

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

##### 2.1.1 Klasifikasi Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

Alga coklat (*Turbinaria ornata*) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Chromista
Filum	: Heterokontophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: <i>Turbinaria</i>
Spesies	: <i>Turbinaria ornata</i> (Turner) J. Agardh 1848
Sumber	: Algaebase.org (Kepel <i>et al.</i> , 2018).

##### 2.1.2 Morfologi Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)



**Gambar 1.** Alga Coklat (*Turbinaria ornata*) (sumber: pribadi)

*Turbinaria ornata* juga dikenal sebagai alga coklat dari famili Sargassaceae dan kelas Phaeophyceae. Umumnya, alga ini hidup berkelompok di berbagai habitat laut, seperti pantai berbatu, kolam pasang surut, terumbu karang, hingga laut dalam. Spesies ini sering tumbuh di celah batu pada area berombak besar atau di antara

karang pada kedalaman 20–30 meter. Bentuk morfologinya yang unik membantu alga ini beradaptasi dan bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrem (Raj *et al.*, 2023).

Alga coklat (*Turbinaria ornata*) diklasifikasikan dalam divisi Thallophyta, yang ditandai dengan warna coklat, pertumbuhan tegak dan kokoh, serta panjang tubuh yang bervariasi antara 2 - 20 cm bahkan dapat mencapai 30 cm. Panjang rata-rata talus pada *T. ornata* tercatat sekitar 30,08 cm (Riry *et al.*, 2022), dengan tinggi thallus berkisar 2,5 - 8,8 cm dan berat antara 2 -16 gram. Cabang-cabangnya tersusun secara sederhana, berseling, atau tidak teratur (Andirasdin *et al.*, 2023). Karena strukturnya tidak memiliki perbedaan yang jelas antara akar, batang, dan daun, tubuh alga ini disebut thallus, yang memiliki bentuk menyerupai bibir bergerigi, tekstur agak keras, kaku, tebal, serta tumbuh tegak (Sarita *et al.*, 2021).

Bentuk thallus sangat beragam, mulai dari bentuk bulat seperti tabung, kantong, pipih, gepeng, hingga menyerupai rambut. Bagian yang berfungsi sebagai tempat melekat pada substrat dan menyerupai akar disebut holdfast. Sedangkan bagian yang menyerupai batang disebut stipe atau cauloid, berbentuk batang panjang menyerupai segi empat dengan diameter antara 1,8 - 3,0 mm. Bagian yang menyerupai daun dan berfungsi untuk fotosintesis disebut blades atau filoid, dengan ukuran antara 1 - 3 cm, tinggi mencapai 21 mm dan bentuk menyerupai segitiga (Andirasdin *et al.*, 2023). Daunnya berbentuk pipih seperti cakram dengan tepi bergerigi tajam dan pada bagian puncak (apeks) daun terdapat dua lapisan yang menyerupai bibir (Riry *et al.*, 2022), umumnya menyerupai corong dengan bagian tengah daun melengkung ke dalam (Sarita *et al.*, 2021).

### 2.1.3 Kandungan Kimia Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

Kandungan kimia makroalga sangat bervariasi dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti musim, lokasi geografis, jenis spesies, waktu panen, dan kondisi lingkungan sekitar (Pramesti *et al.*, 2017). Secara umum, makroalga kaya akan polisakarida non-pati, mineral, dan vitamin, tetapi memiliki kandungan lemak yang rendah. Di Indonesia, komposisi nilai gizi makroalga telah banyak dilaporkan, termasuk protein, lemak, abu, vitamin, asam amino, asam lemak, serta metabolit sekunder (Manteu & Nurjanah, 2018).

Alga merah, hijau, dan coklat menunjukkan perbedaan dalam kandungan mineral, alga coklat memiliki kadar kalium (K) dan kalsium (Ca) yang lebih tinggi (K = 31,4 g/kg, Ca = 10,3 g/kg) sementara alga merah memiliki (K = 14.1 g/kg dan Ca = 3.11 g/kg) serta alga hijau dengan (K = 13.9 g/kg dan Ca = 7.58 g/kg) (Erniati *et al.*, 2016). Makroalga juga mengandung metabolit primer seperti vitamin, mineral, serat, alginat, karagenan, dan agar-agar, yang banyak digunakan dalam kosmetik. Selain itu, makroalga juga menghasilkan metabolit sekunder bioaktif dengan aktivitas farmakologis yang luas, seperti antibakteri, antivirus, antijamur, dan sitostatik (Sidauruk *et al.*, 2021).

Alga coklat (Phaeophyceae) mengandung alginat, suatu polimer dari asam  $\beta$ -D-mannuronat dan asam  $\alpha$ -L-guluronat. Selain itu, alga coklat juga mengandung protein, vitamin C, tanin, iodin, dan fenol yang berpotensi sebagai obat gondok, serta antibakteri dan antitumor. Fucoidan memiliki berbagai khasiat farmakologis seperti antikoagulan, antitrombolitik, antitumor, antivirus, imunomodulator, antioksidan, dan antiinflamasi (Ode & Wasahua, 2014).

Metabolit sekunder lainnya yang ditemukan dalam alga coklat termasuk sterol, polifenol, karotenoid, flavonoid, dan alkaloid yang berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri (Ndahawali *et al.*, 2021). Kandungan fenolik yang tinggi juga telah dilaporkan (Vijayabaskar & Shiyamala, 2011). Selain itu, alga coklat mengandung komponen bioaktif seperti fucoidan (Fauziee *et al.*, 2021) dan neophytadine (Oktaviani *et al.*, 2019).

#### **2.1.4 Bioaktivitas Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)**

Alga coklat telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat, terutama dalam budidaya rumput laut dan sebagai bahan pangan (Oktaviani *et al.*, 2019). Salah satu komponen utama yang dihasilkan dari dinding sel alga coklat adalah asam alginat, yaitu senyawa hidrokoloid yang memiliki berbagai manfaat. Asam alginat dikenal efektif untuk menghentikan perdarahan dan digunakan sebagai bahan pembalut luka dalam bidang medis (Rasyid, 2004). Selain itu, kemampuannya dalam mengentalkan larutan, membentuk gel, serta menghasilkan lapisan atau serat menjadikan senyawa ini bernilai tinggi dalam industri kosmetik, farmasi, dan makanan (Lokollo & Hukubun, 2022).

Selain asam alginat, *Turbinaria ornata* diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti neophytadiene yang memiliki efek penyembuhan luka. Senthil dan Murugan, (2013) melaporkan bahwa gel dari ekstrak etanol alga ini, dapat mempercepat proses regenerasi jaringan pada luka sayat tikus putih, menunjukkan potensi bioaktivitas dalam bidang penyembuhan luka.

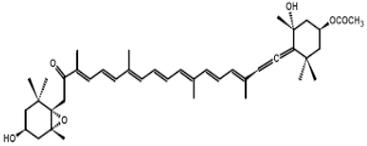
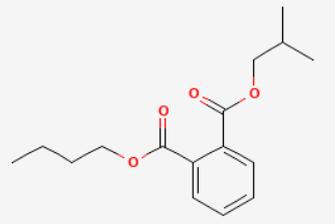
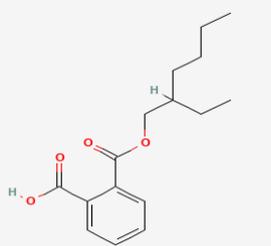
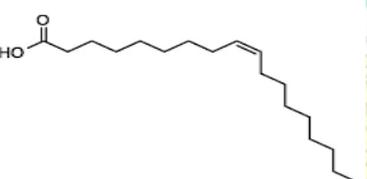
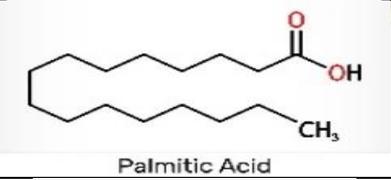
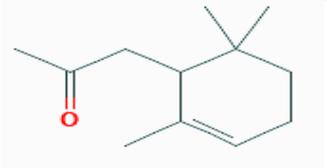
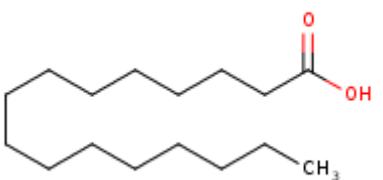
Bioaktivitas lain yang penting dari *T. ornata* adalah aktivitas antioksidan. Kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstraknya mampu menangkal

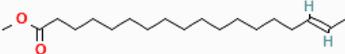
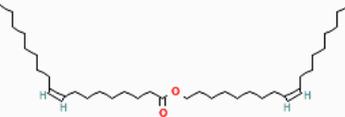
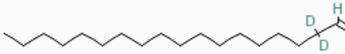
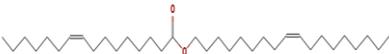
radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Aktivitas antioksidan ini penting dalam mencegah penyakit degeneratif seperti kanker dan gangguan kardiovaskular (Asharo *et al.*, 2024; Sari & Muslimin, 2022).

Selain itu, *T. ornata* juga memiliki potensi sebagai agen antimikroba. Kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan tanin telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen. Penelitian juga menunjukkan bahwa jamur endofitik yang bersimbiosis dengan *T. ornata* mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat menghambat bakteri penghasil *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL), yang resisten terhadap antibiotik (Wiradana *et al.*, 2024; Dyab, 2012).

Senyawa bioaktif lainnya yang ditemukan dalam *T. ornata* adalah fucoidan, memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antikoagulan, antidiabetik, antitumor, antivirus, dan neuroprotektif, melalui mekanisme imunomodulasi (Fauziee *et al.*, 2021). Penelitian oleh Rahelivao *et al.*, (2015) menegaskan potensi bioaktivitas alga coklat dari pesisir Madagaskar, termasuk *Turbinaria ornata*, dengan mengidentifikasi dan mengisolasi senyawa alami yang menunjukkan efek farmakologis. Deepak *et al.*, (2017) juga melakukan analisis fitokimia terhadap *T. ornata* dan menemukan adanya aktivitas antioksidan serta anti-proliferatif yang menjanjikan dalam pencegahan kanker. Selain itu, Rajkumar dan Bhavan, (2017) menguatkan temuan tersebut melalui karakterisasi senyawa kimia dari *T. ornata*, memberikan gambaran mendalam mengenai potensi bioaktivitasnya untuk aplikasi farmasi dan kesehatan.

**Tabel 1.** Senyawa Bioaktif dari Alga Coklat (*Turbinaria sp*)

Senyawa Boaktif	Struktur	Aktivitas	Sumber
fucoxantin		Antibakteri, antikanker, antihipertensi, antiinflamasi	(Karpinski & Adamczak, 2019)
1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester		Antimikroba, antifouling, antivirus.	(Deepak <i>et al.</i> , 2017)
1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester		Antivirus, antikanker, antimikroba, antioksidan, sifat sitotoksik dan anti-inflamasi	(Deepak <i>et al.</i> , 2017)
Hentriacontane		Antioksidan, Antijamur, Antitumor, Antibakteri	(Deepak <i>et al.</i> , 2017)
Asam oleat		Antiproliferatif	(Dyab, 2012)
Asam palminat		Antiproliferatif	(Dyab, 2012)
Cyclohexene, 1,5,5-trimethyl-6-acetylmethyl		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)
Hexadecenoic acid		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)

16- Octadeceno ic acid		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)
Oleyl oleate		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)
2,2- Dideutero octadecanal		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)
9- Hexadeceno ic acid, 9- octadecenyl ester (Z,Z)		Antibakteri	(Alwaleed <i>et al.</i> , 2024)

## 2.2 Jamur Endofit

### 2.2.1 Definisi Endofit dan Jamur Endofit

Endofit merupakan mikroorganisme seperti jamur atau bakteri, hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menyebabkan kerusakan pada inangnya. Mereka membentuk hubungan simbiosis dengan tanaman, merangsang produksi senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat seperti antimikroba atau antikanker. Endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang mirip dengan inangnya, bahkan di luar jaringan tanaman. Mereka ditemukan di hampir semua bagian tanaman (Wahyuni *et al.*, 2019). Meskipun umumnya menguntungkan, endofit juga dapat berperan sebagai saprofit atau patogen (Qin *et al.*, 1996). Endofit, termasuk bakteri atau jamur, hidup dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit. Mereka bersimbiosis dengan tumbuhan, meningkatkan ketahanan terhadap stres biotik dan abiotik, serta menghasilkan senyawa bioaktif untuk tumbuhan dan manusia. Endofit ditemukan di berbagai bagian tumbuhan dan berpotensi dalam aplikasi medis, pertanian, dan industri (Strobel & Daisy, 2003).

Jamur endofit, yang hidup dalam jaringan tumbuhan tanpa merusak inangnya, menghasilkan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid dengan aktivitas biologis (Kusari *et al.*, 2012). Mereka mendukung pertumbuhan tumbuhan melalui fiksasi nitrogen, pengendalian patogen, dan penyerapan nutrisi (Arnold & Lutzoni, 2007). Jamur endofit ditemukan di berbagai lingkungan, termasuk ekstrem seperti gurun dan pegunungan, menunjukkan adaptasi ekologis yang luar biasa. Potensinya sebagai sumber senyawa bioaktif menjadikan mereka fokus penelitian untuk pengembangan obat-obatan, pestisida hayati, dan enzim industri (Bacon & White, 2000).

### **2.2.2 Hubungan Jamur Endofit dengan Tumbuhan Inang**

Hubungan antara endofit dan tumbuhan bersifat simbiosis mutualistik, di mana keduanya saling menguntungkan. Tumbuhan menyediakan habitat yang aman bagi mikroorganisme endofit, sementara endofit menghasilkan senyawa yang membantu tumbuhan menyerap nutrisi, meningkatkan pertumbuhan, dan memperbesar biomassa. Senyawa ini juga meningkatkan ketahanan tumbuhan terhadap patogen, mengurangi risiko infeksi, dan membantu melawan penyakit (Santos *et al.*, 2018). Interaksi antara tumbuhan dan endofit telah berkembang melalui ko-evolusi yang dipengaruhi oleh faktor genetik tanaman, tahap pertumbuhan, jenis jaringan, praktik pertanian, dan kondisi lingkungan seperti suhu, air, dan nutrisi. Proses ini memperkuat hubungan melalui perubahan seluler dan molekuler, mendukung perkembangan tumbuhan (Santos *et al.*, 2018).

Endofit, terutama bakteri secara langsung meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui fiksasi nitrogen, pelarutan fosfor, produksi hormon tumbuh, dan

peningkatan toleransi terhadap stres biologis. Secara tidak langsung, endofit meningkatkan ketersediaan nutrisi, air, dan mineral, membantu tanaman mengatasi stres lingkungan seperti kekeringan, logam berat, atau zat beracun, serta melindungi dari mikroorganisme berbahaya. Oleh karena itu, endofit berperan penting dalam pengendalian hayati untuk menjaga kesehatan tanaman (Santos *et al.*, 2018).

### 2.2.3 Jamur Endofit Yang Memiliki Aktivitas Antibakteri

**Tabel 2.** Jamur Endofit yang Memiliki aktivitas antibakteri

Isolat jamur	Tanaman Inang	Bakteri Uji	Diameter Zona Bening (mm)	Referensi
<i>Phlebiopsis magnicystidiata</i>	<i>T. ornata</i>	<i>E. coli</i> ESBL	23,1 ± 0,70	(Wiradana <i>et al.</i> , 2024)
<i>Peniophora</i> sp.	<i>S. aquifolium</i>	<i>E. coli</i> ESBL	15,2 ± 0,35	(Wiradana <i>et al.</i> , 2024)
<i>Neurospora crassa</i> strain RT3M	<i>P. australis</i>	<i>E. coli</i> ESBL	17,5 ± 0,15	(Wiradana <i>et al.</i> , 2024)
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Halimeda</i> sp.	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	11,0 ± 0,0 4,0 ± 0,0	(Rahaweman <i>et al.</i> , 2016)
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Caulerpa</i> sp.	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	6,5 ± 0,7 6,5 ± 0,7	(Rahaweman <i>et al.</i> , 2016)

### 2.2.4 Identifikasi Jamur Endofit

#### 1. Identifikasi Makroskopis

Identifikasi makroskopis jamur endofit melibatkan pengamatan karakteristik koloni yang tumbuh pada media kultur, seperti warna koloni, tekstur, bentuk tepi, dan kecepatan pertumbuhan. Pengamatan ini penting untuk tahap awal identifikasi jamur sebelum dilakukan analisis lebih lanjut (Suryani & Cahyanto, 2022).

## 2. Mikroskopis

Setelah pengamatan makroskopis, identifikasi dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis untuk melihat struktur hifa, spora, dan organ reproduksi lainnya. Preparat mikroskopis dibuat dengan menyayat bagian kecil dari jamur untuk mengamati miselium dan hifa, baik yang bersepta maupun tidak bersepta. Pengamatan ini membantu dalam mengidentifikasi genus atau spesies jamur secara lebih akurat (Suryani & cahyanto, 2022).

## 3. Molekuler

Pendekatan molekuler, seperti analisis DNA, sering digunakan untuk identifikasi jamur endofit. Namun, metode ini biasanya menjadi pilihan kedua karena biaya yang cukup besar untuk proses ekstraksi DNA, sekuensing, hingga pembuatan pohon filogenetik (Suryani & cahyanto, 2022).

### 2.3 Antibiotik

#### 2.3.1 Definisi Antibiotik

Antibiotik merupakan senyawa kimia, baik yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri dan jamur, maupun yang diproduksi secara sintesis, yang berfungsi untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi (Nufus & Pertiwi, 2019). Penggunaan antibiotik yang tepat sangat penting untuk memastikan efektivitasnya dalam mengobati infeksi bakteri dan mencegah terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik (Emelda *et al.*, 2023). Antibiotik adalah obat yang berasal dari bahan kimia yang dihasilkan oleh jamur atau bakteri, dan digunakan untuk mengobati infeksi bakteri karena kemampuannya

menghambat dan membunuh bakteri (Fauziah, 2016). Antibiotik merupakan golongan obat yang bekerja dengan cara menghentikan atau membunuh bakteri yang berkembang di dalam tubuh, dan digunakan untuk mengatasi serta mencegah infeksi (Ramdhani *et al.*, 2020).

### **2.3.2 Resistensi Antibiotik**

Resistensi antibiotik terjadi ketika mikroorganisme, terutama bakteri, mengembangkan kemampuan untuk bertahan hidup terhadap efek antibiotik yang sebelumnya efektif dalam mengobati infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme tersebut. Ketika antibiotik digunakan, mereka biasanya bekerja dengan cara mengganggu fungsi vital bakteri, seperti sintesis dinding sel atau proses metabolisme lainnya. Namun, bakteri yang resisten dapat bertahan hidup meskipun antibiotik ada, dan mereka dapat berkembang biak dengan kemampuan untuk melawan obat-obatan tersebut. Proses ini dapat terjadi karena mutasi genetik yang memungkinkan bakteri untuk menghindari pengaruh antibiotik atau karena transfer gen resistensi dari bakteri lain (Finley *et al.*, 2013).

Penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak tepat adalah faktor utama yang mempercepat perkembangan resistensi ini. Ketika antibiotik digunakan secara berlebihan, bakteri yang lebih sensitif akan mati, sementara bakteri yang resisten akan bertahan dan berkembang biak, menciptakan populasi mikroba yang sulit diobati (Ventola, 2015). Resistensi antibiotik menjadi masalah kesehatan global karena dapat menyebabkan kegagalan pengobatan dan membuat infeksi yang dulunya mudah diobati menjadi lebih sulit atau bahkan tidak dapat diobati (WHO, 2019). Penggunaan antibiotik yang bijak dan lebih ketat dalam pengawasannya

sangat penting untuk mengurangi resistensi antibiotik. Selain itu, penelitian dan pengembangan antibiotik baru sangat diperlukan untuk mengatasi bakteri yang resisten terhadap pengobatan yang ada saat ini (Ventola, 2015).

## **2.4 Ekstraksi**

### **2.4.1 Definisi Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen atau zat aktif dari campuran menggunakan pelarut tertentu berdasarkan perbedaan kelarutan zat dalam pelarut tersebut (Houghton & Raman, 2012). Ekstraksi dilakukan untuk memperoleh senyawa bioaktif dari mikroorganisme seperti bakteri, jamur, atau alga yang berpotensi memiliki nilai terapeutik, seperti antibakteri, antijamur, atau antikanker (Newman & Cragg, 2016). Proses ini melibatkan penggunaan pelarut organik seperti etanol, metanol, atau kloroform untuk melarutkan senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme (De Castro & Priego-Capote, 2010). Teknik yang digunakan bervariasi, mulai dari metode sederhana seperti perendaman hingga teknik yang lebih kompleks seperti ekstraksi Soxhlet, ekstraksi cair-cair, atau ekstraksi superkritikal (Stalikas, 2007).

Ekstraksi juga merupakan proses pemisahan zat berdasarkan kelarutannya dalam dua cairan yang tidak bercampur, seperti pelarut polar dan non-polar. Prinsip utamanya adalah senyawa polar larut dalam pelarut polar, seperti air atau etanol, sedangkan senyawa non-polar larut dalam pelarut non-polar, seperti heksana atau kloroform. Pemilihan pelarut sangat memengaruhi hasil ekstraksi dan kandungan zat aktifnya, di mana pelarut yang lebih polar dapat mengekstrak lebih banyak senyawa polar (Fakhruzy, 2020).

## 2.4.2 Tujuan Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen tertentu dari suatu bahan dengan menggunakan pelarut yang tepat, dengan tujuan mendapatkan zat aktif atau senyawa spesifik yang dibutuhkan. Dalam penelitian, tujuan ekstraksi dapat beragam bergantung pada objek dan target yang ingin dicapai. Sebagai contoh, ekstraksi dapat dilakukan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder dari campuran lainnya sehingga dapat dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi, seperti pembuatan obat atau penelitian lanjutan (Candra *et al.*, 2021).

Selain itu, ekstraksi juga bertujuan untuk mengisolasi atau memisahkan senyawa dari simplisia atau campuran lainnya, dengan mempertimbangkan metode yang paling efektif dan efisien. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat sangat penting agar hasil yang diperoleh optimal dan sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Syamsul *et al.*, 2020).

## 2.4.3 Metode Ekstraksi

### 1. Ekstraksi Dingin

Ekstraksi dingin merupakan proses pemisahan senyawa dari suatu bahan tanpa menggunakan panas, melainkan dengan pelarut pada suhu ruangan atau suhu rendah. Tujuan dari metode ini adalah untuk melindungi senyawa-senyawa aktif yang sensitif terhadap panas, seperti enzim, vitamin, atau senyawa fenolik, agar tidak rusak selama proses ekstraksi berlangsung. Metode ekstraksi dingin sering dipilih untuk bahan-bahan yang mengandung senyawa termolabil, yaitu senyawa yang mudah rusak ketika terpapar suhu tinggi. Kelebihan dari metode ini adalah kemampuannya menjaga kualitas senyawa aktif, sehingga menghasilkan ekstrak

dengan khasiat yang tetap optimal. Namun, ekstraksi dingin biasanya memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan metode yang menggunakan panas, karena tidak adanya energi tambahan untuk mempercepat pelarutan senyawa ke dalam pelarut (Yennie & Elystia, 2013). Berikut beberapa metode ekstraksi cara dingin:

#### **A. Maserasi**

Teknik yang sering digunakan dalam ekstraksi dingin adalah maserasi, di mana bahan direndam dalam pelarut tertentu dan dibiarkan diam selama beberapa waktu agar senyawa aktif dapat larut ke dalam pelarut tersebut. Proses maserasi dilakukan pada suhu ruang sekitar 20-30°C guna menghindari penguapan pelarut akibat suhu yang terlalu tinggi, serta dilakukan pengadukan selama 15 menit agar bahan dan pelarut dapat tercampur secara merata (Yennie & Elystia, 2013).

#### **B. Perkolasi**

Perkolasi merupakan metode ekstraksi simplisia halus dengan menggunakan pelarut yang sesuai, di mana pelarut tersebut dialirkan perlahan-lahan melalui kolom ekstraksi (Febriana & Oktavia, 2019). Teknik ini dilakukan pada suhu ruang dan memanfaatkan pelarut yang selalu baru agar ekstraksi lebih efektif. Prinsip perkolasi adalah menempatkan serbuk simplisia dalam sebuah bejana silinder dengan bagian bawahnya dilengkapi sekat berpori untuk mendukung aliran pelarut (Irfan, 2018).

Metode perkolasi biasanya memerlukan waktu lebih lama dan jumlah pelarut yang lebih banyak dibandingkan teknik ekstraksi lainnya. Untuk

memastikan bahwa proses perkolasi telah berlangsung sempurna, hasil ekstrak (perkolat) dapat diuji keberadaan metabolit dengan pereaksi khusus.

## 2. Ekstraksi Panas

Ekstraksi panas menggunakan suhu tinggi untuk mempercepat proses pelarutan senyawa aktif ke dalam pelarut. Tujuan pemanasan adalah untuk membantu meningkatkan kelarutan senyawa yang sulit larut pada suhu rendah, seperti minyak esensial atau alkaloid. Salah satu teknik yang umum digunakan dalam ekstraksi panas adalah refluks, di mana sampel dipanaskan dalam pelarut, dan alat kondensasi digunakan untuk mencegah pelarut menguap. Proses ini meningkatkan efisiensi ekstraksi karena panas mempercepat pelarutan senyawa aktif (Hamida *et al.*, 2021).

Namun, ekstraksi panas juga memiliki kekurangan, yaitu dapat merusak senyawa-senyawa yang sensitif terhadap panas. Oleh karena itu, metode ini tidak selalu cocok untuk semua bahan, terutama bahan yang mengandung senyawa termolabil. Pemilihan antara ekstraksi dingin atau panas bergantung pada karakteristik bahan yang akan diekstraksi dan tujuan dari penelitian tersebut, apakah lebih mengutamakan kualitas senyawa aktif atau efisiensi waktu ekstraksi.

### A. Soxhletasi

Soxhlet adalah metode ekstraksi yang menggunakan pelarut baru secara terus-menerus dengan memanfaatkan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara konstan melalui proses pendinginan balik (Hujjatusnaini *et al.*, 2021). Pada metode ini, pemanasan menyebabkan pelarut menguap ke atas dan kemudian mengembun kembali melalui kondensor udara, menghasilkan tetesan yang terkumpul kembali.

Setelah melewati batas lubang pipa samping Soxhlet, sirkulasi akan terus berulang sehingga ekstraksi berlangsung secara efektif. Pemilihan pelarut sangat penting dalam metode ini, dan pelarut yang ideal adalah yang memiliki daya melarutkan tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan tersebut bergantung pada polaritas pelarut serta polaritas senyawa yang akan diekstraksi (Yurleni, 2018).

### **B. Infusa**

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi bahan nabati menggunakan pelarut air pada suhu sekitar 90°C selama 15 menit (Ambarwati, 2018). Biasanya, infusa dibuat dari simplisia yang memiliki jaringan lunak seperti bunga dan daun, terutama yang mengandung minyak atsiri atau zat lain yang tidak tahan pemanasan dalam waktu lama (Karim, 2014). Teknik infusa memungkinkan perolehan zat aktif tanpa merusak komponen sensitif terhadap panas.

### **C. Dekoktasi**

Dekoktasi merupakan teknik ekstraksi yang dilakukan dengan cara merebus simplisia dalam pelarut air pada suhu 90-95°C selama kurang lebih 30 menit (Hastuti, 2024). Bentuk sediaan hasil dekoktasi dapat disimpan pada suhu rendah agar tetap stabil dan dapat digunakan dalam jangka waktu lama, asalkan terhindar dari kontaminasi mikroba atau bahan asing lainnya.

### **D. Destilasi (Penyulingan)**

Destilasi adalah proses pemisahan komponen campuran cair berdasarkan perbedaan titik didih zat penyusunnya (Agustiani *et al.*, 2018). Komponen dengan titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu, kemudian dikondensasikan kembali menjadi cairan melalui proses pendinginan (Susanti, 2010). Pada destilasi

minyak atsiri dari tumbuhan, uap air dan senyawa volatil akan terkondensasi menjadi destilat, yang terdiri dari air dan minyak atsiri yang terpisah.

## 2.5 Bakteri Uji

### 2.5.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat yang cenderung berkelompok seperti anggur. Bakteri ini umumnya hidup di permukaan kulit manusia dan hewan, serta di saluran pernapasan bagian atas. Meskipun sering ditemukan di tubuh manusia tanpa menimbulkan masalah, *Staphylococcus aureus* dapat menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai infeksi serius, termasuk infeksi kulit, pneumonia, sepsis, dan infeksi pada luka operasi. Salah satu ciri khas bakteri ini adalah kemampuannya menghasilkan berbagai toksin yang dapat merusak jaringan tubuh manusia, termasuk toksin yang terkait dengan sindrom syok toksik dan keracunan makanan (Huang *et al.*, 2020).

Bakteri ini dikenal karena kemampuannya mengembangkan resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik, menjadikannya salah satu patogen yang paling menantang dalam pengobatan medis modern. Salah satu bentuk resistensi yang paling dikenal adalah resistensi terhadap methicillin (MRSA), yang membuat infeksi *Staphylococcus aureus* lebih sulit diobati dengan antibiotik standar. Penelitian terus dilakukan untuk memahami lebih dalam mekanisme resistensi ini dan mengembangkan pengobatan yang lebih efektif. Dengan meningkatnya prevalensi strain MRSA, penanganan yang cepat dan tepat terhadap infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* menjadi sangat penting untuk mengurangi

angka kematian dan morbiditas yang terkait dengan infeksi bakteri ini (Zong *et al.*, 2017).

### **2.5.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang yang umum ditemukan di saluran pencernaan manusia dan hewan. Sebagian besar jenis *E. coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa jenis dapat menyebabkan penyakit serius seperti infeksi saluran kemih, diare, dan keracunan darah. Salah satu jenis berbahaya, *E. coli* tipe O157:H7, menghasilkan toksin yang merusak sel darah merah dan menyebabkan sindrom uremik hemolitik, kondisi yang berpotensi fatal. *E. coli* berkembang biak dengan cepat melalui pembelahan biner, memungkinkan bakteri ini tumbuh subur di lingkungan yang hangat dan kaya nutrisi (Kaper *et al.*, 2004).

Meskipun *E. coli* dapat menjadi patogen, bakteri ini juga penting dalam penelitian mikrobiologi dan bioteknologi. *E. coli* sering digunakan dalam studi genetika, biologi sel, dan pembuatan protein rekombinan. Selain itu, bakteri ini berperan dalam pembuatan vaksin dan obat-obatan. Meskipun banyak strain *E. coli* bermanfaat dalam pencernaan, jenis patogen dapat menyebabkan penyakit serius, sehingga diperlukan langkah hati-hati untuk mengendalikan dan mencegah infeksi *E. coli* (Bettelheim, 2013).

## **2.6 Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri**

### **2.6.1 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 2 yaitu:

**a. Metode Kirby-Bauer test (difusi cakram)**

Cara ini sering digunakan untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap berbagai macam antimikroba yaitu menggunakan cakram kertas steril berdiameter 6 mm yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Cakram tersebut kemudian diletakkan diatas media agar yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri uji. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 18-24 jam di suhu 35°C. Pertumbuhan dari mikroba dilihat dari zona hambat berbentuk lingkaran jernih di sekitar cakram diukur diameternya. Kelebihan dari metode ini adalah jumlah zat yang digunakan dapat diatur pemakainnya, mudah dan cepat untuk dilakukan (Nurhayati *et al.*, 2020).

**b. Sumuran (*well diffusion*)**

Pada media agar yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri uji dibuat suatu sumuran berdiameter 6–8 mm 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. Hambatan yang terbentuk disekeliling lubang merupakan tanda untuk menilai pertumbuhan bakteri. Pengukuran luas zona hambat pada metode ini sangatlah mudah dibandingkan metode lain, tapi dalam pembuatannya lumayan susah karena media mudah retak (Nurhayati *et al.*, 2020).

Perbedaan mendasar antara metode kirby bauer dan sumuran adalah cara senyawa antibakteri berinteraksi dengan media agar. pada metode kirby bauer, senyawa antibakteri di resapkan pada cakram kertas, sedangkan pada metode sumuran senyawa antibakteri langsung di masukan kedalam sumuran yang telah di buat pada media agar. metode sumuran menghasilkan zona hambat yang lebih besar di bandingkan dengan metode kirby bauer.

### **2.6.2 Metode Dilusi**

Metode dilusi yaitu metode yang mencampurkan sampel dengan medium yang telah berisi inokulat. Setelah diinkubasi, pertumbuhan mikroorganisme dapat ditentukan dengan perbandingan kekeruhan antara kultur uji dengan kontrol. Metode kebanyakan digunakan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum dari senyawa murni maupun ekstrak.

Keuntungan utama dalam penggunaan metode dilusi yaitu untuk menentukan konsentrasi senyawa uji pada medium agar, biasanya digunakan untuk manentukan nilai konsentrasi hambat minimum. Penggunaan metode ini bisa untuk sampel berupa ekstrak, senyawa murni, senyawa polar maupun non polar. Pada pengujian dilusi agar, sampel pada berbagai konsentrasi dicampurkan dengan nutrient agar. Plat agar lalu diinokulasi dan diinkubasi. Konsentrasi terendah yang tidak menumbuhkan bakteri dihitung sebagai nilai konsentrasi hambat minimum.

Metode dilusi dibagi menjadi 2, yaitu:

#### **a. Metode Dilusi Cair (*Broth Dilution*)**

Metode ini mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambatan minimum, KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, KBM).

Cara kerja metode dilusi cair:

1. Buat seri pengenceran agen antimikroba (obat herbal) pada medium cair yang di tambahkan dengan mikroba uji. Cara pengenceran dilakukan dalam tabung dengan mengencerkan bahan uji (obat herbal) dengan media cair menjadi kelipatan dua secara bertahap sehingga didapatkan konsentrasi dengan kelipatan setengahnya.
2. Inokulasi dengan suspensi bakteri dan diinkubasi selama 24 jam pada temperature 36-37°C dan kemudian diamati hambatan pertumbuhan mikroba dengan membandingkan kekeruhan dan pertumbuhannya dengan kontrol yang mengandung media.
3. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM.
4. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan pada mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam.
5. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

#### **b. Metode Dilusi Padat (*Solid Dilution*)**

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah suatu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji. Pengujian terhadap jamur menggunakan media cair kurang bagus karena sebagian besar jamur tidak tumbuh dan terdispersi dengan baik kecuali beberapa jamur dengan pertumbuhan seperti ragi (*yeast-like growth*). Jamur yang tumbuh seperti ragi antara lain *Candida spp* (Pratiwi, 2008).

### c. Metode Bioautografi

Bioautografi merupakan teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi zat yang mempengaruhi tingkat pertumbuhan organisme uji dalam campuran dan matriks yang kompleks. Metode ini menggabungkan penggunaan teknik kromatografi lapis tipis dengan respon dari mikroorganisme yang diuji berdasarkan aktivitas biologi dari suatu analit yang dapat berupa antibakteri, antijamur, antitumor, antiprotozoal (Choma, 2005).

Aplikasi dari metode bioautografi ini, diantaranya (Choma, 2005):

1. Mencari zat antibiotik, antijamur, antitumor, dan antiprotozoal baru dengan mempelajari aktivitas biologi zat yang berasal dari tanaman, mikroorganisme atau kombinasi secara kimia.
2. Penelitian antibiotik dan senyawa biologis atif lainnya dalam air limbah, air minum, cairan tubuh, pakan dan tanaman.
3. Control kualitas obat-obatan antibiotik.
4. Mencari senyawa antimikroba yang efektif melawan bakteri dan jamur patogen pada tanaman.

5. Deteksi dan penentuan senyawa toksin (misalnya, aflatoksin) atau fototoksik (misalnya, furokumarin).

Metode bioautografi dibedakan menjadi tiga, yaitu (Choma, 2005):

#### 1. Bioautografi Kontak

Bioautografi kontak dilakukan dengan meletakkan plat KLT hasil elusi senyawa yang akan diuji di atas media padat yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Adanya senyawa antimikroba ditandai dengan adanya daerah bening yang tidak ditumbuhi mikroba.

#### 2. Bioautografi imersi atau bioautografi agar overlay

Pada bioautografi agar overlay, plat KLT hasil elusi senyawa yang akan diuji dilapisi dengan agar yang masih cair yang sudah di inokulasi dengan mikroba uji. Setelah agar mengeras, plat KLT diinokulasi dan diwarnai dengan reagen warna tetrazolium. Penghambatan dapat dideteksi dengan terbentuknya pita (band).

#### 3. Bioautografi Langsung

Bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprotkan mikroba uji pada plat KLT hasil elusi senyawa yang akan diuji atau dengan mencelupkan plat KLT pada suspensi mikroba uji yang telah ditumbuhkan pada medium kalsu yang cocok dan diinkubasi. Zona hambat yang terbentuk divisualisasikan dengan menyemprot plat KLT dengan reagen warna tetrazolium.

Keuntungan metode bioautografi ini diantaranya, sifatnya yang efisien untuk mendeteksi adanya senyawa antimikroba karena letak bercak dapat

ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks sehingga memungkinkan untuk mengisolasi senyawa aktif tersebut (Pratiwi, 2008).

## 2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik pemisahan yang digunakan untuk memisahkan komponen dalam suatu campuran berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi antara fase diam dan fase gerak. Fase diam biasanya berupa lapisan tipis adsorben, seperti silika gel atau alumina, yang dilapiskan pada pelat kaca, aluminium, atau plastik. Fase gerak berupa pelarut atau campuran pelarut yang bergerak melalui aksi kapiler pada pelat tersebut (Sari *et al.*, 2022). Teknik kromatografi yang umum digunakan dibidang farmasi yaitu kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas dan *high performance liquid chromatography* (kromatografi cair kinerja tinggi/KCKT) (Wulandari, 2011).

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas partisi atau gabungannya. KLT merupakan salah satu teknik kromatografi yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif, dan isolasi skala preparatif. Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat, dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (Wulandari, 2011).

Pada KLT, identifikasi awal suatu senyawa didasarkan pada nilai  $R_f$ . Faktor-faktor yang menyebabkan nilai  $R_f$  bervariasi meliputi dimensi dan jenis

ruang, sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya. KLT dapat mengatasi sampel yang terkontaminasi, seluruh kromatogram dapat dievaluasi, mempersingkat proses perlakuan sampel sehingga hemat waktu dan biaya. Kehadiran pengotor atau partikel yang terjerap dalam sorben fase diam tidak jadi masalah, karena lempeng hanya digunakan sekali.

## 2.8 Fitokimia

Fitokimia merupakan cabang ilmu yang mempelajari senyawa kimia alami yang terdapat dalam tumbuhan, terutama metabolit sekunder yang tidak terlibat langsung dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman, tetapi memiliki peran penting dalam mekanisme pertahanan terhadap patogen, herbivora, serta tekanan lingkungan lainnya (Julianto, 2019). Metabolit sekunder yang sering ditemukan antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, dan fenol. Senyawa-senyawa ini diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, seperti aktivitas antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, dan antikanker (Akhmadi *et al.*, 2022).

Proses identifikasi senyawa fitokimia pada tanaman umumnya melibatkan beberapa tahapan, dimulai dengan ekstraksi yang bertujuan untuk memisahkan senyawa bioaktif dari jaringan tanaman menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan pelarut sangat dipengaruhi oleh polaritas senyawa yang ingin diekstraksi, pelarut polar seperti metanol dan etanol lebih efektif untuk mengekstrak flavonoid dan saponin, sedangkan pelarut non-polar seperti heksana lebih cocok untuk mengekstrak minyak atsiri dan beberapa terpenoid (Stefani, 2022).

Setelah ekstraksi, dilakukan analisis kualitatif melalui skrining fitokimia untuk mendeteksi keberadaan kelompok senyawa tertentu dalam ekstrak, seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid. Proses ini biasanya menggunakan uji reaksi warna dengan pereaksi kimia tertentu yang menghasilkan perubahan warna khas bila senyawa tersebut ada dalam ekstrak (Stefani, 2022). Tahap berikutnya adalah analisis kuantitatif untuk menentukan konsentrasi senyawa aktif dalam ekstrak menggunakan teknik seperti spektrofotometri UV-Vis, kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan kromatografi gas (GC).

Analisis ini memberikan gambaran yang lebih tepat mengenai jumlah senyawa bioaktif, yang sangat penting untuk mengevaluasi potensi farmakologis dan terapeutik tanaman tersebut (Stefani, 2022). Skrining fitokimia, yang mencakup serangkaian uji kualitatif, juga melibatkan penggunaan pereaksi seperti *Dragendorf* untuk mendeteksi alkaloid dan *Liebermann-Burchard* untuk mengidentifikasi triterpenoid dan steroid (Akhmadi *et al.*, 2022).