

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Diare

Diare didefinisikan sebagai penyakit yang ditandai dengan perubahan bentuk feses lunak atau cair buang air besar lebih sering dari biasanya yaitu tiga kali atau lebih sehari dan berlangsung sealam dua hari atau lebih (Wijaya dan Putri, 2017). Mekanisme dasar penyebab timbulnya diare yaitu rangsangan berupa toksin oleh bakteri sehingga dinding usus mengalami peningkatan sekresi air dan elektrolit ke dalam rongga usus. Peningkatan isi rongga usus menyebabkan terjadinya diare (Anggraini dan Kumala, 2022).

Diare disebabkan oleh bakteri dan parasit menyebar terutama melalui air yang terkontaminasi feses. Infeksi sering terjadi ketika sanitasi buruk dan sanitasi air untuk minum dan pembersihan yang tidak memadai. Mikroorganisme penyebab diare sering menginfeksi melalui makanan dan air yang terkontaminasi yang menghasilkan toksin di lapisan usus. Toksin yang dihasilkan mengakibatkan menurunnya absorpsi natrium dan meningkatkan sekresi NaCl dan air ke lumen usus (Wong dkk., 2009).

Diare dibagi menjadi tiga jenis yaitu diare akut, diare persisten dan diare kronik. Diare akut yaitu Buang Air Besar (BAB) dengan frekuensi yang meningkat dan konsistensi tinja yang lembek atau cair dan datang secara mendadak, serta berlangsung dalam waktu kurang dari dua minggu. Diare persisten yaitu diare akut dengan atau tanpa disertai darah dan berlanjut sampai 14 hari atau lebih, jika terdapat dehidrasi sedang atau berat, diare persisten diklasifikasikan sebagai berat (Ariani, 2016). Diare persisten adalah bagian dari

diare kronik yang disebabkan oleh bakteri / parasit yang masuk lewat makanan (Anggraini dan Kumala, 2022). Diare kronik, yaitu diare yang berlangsung lebih dari empat minggu, yang memiliki penyebab yang bervariasi dan tidak seluruhnya diketahui (Ariani, 2016).

B. Bakteri *B. cereus* dan *E. coli*

Bakteri merupakan organisme mikroskopis dan salah satu golongan organisme prokariotik (bersel tunggal). Bakteri merupakan makhluk hidup yang memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terdapat dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. Bakteri memiliki adaptasi di berbagai kondisi ekstrem, contohnya dapat hidup di suhu tinggi atau hidup tanpa adanya oksigen (Gracela dkk., 2022).

Bakteri penyebab diare salah satunya adalah *B. cereus* dan *E. coli*. *B. cereus* merupakan golongan bakteri Gram positif, aerob fakultatif, motil, katalase positif, dapat membentuk spora dan tersebar luas di alam (olahan makanan, air dan tanah). Selnya berbentuk batang pendek (*bacil*) dalam rangkaian rantai panjang dengan rata-rata ukuran lebar 1,0 mm dan panjang rata-rata 4-5 mm (Arisman, 2009). *B. cereus* memiliki bentuk koloni berbentuk bulat, bewarna putih, permukaan koloni datar dan agak mengkilap (Manikome, 2022). *B. cereus* merupakan bakteri berbentuk rantai, sebagian galur bersifat psikrotrofik yaitu dapat tumbuh pada suhu yang rendah (suhu 4-5°C), sebagian galur bersifat mesofilik (suhu 15-50°C). *B. cereus* tumbuh subur pada pH 4,3 - 9,3 dan hidup pada kondisi pembekuan dan pengeringan (Arisman, 2009).



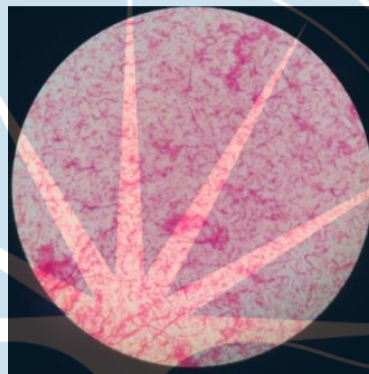
Gambar 1. *B. cereus* (Sumber: Riwanda, 2024)

B. cereus merupakan bakteri yang sering menjadi penyebab penyakit diare dengan menghasilkan toksin emetik (cereulide) dan toksin enterotoksin. Toksin emetik menyebabkan muntah dan enterotoksin menyebabkan diare. Mekanisme *B. cereus* dalam menyebabkan diare yaitu dengan makanan terkontaminasi *B. cereus* masuk ke dalam usus dan melepaskan enterotoksin yang merusak sel epitel usus sehingga menyebabkan peningkatan sekresi cairan ke lumen usus (Navaneethan dan Effarizah, 2021).

Sumber penyebaran *B. cereus* pada kasus Kejadian Luar Biasa (KLB) berasal dari nasi yang dibiarkan pada suhu kamar, bumbu, sayuran, dan susu. Inkubasi diare *B. cereus* selama 8-16 jam dan muntah selama 1-5 jam. Gejala yang diakibatkan setelah terinfeksi *B. cereus* diare akut, nyeri perut, mual, muntah dan durasinya berkisar 24-36 jam (Arisman, 2009). Menurut *Intergrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2011a), *B. cereus* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Sub kerajaan	: Bacillota
Kelas	: Bacilli
Suku	: Bacillaceae
Marga	: <i>Bacillus</i>
Jenis	: <i>Bacillus cereus</i>

E. coli adalah bakteri yang hidup pada traktus gastrointestinal manusia dan umumnya bersifat nonpatogen tetapi beberapa galur menyerang pencernaan manusia (Robbins, 2018). *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran $2\ \mu\text{m} \times 0,4 - 0,7\ \mu\text{m}$, motil, anaerob fakultatif (Soedarto, 2007). Koloni *E. coli* memiliki bentuk bulat, bewarna putih dan elevasi cembung (Foekh dan Safitri, 2024). *E. coli* dapat tumbuh pada suhu $20-40^{\circ}\text{C}$ dan suhu optimal yaitu 37°C (Rismaya dkk., 2019).



Gambar 2. *E. coli* (Sumber: Marbun dkk., 2020)

Penyebaran *E. coli* melalui pengolahan daging yang tidak matang dan melalui cemaran air yang tidak bersih (Ningsih dkk, 2023). *E. coli* membentuk ikatan dengan enteropatogenik sehingga menghasilkan enterotoksin pada sel epitel penyebab diare (Jawetz dan Joseph, 1995). Masa inkubasi setelah mengkonsumsi makanan yang terinfeksi *E. coli* yaitu 3-4 hari. Orang yang terinfeksi *E. coli* akan mengalami kram perut, diare, mual, muntah dan demam ringan (Meiyasa dan Nurjanah, 2021). Menurut *Intergrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2011b), *E. coli* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Pseudomonadota
Kelas	: Gammaproteobacteria
Bangsa	: Enterobacterales
Keluarga	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

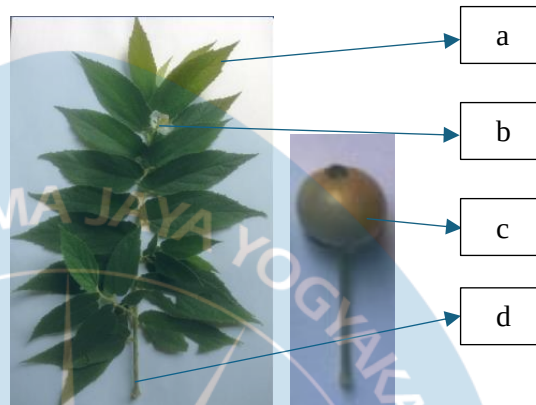
C. Tanaman kersen

Kersen merupakan tanaman yang berasal dari Filipina dan mulai masuk di Indonesia pada tahun 1900 (Yuzammi dkk., 2009). Kersen kadang juga disebut ceri atau talok merupakan salah satu tumbuhan tahunan yang banyak ditemukan di daerah tropis karena bisa tumbuh dengan cepat dan tingginya bisa mencapai 10 meter dan pohonnya memiliki tajuk yang rindang, sehingga sering dijadikan pohon peneduh. Tanaman ini memiliki banyak bagian seperti akar, batang, daun, bunga dan buah bulat kecil (Yuzammi dkk., 2009). Menurut Intergrated Taxonomic Information System (ITIS) (2011c), kersen dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub Kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Malvales / Columniferae
Suku	: Elaeocarpaceae
Marga	: <i>Muntingia</i>
Spesies	: <i>Muntingia calabura</i> L.

Tanaman kersen memiliki tinggi batang dengan percabangan batang *sympodial*. Batang kersen memiliki warna coklat dengan corak garis putih dengan tekstur batang yang kasar. Daun tanaman kersen merupakan daun majemuk genap dengan helaian daun tidak simetris, tepi daun bergerigi dan

ujung daun runcing (Yuzammi dkk., 2009). Daun kersen memiliki ukuran daun 1-4 cm x 4-14 cm dan terdapat bulu halus pada permukaan daun (Tresnarupi dan Hendrawan, 2019). Tanaman kersen dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Dahan Kersen (Sumber: Zahara dan Suryady, 2018)
Keterangan : daun(a), bunga(b), buah(c) dan batang(d)

Bunga tersusun dalam kelompok individu dari ketiak daun, hermafrodit, bertangkai panjang, dengan mahkota meruncing berbentuk benang, mahkota dengan tepi rata, dan berwarna putih. Buahnya merupakan jenis berry bertangkai panjang, diameter buah sekitar 1-15 cm. Berwarna hijau saat belum masak dan merah saat masak, dengan daging lunak berisi banyak biji kecil dan rasa manis saat masak (Yuzammi dkk., 2009). Buah kersen terdapat ratusan biji kecil dan berwarna putih kekuningan dalam daging buah (Noor dkk., 2022).

Kersen yang merupakan tanaman liar sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional, terutama daun dan buah. Daun kersen sering dimanfaatkan sebagai penurun panas, batuk, asam urat, kolestrol dan sebagai antiseptic alami (Nawir dkk., 2021). Buah kersen digunakan sebagai obat asam lambung, diabetes, darah tinggi dan asam urat (Umagapi dkk., 2022). Pada penelitian Wahyuni

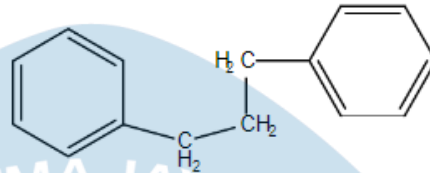
dkk., (2022) pemberian rebusan daun kersen dapat menurunkan kadar kolestrol dari angka 234,30 mg/dL menjadi 204,90 mg/dL. Kandungan daun kersen memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antiinflamasi, antipiretik, antioksidan dan analgetic (Nawir dkk., 2021).

D. Kandungan Fitokimia Daun Kersen

Tumbuhan memproduksi 2 jenis metabolit yaitu metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer sebagai penyusun utama dari makhluk hidup dan keberlangsungan hidup yang berupa polisakarida, lemak, protein dan asam nukleat. Metabolit sekunder yaitu senyawa aktif yang dihasilkan oleh tumbuhan melalui biosintesis senyawa metabolit primer (Saidi dkk., 2018). Daun kersen memiliki senyawa metabolit yaitu flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan terpenoid (Sadino dkk., 2022).

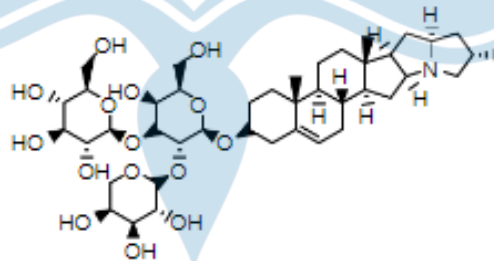
Flavonoid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder paling sering ditemukan pada jaringan tanaman. Senyawa flavonoid merupakan senyawa turunan dari metabolit primer yaitu 2-phenyl-benzyl- γ -pyrone dengan biosintesis jalur fenipropanoid. Senyawa flavonoid biasanya terdapat pada tanaman tingkat tinggi pada batang, akar, daun, buah dan bunga. 5-10% kandungan senyawa sekunder pada tanaman yaitu flavonoid (Putri, 2015). Flavonoid dibagi menjadi 5 berdasarkan persamaan sifat struktural yaitu flavon, flavanon, fenantochyanidin, isoflavone dan flavonol (Estiasih dkk., 2017). Senyawa flavonoid mempunyai banyak manfaat sebagai antioksidan, antimikroba, antikanker, antijamur, dan antiinflamasi (Dias dkk., 2021). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang kerangka dasar

karbonnya terdiri dari 15 atom karbon yang memiliki cincin Benzema (C_6) terikat pada rantai propane (C_3) sehingga membentuk stuktur kimia $C_3-C_3-C_6$. (Sadiah dkk., 2022).



Gambar 4. Struktur Flavonoid (Sumber: Noer dkk, 2018)

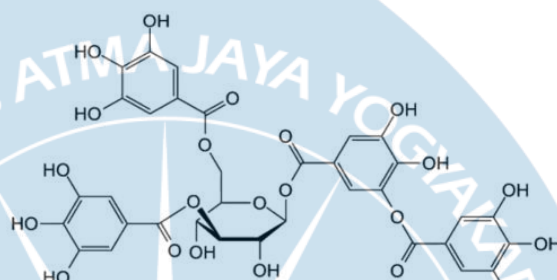
Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan berat molekul yang tinggi sebesar 414,62 g/mol (Santosa dkk., 2018). Saponin merupakan glikosida amfipatik (memiliki 2 ujung senyawa yang berbeda sifat) yang dapat mengeluarkan busa jika dikocok dalam suatu larutan. Busa yang dihasilkan oleh saponin biasanya bersifat stabil dan tidak mudah hilang. Saponin memiliki sifat fisik, kimia dan biologis yaitu memiliki rasa pahit, berbusa, pengemulsi, dan sifat hemolitik (Restiadi, 2022).



Gambar 5. Struktur Saponin (Sumber: Noer dkk., 2018)

Tanin merupakan glikosida cair yang bersumber dari *polipeptida* dan *ester polimer* melalui hidrolisis sekresi empedu dan glukosa (Herdiana dkk., 2024). Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki berat molekul yang tinggi yaitu 1000 g/mol, mempunyai gugus hidroksil dan gugus lainnya (karbosil) sehingga dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein dan

makromolekul dengan kondisi lingkungan tertentu (Aryanto dan Siti, 2020). Tanin dibangun dari elemen C, H, dan O yang membentuk bobot molekul besar dan memiliki rumus molekul $C_{15}H_{12}O_5$. Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang memiliki sifat antidiare, astrigen, antibakteri dan antioksidan (Aryanto dan Siti, 2020).



Gambar 6. Stuktur Tanin (Sumber: Hasby dkk., 2022).

E. Standarisasi Simplisia

Standarisasi simplisia merupakan suatu standar yang ditetapkan untuk menjaga kualitas bahan baku dari tanaman. Simplisia yang digunakan harus memenuhi syarat yang terdapat pada monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan RI (Materia Medika Indonesia)(1995). Tujuan dari standarisasi simplisia yaitu menjamin kualitas, keamanan dan konsistensi dari kandungan senyawa aktif yang terdapat pada simplisia atau ekstrak (Mewar dan As' ad, 2023).

Parameter spesifik dan non spesifik harus ada dalam standarisasi (Indrawati dkk., 2021). Parameter spesifik yaitu pengujian terhadap golongan senyawa spesifik yang menggambarkan efek farmakologis sedangkan parameter non spesifik yaitu oengujian terhadap sifat kimia dan fisika yang melibatkan keamanan dan mutu simplisia (Sari dkk., 2023).

Parameter spesifik yaitu kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, identitas simplisia dan organoleptik simplisia. Parameter non spesifik dapat berupa kadar air, kadar abu total, kadar abu total tidak larut asam dan susut pengeringan. Pada penelitian ini menguji parameter simplisia spesifik dan non-spesifik. Standar mutu simplisia daun kersen dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Standar Mutu Simplisia Daun Kersen

Parameter	Syarat Mutu Materia Medika Indonesia Edisi IV (Departemen Kesehatan RI, 1995)
Kadar Air	$\leq 10\%$
Kadar Sari Larut Air	$\geq 7\%$
Kadar Sari Larut Etanol	$\geq 3\%$
Kadar Abu	$\leq 15\%$
Kadar Abu Tidak Larut Asam	$\leq 2\%$
Susut Pengeringan	$\leq 10\%$

Keterangan : Departemen Kesehatan RI (1995)

Uji kadar air dilakukan agar mengurangi kadar air dalam simplisia, menghambat jamur dan bakteri tumbuh dan tidak terjadi pembusukan sehingga simplisia dapat disimpan dalam waktu yang lama serta mutunya tetap terjaga (Wandira dkk., 2023). Prinsip dari uji air yaitu menguapkan air pada sampel / simplisia menggunakan alat pemanas dan kemudian ditimbang hingga mendapatkan berat yang konstan. Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil dalam pengujian kadar air yaitu suhu ruangan, kelembaban, dan ukuran partikel (Daud dkk., 2020) Uji kadar air dapat diujikan menggunakan beberapa metode yaitu metode destilasi (thermovolumetri), pengeringan (thermogravimeri), fisis dan kimiawi (Karl Fischer Method) (Daud dkk., 2020)

Kadar abu merupakan sisa kandungan mineral yang ada pada bahan organik setelah proses pembakaran (Nurhidayah dkk., 2019). Menurut Departemen Kesehatan RI (2000), Uji kadar abu bertujuan untuk

menidentifikasi kandungan mineral yang terdapat pada simplisia dari proses awal hingga menjadi ekstrak. Faktor yang mempengaruhi penentuan kadar abu yaitu jenis bahan, lama waktu dan suhu yang digunakan (Falah dan Sa'diyah, 2024). Prinsip dalam pengukuran kadar abu yaitu mengoksidasi zat organik pada suhu tinggi antara 500 - 600°C, kemudian meninmbang zat yang tertinggal setelah proeses pembakaran (Nurhidayah dkk., 2019).

Kadar abu tidak larut asam yaitu kandungan mineral yang ada pada simplisia yang tidak bisa larut dengan penambahan asam klorida (Devitria dkk., 2023). Kadar abu tidak larut asam menunjukkan jumlah kontaminasi yang berasal dari faktor luar seperti silika dan silikat yang masih menempel pada simplisia. Tinggi rendahnya nilai kadar abu tidak larut asam menunjukkan selisih kadar abu total dengan residu setelah abu total dididihkan dengan asam. Kadar abu total dan abu tidak larut asam lebih tinggi daripada standar yang telah ditetapkan maka bahan baku tersebut tidak layak untuk diproses (Sudarsono dan Purwantini, 2022).

Susut pengeringan merupakan presentase senyawa yang menghilang setelah proses pemanasan tidak hanya senyawa air yang hilang tetapi senyawa lain yang hilang setelah pemanasan. Tujuan dari susut pengeringan yaitu menentukan rentang antara besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan, Susut pengeringan dilakukan dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 30 menit hingga berat menjadi konstan (Departemen Kesehatan RI, 2000). Semakin kecil nilai dari susut pengeringan maka semakin bagus proses pengeringan sampel (Sutomo dkk., 2021).

Kadar sari larut air dilakukan untuk melihat kemampuan suatu kandungan dalam bahan baku obat atau simplisia yang dapat tersari dalam zat pelarut yaitu air (Veninda dkk., 2023). Pengujian kadar sari larut air dilakukan dengan simplisia ditambahkan dengan kloroform, kemudian larutan dimaserasi kurang lebih selama 24 jam dan dilakukan penguapan hingga kering. Hasil bobot tetap dihitung dan dikurangi dengan berat cawan. Kloroform dalam sari larut air bertujuan agar air menjadi jenuh dengan pelarut organik sehingga senyawa yang tersari hanya senyawa yang larut dalam air (Astuti dkk., 2021).

Kadar sari larut etanol merupakan uji parameter untuk mengukur jumlah senyawa kimia pada simplisia atau bahan baku obat yang larut dalam etanol. Pengujian kadar sari larut etanol dilakukan dengan simplisia ditambahkan dengan pelarut etanol, kemudian larutan dimaserasi kurang lebih selama 24 jam dan dilakukan penguapan hingga kering, hasil bobot tetap dihitung (Astuti dkk., 2021). Pada pengujian kadar sari etanol menggunakan etanol karena etanol termasuk dalam pelarut universal yang dapat melarutkan semua senyawa (Febrianti dkk., 2019).

Kadar sari larut air merupakan uji untuk menentukan jumlah total senyawa yang dapat larut dalam air. Senyawa yang terlarut dapat berupa mineral, asam organik, atau gula. Penetapan nilai kadar sari larut air untuk mengukur kadar sari yang bersifat polar dan sari larut etanol untuk mengukur senyawa kimia yang bersifat polar, semi polar dan nonpolar pada suatu bahan. Kadar sari larut air dan etanol menunjukkan kandungan zat yang berperan dalam memberikan efek tertentu dalam suatu bahan (Febrianti dkk., 2019).

Uji organoleptik atau uji sensori adalah pengujian dengan menggunakan indra pada manusia untuk menjadi alat tolak ukur untuk daya penerimaan suatu produk atau bahan. Indra yang digunakan dalam uji organoleptic yaitu indra penglihatan (mata), indra penciuman (hidung), indra pengecap (lidah), dan indra peraba (tangan) (Octavia dkk, 2023). Objek dari uji organoleptic pada suatu bahan yaitu bentuk, warna, bau dan rasa (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Determinasi tanaman merupakan tahap awal dari penelitian sebelum diproses menjadi produk. Tujuan dari determinasi tanaman yaitu mengetahui mengenai tanaman yang diteliti dan menghindari adanya pengambilan sampel tanaman yang tercampur dengan sampel tanaman yang lain. Cara determinasi untuk menentukan spesies tumbuhan yaitu menggunakan ciri tanaman secara spesifik dan dibandingkan dengan tanaman yang lain (Klau dan Hesturini, 2021).

F. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Yuswi, 2017). Tujuan dari ekstraksi yaitu penarikan kandungan senyawa kimia aktif dari jaringan tumbuhan ataupun hewan sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dalam pelarut cair (Syamsul dkk., 2020). Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi yaitu suhu, waktu, pH, kecepatan pengadukan, ukuran dan bentuk partikel, jenis simplisia, perbandingan antara pelarut dan simplisia

(Anggista dkk., 2019).

Ekstraksi dibagi menjadi 2 macam yaitu ekstraksi dingin (maserasi, perkolasi, soxhletasi, sonikasi) dan panas (refluks,soxhletasi, destilasi uap) (Susanty dkk., 2019). Ekstraksi dingin merupakan ekstraksi yang tidak melalui proses pemanasan. Tujuan dari ekstraksi dingin yaitu mencegah rusaknya senyawa kimia pada simplisia akibat pemanasan (Daryanti dkk., 2023). Kelebihan dari ekstraksi dingin yaitu proses dan alat yang digunakan sederhana dan relatif murah, kekurangan dari ekstraksi dingin yaitu memerlukan waktu yang lama dan penggunaan pelarut yang tinggi. Ekstraksi panas yaitu ekstraksi yang memerlukan panas dalam prosesnya sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama dan menggunakan lebih sedikit pelarut namun tidak cocok untuk senyawa yang tidak tahan panas (Daryanti dkk., 2023).

Maserasi merupakan salah satu ekstraksi yang sering digunakan dalam ekstraksi karena prosesnya sederhana. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi dengan cara pemisahan senyawa dengan pelarut organik dengan menggunakan suhu dingin atau suhu ruang tanpa ada proses pemanasan (Handayono, 2020). Proses maserasi dilakukan dengan simplisia dicampur dengan pelarut yang ditaruh di dalam wadah kemudian didiamkan selama 18-36 jam dengan pengadukan secara berkala pada suhu ruang dan tidak boleh terkena sinar matahari (Natsir dkk., 2019). Proses maserasi tidak melalui proses pemanasan sehingga pada proses maserasi membutuhkan pengadukan berulang agar mempercepat waktu larutan dalam mengekstraksi simplisia (Handayono, 2020).

Prinsip dari maserasi yaitu pelarut masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi komponen sel akan larut karena terjadi perbedaan konsentrasi pada dalam sel dengan luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar dan digantikan oleh pelarut yang memiliki konsentrasi rendah, proses akan berhenti jika terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Natsir dkk., 2019). Kelebihan dari maserasi yaitu prosesnya yang sederhana dan tidak mahal, kekurangan dari maserasi yaitu memerlukan waktu lama dan pelarut yang digunakan lebih banyak (Natsir dkk., 2019).

Pelarut merupakan medium cair yang mampu melarutkan senyawa tanpa mengubah sifat kimia utama dari zat yang dilarutkan (Masengi dkk., 2020). Pelarut merupakan hal penting dalam proses ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam memilih pelarut. Faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut yaitu kepolaritas pelarut yang sesuai sehingga dapat memaksimalkan hasil dan tidak berbahaya atau beracun (Guenther, 2006).

Pelarut dibagi tiga menurut sifat kepolaritas yaitu non-polar, semi-polar dan polar. Pelarut non-polar contohnya aseton, dietil eter dan kloroform, sedangkan pelarut polar contohnya metanol, etanol, dan air (Rehman dkk., 2020). Jenis pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi menentukan senyawa apa yang ingin ditarik karena senyawa dalam tanaman memiliki tingkat polaritas yang berbeda-beda (Yulianti dkk., 2020).

Etanol atau alkohol dengan rumus kimia $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ merupakan cairan mudah terbakar, mudah menguap dan tidak berwarna. Etanol termasuk dalam

kelompok hidroksil karena kemampuannya untuk memberikan polaritas pada molekul sehingga ikatan hidrogen intermolekul meningkat. Etanol memiliki tingkat kelarutannya tinggi dan tidak beraksi dengan komponen lain dan tidak toksik (Arsa dan Achmad, 2020).

Etanol memiliki titik didih pada suhu 78°C pada tekanan atmosfer dan memiliki massa jenis sebesar 0,7893 g/mL. Etanol dapat melarutkan senyawa polar dan non-polar dikarenakan gugus -OH bersifat polar dan gugus -CH₃CH₂ bersifat nonpolar. Etanol sering dimanfaatkan berdasarkan *grade* sehingga pemanfaatannya berbeda-beda. Pada *grade* 96-99% sering digunakan dalam industri (farmasi, minuman keras, parfum), *grade* 99,5-100% digunakan untuk bahan bakar kendaraan (Arsa dan Achmad, 2020).

G. Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia merupakan suatu metode untuk mengidentifikasi dan mengenali metabolit sekunder yang ada pada tanaman (Sulistyarini dkk., 2020). Sampel yang digunakan dapat berupa akar, daun, batang, bunga, umbi yang memiliki potensi yang berguna untuk pembuatan obat (Safutri dkk., 2022). Analisis fitokimia untuk melihat reaksi pengendapan dan uji reaksi terhadap golongan senyawa yang dapat diuji. Analisis fitokimia dapat dibuktikan melalui uji kualitatif dan kuantitatif yang meliputi uji flavonoid, uji tanin dan saponin (Sulistyarini dkk., 2020).

a. Kualitatif

Kualitatif flavonoid bertujuan untuk mengetahui suatu ekstrak mengandung senyawa flavonoid atau tidak. Penambahan H₂SO₄ pekat

menimbulkan reaksi substitusi elektrofilik dengan senyawa flavonoid. Pereaksi H_2SO_4 pekat menyebabkan terjadinya reaksi reduksi asam inti benzopiron pada senyawa flavonoid sehingga terbentuknya garam flavilum yang dapat merubah warna. Perubahan warna menjadi orange, merah, atau kuning menandakan adanya senyawa flavonoid (Ferdinan dan Natasa, 2024).

Kualitatif saponin yaitu uji untuk melihat apakah sampel yang diuji memiliki senyawa saponin yang ditandai dengan menghitung ketinggian busa pada sampel yang diamati (Krisnaningsih dkk., 2023). Saponin memiliki karakteristik berupa busa jika dicampurkan dengan air dan dikocok dikarenakan sebagian senyawa larut dalam pelarut polar (hidrofilik) dan sebagian larut dalam pelarut non polar (hidrofobik) (Rahmatia dkk., 2022). Saponin menghasilkan misel yang pada strukturnya gugus polar menghadap keluar sedangkan gugus nonpolar menghadap ke dalam sehingga terlihat seperti berbusa (Robinson, 1991). Senyawa nonpolar pada saponin digunakan sebagai surfaktan yang dapat mengurangi tegangan permukaan (Krisnaningsih dkk., 2023).

Kualitatif tanin merupakan metode untuk mengidentifikasi senyawa tanin dalam suatu sampel. Tanin memiliki kemampuan dalam mengikat protein, logam atau alkaloid. Uji kualitatif tanin direaksikan dengan reagen FeCl_3 yang memiliki fungsi untuk menghidrolisis golongan tanin sehingga menghasilkan perubahan warna menjadi biru kehitaman atau coklat kehitaman (Durri dan Walid, 2024).

b. Uji kuantitatif

Uji kuantitatif fitokimia yaitu uji bertujuan untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang ada pada suatu tanaman dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengukur jumlah senyawa suatu sampel berdasarkan nilai absorbansi Cahaya (Dewi, 2020). Uji kuantitatif membutuhkan larutan standar sebagai larutan yang sudah diketahui konsentrasinya (Febriana dan Kasmui, 2021).

Kuersetin merupakan larutan baku yang digunakan dalam pengujian fitokimia flavonoid untuk menentukan serapan maksimal senyawa dan kurva standar. Kuersetin merupakan senyawa flavonoid berasal dari konglomerasi flavonoid yang memiliki konglomerasi keton di molekul C4 dan konglomerasi hidroksil di molekul C3 ataupun C4 berdekatan dengan flavonoid serta flavonol (Oktaria dan Marpaung, 2023). Kuersetin digunakan dalam uji kuantitatif flavonoid memiliki penyebaran paling luas pada tanaman (Stywan dan Rohmanti, 2020). Panjang gelombang memiliki range 400 – 450 nm (Larasati dan Putri, 2023).

Pengujian kuantitatif tanin menggunakan larutan standar asam tanat. Asam tanat merupakan salah satu senyawa polifenol alami yang mengandung gugus hidroksil fenolik dan gugus karboksil yang memiliki kemiripan sktruktur tanin (Basri dkk., 2023). Rentang panjang gelombang asam tanat berkisar 400-800 nm (Pratama dkk., 2019). Larutan standar saponin digunakan dalam pengujian kadar saponin pada tanaman. Panjang gelombang saponin berkisar 200-800 nm (Takaeb dan Leo, 2023).

H. Kemurnian Bakteri

Karakteristik setiap bakteri berbeda-beda sehingga diperlukan identifikasi untuk mengetahui jenis bakteri. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan ciri dan sifat bakteri yang sudah ada. Identifikasi bakteri dapat melalui metode atau uji secara biokimia dan morfologis. Uji morfologi dapat dilakukan melalui uji koloni tunggal, uji pewarnaan gram, uji aerob dan anaerob serta uji motilitas. Aktivitas biokimia bakteri dapat melalui uji fermentasi karbohidrat dan uji katalase (Aruan dan Andareas, 2024).

Uji biokimia merupakan uji untuk mengidentifikasi secara fisiologis kemampuan jenis bakteri yang sudah diisolasi dalam proses kimiawi. Uji biokimia berhubungan dengan metabolisme sel bakteri secara kimiawi dalam menghasilkan energi dan membentuk sel. Reaksi biokimia dapat terjadi di luar atau dalam sel bakteri yang diatur oleh katalisis biologi yaitu enzim. Enzim dibagi menjadi 2 yaitu enzim ekstraseluler (eksoenzim) dan enzim intraseluler (endoenzim) (Aruan dan Andareas, 2024).

Uji koloni tunggal yaitu pengamatan visual bakteri berdasarkan kemiripan fisik yang sudah diidentifikasi. Parameter dalam pengamatan koloni tunggal yaitu warna, bentuk, ukuran dan letak koloni bakteri. Bentuk koloni ada beberapa jenis yaitu lingkaran / bulat, akar, tidak beraturan, berserabut, dan lonjong. Jenis dari tepi bakteri yaitu tepi rata, tepi bergelombang, tepi berlekuk, tepi bergerigi, dan tepi berfilamen / tidak beraturan. Ketinggian bakteri ada beberapa jenis yaitu data, timbul, cembung, *unbunate*, kawah, berlembung dan umbilikat sedangkan ukuran bakteri juga ada

beberapa jenis yaitu kecil ($< 1 \text{ mm}$) $>$, sedang ($= 1 \text{ mm}$), besar ($> 1 \text{ mm}$) dan *pinpoint* ($< 0,5 \text{ mm}$) (Aruan dan Andareas, 2024).

Uji pengecatan bakteri yaitu uji reaksi yang timbul pada dinding sel sehingga bakteri dapat dikelompokkan dalam kelompok bakteri tertentu (Harahap dkk., 2021). Tujuan pengecatan Gram untuk memperjelas bentuk bakteri, membedakan jenis bakteri dari struktur dinding sel, mempermudah melihat secara mikroskop. Pengecatan Gram dilakukan dengan empat macam larutan yaitu perwarna utama kristal violet, perwarna kedua yaitu lugol, larutan ketiga yaitu aseton, dan larutan keempat yaitu safranin (Bulele dkk., 2019).

Kristal violet berfungsi sebagai cat utama bakteri berwarna ungu, Lugol's iodine berfungsi meningkatkan afinitas cat utama dengan dinding sel bakteri sehingga bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif akan berwarna ungu atau merah. Zat pendekolorisasi yaitu aseton berfungsi meluruhkan warna ungu pada bakteri Gram negatif sedangkan bakteri Gram positif tetap berwarna ungu. Zat perwarna lawan seperti safranin untuk memberikan warna pink atau merah pada bakteri Gram negatif sedangkan bakteri Gram positif tetap berwarna ungu (Harahap dkk., 2021).

Prinsip pengecatan Gram yaitu berdasarkan pada sifat kimia dan fisik dinding sel bakteri. Perbedaan warna pada Gram positif dan Gram negatif disebabkan oleh struktur dan ketebal dinding sel (peptidoglikan). Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal sehingga warna dari larutan kristal violet dan tidak akan larut dalam aseton. Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang tipis sehingga warna kristal violet larut ketika diberikan aseton, Warna

yang diserap oleh bakteri Gram negatif yaitu warna merah pada safranin (Pakaya dkk., 2022).

Uji kebutuhan oksigen yaitu uji untuk mengetahui pemanfaatan oksigen pada bakteri untuk tumbuh dan mengklasifikasikannya berdasarkan cara memanfaatkan metabolisme yang ada (Tjampakasari dan Hanifah, 2023). Respirasi pada bakteri dibagi menjadi 2 yaitu respirasi aerob dan anaerob. Respirasi aerob yakni respirasi yang memerlukan oksigen sedangkan respirasi anaerob yaitu respirasi tanpa menggunakan oksigen (Susilowarno dkk., 2007).

Bakteri akan tersuspensi merata pada media, setelah inkubasi bakteri yang tumbuh pada permukaan akan lebih mudah mendapatkan oksigen sedangkan bakteri yang tumbuh pada dasar media akan mendapatkan oksigen yang terlarut dalam media. Bakteri aerob akan tumbuh pada permukaan media, bakteri anaerob fakultatif tumbuh rata pada media sedangkan bakteri anaerob akan tumbuh pada dasar media (Hadioetomo, 1993).

Uji motilitas yaitu pengujian yang dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri untuk bergerak. Kemampuan ini berdasarkan pada struktur bakteri untuk bergerak di lingkungannya seperti flagel atau phili (Pratiwi dan Asri, 2022). Pengujian motilitas dilakukan dengan inokulasi bakteri ke media padat tegak *Nutrient Agar* menggunakan enten kemudian diinkubasi selama 24 - 48 jam (Kosasi dkk., 2019). Hasil positif ditandai dengan adanya sebaran bewarna putih berbentuk seperti akar pada bekas tusukan (motil), hasil negatif ditandai dengan tidak adanya sebaran pada bekas tusukan (non-motil) (Liempepas dkk., 2019).

Uji katalase yaitu uji untuk mengetahui apakah suatu bakteri dapat menghasilkan enzim katalase atau tidak (Liempepas dkk., 2019). Respirasi aerob pada bakteri menghasilkan hidrogen peroksida yang bersifat toksik dikarenakan menginaktivasi enzim dalam sel sehingga menyebabkan kematian. Untuk menghasilkan energi, bakteri menggunakan respirasi aerob dan oksigen sebagai akseptor elektron akhir. Bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase dapat mengurai hidrogen peroksida menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) dengan cepat sehingga tidak terjadinya kematian (Aruan dan Andareas, 2024). Hasil positif dari uji katalase yaitu terbentuk gelembung gas dengan setelah ditambahkan hidrogen peroksida (H_2O_2) pada permukaan bakteri, sedang hasil negatif yaitu tidak terbentuknya gelembung (Liempepas dkk., 2019).

Uji fermentasi karbohidrat merupakan uji untuk mengetahui dan mengidentifikasi bakteri yang memiliki kemampuan fermentasi gula. Bakteri memiliki mekanisme yang berbeda-beda dalam memperoleh energi berdasarkan enzim yang dimiliki salah satunya adalah fermentasi. Pada fermentasi karbohidrat, proses biooksidasi tidak memerlukan oksigen dan substrat organik sebagai akseptor elektron akhir (Aruan dan Andareas, 2024).

Fermentasi gula dapat dilakukan secara aerobik atau anerobik dengan memanfaatkan enzim. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan medium gula (glukosa, laktosa dan sukrosa) sebagai substrat dengan penambahan *phenol red* (Aruan dan Andareas, 2024). Perubahan warna merah menjadi warna kuning disebabkan oleh pemanfaatan gula sebagai sumber karbon sehingga

menghasilkan asam untuk menurunkan pH dengan ada atau tidaknya gelembung gas pada tabung Durham. Adanya gelembung gas disebabkan oleh proses fermentasi gula menjadi etanol dan CO₂ yang berbentuk gas (Anggrayeni dkk., 2019).

I. DMSO

DMSO atau *Dimethyl sulfoxide* merupakan senyawa yang memiliki ciri tidak berwarna sebagai suatu senyawa organosulfur yang berfungsi sebagai pelarut aprotik polar (Zainab, 2022). DMSO atau *Dimethyl sulfoxide* dengan rumus kimia (CH₃)₂SO memiliki berat molekul 78,13 g/mol dan tidak berwarna (Mafruchati, 2023). DMSO digunakan karena memiliki sifat untuk melarutkan senyawa polar dan non-polar dan tidak memiliki aktivitas antibakteri. DMSO merupakan salah satu pelarut kuat yang dapat melarutkan berbagai bahan organik dan polimer secara efektif. DMSO merupakan senyawa netral karena termasuk dalam pelarut aprotik (tidak bersifat asam dan basa) (Zainab, 2022).

J. Cotrimoxazole

Cotrimoxazole merupakan antibiotik yang mengandung kombinasi sulfamethoxazole dan trimethoprim dengan perbandingan 5:1 (400+80 mg). Campuran tersebut memiliki sifat sinergik dan bakterisida sehingga banyak digunakan untuk berbagai penyakit infeksi bakteri. Cotrimoxazole merupakan antibiotik memiliki spektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan negatif sehingga biasa diresepkan untuk mengobati penyakit diare terutama infeksi *B. cereus* dan *E. coli* (Wahyuni dan Riska, 2021).

Mekanisme dari antibiotik cotrimoxazole yaitu kandungan

sulfametoksazol berperan sebagai kompetitif inhibitor terhadap asam para-aminobenzoat (PABA) yang menghambat pertumbuhan molekul PABA masuk dalam molekul asam folat. Trimetoprim berperan dalam menghambat enzim dihidrofolat reductase sehingga enzim yang dibutuhkan bakteri (asam tetradirofolat) tidak terbentuk. Terhambatnya enzim menyebabkan efek sulfametoksazol semakin kuat (Anonim, 2008).

K. Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri dengan mengganggu atau merusak metabolisme bakteri yang merugikan. Proses mekanisme dari antibakteri meliputi menghambat proses sintesis pada dinding sel, menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim dan menghambat asam nukleat serta protein (Dwidjoseputro, 1978). Faktor yang dapat mempengaruhi dalam aktivitas antibakteri yaitu pH, suhu, jumlah bahan yang digunakan dan lama inkubasi (Swastini dan Dewi, 2024).

Antibakteri dibagi menjadi 3 jenis yaitu bakteriostatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik. Agen bakteriostatik yaitu kondisi mikroba hanya dicegah atau menghambat tanpa langsung membunuh, dengan cara menghambat proses biokimia, jika senyawa bakteriostatik dihilangkan maka bakteri dapat melanjutkan pertumbuhan. Senyawa bakteriosidal mengikat pada sel target dan membunuh sel tetapi sel yang mati tidak terlisiskan sehingga jumlah sel tetap sama, terlihat pada tingkat kekeruhan kultur. Senyawa bakteriolitik melisiskan dan melepaskan isi sitoplasma sehingga membunuh mikroba sehingga jumlah

sel mikroba menjadi menurun (Astuti dkk., 2022).

Senyawa aktif flavonoid, tanin dan saponin memiliki mekanismenya tersendiri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri yaitu merusak membran sitoplasma dan dinding sel bakteri. Flavonoid menargetkan fosfolipid pada membran sitoplasma bakteri sehingga fosfolipid tidak dapat mempertahankan membran sitoplasma yang mengakibatkan kebocoran sel. Kebocoran sel pada membran sitoplasma membuat zat yang diperlukan bakteri dalam metabolisme terbuang keluar sehingga terjadi kematian bakteri. Flavonoid bereaksi dengan lipid dan asam amino yang merupakan penyusun dinding sel bakteri sehingga terjadi merusak dinding sel bakteri. Rusaknya dinding sel bakteri mengakibatkan senyawa flavonoid masuk dalam sel bakteri dan bereaksi dengan DNA sehingga terjadi kerusakan pada struktur lipid DNA kemudian bakteri lisis (Amanda dkk., 2019).

Mekanisme tanin dalam menghambat pertumbuhan bakteri yaitu dengan menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga pembentuk sel bakteri tidak terbentuk. Tanin selain menonaktifkan adhesin sel mikroba dan enzim, tanin dapat mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga menyerang peptidoglikan dinding sel bakteri sehingga pembentukan sel dinding sel tidak sempurna. Dinding sel yang tidak sempurna menyebabkan lisis dikarenakan perbedaan tekanan osmotik dan fisik sehingga bakteri menjadi mati (Sarijowan dkk., 2022). Mekanisme saponin adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga

mengakibatkan rusaknya porin (Rahmawatiani dkk., 2020).

Zona hambat merupakan daerah tempat mikroba tidak terjadi pertumbuhan karena adanya senyawa antibakteri (Minarni dkk, 2020). Luas zona hambat menunjukkan sensitifitas terhadap agen antibakteri yang digunakan, semakin besar konsentrasi ekstrak yang digunakan, semakin besar juga luas zona hambat yang terbentuk (Hassanuddin dan Salnus, 2020). Kemampuan antibakteri suatu sampel dinilai berdasarkan diameter luas zona hambat yang dibagi menjadi 4 yaitu kategori lemah ($<5\text{mm}$), sedang ($5\text{-}10\text{mm}$), kuat ($11\text{-}20\text{ mm}$) dan sangat kuat ($>20\text{ mm}$) (Indriani dkk., 2020).

Metode yang digunakan dalam aktivitas antibakteri yaitu menggunakan metode difusi. Metode difusi sumuran merupakan salah satu metode yang dilakukan dengan melubangi media agar yang sudah bakteri uji sehingga terbentuk sumuran dengan diameter tertentu. Perlakuan diinokulasikan pada sumuran dan diinkubasi. Indikator zona hambat dapat dilihat melalui zona jernih yang terbentuk di sekitar sumuran. Pembacaan hasil dilakukan dengan jangka sorong (Sari dan Basyarhil, 2021). Difusi sumuran memiliki kelebihan yaitu prosesnya mudah, pengukuran zona hambat yang lebih akurat, tidak membutuhkan alat dan bahan yang banyak. Kekurangan metode difusi sumuran yaitu tidak dapat mengetahui tingkat resistensi atau kepekaan suatu bakteri terhadap agen antibakteri (Andriani, 2024).

L. Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal zat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi

24 jam dan mengamati banyaknya koloni bakteri yang tumbuh (Saputra dkk., 2019). Tujuan dari uji KHM yaitu mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat bakteri (Assauqi dkk., 2023). Prinsip dari pengujian KHM yaitu kemampuan suatu sampel dalam menghambat bakteri uji (Aruan dan Andareas, 2024).

Metode yang digunakan dalam uji KHM yaitu metode dilusi. Metode dilusi dibagi menjadi dua yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Metode dilusi cair dilakukan dengan mengencerkan seri zat antibakteri dan dicampurkan dengan bakteri uji yang kemudian diinokulasikan pada medium agar (Fitriana dkk., 2019). Metode dilusi padat dilakukan dengan bakteri diinokulasikan pada medium padat yang telah dicampurkan dalam antibakteri (Fitriana dkk., 2019). Metode dilusi memiliki kelebihan yaitu sederhana, dapat memperkirakan konsentrasi suatu ekstrak terhadap mikroorganisme (Pratiwi, 2008).

M. Hipotesis

1. Ekstrak etanol 96% daun kersen memiliki kadar flavonoid total 13,375 - 93,21 mgQE/g ekstrak, kadar tanin total sebesar 13,375 - 31,584 mg TAE/g ekstrak, dan kadar saponin total sebesar 2,8 – 145,45 mgSE/g ekstrak
2. Ekstrak Ekstrak etanol 96% daun kersen memiliki luas zona hambat terhadap *B. cereus* dan *E. coli* yaitu 0 - 21 mm
3. Ekstrak etanol 96% daun kersen dengan konsentrasi 10% merupakan konsentrasi terkecil dalam menghambat *B. cereus* dan *E. coli*