan pada daun sedang dan tua mengandung alkaloid, steroid, flavonoid, dan tanin (Wijayanti *et al.*, 2022). Ekstrak daun nipah (*Nypa fruticans* Wurmmb.) juga memiliki senyawa metabolit sekunder lainnya seperti *3-O-Caffeoyl shikimic acid*, *Isoorientin*, dan *Isovitexin* (Thongphicai *et al.*, 2023).

Penelitian Suryanizak *et al.*, (2023) menunjukkan bahwa, buah nipah (*Nypa fruticans* Wurmmb.) mengandung metabolit sekunder berupa tanin, triterpenoid, dan alkaloid. Pada buah muda, kandungan tanin dan triterpenoid lebih dominan

dibandingkan alkaloid. Pada buah berusia sedang, senyawa tanin dan alkaloid lebih kuat dibandingkan triterpenoid. Sementara itu, pada buah tua, ketiga senyawa tersebut (tanin, triterpenoid, dan alkaloid) tergolong lemah. Akar nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) mengandung berbagai metabolit sekunder yang meliputi alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan tanin.

2.1.3 Bioaktivitas Tumbuhan Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.)

Tabel 2.2. Aktivitas Farmakologis Tumbuhan Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.)

Asal	Aktivitas	Kekuatan	Referensi
Ekstrak daun	Antibakteri <i>Bacillus Cereus</i>	Zona hambat: 11,250 mm±0,007	Lestari, Y <i>et al.</i> , 2016
	Antibakteri <i>Escherichia coli</i>	Zona hambat: 9,012 mm± 0,051	
Ekstrak daun (3- <i>O</i> -Caffeoyl shikimic acid)	Antibakteri <i>S. aureus</i>	MIC 1000 µg/mL	Thongphicai <i>et al.</i> , 2023
	Antibakteri <i>E. coli</i>	MIC 1000 µg/mL	
Ekstrak daun (<i>Isoorientin</i>)	Antibakteri <i>S. aureus</i>	MIC 1000 µg/mL	Thongphicai <i>et al.</i> , 2023
	Antibakteri <i>E. coli</i>	MIC 1000 µg/mL	
Ekstrak daun (<i>Isovitexin</i>)	Antibakteri <i>S. aureus</i>	MIC >1000 µg/mL	Thongphicai <i>et al.</i> , 2023
	Antibakteri <i>E. coli</i>	MIC 800 µg/mL	
Bakteri endofit buah (YN18)	Antibakteri MDR <i>Escherichia coli</i>	Zona hambat: 15,25 mm	Zahrina, 2020
Ekstrak metanol daun	Antioksidan	IC ₅₀ 7,045 µg/mL (sangat kuat)	Rusli, 2020
Ekstrak kasar daun	Toksistas dengan metode BSLT	LC ₅₀ : 20,89 µg/mL (sangat toksik)	Fatimah <i>et al.</i> , 2022
Ekstrak etanol daun	Uji toksistas dengan metode BSLT	LC ₅₀ : 88,77 µg/mL	Noviana & Johannes, 2022
Ekstrak kasar daun	Antibakteri <i>Auromonas hydrophila</i>	Zona hambat: 15,90 mm	Sari, 2017
	Antibakteri <i>Streptococcus agalactiae</i>	Zona hambat: 16,85 mm	
Ekstrak kasar daun (metanol)	Antioksidan	IC ₅₀ : 22,50 µg/mL (sangat kuat)	Imra <i>et al.</i> , 2016

Asal	Aktivitas	Kekuatan	Referensi
Ekstrak kasar metanol daun	Antibakteri <i>Vibrio sp.</i>	Zona hambat: 8,75 mm	Imra <i>et al.</i> , 2016
Ekstrak kasar methanol buah	Antibakteri <i>Vibrio sp.</i>	Zona hambat: 5,5 mm	
Ekstrak jamur endofit	Antibakteri <i>E. coli</i>	Zona hambat: 20,50 mm	Ariffin <i>et al.</i> , 2011
Ekstrak etanol akar	Antibakteri <i>S. aureus</i>	Zona hambat: 5,35 mm	Agustina & Marpaung, 2023

2.2 Jamur Endofit

2.2.1 Definisi Jamur Endofit

Jamur endofit adalah mikroorganisme yang hidup pada sel-sel jaringan inangnya yang tidak menunjukkan gejala penyakit dan telah ditemukan di berbagai spesies tanaman berkayu dan rumput. Jamur endofit ditemukan hampir pada semua jenis tanaman, seperti pohon, rumput, alga, dan tanaman herba. Hubungan inang dan mikroba endofit terjadi secara mutualisme, dimana inang melindungi dan memberi nutrisi untuk mikroba sehingga mikroba dapat menghasilkan zat bioaktif seperti pengatur pertumbuhan tanaman, antibakteri, antijamur, antivirus, insektisida dan lainnya, untuk meningkatkan pertumbuhan serta daya saing inang di alam (Nisa *et al.*, 2015).

Jamur endofit menjadi pelindung bagi tanaman terhadap berbagai macam patogen seperti bakteri, jamur, dan serangga, yang mana sifat antimikroba ini biasa ditemukan pada beberapa genera jamur seperti, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, dan *Pestalotiopsis* (Triastuti, 2020).

Tabel 2.3. Jamur Endofit dengan Aktivitas Antibakteri

Senyawa	Jamur Endofit (Tumbuhan)	Mikroba	Kekuatan	Referensi
7-desmethyl fusarin C-derivates	<i>Fusarium solani</i> JK10 (<i>Chlorophora regia</i>)	<i>E. coli</i>	MIC: 10,0 µg/mL	Kyekyeku <i>et al.</i> , 2017
		<i>S. aureus</i>	MIC: >10,0 µg/mL	
Harzianic acid	<i>Trichoderma harzianum</i> (<i>Zingiber officinale</i>)	<i>S. aureus</i>	MIC: 30,11 µg/mL	Harwoko <i>et al.</i> , 2021
Isoharzianic acid	<i>Trichoderma harzianum</i> (<i>Zingiber officinale</i>)	<i>S. aureus</i>	MIC: 15,05 µg/mL	
Neopestalotio psis sp.	<i>Neopestalotio psis</i> sp. (<i>Rhizophora mucronate</i>)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC: 250 µg/mL	Fareza <i>et al.</i> , 2018
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC: 250 µg/mL	
<i>Peniophora lycii</i>	<i>Peniophora lycii</i> (<i>Rhizophora mucronate</i>)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC: 250 µg/mL	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC: 250 µg/mL	
	<i>Culvularia lunata</i> (<i>Acanthus ilicifolius</i>)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC: 500 µg/mL	Ayu & Widjajanti, 2019
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC: 500 µg/mL	
	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (<i>Acanthus ilicifolius</i>)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC: 1.000 µg/mL)	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC: 250 µg/mL	
	<i>Torulla</i> sp. (<i>Kaempferia galanga</i> L.)	<i>S. aureus</i>	Zona hambat: 12,75±3,71 mm	Efendi <i>et al.</i> , 2020
		<i>E. coli</i>	Zona hambat: 15,50±0,70 mm	
	<i>Fusarium</i> sp. (<i>Kaempferia galanga</i> L.)	<i>S. aureus</i>	Zona hambat: 8 mm	Efendi <i>et al.</i> , 2020
		<i>E. coli</i>	Zona hambat: 7 mm	
	<i>Drechera</i> sp. (<i>Kaempferia galanga</i> L.)	<i>S. aureus</i>	Zona hambat: 11,50±1,41 mm	
		<i>E. coli</i>	Zona hambat: 12,17±1,04 mm	

2.2.2 Cara Identifikasi Karakteristik Jamur Endofit

Identifikasi karakteristik jamur endofit dapat dilakukan secara makroskopis, mikroskopis ataupun secara konvensional. Pengamatan dilakukan dengan mengelompokkan ciri dan karakter morfologi dari koloni jamur yang ditumbuhkan di atas media pertumbuhan pada suhu kamar. Secara makroskopis karakter yang diamati meliputi; warna dan permukaan koloni (bergranul, seperti tepung, menggunung, licin), tekstur, zona tumbuh, garis-garis lingkaran dan konsentris, warna balik koloni (*reverse color*), dan tetes eksudat (*exudate drops*). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan bantuan mikroskop Nikon *eclips* 80i yang meliputi ada tidaknya septum pada hifa, pigmentasi hifa, *clamp connection*, bentuk dan ornamentasi spora (vegetatif dan generatif), bentuk dan ornamentasi tangkai spora (Barnett, 1955; Barnett dan Hunter, 1998).

Identifikasi secara konvensional menjelaskan mengenai karakteristik morfologi dan biokimiawi dari jamur tersebut. Tahap awal identifikasi molekuler yaitu dengan melakukan isolasi DNA. Isolasi DNA merupakan proses memisahkan dan mendapatkan DNA dari suatu sel. Prinsip isolasi DNA yaitu memperoleh DNA dengan cara merusak komponen sel tanpa merusak DNA. Proses pemisahan DNA sangat mempengaruhi hasil pengujian selanjutnya. Dalam proses pemisahan DNA, kualitas DNA yang dihasilkan akan sangat tergantung dari kondisi sel yang digunakan (Maryam, *et al.*, 2022).

2.3 Resistensi Bakteri

Kemampuan bertahan hidup suatu patogen terhadap paparan dan pemberian antibiotik yang dapat membunuh atau membatasi perkembangbiakannya disebut dengan resistensi antibiotik. Ada beberapa faktor yang menjadi latar belakang munculnya resistensi terhadap antibiotik atau agen antibakteri, antara lain, derajat ekspresi resistensi strain bakteri dan kemampuannya untuk bertahan melalui mekanisme resistensi. Strain bakteri memiliki ketahanan bawaan atau bereaksi kuat terhadap ekspresi transgen dari satu bakteri ke bakteri lain melalui plasmid, elemen genetik, dan fag, atau melalui perubahan gen sel (ketidakstabilan kromatin) yang mengakibatkan resistensi silang. Mikroorganisme yang resisten dapat berkembang biak dengan cepat jika terdapat faktor resistensi pada plasmid (Muteeb *et al.*, 2023).

Resistensi terhadap antibiotik muncul melalui beberapa mekanisme yang berbeda, seperti target obat yang berubah, inaktivasi obat enzimatis, peningkatan eflux senyawa antibakteri, aksesibilitas obat yang berubah, dan penyebaran resistensi dibantu oleh banyak elemen genetik yang dapat berpindah-pindah. Meskipun resistensi telah diamati untuk semua senyawa, pada dasarnya strain yang resisten terhadap semua obat belum ditemukan. Namun resistensi masih menimbulkan tantangan dalam pengobatan, seperti yang terjadi pada penggunaan methicillin dan vancomisin (Vestergaard *et al.* 2019).

2.4 Bakteri

Bakteri adalah prokariota atau tidak mempunyai selubung inti, tetapi dapat membawa informasi genetik dalam bentuk DNA melingkar panjang yang disebut nukleoid. Pengujian pewarnaan Gram merupakan kriteria klasifikasi yang efektif.

Hasil pewarnaan menunjukkan perbedaan mendasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga bakteri dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif (Holderman dkk, 2017).

Pada pewarnaan Gram, bakteri Gram positif tampak berwarna ungu karena memiliki lapisan peptidoglikan dengan ketebalan 20 hingga 80 nm, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan tipis, sekitar 5 hingga 10 nm, dan komponen utamanya adalah bakteri lipolitik, membran luar, dan polisakarida (Holderman dkk, 2017).

2.4.1 *Escherichia coli*



Gambar 2.1 Koloni Bakteri *E. coli* dengan Pewarnaan Gram (Trisno dkk 2019)

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Jawetz dkk (2007):

Kingdom	: <i>Procaryotae</i>
Divisi	: <i>Gracilicutes</i>
Kelas	: <i>Scotobacteria</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Famili	: <i>Euterobactericea</i>

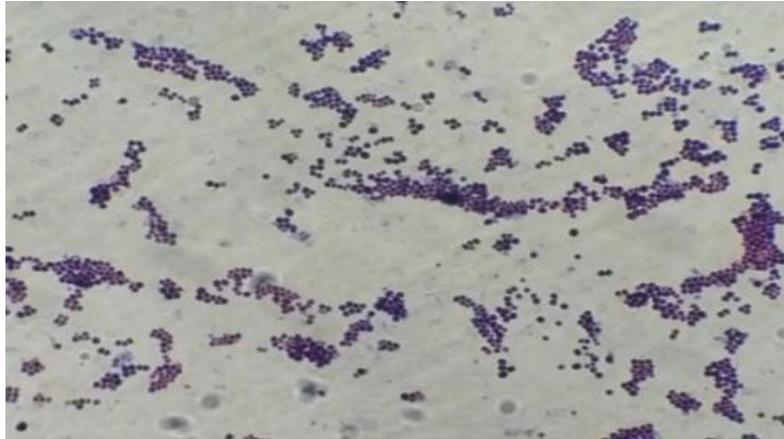
Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, berukuran 1,0-1,5 μm x 2,0-6,0 μm , berflagel, tidak bergerak atau motil, mampu tumbuh dengan ada atau tidak adanya oksigen, anaerobik fakultatif, dan tahan terhadap media yang kekurangan nutrisi. Sifat biokimia lain dari *E. coli* termasuk kemampuan menghasilkan indole, berkurangnya kemampuan memfermentasi asam sitrat dan uji urease negatif.

E. coli sering hidup di saluran pencernaan manusia dan hewan. Secara fisiologis, *E. coli* memiliki kemampuan bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang sulit seperti tumbuh baik di air tawar, air laut, dan tanah. Dalam kondisi ini, *E. coli* terpapar pada lingkungan abiotik dan biotik. Penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* didukung oleh kemampuannya beradaptasi dan bertahan hidup di lingkungan yang berbeda. Kondisi lingkungan yang kurang mendukung kelangsungan hidup *E. coli* antara lain lingkungan asam (pH rendah), seperti saluran pencernaan manusia, fluktuasi suhu, dan tekanan osmotik. *E. coli* juga terbukti toleran terhadap kondisi kering karena kemampuannya menahan pendinginan dan pembekuan (Rahayu dkk., 2018).

2.4.2 *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.2 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* (Hayati *et al.*, 2019)

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Soedarto (2015) ialah sebagai berikut:

Domain : *Bacteria*
Kingdom : *Eubacteria*
Filum : *Firmicutes*
Kelas : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri patogen Gram positif berbentuk *coccus* dengan diameter 0,7-1,2 μm , terdiri dari kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, tidak membentuk spora, dapat tumbuh pada berbagai media dan suasana aerob serta dapat memproduksi enzim katalase. Bakteri

ini tumbuh pada suhu optimal 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Bakteri ini dapat memfermentasikan beberapa karbohidrat dan dapat menghasilkan pigmen yang berwarna dan tidak larut dalam air (Staf Pengajar FKUI, 1994).

2.5 Antibiotik dan Antibakteri

Antibiotik (L. anti = lawan, bios = hidup) merupakan senyawa kimia yang dihasilkan dari jamur dan bakteri serta mampu memperlambat perkembangan atau membunuh mikroorganisme lainnya, namun memiliki toksisitas yang rendah bagi manusia. Antibiotik yang membunuh bakteri disebut bakterisidal, sedangkan antibiotik yang memperlambat perkembangan bakteri disebut bakteristatik (Atmodjo dkk, 2014). Mekanisme kerja agen antibakteri diantaranya ialah menghambat pembentukan dinding sel bakteri, menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri, menghambat sintesis asam nukleat bakteri, menghambat sintesis protein bakteri, dan menghambat jalur utama metabolisme.

Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang dapat membunuh atau memperlambat pertumbuhan bakteri sehingga dapat digunakan untuk mencegah atau mengatasi infeksi bakteri. Senyawa ini dihasilkan dari metabolit sekunder mikroorganisme tertentu, dapat diisolasi dari tumbuhan atau hewan ataupun dihasilkan dari sintesis kimia (Pelczar, 1988).

Dalam menghambat pertumbuhan bakteri ataupun membunuhnya, terdapat Konsentrasi Hambatan Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu dapat meningkatkan aktivitasnya dari bakteristatik menjadi

bakterisida apabila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi Konsentrasi Hambatan Minimal (KHM) (Pelczar, 1988).

Tabel 2.4. Kategori Aktivitas Antibakteri

Diameter Hambat (mm)	Aktivitas
< 5	Lemah
5-10	Sedang
10-20	Kuat
≥ 20	Sangat Kuat

(Davis dan Stout, 1971)

2.6 Ekstraksi

2.6.1 Pengertian Ekstraksi/Isolasi

Menurut Djamal, 2011, isolasi merupakan proses pengambilan atau pemisahan suatu zat dari bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai. Sedangkan ekstraksi ialah suatu cara untuk memisahkan beberapa campuran zat kimia menjadi komponen-komponen yang terpisah. Ekstraksi tanaman adalah pemisahan secara kimia atau fisika suatu bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan, yaitu tanaman bahan alam. Teknik ini biasanya menggunakan pelarut untuk mengekstraksi bahan tanaman dikatakan ekstraksi padat/cair. Pada ekstraksi padat-cair ini, ada 2 proses secara paralel pelepasan (*release*) bahan yang di ekstraksi melalui proses difusi. Proses ini akan meningkat apabila sel tanaman ditambahkan dengan air atau pelarut yang mengandung air, yang akan menyebabkan pengembangan/pemekaran (*swelling*) sel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas atau pecahnya dinding sel.

Ekstraksi dengan pelarut berkaitan dengan dua tipe ekstraksi, yaitu ekstraksi padatan-cairan (*solid-liquid extraction*) dan ekstraksi cairan-cairan (*liquid-liquid*

extraction). Ekstraksi padatan-cairan merupakan penyarian atau pemisahan senyawa metabolit suatu bagian bahan padat dari bagian tertentu atau keseluruhan bagian bahan tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Sedangkan ekstraksi cairan-cairan adalah penyarian atau pemisahan senyawa metabolit yang telah terlarut pada suatu pelarut dengan cara menambahkannya dengan pelarut lain yang bersifat *immiscible* (tidak dapat bercampur baik) dengan pelarut awal tetapi memiliki tingkat polaritas sesuai dengan senyawa yang akan dipisahkan, sehingga senyawa-senyawa target dapat larut atau terkumpul dengan pelarut baru tersebut (Nugroho, 2017).

2.6.2 Macam-macam Ekstraksi

Menurut (Nugroho, 2017), ekstraksi dibagi dalam beberapa jenis yaitu:

(a) Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana dan kuno. Walaupun begitu, metode ini masih dimanfaatkan secara luas dengan keunggulan seperti biaya yang murah, alat-alat yang sederhana, serta tanpa penggunaan panas sehingga menjadi pilihan terbaik untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (*termolabile*). Sedangkan kelemahan dari metode ini diantaranya adalah satu kali ekstraksi memerlukan waktu 1 hari hingga 7 hari, tergantung pada jenis bahan yang diekstrak, semakin kuat jaringan dan dinding sel pada bahan maka membutuhkan waktu yang lebih panjang. Selain itu, juga membutuhkan *solvent* dalam volume tidak sedikit, serta memungkinkan hilangnya senyawa metabolit karena menempel pada bahan, kertas saring, menempel pada bejana, dll.



Gambar 2.3 Maserasi dengan Skala Kecil (Nugroho, 2017)

Prosedur maserasi adalah merendam sampel yang telah disiapkan (kering dan halus) dengan pelarut yang sesuai pada suatu bejana dan diletakkan pada suhu ruang dan ditunggu untuk beberapa waktu. Pengadukan secara berkala dilakukan untuk mempercepat proses penyarian. Untuk meningkatkan rendemen, maka proses di atas dapat diulangi dua atau tiga kali dengan menggunakan sisa/ampas bahan hasil ekstraksi tahap pertama.

(b) Perkolasi

Perkolasi juga termasuk dalam ekstraksi tanpa panas dengan alat khusus yang disebut perkolator. Proses perkolasi dilakukan dengan melarutkan senyawa metabolit menggunakan pelarut yang dialirkan pada matriks bahan atau sampel yang telah disusun pada perkolator sehingga senyawa metabolit terlarut dan mengalir keluar menuju bejana penampung.



Gambar 2.4 Alat perkolator (Nugroho, 2017)

Metode ini memiliki keuntungan tidak membutuhkan proses penyaringan, karena ekstrak sudah tersaring pada perkolator. Namun adapun kelemahannya yaitu hanya efektif untuk bahan-bahan dengan tingkat kelarutan yang tinggi terhadap pelarut, volume pelarut yang digunakan harus lebih banyak, karena dilakukan secara berkala dan tanpa adanya waktu kontak yang lama. Selain itu, karena sampel bahan disusun pada bejana perkolator, ada kemungkinan penyusunan tidak rata.

(c) Reflux



Gambar 2.5 Proses Reflux (Nugroho, 2017)

Ekstraksi dengan cara ini menjadi metode ekstraksi yang paling banyak diterapkan karena dinilai lebih murah dan simpel dengan rendemen yang cukup tinggi, jika dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi. Reflux berarti pelarut yang diputar kembali atau di-*recycle* secara berkala melalui kondensasi berulang pada sebuah alat kondensor. Prosesnya adalah bahan yang akan diekstrak direndam dengan pelarut pada sebuah bejana/labu biasanya berbentuk bulat dan ditempatkan pada sebuah pemanas (dapat menggunakan *water bath*, *heating mantle*, atau *hot plate*). Bagian atas labu dengan sebuah lubang yang mengeluarkan bahan, pelarut, maupun hasil ekstrak.

(d) Soxhlet



Gambar 2.6 Soxhletasi (Nugroho, 2017)

Ekstraksi dengan soxhlet juga termasuk salah satu metode yang paling banyak digunakan karena tingkat kepraktisan dan kenyamanannya. Prinsipnya adalah dengan mengekstrak bahan yang sudah dihaluskan dan dibungkus dengan selembar kertas saring lalu dimasukkan ke dalam alat soxhlet. Ketika soxhlet dipanaskan, pelarut akan menguap dan terkondensasi kembali karena adanya kondensator pada bagian atas, sehingga kembali menyiram dan merendam bahan dalam bungkus kertas saring berisi sampel.

(e) Ultrasonikasi



Gambar 2.7 Ultrasonikasi (Nugroho, 2017)

Metode ini merupakan modifikasi dari maserasi dimana pengadukan diganti dengan gelombang suara yang memiliki frekuensi yang tinggi (20.000 Hz), frekuensi di atas ambang batas kemampuan telinga manusia menangkap gelombang suara. Gelombang ini akan menghasilkan efek getaran dengan frekuensi yang kuat terhadap bahan sehingga menimbulkan efek tekanan mekanis pada sel dan jaringan. Kerusakan sel akan mempercepat kelarutan senyawa metabolit sehingga akan meningkatkan rendemen dari ekstrak yang dihasilkan.

2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Menurut Schwalbe *et al.*, 2007 metode pengujian antibakteri diantaranya:

1. Metode Difusi

Dalam metode ini, penentuan aktivitas dilihat dari kemampuan perpindahan zat antimikroba dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona bening yang akan terbentuk di sekeliling zat antimikroba pada waktu inkubasi. Metode difusi dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu:

a) Metode Cakram (*Disc*)

Cara ini sering digunakan untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap berbagai macam antimikroba. Cara ini menggunakan suatu cakram yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Cakram tersebut kemudian diletakkan pada media agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu, umumnya selama 18-24 jam dengan suhu 37 °C, kemudian diukur zona bening pada lempeng agar yang timbul.

b) Metode Parit (*Ditch*)

Suatu media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat parit. Parit diisi dengan zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar parit.

c) Metode Sumuran (*Hole/Cup*)

Pada media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu sumuran kemudian diisi dengan zat antimikroba. Lalu setiap lubang diisi dengan zat uji dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona bening sekitar sumuran.

2. Metode Dilusi

Metode ini dilakukan dengan menggabungkan zat antimikroba dan media, yang selanjutnya diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan mengamati pertumbuhan mikroba dalam media. Aktivitas zat antimikroba ditentukan dengan melihat Konsentrasi Hambatan Minimal (KHM) yang merupakan konsentrasi paling kecil dari zat antimikroba uji yang masih memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji. Metode ini terbagi atas dua cara antara lain:

a) Pengenceran Serial dalam Tabung

Uji dilakukan menggunakan deretan tabung reaksi yang diisi dengan inokulum bakteri dan larutan antibakteri dengan konsentrasi berbeda. Zat uji diencerkan sesuai serial dalam media cair, lalu diinokulasikan dengan bakteri dan diinkubasi

pada waktu dan suhu yang sesuai dengan mikroba uji. Aktivitas zat ditentukan dengan melihat kekeruhan yang terjadi pada tabung sebagai Konsentrasi Hambatan Minimal (KHM).

b) Penapisan Lempeng Agar

Cara ini dikerjakan dengan pengenceran inokulum dalam media agar dan dituangkan ke cawan Petri. Setelah agar membeku, tanamkan bakteri, dan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Konsentrasi terendah dari larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambatan Minimal (KHM).

3. Metode Difusi dan Dilusi (*E-test*)

Metode ini merupakan campuran antara metode dilusi dan metode difusi antibakteri ke dalam media. Cara ini dilakukan dengan menggunakan strip plastik mengandung antibakteri dengan konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi diletakkan dalam media agar yang telah ditanamkan inokulum. Hambatan pertumbuhan mikroorganisme bisa diamati dengan adanya area bening di sekitar strip tersebut.

2.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu metode analisa sederhana yang biasa digunakan di laboratorium karena waktu lebih singkat, alat sederhana dan hanya memerlukan sedikit sampel. KLT sendiri merupakan metode fisiko-kimia yang berkaitan dengan adanya fase diam (terdiri dari bahan pemisah dan diletakkan diatas plat gelas, logam atau lapisan yang cocok), fase gerak (pembawa senyawa untuk dipisahkan) dan penampak noda (untuk memberikan warna pada senyawa

yang tidak berwarna). Selain KLT ada beberapa jenis kromatografi lainnya seperti berikut (Djamal, 2012):

- a. Kromatografi preparatif, serupa dengan KLT namun plat yang digunakan adalah kaca, dimana setelah bercak terpisah, plat dikerok dan hasilnya dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, selanjutnya dilakukan reskristalisasi hingga dapat senyawa yang benar-benar murni.
- b. Kromatografi Kertas (KKt) merupakan metode yang digunakan untuk senyawa polar seperti flavonoid. Eluen yang biasa digunakan biasanya ialah BAA (Butanol, asam asetat, air). Kertas yang disarankan untuk uji ini yaitu kertas Whatman 3MM atau sejenisnya.
- c. Kromatografi Kolom adalah pemisahan lanjutan dari KLT, pada KK digunakan fasa diam berupa silika dan ditambahkan fasa gerak ke dalam kolom yang telah dilapisi dengan kapas atau serat fiber hingga fasa diam padat.

