

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tumbuhan Biwa (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.)

2.1.1. Taksonomi dan Morfologi Biwa

Taksonomi tumbuhan Biwa (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) menurut Ibrahim (2021; Hasil identifikasi laboratorium ANDA) sebagai berikut:



Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Viridaeplantae</i>
Divisi	: <i>Tracheophyta</i>
Subdivisi	: <i>Spermatophytina</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Rosales</i>
Famili	: <i>Rosaceae</i>
Genus	: <i>Eriobotrya</i>
Spesies	: <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.

Di Indonesia, tumbuhan *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. dikenal dengan nama biwa. *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. merupakan pohon buah hijau berukuran sedang yang termasuk dalam famili *Rosaceae* dan dikenal dengan nama *loquat*. Tanaman ini telah dibudidayakan selama lebih dari dua ribu tahun, berasal dari Jepang dan Tiongkok, serta kini ditanam secara komersial lebih dari 30 negara, termasuk Jepang, Irak, Turki, Spanyol, Italia, dan Suriah. Biwa memiliki berbagai

sebutan lokal, antara lain dalam bahasa Inggris disebut *loquat*, bahasa Arab *beshmelah*, bahasa Jerman *loquate*, bahasa Prancis *bibassier*, serta dalam bahasa Mandarin dikenal sebagai *luju* atau *biba*. Pohon ini dapat tumbuh hingga lebih dari 6 meter, dengan daun tebal berbentuk oval lonjong dan selalu hijau. Buahnya berwarna kuning hingga jingga, berbentuk menyerupai buah pir, berukuran sekitar 4 sentimeter, berisi 3 hingga 4 biji, serta memiliki rasa manis (Ibrahim, 2021).

Daun biwa umumnya bertepi bergerigi, berwarna hijau tua hingga hijau muda, bertekstur keras, serta berbulu halus pada fase muda yang kemudian hanya tersisa di bagian bawah saat dewasa. Batang berukuran kecil, dapat berpermukaan kasar atau halus, lunak dan berbulu pada fase muda, lalu mengeras dan licin tanpa bulu ketika dewasa. Bunganya berbentuk majemuk, berwarna putih, dengan 5–10 helai mahkota, berfungsi sebagai organ penyerbukan dan pembuahan. Buah berbentuk bulat berdiameter 3–5 cm, berdaging bening kenyal, berwarna hijau dan berbulu saat muda, kemudian berubah menjadi kuning dengan bulu yang berkurang ketika matang (Pinem, 2017).

Tabel 1. Morfologi Tumbuhan Biwa

Morfologi Biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.)		Keterangan
		Pohon biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.) (Surya <i>et al.</i> , 2020).

	Daun biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.) (Pinem, 2017).
  A B	Batang biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.) (Pinem, 2017).
	Bunga biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.) (Pinem, 2017).
	Buah biwa (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.) (Ibrahim, 2021).

2.1.2. Kandungan Kimia Tumbuhan Biwa

Eriobotrya japonica merupakan tanaman yang kaya akan fitokimia, antara lain fenol, alkaloid, glikosida jantung, flavonoid, mukilase, getah, serta fitosterol. Daun dan buahnya mengandung berbagai senyawa aktif seperti vitamin, flavonoid, fenol, karotenoid, dan senyawa bioaktif lainnya. Buah yang telah matang diketahui memiliki senyawa fenolik utama, meliputi kafein, asam 4-O-kafeoilkuinat, asam neoklorogenat, asam klorogenat, asam 4-hidroksibenzoat, asam protokatekuat, asam okoumarat, asam elagat, serta asam ferulat (Syahputra *et al.*, 2025). Beberapa penelitian melaporkan aktivitas antibakteri pada berbagai senyawa diatas, seperti asam klorogenat memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA NCTC 13277 (256 µg/mL) (Bisso *et al.*, 2025), asam elagat memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA (24.2 ± 1.54 mm) dan *E. coli* (23.6 ± 1.57 mm) (Aljassim *et al.*, 2022), dan asam protokatekuat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* (512 µg/mL) (Miklasinka *et al.*, 2022).

Sementara itu, biji biwa mengandung tanin, pati, mineral, dan protein dalam jumlah signifikan. Bagian bunga *Eriobotrya japonica* merupakan sumber yang baik dari flavonoid dan senyawa fenolik, sedangkan daunnya mengandung asam fenolik, flavonoid, tanin, seskuiterpen, triterpen, serta glikosida megastigmane. Selain itu, asam oleanolat dan asam ursolat juga teridentifikasi pada bunga maupun daun, dengan variasi kadar yang dipengaruhi oleh jenis kultivar serta tahap perkembangan tanaman (Syahputra *et al.*, 2025).

2.1.3. Bioaktivitas Tumbuhan Biwa

Tabel 2. Aktivitas Farmakologis Tumbuhan Biwa

Asal	Aktivitas	KHM / DH	Referensi
Ekstrak metanol daun biwa	Antibakteri MRSA KCTC 1927	64µg/mL	Yu <i>et al.</i> , 2019
	Antibakteri MSSA 40510	64µg/mL	
	Antibakteri MSSA 40511	32µg/mL	
Ekstrak etanol 20% biwa	Antibakteri <i>S. aureus</i>	9.60 mm	Asahan <i>et al.</i> , 2020
Ekstrak metanol biwa	Antibakteri <i>S. aureus</i>	250 µg/mL	Rashed <i>et al.</i> , 2013
	Antibakteri <i>E. coli</i>	125 µg/mL	
Ekstrak daun biwa	Antibakteri <i>E. coli</i>	24 mm	Nazir <i>et al.</i> , 2021
		215 µg/mL	
	Antibakteri <i>S. aureus</i>	35 mm	
		197 µg/mL	
Ekstrak etanol biwa	Antibakteri <i>E. coli</i>	1,26 ± 1,15 mm	Juventino <i>et al.</i> , 2024

Keterangan : KHM / Konsentrasi Hambat Minimum (mm)
DH / Diameter Hambat (µg/mL)

2.2. Jamur Endofit

2.2.1. Definisi Jamur Endofit

Endofit merupakan mikroorganisme yang menjalani seluruh atau sebagian siklus hidupnya di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek merugikan bagi inangnya. Mikroba endofit diketahui mampu mensintesis senyawa bioaktif di dalam jaringan tanaman yang dapat memberikan berbagai manfaat fisiologis bagi tanaman

tersebut. Endofit berasosiasi dengan jaringan tanaman inang dalam suatu hubungan simbiotik, di mana mikroba memperoleh keuntungan berupa perlindungan struktural serta ketersediaan senyawa metabolik yang melimpah dari tanaman inangnya (Omomowo *et al.*, 2023).

Mikroba endofit adalah mikroorganisme baik bakteri maupun jamur yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit pada inangnya. Keberadaan mikroba endofit dalam jaringan tanaman sering kali memberikan manfaat bagi inang mereka, seperti meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen, meningkatkan penyerapan nutrisi, dan bahkan memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmakologis (Rahman, 2025).

2.2.2. Hubungan Jamur Endofit dengan Inangnya

Hubungan simbiotik antara jamur endofit dan tanaman inang telah mengalami perkembangan yang kompleks. Interaksi ini melibatkan proses pengenalan, seleksi, serta pembentukan hubungan yang stabil dan saling menguntungkan bagi keduanya. Jamur endofit mampu hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit, baik selama sebagian maupun seluruh siklus hidupnya. Kehadiran jamur endofit dapat memengaruhi fisiologi dan metabolisme tanaman, sehingga berkontribusi terhadap peningkatan pertumbuhan, perkembangan, serta ketahanan tanaman terhadap berbagai jenis stres lingkungan. Sebaliknya, ketersediaan nutrisi bagi jamur endofit bergantung pada kondisi internal tanaman inangnya, yang berperan dalam membentuk komunitas endofit secara keseluruhan (Ji *et al.*, 2022).

Dalam jangka panjang, jamur endofit dan tanaman inang membentuk suatu sistem kerja sama yang disebut “holobiont,” di mana keduanya bereaksi bersama terhadap tekanan biotik maupun abiotik. Oleh karena itu, jamur endofit sering dianggap sebagai bagian tambahan dari organ tanaman, dan gen yang dimilikinya menjadi bagian penting dari keseluruhan sistem genetik tanaman. Memahami proses pembentukan serta mekanisme interaksi dalam sistem “holobiont” ini menjadi langkah penting untuk memanfaatkan hubungan antara tanaman dan endofit guna meningkatkan kesehatan dan produktivitas tanaman (Ji *et al.*, 2022).

2.2.3. Identifikasi Jamur Endofit

1. Identifikasi Makroskopis

Ciri-ciri makroskopis yang diamati meliputi warna koloni, keberadaan pola pertumbuhan berupa garis radial atau konsentris, adanya eksudat (cairan yang dikeluarkan koloni), tekstur atau permukaan koloni, serta ukuran diameter koloni. Pengamatan makroskopis ini bertujuan untuk mengetahui karakter visual jamur, seperti warna, bentuk, dan pola pertumbuhan yang dapat membantu dalam proses identifikasi spesies (Nurfitri *et al.*, 2024).

2. Identifikasi Mikroskopis

Ciri-ciri mikroskopis yang diamati mencakup bentuk dan ukuran konidia (spora aseksual), struktur dan warna hifa (benang penyusun tubuh jamur), keberadaan sekat (septa) pada hifa, serta struktur pendukung seperti vesikel dan konidiofor. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengetahui karakter morfologi seluler jamur yang tidak

dapat dilihat dengan mata telanjang, sehingga hasilnya dapat digunakan sebagai dasar dalam penentuan jenis dan klasifikasi jamur secara lebih akurat (Nurfitri *et al.*, 2024).

2.3. Resistensi Bakteri

Kemampuan mikroorganisme untuk menahan atau menghambat efek kerja agen antimikroba, suatu kondisi yang terjadi ketika antibiotik kehilangan efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri disebut resistensi antibiotik. Peningkatan penggunaan antibiotik di sektor kesehatan maupun pertanian telah berkontribusi terhadap munculnya fenomena resistensi antibiotik secara global. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional dapat menimbulkan berbagai permasalahan, termasuk menurunnya efektivitas terapi dan meningkatnya biaya pengobatan. Resistensi ini ditemukan pada berbagai jenis mikroorganisme dengan prevalensi tinggi yang berpotensi mengancam kesehatan manusia. Secara umum, resistensi antibiotik dapat timbul akibat mutasi pada genom bakteri yang telah ada sebelumnya, sementara pengaruh faktor lingkungan eksternal terhadap terjadinya mutasi bersifat lebih kecil (Putri *et al.*, 2023).

2.4. Bakteri Uji

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang umumnya bersifat uniseluler dan tidak memiliki membran inti sel (prokariot). Sebagian besar bakteri memiliki dinding sel, namun tidak mengandung klorofil sehingga tidak dapat melakukan fotosintesis seperti tumbuhan. Meskipun berukuran sangat kecil, bakteri memiliki peranan penting dalam kehidupan. Beberapa jenis bakteri bermanfaat dan

banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang, khususnya industri pangan, misalnya dalam proses fermentasi. Namun demikian, terdapat pula jenis bakteri yang bersifat merugikan, karena dapat menyebabkan pembusukan bahan makanan serta menimbulkan berbagai infeksi dan penyakit pada manusia (Febriza dan Adrian, 2021).

Uji biokimia pewarnaan Gram merupakan salah satu metode yang efektif untuk mengklasifikasikan bakteri. Teknik ini didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang menyebabkan bakteri memberikan hasil pewarnaan yang berbeda. Berdasarkan hasil pewarnaan, bakteri dibedakan menjadi dua kelompok utama, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu karena memiliki lapisan peptidoglikan tebal dengan ketebalan sekitar 20–80 nm. Sebaliknya, bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis, yaitu sekitar 5–10 nm, dan tersusun atas lipoprotein, membran luar, serta polisakarida sebagai komponen utamanya (Holderman *et al.*, 2017).

2.4.1. *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Jawetz *et al.*, (2007):

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

Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan jenis bakteri gram negatif yang termasuk dalam flora normal pada saluran pencernaan manusia dan hewan ternak. Namun, beberapa strain *E. coli* bersifat patogen dan dapat menyebabkan infeksi serta penyakit bawaan makanan (*food borne disease*), salah satunya adalah *E. coli* O157:H7 yang mampu menghasilkan toksin jenis Shiga toxin. Apabila jumlah bakteri *E. coli* melebihi batas aman yang ditentukan, kondisi ini dapat menimbulkan berbagai gangguan kesehatan pada manusia, seperti diare, meningitis, dan sindrom uremik hemolitik (HUS). Dalam beberapa kasus, infeksi *E. coli* dapat berkembang menjadi septicemia dan memperparah kondisi penyakit (Bria *et al.*, 2022).

Penularan *E. coli* pada manusia dapat terjadi melalui kontak langsung, konsumsi daging yang tidak dimasak dengan sempurna, maupun produk olahan daging yang terkontaminasi, karena daging merupakan media pertumbuhan yang baik bagi mikroorganisme dan dapat membahayakan kesehatan (Bria *et al.*, 2022).

2.4.2. *Staphylococcus aureus*

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

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*

Filum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacilli*

Ordo : *Bacillales*

Famili : *Staphylococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan salah satu jenis bakteri gram positif, berbentuk bulat (kokus) yang bergerombol seperti anggur, bersifat aerob fakultatif dengan diameter sekitar 0,8-1,0 μm dan ketebalan dinding sel 20-80 nm. Lapisan penyusun dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* terdiri dari lapisan makromolekul peptidoglikan yang tebal dan membran sel selapis yang tersusun oleh protein dan lipid dan asam teichoic. Asam teichoic berfungsi untuk mengatur fungsi elastisitas, porositas, kekuatan tarik dan sifat elektrostatis dinding sel (Sihombing, 2022).

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal pada manusia yang terdapat pada kulit dan selaput mukosa pada manusia. *Staphylococcus aureus* mengandung polisakarida dan protein yang berfungsi sebagai antigen dan struktur dinding sel. Bakteri ini tidak memiliki flagel, tidak motil dan tidak membentuk spora. Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dengan waktu inkubasi yang relatif pendek yaitu 1-8 jam. Bakteri *Staphylococcus aureus* juga dapat tumbuh pada pH 4,5-9,3 optimumnya yaitu pH 7,0-7,5 (Sihombing, 2022).

2.4.3. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan strain *Staphylococcus aureus* yang memiliki resistensi terhadap antibiotik golongan β -laktam, termasuk penicillinase-resistant penicillin (seperti metisilin, oksasilin, dan

nafcilin) serta sefalosporin. Mekanisme Resistensi Bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yaitu antibiotik golongan β -laktam bekerja dengan cara menghambat enzim transpeptidase pada dinding sel bakteri, yang dikenal sebagai *penicillin-binding protein* (PBP). Enzim ini berperan penting dalam proses pembentukan ikatan silang peptidoglikan selama sintesis dinding sel bakteri (Handayani *et al.*, 2022).

Resistensi terhadap antibiotik β -laktam pada *Staphylococcus aureus* terjadi melalui dua mekanisme utama. Mekanisme pertama adalah inaktivasi enzimatis oleh β -laktamase yang dikodekan oleh gen *blaZ*, yang menyebabkan resistensi terhadap penisilin kecuali jenis isoksazolil-penisilin. Mekanisme kedua adalah perubahan target aksi antibiotik akibat keberadaan gen *mecA* atau *mecC*, yang menghasilkan protein pengikat penisilin alternatif (PBP2a) dengan afinitas rendah terhadap antibiotik β -laktam. Mekanisme ini menyebabkan resistensi menyeluruh terhadap seluruh golongan β -laktam dan menjadi dasar resistensi metisilin pada *S. aureus* atau MRSA. Resistensi MRSA ditentukan oleh keberadaan elemen genetik *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) yang terintegrasi pada kromosom *S. aureus*. Hingga saat ini, telah diidentifikasi dua belas tipe SCCmec (I–XII) yang diklasifikasikan berdasarkan tipe gen rekombinase (*ccr*) dan kompleks gen *mec*. Seluruh tipe SCCmec umumnya mengandung gen *mecA*, kecuali tipe XI yang sebagian besar telah digantikan oleh bentuk penisilin yang lebih stabil seperti oksasilin, flukloksasilin, dan dikloksasilin (Handayani *et al.*, 2022).

MRSA pertama kali muncul pada awal tahun 1960-an dan dikenal sebagai patogen yang menyebar di lingkungan rumah sakit, disebut Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA). Pada dekade 1990-an, kasus MRSA juga ditemukan di masyarakat umum melalui kontak langsung dengan individu yang terinfeksi, yang dikenal sebagai Community-associated MRSA (CA-MRSA). Sejak pertengahan tahun 2000-an, infeksi MRSA juga ditemukan pada hewan ternak dan dikenal dengan istilah Livestock-associated MRSA (LA-MRSA) (Handayani et al., 2022).

2.5. Ekstraksi

2.5.1. Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan komponen atau senyawa aktif dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai berdasarkan sifat kelarutan senyawa tersebut. Proses ekstraksi akan berlangsung hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi antara senyawa yang terlarut dalam pelarut dengan senyawa yang masih berada di dalam jaringan tanaman. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan dari sampel melalui proses penyaringan untuk memperoleh ekstrak awal (ekstrak kasar). Namun, ekstrak awal ini umumnya masih mengandung campuran berbagai senyawa dengan tingkat polaritas dan ukuran molekul yang berbeda, sehingga tidak dapat langsung digunakan untuk isolasi senyawa tunggal (Erwin et al., 2025).

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).

2.5.2. Metode Ekstraksi

Menurut Nugroho, 2017, ekstraksi dibagi dalam beberapa jenis metode yaitu:

1. Maserasi



Gambar 1. Maserasi (Nugroho, 2017)

Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana dan telah digunakan sejak lama. Meskipun tergolong metode tradisional, teknik ini masih banyak diterapkan karena memiliki beberapa keunggulan, antara lain biaya yang relatif rendah, peralatan yang sederhana, serta tidak memerlukan pemanasan, sehingga sangat sesuai untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (tidak tahan panas). Namun

demikian, metode ini juga memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya waktu ekstraksi yang cukup lama yaitu berkisar antara satu hingga tujuh hari tergantung pada jenis bahan yang digunakan. Semakin kuat struktur jaringan dan dinding sel bahan, maka semakin lama pula waktu yang dibutuhkan. Selain itu, metode ini memerlukan volume pelarut yang cukup besar serta berpotensi menyebabkan kehilangan sebagian senyawa metabolit akibat teradsorpsi pada bahan, kertas saring, atau dinding wadah ekstraksi.

Prosedur maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel yang telah disiapkan dalam bentuk kering dan berukuran halus ke dalam pelarut yang sesuai di dalam suatu wadah. Kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama jangka waktu tertentu. Pengadukan dilakukan secara berkala guna mempercepat proses penyarian senyawa. Untuk memperoleh rendemen yang lebih tinggi, proses maserasi dapat diulangi dua hingga tiga kali dengan memanfaatkan ampas bahan dari hasil ekstraksi tahap sebelumnya.

2. Perkolasi



Gambar 2. Perkolasi (Nugroho, 2017)

Perkolasi merupakan metode ekstraksi tanpa menggunakan panas yang dilakukan dengan bantuan alat khusus yang disebut perkolator. Proses ini dilakukan dengan cara melarutkan senyawa metabolit menggunakan pelarut yang dialirkan melalui matriks bahan atau sampel yang telah disusun di dalam perkolator, sehingga senyawa metabolit dapat terlarut dan mengalir keluar menuju wadah penampung.

Metode ini memiliki keunggulan karena tidak memerlukan proses penyaringan tambahan, mengingat ekstrak yang dihasilkan telah tersaring secara langsung di dalam perkolator. Namun demikian, metode ini juga memiliki beberapa keterbatasan, antara lain hanya efektif untuk bahan yang memiliki tingkat kelarutan tinggi terhadap pelarut, serta membutuhkan volume pelarut yang lebih besar karena proses dilakukan secara bertahap tanpa waktu kontak yang panjang. Selain itu, penyusunan sampel di dalam bejana perkolator yang tidak merata dapat memengaruhi efisiensi proses ekstraksi.

3. Reflux



Gambar 3. Reflux (Nugroho, 2017)

Metode ekstraksi ini merupakan salah satu teknik yang paling banyak digunakan karena dianggap lebih ekonomis dan sederhana, serta mampu menghasilkan

rendemen yang relatif tinggi dibandingkan dengan metode maserasi maupun perkolasi. Refluks merupakan proses ekstraksi yang melibatkan sirkulasi kembali pelarut melalui kondensasi berulang menggunakan alat kondensor. Dalam prosedurnya, bahan yang akan diekstrak direndam dalam pelarut di dalam bejana atau labu berbentuk bulat yang diletakkan di atas alat pemanas, seperti *water bath*, *heating mantle*, atau *hot plate*. Pada bagian atas labu terdapat saluran yang berfungsi untuk mengalirkan uap pelarut maupun hasil ekstraksi.

4. Soxhlet



Gambar 4. Soxhletasi (Nugroho, 2017)

Metode ekstraksi menggunakan soxhlet merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan karena memiliki tingkat kepraktisan dan efisiensi yang tinggi. Prinsip kerjanya adalah mengekstraksi bahan yang telah dihaluskan dan dibungkus menggunakan kertas saring, kemudian ditempatkan di dalam alat soxhlet. Selama proses berlangsung, pelarut yang dipanaskan akan menguap dan kemudian terkondensasi kembali melalui kondensor di bagian atas alat, sehingga pelarut tersebut secara berulang menyiram dan merendam sampel di dalam bungkus kertas saring.

5. Ultrasonikasi



Gambar 5. Ultrasonikasi (Nugroho, 2017)

Metode ini merupakan modifikasi dari teknik maserasi, di mana proses pengadukan digantikan oleh penggunaan gelombang ultrasonik dengan frekuensi tinggi (sekitar 20.000 Hz), yaitu frekuensi yang berada di atas ambang pendengaran manusia. Gelombang ultrasonik tersebut menghasilkan getaran dengan intensitas tinggi yang menimbulkan tekanan mekanis pada sel dan jaringan bahan. Kerusakan struktur sel akibat getaran tersebut mempercepat pelepasan serta kelarutan senyawa metabolit, sehingga dapat meningkatkan rendemen ekstrak yang dihasilkan.

2.6. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

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

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 3 yaitu:

1. 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. Selanjutnya diukur zona bening pada lempeng agar yang timbul.

2. 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.

3. 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. Kemudian dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona bening sekitar sumuran.

2.6.2. 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:

1. 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).

2. 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).

2.6.3. 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.

2.7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan teknik analisis sederhana yang digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa dalam suatu ekstrak. Keberhasilan proses pemisahan senyawa pada metode ini sangat dipengaruhi oleh komposisi eluen yang digunakan. Komposisi dan jenis eluen memiliki peran penting dalam menentukan efektivitas pemisahan dan hasil analisis (Lintang *et al.*, 2024).

Eluen merupakan cairan yang berfungsi menggerakkan fase diam pada plat KLT serta membawa senyawa-senyawa dalam sampel sehingga terjadi proses pemisahan. Oleh karena itu, optimasi eluen atau pelarut menjadi langkah krusial dalam memperoleh pemisahan senyawa yang optimal. Perbandingan eluen, yang juga dikenal sebagai rasio campuran pelarut atau fase gerak, mengacu pada proporsi relatif dari berbagai komponen eluen yang digunakan dalam KLT. Variasi komposisi eluen memberikan pengaruh signifikan terhadap proses pemisahan dan hasil analisis (Lintang *et al.*, 2024).