

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga coklat (*Sargassum crassifolium*)

2.1.1 Karakteristik dan Klasifikasi *Sargassum crassifolium*

Sargassum crassifolium merupakan salah satu jenis alga coklat dari kelompok *Phaeophyta*, sering ditemukan di ekosistem laut tropis. Struktur thallus alga ini bervariasi dari bentuk silindris hingga agak gepeng, dengan cabang-cabang yang menyerupai pohon kecil. Alga ini tumbuh di habitat seperti zona intertidal dan subtidal, terutama di perairan dengan arus yang deras dan paparan cahaya matahari yang cukup (Dawes, 1998). Ciri unik dari *Sargassum Crassifolium* yakni keberadaan gelembung udara (*bladder*), yang berfungsi menjaga thallus tetap mengapung di permukaan air sehingga mendapatkan intensitas cahaya optimal untuk fotosintesis (Pakidi & Suwoyo, 2017).

Sargassum crassifolium memiliki kemampuan berkembang biak secara mandiri (*self-fertile*) tanpa memerlukan bantuan organisme lain. Reproduksiya berlangsung pada musim semi, musim panas, hingga awal musim gugur, tergantung pada kondisi suhu air. Pertumbuhan *Sargassum crassifolium* dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, salinitas, intensitas cahaya, pergerakan air, dan tingkat keasaman (pH) lingkungan. Alga ini umumnya ditemukan di perairan tropis dengan kedalaman 0,5 hingga 10 meter, terutama di area yang memiliki arus dan gelombang, dengan suhu air ideal antara 27–30°C. Salinitas optimal bagi pertumbuhannya berkisar antara 3–33,5. Namun, perubahan salinitas yang drastis,

seperti pencampuran air laut dengan air tawar, dapat menghambat pertumbuhan alga karena menciptakan kondisi yang kurang mendukung (Pakidi & Suwoyo, 2017).

Adapun Klasifikasi *Sargassum crassifolium* mencakup

Kingdom	: Chromista
Subkingdom	: Harosa
Infrakingdom	: Heterokonta
Filum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Subkelas	: Fucophycidae
Ordo	: Fucales
Famil	: Sargassaceae
Spesies	: <i>Sargassum crassifolium</i>

(Angradiredja *et al.*, 2006)

Ciri-cirinya meliputi: thallus yang berbentuk agak pipih, permukaannya licin, tetapi bagian batang utamanya cenderung berbentuk bulat dan sedikit kasar. Bagian holdfast berbentuk cakram yang menggaruk permukaan. Cabang pertama tumbuh di bagian pangkal sekitar 1 cm dari holdfast, dengan pola percabangan yang teratur dan berselang-seling. Daunnya berbentuk oval atau memanjang, berukuran sekitar 40 x 10 mm, dan memiliki urat tengah yang jelas. (Tuiyo, 2013)

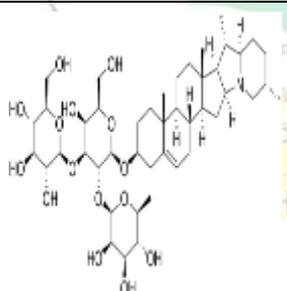


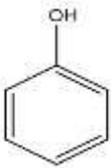
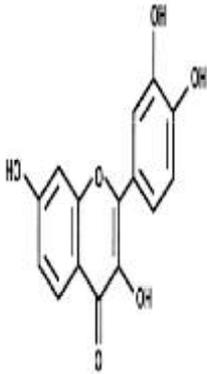
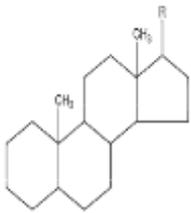
Gambar 1. *Sargassum crassifolium* (Sumber : Pribadi)

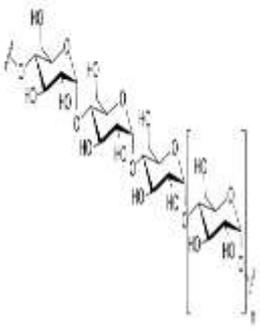
2.1.2 Kandungan Bioaktif *Sargassum Crassifolium*

Sargassum crassifolium sebagai salah satu spesies yang melimpah di perairan Indonesia, memiliki bioaktivitas yang menjanjikan, diantaranya, metabolit sekunder seperti: alkaloid, terpenoid, poliketida, flavonoid, saponin, fenol, dan steroid yang berperan sebagai antivirus, anti bakteri, antiinflamasi, antioksidan, antikanker dan antijamur. Metabolit sekunder yang dapat berperan sebagai antibiotik diantaranya alkaloid, terpenoid, flavonoid, saponin, dan fenol. Oleh karena itu, eksplorasi lebih lanjut terhadap kandungan bioaktif *sargassum crassifolium* memiliki potensi besar dalam pengembangan obat-obatan alami untuk mengatasi berbagai penyakit salah satunya antibakteri. (Albratty *et al.*, 2021)

Tabel 1. Senyawa Bioaktif pada *Sargassum sp.*
(Albratty *et al.*, 2021)

Senyawa	Struktur	Aktivitas	Referensi
Saponin		Mekanisme kerja senyawa saponin yaitu dengan cara mengganggu permeabilitas sel yang menyebabkan senyawa intraseluler seperti sitoplasma akan keluar dan mengakibatkan kematian sel. Hal tersebut diperkuat oleh	Nuria & Faizatun. 2009

Fenol	 <p style="text-align: center;">fenol</p>	<p>memiliki aktivitas antimikroba (MIC = 80 µg/L) terhadap <i>Escherichia coli</i> serta bakteri Gram negatif lainnya seperti <i>Salmonella typhimurium</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>, dengan mekanisme kerja melalui peningkatan permeabilitas membran dan pengikatan DNA yang mengganggu fungsi sel.</p>	Teke <i>et al.</i> , 2011
Tanin		<p>Menunjukkan aktivitas antibakteri spektrum luas khususnya terhadap bakteri gram positif dibanding dengan gram negatif. Aktivitas antibakteri asam tanat mempunyai mekanisme utama inhibitor pompa NorA Efflux sehingga memiliki daya antibakteri</p>	Belhaoueset <i>et al.</i> , 2020
Steroid		<p>Steroid memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap pertumbuhan <i>S. aureus</i> dengan nilai MIC 4 dan 16 µg/mL</p>	Vollaro <i>et al.</i> , 2020

Polisakarida (Fukoidan)		Polisakarida memiliki aktivitas antibakteri tertinggi ($21 \pm 1,0$ mm) terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan aktivitas terendah ($16 \pm 0,53$ mm) tercatat terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .	Palanisamy <i>et al.</i> , 2019
----------------------------	---	---	---------------------------------

2.2 Jamur Endofit

2.2.1 Defisini jamur endofit

Mikroba endofit, yang meliputi bakteri dan jamur, merupakan mikroorganisme yang sebagian besar kehidupannya berada di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan bahaya bagi inangnya. Beberapa jamur endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder dan senyawa bioaktif yang serupa dengan yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya. Jamur endofit mampu melakukan kolonisasi di ruang antar sel atau dalam sel tanaman, dengan akar menjadi lokasi utama kolonisasi yang lebih sistematis dan meluas dibandingkan daun atau batang. Pada stomata, kolonisasi lebih bergantung pada cairan apoplastik inang sebagai sumber nutrisi. Selama proses ini, jamur endofit dapat membentuk hubungan mutualistik (menguntungkan), komensalistik (tidak menguntungkan tetapi tidak merugikan), atau patogenik (merugikan inang), tergantung pada kondisi fisiologis tanaman (Schulz *et al.*, 2002).

2.2.2 Hubungan Jamur Endofit dan inangnya

1. Mutualisme

Dalam hubungan mutualisme, jamur dan tanaman saling menguntungkan. Jamur membantu tanaman meningkatkan toleransi terhadap kekeringan, logam berat, dan serangan patogen (Cui *et al.*, 2021). Selain itu, mereka mendukung pertumbuhan tanaman, efisiensi penyerapan nutrisi, serta sistem pertahanan terhadap herbivora dan hama. Sebagai imbalannya, tanaman menyediakan tempat tinggal, perlindungan, dan nutrisi yang mendukung siklus hidup jamur (Poveda *et al.*, 2020). Interaksi ini juga melibatkan produksi metabolit bioaktif oleh jamur yang membantu meningkatkan sistem kekebalan tanaman dengan mengubah fisiologinya untuk merespons infeksi atau ancaman eksternal. (Alam *et al.*, 2021).

2. Komensalisme

Dalam hubungan komensalisme jamur endofit biasanya hidup dalam jaringan tanaman tanpa memberikan dampak yang besar pada kesehatan tanaman. Dalam kondisi normal, jamur endofit tetap tidak aktif tanpa menimbulkan gejala apa pun (Alam *et al.*, 2021)..

3. Patogenisme

Patogenisme dalam jamur endofit (EF) dan tanaman inang terjadi ketika EF bertransisi dari fase dormansi menjadi patogen aktif. Perubahan ini sering dipicu oleh stres lingkungan, seperti kekeringan, kekurangan nutrisi, atau perubahan fisiologi tanaman, seperti penuaan atau gangguan ontogenetik. Dalam kondisi ini, EF dapat menyebabkan gejala penyakit pada tanaman, seperti nekrosis, klorosis, dan perubahan morfologi (Alam *et al.*, 2021).

Beberapa jenis jamur, seperti *Cladosporium*, *Fusarium*, dan *Colletotrichum*, sering ditemukan dalam keadaan laten di tanaman. Ketika aktif sebagai patogen, jamur ini dapat mengubah bentuk fisik dan fungsi tanaman, yang dapat menyebabkan kerugian besar. Fase dormansi ini sangat penting karena menentukan kapan EF tidak berbahaya dan kapan menjadi patogen yang merugikan. (Alam *et al.*, 2021).

Berbagai jenis jamur endofit juga ditemukan pada *Sargassum sp.* meliputi *Aspergillus terreus* dan *Cunninghamella elegans* pada *Sargassum oligocystum*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, dan *Penicillium rubens* pada *Sargassum polycystum*, serta *Penicillium citrinum* pada *Padina minor* (Royani, 2021).

Tabel 2. Bioaktivitas jamur endofit yang memiliki aktivitas antibakteri

Isolasi jamur	Tanaman inang	Bakteri uji	Diameter Zona Bening (mm)	Referensi
<i>Fusarium solani</i>	<i>Cassia alata</i>	<i>S. aureus</i>	11	(Khan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Fusarium chlamydosporium</i>	<i>Anvillea garcinia</i>	<i>S. aureus</i>	17,4	(Ibrahim <i>et al.</i> , 2018)
<i>Aspergillus sp</i>	<i>Garcinia mangostana L</i>	<i>E. coli</i>	9,91	(Elfina D <i>et al.</i> , 2014)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>Sonneratia alba</i>	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	12,4 11	(Handayani <i>et al.</i> , 2019)

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Sonneratia griffithii</i>	<i>S. aureus</i>	9	(Handayani <i>et al.</i> , 2017)
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Rhizophora apiculata</i>	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	12.07 ± 2.87 14.62 ± 2.28	(Mukhlis <i>et al.</i> , 2018)

2.2.3 Senyawa metabolit sekunder dari Jamur Endofit *Sargassum sp.* Yang memiliki aktivitas antibakteri

Metabolit sekunder yang diproduksi oleh jamur endofit memiliki peran yang penting dalam hubungan simbiotik dengan tanaman inang. Jamur endofit menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang dapat memengaruhi morfologi dan fisiologi tanaman inang, memberikan perlindungan terhadap stres biotik dan abiotik, serta mendukung kelangsungan hidup jamur itu sendiri. Salah satu mekanisme yang digunakan oleh jamur endofit untuk beradaptasi dengan tanaman inang adalah dengan mendegradasi dinding sel tumbuhan inang secara enzimatik, yang memungkinkan infiltrasi, kolonisasi, dan proliferasi jamur di dalam jaringan tumbuhan. Enzim-enzim yang terlibat dalam proses ini, seperti selulase, lakase, pektinase, dan xilanase, berfungsi untuk memecah komponen-komponen dinding sel tumbuhan, memberikan akses yang lebih besar bagi jamur endofit ke jaringan tanaman inang (Chow & Ting, 2019). Setelah dinding sel tanaman terdegradasi, tanaman inang merespons dengan mengaktifkan mekanisme pertahanan, termasuk reseptor pengenalan pola (PRR), yang memberi perlindungan imun bawaan. Namun, agar jamur endofit dapat bertahan hidup di dalam tanaman, mereka harus menghindari deteksi oleh sistem imun tanaman. Salah satu strategi

digunakan adalah dengan memodifikasi kitin atau oligomer kitin menggunakan enzim kitin deasetilase untuk menyamakan keberadaan mereka (Cord-Landwehr *et al.*, 2016).

Banyak jamur endofit yang menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, poliketida, flavonoid, saponin, fenol, asam fenolik, peptida, dan steroid. Metabolit ini tidak hanya berperan dalam melindungi tanaman dari stres lingkungan, tetapi juga memiliki potensi terapeutik bagi manusia. *Sargassum crassifolium* dikenal sebagai sumber utama senyawa bioaktif yang dapat menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang beragam.

Beberapa studi menunjukkan bahwa alga ini mengandung berbagai senyawa bioaktif, termasuk flavonoid, terpenoid, fenol, dan asam lemak yang berkontribusi terhadap aktivitas terapeutik. Senyawa ini telah terbukti memiliki aktivitas sitostatik, antivirus, anthelmintik, antijamur, dan antibakteri. Keunggulan *Sargassum crassifolium* terletak pada kemampuannya untuk diperbarui secara alami dan kandungan senyawa bioaktif yang tinggi. Flavonoid memiliki sifat antibakteri yang kuat, dengan mekanisme kerja menghambat enzim-enzim penting dalam metabolisme bakteri. Oleh karena itu, metabolit sekunder ini menawarkan potensi besar dalam pengembangan agen antibakteri baru, terutama di tengah meningkatnya masalah resistensi antibiotik (Shamsudin *et al.*, 2022).

2.2.4 Identifikasi Jamur Endofit

Ciri makroskopis jamur endofit dapat diamati melalui warna, bentuk, dan pola distribusi koloninya menggunakan pendekatan (Dosch *et al.*, 1980). Selain

pengamatan makroskopis, karakteristik mikroskopis juga diamati untuk mendapatkan identifikasi yang lebih detail. Pengamatan mikroskopis meliputi bentuk konidiofor (bercabang atau tidak), fialid, dan konidia dengan berbagai bentuk, seperti bulat, lonjong, elips, atau memanjang. Warna konidia juga bervariasi, mulai dari terang, hijau pucat, gelap, hitam, hingga kecokelatan. Observasi mikroskopis dilakukan pada hari kelima menggunakan mikroskop binokuler. Untuk mempersiapkan preparat, hifa jamur endofit diambil menggunakan jarum ose, ditempatkan di atas kaca objek, dan ditutup dengan kaca penutup steril. Preparat tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 4×10 untuk memperoleh gambaran yang lebih rinci.

2.3 Antibiotik

Antibiotik merupakan senyawa kimia yang diproduksi oleh mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lainnya (Utami, 2011). Antibiotik dapat dikelompokkan ke dalam tiga kategori utama berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu: antibiotik yang mempengaruhi dinding sel bakteri, antibiotik yang menghambat sintesis protein baru, dan antibiotik yang menargetkan DNA atau proses replikasi DNA (Hauser, 2018).

2.3.1 Mekanisme Kerja Antibiotik

1. Menghambat Sintesis Dinding Sel

Dinding sel bakteri adalah struktur makromolekul elastis yang penting untuk menjaga bentuk sel dan melindungi bakteri dari lisis akibat tekanan osmotik intraseluler yang tinggi. Peptidoglikan, komponen utama dinding sel, tersusun dari

rantai panjang *N-acetylglucosamine* (GlcNAc) dan N-acetylmuramic acid (MurNAc) yang terhubung silang dengan peptida pendek melalui enzim transpeptidase dan karboksipeptidase, yang juga dikenal sebagai *Penicillin-binding protein* (PBP). Dinding sel ini menjadi target utama bagi antibiotik seperti β -laktam dan glikopeptida. Antibiotik yang bekerja dengan mekanisme ini meliputi golongan β -laktam (penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam) serta glikopeptida (vankomisin dan teikoplanin) (Hauser, 2018).

2. Merusak Fungsi Membran Sel

Bakteri dilapisi oleh membran plasma dan dinding sel, di mana dinding sel utamanya berfungsi sebagai pelindung terhadap tekanan internal. Dinding sel bakteri terbuat dari peptidoglikan yang berada di luar membran sitoplasma dan berperan sebagai penghalang permeabilitas, kecuali untuk molekul kecil. Polimiksin, antibiotik bermuatan positif, mampu menarik bakteri bermuatan negatif karena adanya peptidoglikan dan lipopolisakarida (LPS) pada membran luar bakteri. Polimiksin berikatan dengan membran sel bakteri, meningkatkan permeabilitasnya, dan merusak struktur dinding sel. Kerusakan ini menyebabkan ketidakseimbangan osmotik, keluarnya molekul sel, masuknya cairan ke dalam sel, gangguan respirasi sel, dan akhirnya kematian sel bakteri (Hauser, 2018).

3. Menghambat Sintesis Protein

Proses sintesis protein merupakan mekanisme biologis kompleks yang sangat penting bagi sel, yang melibatkan transkripsi dan translasi. Sintesis protein terdiri dari empat tahap, yaitu inisiasi, elongasi, terminasi, dan recycling. Antibiotik yang menghambat sintesis protein memanfaatkan perbedaan struktural antara ribosom

prokariotik dan eukariotik, sehingga secara selektif menghambat pertumbuhan bakteri, khususnya pada subunit 30S dan 50S ribosom 70S. Antibiotik yang bekerja pada subunit 30S meliputi makrolid, aminoglikosida, dan tetrasiklin. Antibiotik ini memiliki gugus karbohidrat bermuatan positif yang memungkinkan difusi ke dalam sel bakteri melalui interaksi dengan membran plasma bermuatan negatif, mengakibatkan mistranslasi dalam sintesis protein. Sementara itu, antibiotik yang menargetkan subunit 50S termasuk kloramfenikol (Hauser, 2018).

4. Menghambat Sintesis Asam Nukleat

Sintesis DNA pada bakteri memerlukan enzim topoisomerase, yang dibagi menjadi tipe IA (Topo I dan Topo III) dan tipe IIA (DNA girase dan Topo IV). Kekurangan enzim ini akan menyebabkan pembentukan DNA yang tidak normal. Antibiotik fluoroquinolon, dengan spektrum luas, efektif melawan bakteri gram positif, gram negatif, dan anaerob. Obat ini menghambat enzim DNA girase pada bakteri gram negatif, yang berperan dalam inisiasi replikasi DNA, serta menghambat enzim topoisomerase IV pada bakteri gram positif, yang diperlukan dalam proses segregasi sel anak (dekatenasi) (Hauser, 2018).

5. Menghambat Jalur Metabolisme/Enzim Bakteri

Sel eukariotik memperoleh folat melalui sistem transpor aktif, sedangkan mikroorganisme mensintesis folat melalui jalur *de novo*. Jalur biosintesis folat ini menjadi target potensial dalam terapi antibiotik. Sulfonamid bekerja dengan menghambat para-aminobenzoic acid (PABA), komponen penting dalam sintesis folat bakteri. Sulfonamid memiliki struktur serupa dengan PABA dan bertindak sebagai penghambat kompetitif, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri

dengan mencegah penggunaan folat. Selain itu, antibiotik golongan diaminopiridin, seperti trimetoprim, bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase (DHFR), enzim terakhir dalam jalur sintesis folat (Hauser, 2018).

Antibiotik merupakan senyawa kimia yang diproduksi oleh mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lainnya (Utami, 2011). Antibiotik dapat dikelompokkan ke dalam tiga kategori utama berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu: antibiotik yang mempengaruhi dinding sel bakteri, antibiotik yang menghambat sintesis protein baru, dan antibiotik yang menargetkan DNA atau proses replikasi DNA (Hauser, 2018).

2.3.2 Mekanisme Resistensi Antibiotik

Situasi yang dikenal sebagai resistensi antibiotik terjadi ketika efek antibiotik tidak lagi dirasakan oleh bakteri atau mikroorganisme lain dalam tubuh manusia. Bakteri dapat menunjukkan dua jenis resistensi antibiotik, yaitu resistensi intrinsik dan resistensi yang didapat. Resistensi intrinsik adalah kemampuan alami yang dimiliki bakteri berdasarkan struktur atau fungsi bawaan mereka (Cox & Wright 2013). Sebaliknya, resistensi yang didapat terjadi karena perubahan genom bakteri, baik melalui mutasi gen target antibiotik maupun perolehan DNA dari luar. DNA eksogen ini dapat diperoleh melalui transfer horizontal menggunakan plasmid, bakteriofag, transposon, atau elemen genetik bergerak lainnya (Woodford & Ellington 2007).

Hingga saat ini, telah diidentifikasi berbagai mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik, seperti modifikasi target antibiotik, perubahan permeabilitas

membran sel, pengeluaran aktif antibiotik dari sel melalui sistem efluks, dan inaktivasi antibiotik oleh enzim (Peterson & Kaur 2018). Salah satu mekanisme utama adalah modifikasi target antibiotik, yang sering ditemukan pada bakteri yang resistan terhadap β -laktam. Contohnya, bakteri *Staphylococcus aureus* resisten methicillin (MRSA) mengekspresikan protein PBP2a yang telah dimodifikasi. Protein ini memiliki afinitas rendah terhadap β -laktam tetapi tetap dapat menjalankan fungsi katalitik untuk sintesis dinding sel (Hawkey, 1998).

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen-komponen dalam campuran dengan menggunakan pelarut yang tepat. Proses ini dihentikan ketika terjadi keseimbangan antara konsentrasi senyawa di dalam pelarut dan dalam sel tanaman. Setelah ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan dari sampel melalui penyaringan. Ekstrak yang diperoleh pada tahap awal sulit untuk dipisahkan menjadi senyawa tunggal dengan menggunakan satu teknik pemisahan. Oleh karena itu, ekstrak tersebut perlu dipisahkan lebih lanjut menjadi beberapa fraksi yang memiliki kesamaan dalam polaritas dan ukuran molekulnya.

2.4.1 Ekstraksi dingin

Untuk melindungi bahan kimia yang sensitif terhadap panas, ekstraksi dingin merupakan teknik ekstraksi yang tidak memerlukan pemanasan. Teknik ini dapat mengekstrak berbagai bahan kimia, meskipun beberapa di antaranya hanya larut sedikit pada suhu kamar (Puspitasari & Proyogo, 2017). Ekstraksi dingin memiliki beberapa keuntungan, seperti prosedur yang mudah, penggunaan peralatan dasar, dan biaya yang cukup murah. Namun, metode ini memiliki

kekurangan, yaitu waktu pemrosesan yang lama dan penggunaan pelarut yang kurang efektif. Salah satu jenis ekstraksi dingin yang populer adalah maserasi yaitu, perendaman simplisia dalam pelarut dan biasanya digunakan pada bahan bertekstur lunak seperti daun dan bunga (Kiswandono, 2017).

2.4.1.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana yang sering digunakan untuk mengekstrak bahan-bahan. Prinsip dasar ekstraksi maserasi adalah kesetimbangan konsentrasi antara pelarut dan senyawa yang ada dalam sel tanaman. Proses ini melibatkan perendaman material tanaman dalam pelarut yang sesuai, yang dilakukan dalam wadah tertutup pada suhu ruangan. Ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan konsentrasi antara senyawa dalam pelarut dan dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan dari sampel dengan cara penyaringan (Triyanti *et al.*, 2025).

2.4.1.2 Perkolasi

Proses ekstraksi dilakukan pada suhu ruang dengan menggunakan pelarut segar yang diganti secara berkala. Prinsip kerja metode perkolasi melibatkan pemasukan bahan simplisia ke dalam alat perkolator, di mana pelarut dialirkan secara kontinu dari bagian atas melewati simplisia. Proses ini memungkinkan senyawa terlarut diekstraksi dan dialirkan ke bagian bawah untuk kemudian dikumpulkan (Tutik *et al.*, 2022)

2.4.1.3 Fermentasi

Beberapa metode fermentasi dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme, khususnya fungi, seperti yang dijelaskan oleh Strainer (1982),

yaitu:

1. Fermentasi Permukaan (Surface Culture)

Pada metode ini, spora atau miselium jamur ditanam pada permukaan media cair. Miselium akan tumbuh membentuk koloni di bagian atas media. Metode ini tergolong sederhana dan hemat biaya, namun memiliki kekurangan, seperti pertumbuhan miselium yang tidak merata. Miselium yang berada di permukaan mendapat lebih banyak oksigen (aerob), sedangkan yang berada lebih dalam mendapat lebih sedikit oksigen, sehingga pertumbuhannya tidak seragam.

2. Fermentasi dengan Pengocokan (Shaker Culture)

Dalam metode ini, media yang telah diinokulasi spora atau miselium dikocok secara terus-menerus. Hal ini menyebabkan pertumbuhan jamur menyebar merata ke seluruh bagian media. Keunggulan metode ini adalah efisiensi penggunaan nutrisi media yang lebih baik, pertumbuhan lebih cepat, dan hasil yang lebih seragam dibandingkan metode fermentasi permukaan.

3. Fermentasi dengan Pengadukan dan Aerasi (Stirred Aerated Culture)

Metode ini merupakan pengembangan dari fermentasi dengan pengocokan. Di sini digunakan pengaduk dan suplai udara (aerasi) secara aktif ke dalam media. Kombinasi pengadukan dan oksigenasi ini sangat efektif untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dari fungi, terutama dalam skala besar. Metode ini dianggap sebagai salah satu metode paling efisien dalam fermentasi industri.

4. Fermentasi Berkelanjutan (Continuous Culture)

Pada metode ini, media dalam fermentor secara berkala diganti dengan media baru, sehingga proses fermentasi dapat terus berlangsung tanpa harus dihentikan.

Dengan cara ini, produksi metabolit atau biomassa dapat dipertahankan secara konsisten dalam jangka waktu lama.

2.4.2 Ekstraksi Panas

Metode ini menggunakan panas untuk membantu proses ekstraksi. Penggunaan panas dapat mempercepat pengambilan zat aktif dibandingkan dengan metode tanpa pemanasan. Namun, cara ini hanya cocok untuk mengekstrak senyawa yang tidak rusak oleh panas. Ada beberapa teknik ekstraksi yang menggunakan pemanasan, yaitu:

2.4.2.1 Refluks

Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada suhu didihnya selama beberapa waktu. Teknik ini efisien karena menggunakan kondensor untuk mendinginkan uap pelarut, sehingga pelarut bisa dipakai berulang kali. Proses refluks biasanya berlangsung sekitar 4 jam dan diulang 3 hingga 5 kali pada residu pertama untuk mendapatkan ekstraksi yang maksimal. Metode ini cocok digunakan untuk bahan yang tahan panas dan memiliki tekstur keras, seperti akar, batang, buah, biji, dan tanaman herbal (Depkes RI, 2000).

2.4.2.2 Soxhletasi

Soxhletasi merupakan metode ekstraksi yang menggunakan alat soxhlet. Prinsip dari metode ini melibatkan pemanasan dan perendaman sampel, yang menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel. Metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan larut ke dalam pelarut organik. Larutan yang terbentuk kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara, yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan

dan mengumpulkannya kembali (Febryanto, 2017).

2.4.2.3 Infusa

Infusa merupakan metode ekstraksi yang menggunakan pemanasan dengan pelarut air untuk memperoleh zat aktif yang bersifat polar secara optimal. Pembuatan infusa dilakukan dengan cara merebus bahan dalam air pada suhu 90°C selama 15 menit untuk mengekstraksi zat aktifnya (Hasanah, *et al.*, 2023).

2.4.2.4 Digesti

Digesti merupakan metode ekstraksi yang termasuk dalam kategori maserasi kinetik, yang dilakukan dengan pemanasan ringan pada suhu sekitar 40°C hingga 50°C. Penerapan pemanasan ringan dalam proses ini dapat meningkatkan kelarutan senyawa fenolik ke dalam pelarut dan mempercepat difusi zat aktif, sehingga proses ekstraksi berlangsung lebih efisien dan optimal (Uzwatania & Ma'ruf 2024).

2.4.2.5 Dekoktasi

Dekoktasi merupakan metode ekstraksi yang mirip dengan infusa, namun dilakukan dengan waktu yang lebih lama dan suhu mencapai titik didih air selama sekitar 30 menit. Pada proses ini, rasio awal bahan mentah terhadap air biasanya tetap, misalnya 1:4 atau 1:16. Selama perebusan, volume pelarut dikurangi hingga seperempat dari volume awal. Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak yang telah terkonsentrasi disaring dan dapat langsung digunakan atau diproses lebih lanjut (Handa, 2008).

2.5 Metode Pengujian Aktivitas Antibiotik

Metode penyebaran/difusi bekerja dengan cara menyebarkan senyawa

antimikroba (seperti antibiotik) ke dalam media padat yang sebelumnya sudah ditanami mikroba uji (seperti bakteri patogen). Ada dua cara umum yang digunakan dalam metode ini, yaitu dengan cakram kertas (paper disk) atau dengan membuat sumuran (well). Aktivitas antimikroba diukur berdasarkan seberapa jauh senyawa tersebut dapat menyebar dalam media agar yang sudah berisi mikroba. Hasil pengamatan ditunjukkan dengan muncul atau tidaknya area bening (zona hambat) di sekitar sumber senyawa antimikroba setelah inkubasi selama waktu tertentu.

2.5.1 Metode difusi sumur

Dilakukan dengan membuat lubang kecil (sumur) pada media agar yang sudah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Kemudian, larutan agen antibakteri dimasukkan ke dalam sumur tersebut. Setelah media diinkubasi, akan terlihat area bening di sekitar sumur jika agen antibakteri berhasil menghambat pertumbuhan mikroba. Luasnya area bening ini diukur untuk menilai efektivitas antimikroba bahan uji (Kundera & Abdurahman 2017).

2.5.2 Metode Difusi Cakram

Metode disk diffusion (difusi cakram) dilakukan dengan menempatkan cakram kertas yang sudah direndam dalam larutan antimikroba pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Zat antimikroba akan menyebar dari cakram ke dalam media agar. Setelah proses inkubasi, zona bening di sekitar cakram diukur untuk menilai seberapa efektif bahan antimikroba tersebut dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Januarista *et al.*, 2023)

2.5.3 Dilusi

Metode dilusi terbagi menjadi dua jenis, yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Metode dilusi cair digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), sedangkan metode dilusi padat bertujuan mengukur Kadar Bakterisidal Minimum (KBM). Pada metode dilusi cair, dilakukan serangkaian pengenceran agen antimikroba dalam media cair yang kemudian ditambahkan mikroorganisme uji. Sementara itu, metode dilusi padat dilakukan dengan menanam mikroba uji pada media agar yang telah dicampur dengan agen antimikroba. Kelebihan metode dilusi ini adalah memungkinkan penggunaan satu konsentrasi agen antimikroba untuk menguji beberapa mikroba sekaligus (Pratiwi, 2008).

2.5.4 Bioautografi

Bioautografi merupakan teknik analisis yang mengombinasikan metode kromatografi dengan pengujian biologis guna mendeteksi keberadaan senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba. Pada prosedur ini, ekstrak suatu sampel dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), kemudian kromatogram yang terbentuk diuji terhadap mikroorganisme sasaran. Adanya zona hambat pada kromatogram menandakan lokasi senyawa aktif yang berpotensi sebagai agen antimikroba. Teknik ini memungkinkan identifikasi langsung senyawa bioaktif dalam campuran kompleks tanpa memerlukan proses isolasi terlebih dahulu (Saepudin *et al.*, 2024)

2.6 Bakteri Uji

Bakteri merupakan mikroorganisme yang terdiri dari satu sel, dengan ukuran panjang antara 0,5 hingga 10 mikrometer (μ) dan lebar antara 0,5 hingga 2,5 mikrometer (μ). Bakteri tidak memiliki inti sel sejati, artinya inti selnya tidak

terbungkus oleh membran inti. Sebagai gantinya, bahan genetiknya berupa molekul DNA tunggal yang berada langsung di dalam sitoplasma. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menguraikan senyawa hidrokarbon dan menggunakannya sebagai sumber karbon serta energi yang diperlukan untuk proses pertumbuhannya (Puspitasari *et al.*, 2020).

2.6.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat dengan ukuran antara 0,7 hingga 1,2 μm . Bakteri ini biasanya berkumpul dalam bentuk yang tidak teratur, seperti buah anggur. *S. aureus* tidak menghasilkan spora, bisa tumbuh baik dengan atau tanpa oksigen, dan tidak dapat bergerak. Suhu terbaik untuk pertumbuhannya adalah 37°C, tetapi pada suhu kamar (20°C - 25°C), bakteri ini tetap dapat menghasilkan pigmen. Pigmen yang dihasilkan bervariasi dari abu-abu hingga kuning keemasan, dengan koloni yang berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menunjukkan bahwa *S. aureus* memiliki lapisan tipis dari polisakarida yang membantu meningkatkan kekuatan patogeniknya (Karimela *et al.*, 2017).

Karena kemampuannya memproduksi enzim koagulase, *S. aureus* merupakan spesies bakteri yang paling invasif dan unik. Menurut Husna (2018), sekitar 40% individu sehat memiliki bakteri ini, terutama di hidung, kulit, ketiak, atau perineum. Karena *S. aureus* dapat membelah dan berpindah ke jaringan tubuh dengan memproduksi berbagai zat kimia ekstraseluler, termasuk toksin dan enzim, bakteri ini dapat menyebabkan penyakit (Brooks, G. F. *et al.*, 2005). Lebih jauh lagi, *S. aureus* memiliki sejumlah kemampuan, seperti kemampuan untuk melekat pada

sel inang menggunakan protein permukaan, memecah protein menggunakan enzim, dan merusak sel inang dengan toksin (Robbins & Kumar, 2009). *S. aureus* unik karena mengandung beberapa plasmid yang mengkode protein penting untuk resistensi terhadap antibiotik dan lainnya. Protein permukaan dalam struktur *S. aureus* membantu kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang. Protein ini, yang membentuk matriks ekstraseluler pada permukaan epitel dan endotelium, meliputi fibronektin dan laminin. Selain itu, beberapa galur mengandung protein yang membantu perlekatan bakteri pada darah dan jaringan dengan mengikat fibrin dan fibrinogen. Mayoritas *S. aureus* juga mengandung adhesin yang dapat menempel pada kolagen dan protein yang dapat mengikat fibronektin dan fibrinogen. Agar kuman dapat melekat pada jaringan tubuh, kontak ini sangat penting (Radji, 2011).

2.6.2 Bakteri *Escherichia coli*

Famili bakteri *kolidiform* *Enterobacteriaceae* mencakup *Escherichia E. coli*, yang tumbuh dan berkembang biak di saluran pencernaan. Menurut Yang dan Wang (2014), *E. coli* adalah bakteri anaerob fakultatif Gram-negatif berbentuk batang yang dapat bertahan hidup dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini juga tidak menghasilkan spora dan merupakan komponen normal flora usus mamalia. Strain *E. coli* tertentu baik untuk manusia karena dapat menghentikan pertumbuhan kuman penyebab penyakit di sistem pencernaan. Namun, strain *E. coli* lain, yang awalnya diidentifikasi sebagai penyebab diare pada tahun 1935, juga dapat berbahaya (Manning, 2010). ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, EAEC, dan ETEC adalah enam jenis *E. coli* penyebab diare, yang juga dikenal sebagai *E. coli* diaregenik

(DEC).

Berdasarkan cara bakteri ini berinteraksi dengan inang manusia, *E. coli* diklasifikasikan menjadi tiga kelompok utama: patogen non-patogen (komensal), patogen saluran pencernaan, dan patogen ekstraintestinal (di luar saluran pencernaan). Keberadaan bakteri ini sering dikaitkan dengan kontaminasi dari kotoran (feses), karena *E. coli* biasanya ditemukan di usus manusia dan hewan). Oleh karena itu, keberadaan bakteri ini dalam makanan atau air menandakan prosedur pengolahan yang bersentuhan dengan kotoran. Jika *E. Coli* berhasil menyusup ke dalam tubuh inang, beradaptasi, dan berkembang biak di sana, bakteri tersebut dapat menyerang sistem imun dan akhirnya menimbulkan gejala penyakit. Seperti mikroorganisme patogen lainnya, proses patogenesis ini terjadi dalam beberapa tahap. Tahap-tahap ini meliputi kolonisasi sel permukaan usus (sel mukosa), pembelahan sel, kematian sel usus, masuknya sel usus dan aliran darah, perlekatan pada organ target, dan akhirnya kerusakan organ (Kaper *et al.* 2004).

2.7 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan teknik analisis yang bertujuan untuk mendeteksi serta mengidentifikasi senyawa kimia dalam sampel tumbuhan atau hewan, khususnya metabolit sekunder. Teknik ini memiliki signifikansi dalam bidang farmakologi karena membantu dalam penemuan senyawa bioaktif yang berpotensi dikembangkan sebagai obat. Setiap pengujian fitokimia menggunakan pereaksi tertentu yang bereaksi dengan kelompok senyawa spesifik, menghasilkan perubahan warna atau pembentukan endapan sebagai indikasi keberadaan senyawa tersebut.

Berbagai metode uji fitokimia yang sering digunakan mencakup uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolat, serta triterpenoid dan steroid. Deteksi alkaloid dapat dilakukan dengan beberapa pereaksi, seperti pereaksi Mayer yang mengandung HgCl_2 dan KI dengan indikator positif berupa endapan putih, pereaksi Wagner yang terdiri dari I_2 dan KI dengan endapan berwarna coklat, serta pereaksi Dragendorff yang mengandung $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ dan KI, di mana hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah jingga atau coklat muda. Sementara itu, flavonoid dapat dideteksi menggunakan pereaksi Wilstater dengan penambahan HCl dan serbuk magnesium yang memunculkan perubahan warna, atau menggunakan pereaksi Smith-Metcalf yang terdiri dari campuran asam sulfat dan formaldehida yang juga menghasilkan perubahan warna sebagai indikasi keberadaan flavonoid.

Uji saponin dilakukan dengan cara mengocok ekstrak dalam air panas, di mana terbentuknya busa stabil menjadi tanda adanya senyawa saponin. Untuk mendeteksi tanin, digunakan pereaksi seperti FeCl_3 1% atau Pb asetat yang menyebabkan perubahan warna atau pembentukan endapan sebagai indikasi positif. Selanjutnya, uji fenolat menggunakan FeCl_3 10%, yang menghasilkan perubahan warna sebagai tanda keberadaan senyawa fenolik. Adapun uji triterpenoid dan steroid dapat dilakukan dengan metode Liebermann-Burchard, yang menggunakan pereaksi asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat, di mana perubahan warna menjadi hijau atau ungu menunjukkan keberadaan senyawa tersebut. Faktor-faktor seperti konsentrasi pereaksi dan kondisi lingkungan selama pengujian sangat berpengaruh terhadap hasil yang diperoleh, sehingga diperlukan penerapan prosedur

laboratorium yang tepat untuk memastikan akurasi analisis (Widyaningsih, *et al.*, 2016)

