

II. TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Tumbuhan belimbing wuluh berasal dari Amerika dengan iklim tropis dan dibudidayakan pada beberapa negara seperti Argentina, Australia, Brazil, India, Filipina, Singapura, Malaysia, Thailand dan Venezuela (Pendit dkk., 2016). Tumbuhan ini tercatat penyebarannya di Kawasan Asia dari India kemudian menyebar ke negara beriklim tropis (Wulandari dkk., 2017). Belimbing wuluh banyak ditemui di Indonesia dan dikenal dengan banyak nama lain sebagai belimbing asem, limeng, calingcing dan bainang. Tumbuhan ini hidupnya di tempat terkena cahaya matahari langsung dan cukup lembap dan pohonnya bisa mencapai 500 meter di atas permukaan laut. Cara perkembangbiakan tumbuhan ini dengan penyemaian biji atau pencangkakan (Yulianingtyas dan Kusmartono, 2016).

Morfologi tumbuhan ini yaitu pohonnya kecil dengan batang kasar dan berbenjol-benjol dengan tinggi mencapai 10 meter. Pohon belimbing wuluh mempunyai cabang sedikit dan arahnya condong ke atas, mempunyai bulu halus seperti beludru warna coklat muda, dan daunnya terdapat 21 sampai 45 pasang (Abrori dkk., 2024). Daun belimbing wuluh merupakan daun majemuk menyirip ganjil, tersusun berhadapan atau berseling, bentuk daun lonjong sampai pangkal daun melebar dan ujungnya meruncing warnanya kemerahan saat muda dan hijau muda setelah tua. Akar dari

belimbing wuluh yaitu akar tunggang dan kedalamannya sekitar 1,5 sampai 2 meter (Purwaningsih, 2007).

Jenis bunga berkelompok dan keluar dari batang, dengan cabang-cabangnya menggantung 5 sampai 20 cm. Mahkota bunganya berbentuk elips dengan panjang 13 sampai 20 mm dengan warna ungu gelap dan bagian pangkalnya ungu muda (Abrori dkk., 2024). Warna bunga tumbuhan ini ada juga yang kelopaknya kemerahan, warna pangkal mahkota bunga merah tetapi ujungnya keungu-unguan. Bunganya terdiri 5 kelopak dan 5 mahkota, bakal buah ada 5 ruang dengan bakal biji yang jumlahnya lebih dari 1. Kuntum bunga ini kecil dan lemah sehingga mudah gugur jika tertiuip angin (Purwaningsih, 2007).

Biji belimbing wuluh berwarna putih dengan ukuran kira-kira 6 mm dengan bentuk bulat seperti telur dengan kedua sisi runcing lalu bagian luar biji berlendir dengan struktur pipih. Bagian pada biji belimbing wuluh ada kulit biji, endosperma dan lembaga kemudian warna kulit buah hijau mengkilap dan tipis dan bertumbuh berkelompok. Rasa buah ini ketika masih muda sangat asam dan sedikit sepat, lalu saat matang masih asam tapi tidak sepat dan kadar airnya lebih banyak (Abdullah dan Munadirah, 2021).

Buah ini secara bentuk yaitu elips mirip torpedo dan bisa mencapai 10 cm dan buahnya terdapat sisa kelopak bunga yang menempel di ujungnya (Purwaningsih, 2007). Bentuk buah belimbing wuluh juga ada yang lonjong sampai berbentuk galah dengan panjangnya 4 sampai 6,5 cm berwarna hijau kekuningan. Rasa buahnya asam dan mempunyai biji berbentuk bulat telur

agak gepeng. Klasifikasi tumbuhan ini adalah sebagai berikut (Abrori dkk., 2024).

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermathophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Roside
Ordo	: Geraniales
Famili	: Oxalidaceae
Genus	: Avorrhoa
Spesies	: <i>Avorrhoa bilimbi</i> L.



Gambar 1. Batang, Buah dan Daun Belimbing Wuluh (Liantari, 2014).

Manfaat yang berpotensi dari belimbing wuluh diketahui sebagai antiradang, anti batuk, anti hipertensi, mengobati lambung dan antiinfeksi lalu berdasarkan percobaan farmakologi sebagai efek penurun panas (antipiretik) dan penurunan gula darah (hipoglikemik) (Abrori dkk., 2024). Masyarakat memanfaatkan daun belimbing wuluh sebagai pereda sakit atau nyeri dan penurun kadar gula darah, lalu dari bunganya digunakan untuk obat batuk dan asupan vitamin C dari buahnya serta penghilang ketombe atau penghilang

panu jika digosokan lalu sebagai antibiotik alami (Afifi dkk., 2018). Keseluruhan manfaat belimbing wuluh belum dimanfaatkan secara optimal karena lebih sering memanfaatkan bagian buahnya. Contoh manfaat dari buahnya dari rasa asam ialah sirup, bahan penyedap masakan, pembersih noda pada kain atau tangan kotor, pengilap barang-barang yang terbuat dari kuningan dan obat tradisional. Pemanfaatan lain buah sebagai obat tradisional untuk penyakit malaria, sakit tenggorokan, diare, luka bisul, koreng, asma, gusi berdarah, sakit gigi berlubang dan memperbaiki fungsi pencernaan (Wulandari dkk., 2017).

2. Senyawa Metabolit Sekunder Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Senyawa organik pada tumbuhan yang tidak memiliki fungsi langsung pada fotosintesis, pertumbuhan atau respirasi, translokasi, transportasi zat terlarut, sintesis protein, asimilasi nutrient, diferensiasi, pembentukan karbohidrat, protein, dan lipid disebut sebagai metabolit sekunder. Umumnya ditemui pada satu spesies atau kelompok spesies dan berbeda dari metabolit primer yang tidak merupakan kebutuhan pokok untuk hidup atau tumbuh. Hasil metabolit sekunder digunakan untuk aktivitas tertentu dan sifatnya tidak esensial tetapi jika dalam keadaan darurat bisa jadi nutrient untuk pertahanan hidup (Illing dkk., 2017).

Belimbing wuluh sebagai tanaman memiliki kandungan kimia yaitu saponin, tanin, glikosida, kalsium oksalat, vitamin A, vitamin B1, vitamin C, peroksida, asam amino, ion kalium, sianidin, glukosida dan asam sitrat (Abdullah dan Munadirah, 2021). Senyawa pada belimbing wuluh secara

umum ada flavonoid, tanin, pektin, kalium oksalat, asam galat dan asam ferulat. Bagian daun mengandung sulfur, tanin, peroksida, asam format, kalsium oksalat, kalium sitrat, flavonoid, dan saponin yang bermanfaat untuk menyembuhkan penyakit infeksi karena bakteri yang salah satunya bakteri *Propionibacterium acnes* yang menjadi penyebab jerawat (Chaniago dkk., 2024).

Fungsi kandungan vitamin C pada belimbing wuluh untuk menambah daya tahan tubuh serta melindungi tubuh dari paparan penyakit. Senyawa flavonoid sebagai antibakteri bekerja dengan cara fungsi membran sel dihambat dan membentuk senyawa kompleks yang dapat merusak membran sel bakteri. Cara lain flavonoid yakni membran sel diganggu permeabilitasnya kemudian ikatan enzim bakteri dihambat dan bisa juga penghambatan metabolisme energinya dihambat dengan penggunaan oksigen oleh bakteri (Abdullah dan Munadirah, 2021).

Senyawa kompleks yang terbentuk dari zat aktif flavonoid pada daun belimbing wuluh dengan protein bakteri terjadi melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri tidak stabil lalu kehilangan aktivitas biologinya dan fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu serta terjadi lisis akibat sel bakteri mati. Ion H^+ dari fenol dan turunan flavonoid akan menyerang gugus polar seperti gugus fosfat pada kerusakan membran sampai molekul fosfolipida terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Membran sitoplasma bocor dan pertumbuhan terhambat dan kematian bakteri yang kemudian mencegah

bahan atau nutrisi yang diperlukan untuk menghasilkan energi masuk ke membran sitoplasma (Saputra dan Anggraini, 2016).

Tanin sebagai antibakteri memiliki mekanisme dengan menghambat enzim antibakteri dan pertumbuhan bakteri dengan bereaksi dengan membran sel serta menginaktivasi enzim genetik pada bakteri. Saponin pada belimbing wuluh sebagai antiinflamasi dan antibakteri yaitu menurunkan tegangan pada permukaan dinding sel bakteri dan mengakibatkan kebocoran protein dan enzim pada sel (Abdullah dan Munadirah, 2021). Mekanisme tanin bekerja dengan menginaktivasi enzim-enzim esensial dan materi genetik, lalu senyawa tanin membentuk kompleks dengan protein melalui interaksi hidrofobik dan terjadi denaturasi sehingga metabolisme sel akhirnya terganggu (Saputra dan Anggraini, 2016).

3. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat aktif dengan pelarut tertentu dan memiliki tujuan mengekstraksi fraksi atau molekul tunggal serta menentukan senyawa metabolit dalam ekstrak tertentu. Ekstraksi memiliki prinsip yakni penggunaan pelarut dengan polaritas yang tinggi sehingga dicapai keadaan konsentrasi ekstraksi zat larut dan pelarut. Metode ekstraksi dibedakan menjadi dua yaitu ekstraksi dingin contohnya maserasi, perkolasi, ekstraksi *phytonic*, fermentasi, dan mikroekstraksi fase padat lalu ekstraksi panas yaitu ekstraksi Soxhlet, perebusan, infus, hidrodistilasi, ekstraksi *microwave*, ekstraksi ultrasonik (Mukherjee, 2019).

Proses pemisahan zat aktif pada ekstraksi bisa dari bagian tanaman

obat dan hewan dengan disesuaikan pelarutnya, lalu yang tersisa seperti serbuk atau massa diperlakukan hingga memenuhi baku yang ditetapkan. Perpindahan komponen zat aktif ke pelarut dimulai dari lapisan antar muka lalu berdifusi ke dalam pelarut yang kemudian hasil dari proses ekstraksi disebut ekstrak. Pedoman sederhana dari ekstraksi yaitu senyawa polar akan larut dengan baik pada fase polar dan senyawa nonpolar larut pada fase nonpolar atau istilahnya *like dissolve like* (Illing dkk., 2017).

Pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya ada 3 jenis yaitu polar dengan contoh etanol 96%, semi polar dengan contoh etil asetat, dan non polar dengan contohnya n-heksana (Widyasanti dkk., 2018). Penggunaan pelarut untuk ekstraksi bisa keadaan asam, basa, atau netral dengan metode yang khas dan sesuai sifat fisik dan kimia dari kandungan kimianya. Pelarut yang digunakan untuk proses ini antaranya eter, etanol, karbon, tetra klorida, aseton, methanol, heksan, petroleum eter dan lainnya (Illing dkk., 2017).

Faktor ekstraksi dipengaruhi oleh tipe persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, tipe pelarut dan suhu. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana dengan keunggulannya mengikat bahan simplisia dalam cairan pelarut. Proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan memecahkan dinding dan membran sel pada bahan karena bedanya tekanan di dalam dan di luar sel yang menyebabkan metabolit sekunder di sitoplasma terlarut oleh pelarut (Pendit dkk., 2016).

Cara kerja maserasi dilakukan dengan serbuk simplisia direndam dengan pelarut yang cocok tanpa pemanasan dan dilakukan pada suhu kamar

dan terlindung dari cahaya. Pelarut untuk maserasi ada air, etanol, eter dan paling umum dipilih yakni etanol karena bersifat selektif dan tidak beracun, mempunyai daya absorbansi baik, melarutkan zat aktif dan meminimalisir terlarutnya zat pengganggu seperti lemak (Fatayati dkk., 2025). Kelebihan lain dari etanol yakni kapang dan khamir sulit tumbuh, mudah menguap dan ekstrak kental yang didapat lebih cepat jika dibandingkan pelarut lain (Astuti dkk., 2024). Proses ekstraksi dengan cara maserasi memiliki kelebihan yaitu proses biaya yang rendah, tidak memerlukan keahlian khusus untuk menerapkannya, tidak perlu pemanasan jika dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lainnya (Prayoga dkk., 2019). Kekurangan dari maserasi yaitu dibutuhkan banyak pelarut dengan kemurnian tinggi, waktu ekstraksi lama, evaporasi pelarut dalam jumlah banyak, dan selektivitas ekstraksi yang rendah (Kautsari dkk., 2020).

Ekstraksi dimulai dengan bahan atau sampel yang digunakan dilakukan sortasi basah atau dibersihkan supaya tidak ada kotoran yang menempel, lalu dilakukan sortasi kering dengan cara dikeringkan untuk mengurangi kadar air dalam bahan sampai mikroorganisme dan penyebab pembusukan terhenti (Yuliana dkk., 2023). Pengeringan dilakukan pada suhu yang bertujuan agar senyawa pada sampel tidak rusak dan jika sudah kering maka dihaluskan hingga menjadi serbuk supaya memperbesar permukaan dan mempermudah proses ekstraksi terutama proses tertariknya komponen zat aktif pada sampel (Nurjanah dkk., 2022). Kadar air pada simplisia yang baik yakni $\leq 10\%$ sehingga mikroorganisme sulit untuk tumbuh sehingga bisa

disimpan dalam waktu cukup lama (Fatayati dkk., 2025).

Ekstraksi dengan maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 96% dan ditutup rapat selama 3 hari dengan sesekali diaduk atau digoyangkan kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dari ampas. Ampas dimaserasi kembali dengan etanol 96% untuk memastikan zat aktif terekstraksi sempurna. Hasil filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental yang bebas dari pelarut, lalu ekstrak bisa diencerkan sesuai konsentrasi yang dibutuhkan (Astuti dkk., 2024).

Perbandingan hasil banyaknya ekstrak yang diperoleh setelah ekstraksi dari sampel ialah rendemen. Nilai rendemen menunjukkan tinggi atau rendahnya tingkat komponen senyawa zat aktif yang terkandung pada simplisia dan penting untuk mengetahui data rendemen dari simplisia untuk digali komponen zat aktifnya (Chaniago dkk., 2024). Syarat rendemen yang diperoleh dan dikatakan baik yakni lebih dari $<10\%$ dan hal itu dipengaruhi waktu, suhu, pengadukan dan pelarut saat proses ekstraksi (Astuti dkk., 2024).

4. Fitokimia

Pengujian fitokimia atau skrining fitokimia adalah uji secara kualitatif pada tahap pendahuluan yang dilakukan dan bertujuan mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung (Simanullang dkk., 2021). Skrining fitokimia bisa dibilang tahapan penting dalam mengetahui potensi sumber daya tanaman obat sebagai antioksidan, antibakteri dan antikanker. Cara yang dilakukan supaya metabolit sekunder pada tumbuhan diidentifikasi yaitu

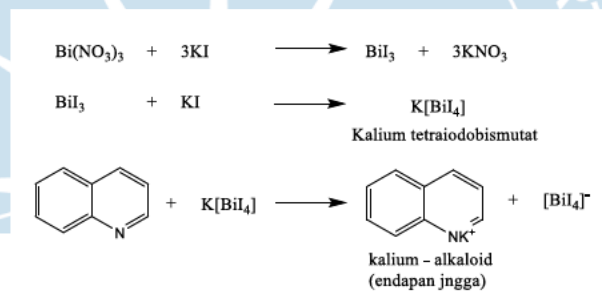
ekstrak dianalisis, lalu dilihat reaksi perubahan warna dan diketahui senyawa yang terkandung. Senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan ialah saponin, terpenoid, steroid, tanin flavonoid dan alkaloid (Karmilah dkk., 2023).

a. Alkaloid

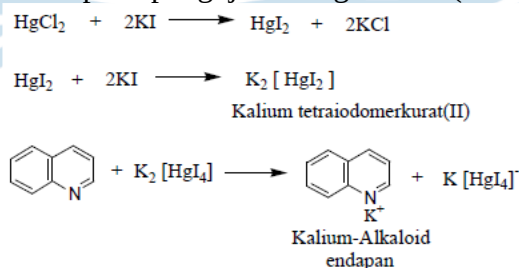
Senyawa alkaloid ialah golongan atau kelompok senyawa organik siklik yang mengandung nitrogen dan metabolit sekunder terbesar yang diketahui ada 5500 jenis, lalu umumnya dimanfaatkan untuk pengobatan. Alkaloid dibagi menjadi 3 jenis yaitu alkaloid sejati yang mengandung cincin nitrogen heterosiklik, bersifat basa dan dari asam amino. Jenis lainnya alkaloid gabungan yang merupakan turunan asam amino tanpa cincin heterosiklik dengan contoh meskalina kemudian alkaloid semu yang bukan berasal dari asam amino tapi mengandung nitrogen heterosiklik yang contohnya turunan terpenoid atau senyawa asetat. Berdasarkan sistem cincin nitrogen alkaloid yaitu piridina, piperidina, indol, isokunolina, dan tropana lalu meskalina dan efedrina memiliki nitrogen dalam rantai alifatik. Penyerapan spektrum UV alkaloid yaitu λ_{maks} 250 sampai 303 nm lalu dapat ditemui sebagai garam organik terutama garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat pada laboratorium (Illing dkk., 2017).

Pengujian alkaloid dilakukan dengan menggunakan tiga pereaksi yaitu Dragendorff, Mayer dan Wagner. Pereaksi Mayer dibuat dari larutan merkuri(II) klorida (HgCl_2) dengan kalium iodide (KI) dengan hasil reaksinya yaitu endapan merah merkuri(II) iodide (HgI_2) dan apabila

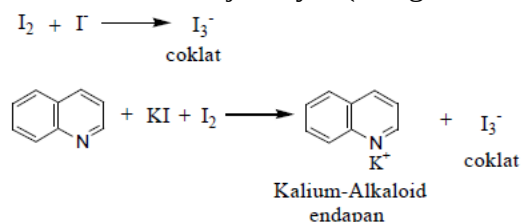
tambahan KI berlebih maka terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II) ($K_2[HgI_2]$). Pereaksi Dragendorff terdiri dari bismuth nitrat ($Bi(NO_3)_3$) yang dilarutkan ke HCl dan direaksikan dengan KI dengan reaksinya ada endapan coklat jingga. Pereaksi Wagner dari iodine (I_2) dengan KI yang menghasilkan warna coklat dari reaksi iodine dengan ion I^- dari KI menjadi I_3^- lalu gugus nitrogen alkaloid berikatan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ terbentuk kompleks kalium-alkaloid (Yanti dan Vera, 2019). Reaksi pengujian alkaloid bisa dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.



Gambar 2. Reaksi pada pengujian Dragendorff (Tandi dkk., 2020)



Gambar 3. Reaksi Uji Mayer (Illing dkk., 2017)



Gambar 4. Reaksi Uji Wagner (Illing dkk., 2017)

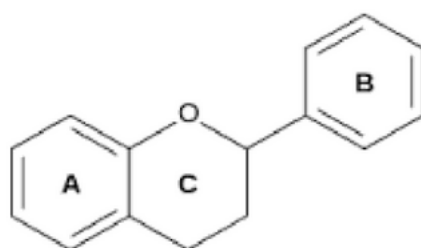
Pengujian dengan dragendorff memiliki hasil positif jika terdapat endapan kalium alkaloid karena pereaksi Dragendorff dibuat dari pencampuran bismut nitrat dengan HCl yang bertujuan agar terbentuk ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Ion Bi^{3+} bereaksi dengan kalium iodida dan terbentuk endapan hitam bismut (III) iodida yang terlarut dalam kalium iodida dan membentuk kalium tetraiodobismutat. Penggunaan nitrogen pada uji alkaloid dengan Dragendorff ditujukan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam K^+ (Tandi dkk., 2020).

b. Flavonoid

Flavonoid ialah senyawa polifenol turunan flavan yang memiliki kerangka karbon C6-C3-C6, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Struktur aromatik terkonyugasi dalam flavonoid membuatnya menunjukkan penyerapan kuat pada spektrum UV yakni flavon λ_{maks} 250 hingga 270 nm dan 330 hingga 350 nm, flavanol λ_{maks} 250 sampai 270 nm dan 350 hingga 390 nm, isoflavone 255 hingga 265 nm, dan flavanon 275 sampai 290 nm. Senyawa ini banyak ditemukan dalam tumbuhan dan dikenal sebagai salah satu tipe polifenol yang umum serta memiliki berbagai aktivitas biokimia, seperti antioksidan, antimutagenik, sitotoksik, dan pengatur ekspresi gen (Illing dkk., 2017).

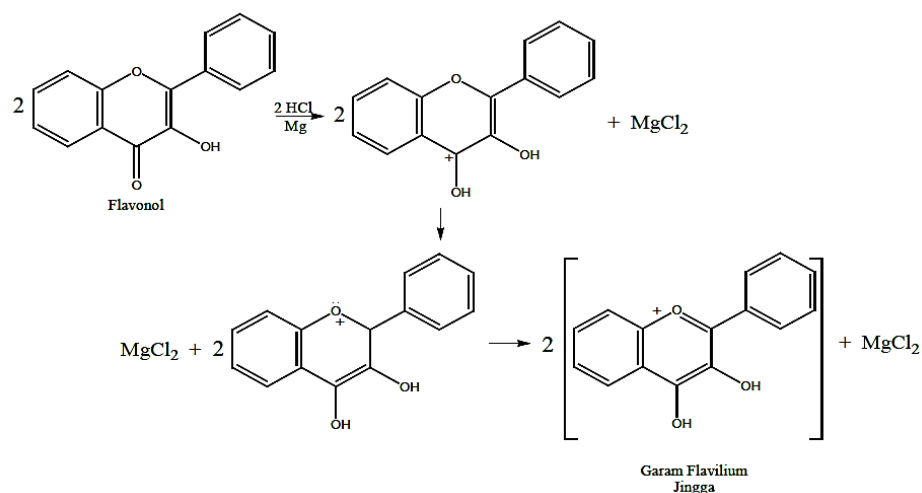
Senyawa ini merupakan juga salah satu kelompok fenolik yang memiliki beberapa gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula dan

juga senyawa polar yang larut dengan pelarut polar. Contoh pelarut polar yakni ada etanol (EtOH), methanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetil formamide (DMF), air dan lainnya. Senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan seperti daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nectar, bunga dan biji. Manfaat flavonoid yakni menjadi antioksidan, melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang, antidiare, antidiabetes dan antibiotik. Flavonoid umumnya tersebar pada golongan tumbuhan angiospermae seperti sereal, sayur-sayuran dan buah (Yulianingtyas dan Kusmartono, 2016).



Gambar 5. Struktur flavonoid (Fikayuniar, 2022)

Uji flavonoid memiliki hasil positif yaitu perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga dengan pereaksi HCl pekat dan serbuk Mg. Penambahan Mg dan HCl untuk mereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavillum yang menyebabkan perubahan warna menjadi merah atau jingga. Hasil positif tersebut didukung dengan gelembung-gelembung gas H₂ (Illing dkk., 2017).



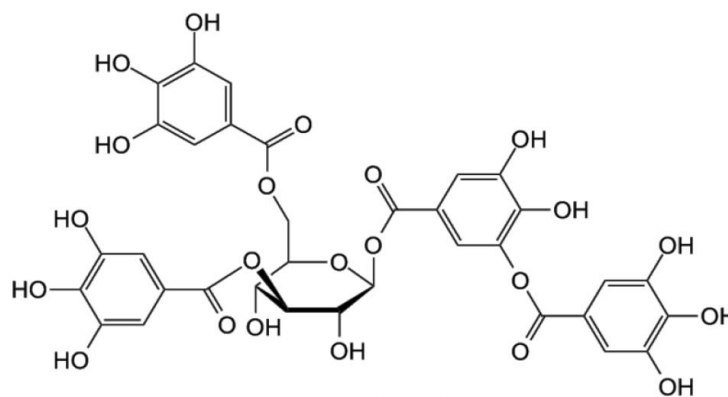
Gambar 6. Reaksi pengujian flavonoid antara HCl dan logam Mg (Tandi dkk., 2020)

c. Tanin

Tanin berasal dari tumbuhan yang terpisah dari protein dan enzim sitoplasma dan himpunan polihidroksi fenol yang dapat dibedakan dari fenol lainnya karena kemampuan mengendapkan protein. Tanin termasuk senyawa yang tidak larut dalam pelarut non polar seperti eter, kloroform dan benzene tapi mudah larut dalam air seperti air, dioksan, aseton, alkohol dan sedikit larut dalam etil asetat (Saputra dan Anggraini, 2016). Senyawa Tanin adalah senyawa fenol yang mempunyai besar berat molekul terdiri gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil kompleks kuat yang efektif dengan protein dan makromolekul (Hidjrawan, 2018).

Senyawa tanin memiliki aktivitas antioksidan yang menghambat pertumbuhan tumor dan pada tanaman senyawa ini menjadi pertahanan melawa jamur, bakteri patogenik dan pemakannya seperti serangga dan

herbivora (Saputra dan Anggraini, 2016). Senyawa ini pada tumbuhan dalam melindungi dari gangguan hewan dengan memberi rasa sepat atau pahit. Tanin bersifat mudah teroksidasi dan mudah berubah menjadi asam tanat yang bergantung pada senyawa ini terkena air atau udara (Hidjrawan, 2018).

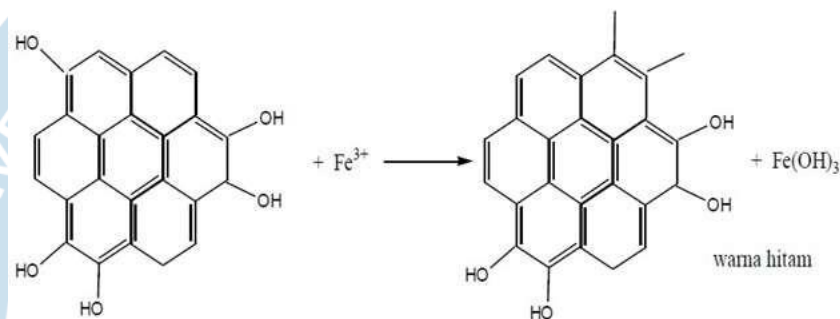


Gambar 7. Struktur kimia tanin (Hidjrawan, 2018)

Senyawa ini mempunyai dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan terhidrolisis pada tumbuhan yang mana keduanya ada pada tumbuhan. Perbedaan kedua jenis tanin yakni jika tanin terkondensasi terjadi dari reaksi polimerisasi antar flavonoid, sedangkan tanin terhidrolisis reaksi esterifikasi asam fenolat dan glukosa. Asam tanat merupakan salah satu contoh tanin terhidrolisis yang berasal dari polimer asam galat dan glukosa lalu bentuknya serbuk amorf, berkilau, berwarna kuning putih hingga coklat terang dengan bau khas. Asam tanat memiliki fungsi untuk mengobati diare, efek anti bakteri, antienzimatik, antioksidan dan antimutagen (Hidjrawan, 2018).

Reaksi pengujian tanin positif jika berubah warna menjadi biru tua

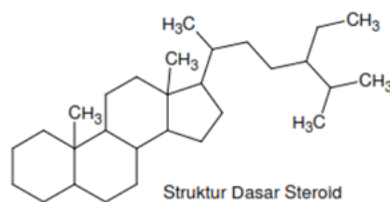
atau hijau kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon. Warna tersebut didapat dari penambahan FeCl_3 bereaksi dengan ion Fe^{3+} membentuk senyawa kompleks. Proses pengujian tanin bisa dilihat pada Gambar 8 (Astuti dkk., 2024).



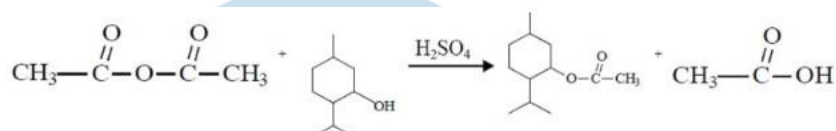
Gambar 8. reaksi uji tanin (Astuti dkk., 2024)

d. Steroid dan Triterpenoid

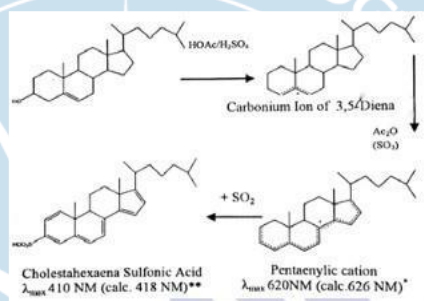
Uji triterpenoid atau steroid dilakukan dengan pereaksi Lieberman-Burchard (anhidrida asetat dan H_2SO_4 pekat) yang kebanyakan triterpena dan sterol. Hasil positifnya yaitu warna hijau-biru menunjukkan positif adanya steroid dan jika perubahan warna merah-ungu, coklat menunjukkan adanya triterpenoid (Putra dkk., 2016). Hasil positif pada senyawa steroid atau triterpenoid karena steroid dan triterpenoid bersifat nonpolar (Firdiyani dkk., 2015).



Gambar 9. struktur dasar steroid (Illing dkk., 2017)



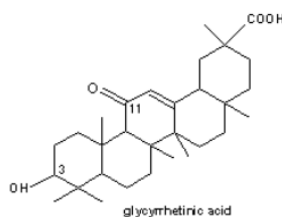
Gambar 10. Reaksi uji triterpenoid (Astuti dkk., 2024)



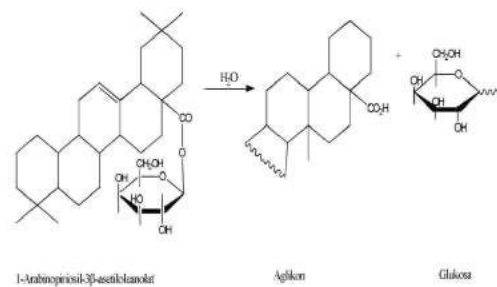
Gambar 11. pengujian steroid (Astuti dkk., 2024)

e. Saponin

Uji saponin dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan saponin pada ekstrak sampel melalui uji busa. Uji busa saponin bersifat polar sehingga akan lebih mudah larut dan pelarut yang paling baik untuk uji saponin yaitu methanol karean paling baik dalam menarik senyawa saponin. Hasil positif uji saponin yaitu terbentuk busa stabil dengan ketinggian 1 sampai 3 cm (Marpaung dan Romelan, 2018).



Gambar 12. Struktur Saponin (illing dkk., 2017)



Gambar 13. Proses Hidrolisis uji Saponin (Astuti dkk., 2024)

5. Handsanitizer

Handsanitizer merupakan salah satu contoh produk dari antiseptik yang merupakan pembersih untuk tangan secara praktis tanpa air. Fungsi *Handsanitizer* yaitu menjadi pengganti dari sabun dan air saat akan membersihkan tangan dari bakteri dan efisien waktu karena lebih cepat dalam membersihkan tangan (Asngad dan Nopitasari, 2018). Bentuk sediaan *handsanitizer* yang ditemui secara umum yaitu berupa *spray* dan gel. Bentuk *spray* memiliki kelebihan yaitu mudah diaplikasikan dan pemakaian lebih cepat (Martono dan Suharyani, 2018). Kekurangan sediaan *spray* yaitu pemakaian tergantung cara penyemprotannya (Lestari dkk., 2020).

Sediaan *handsanitizer* lainnya yaitu gel memiliki kelebihan daya sebar lebih baik tetapi kekurangannya yaitu lebih lengket di tangan daripada *spray* (Martono dan Suharyani, 2018). Alasan lain *handsanitizer* digunakan karena proteksi dasar WHO yang menganjurkan untuk mencuci tangan dengan sabun dan air atau cairan berbahan alkohol. Bahan pembuatan *handsanitizer* dibagi menjadi 2 yaitu basis non alkohol dan basis mengandung alkohol yang merupakan salah satu pilihan untuk mendesinfeksi tangan antara

60 % sampai 95 % sebagai humektan (Golin dkk., 2020). Contoh senyawa alkohol yaitu etanol, propanol, iso propanol dengan konsentrasi sekitar 60 % sampai 80 %. Kelebihan penggunaan alkohol yaitu murah, mudah didapatkan dan memiliki efek kuat pada bakteri (Isa dkk., 2019).

Kekurangan penggunaan alkohol yaitu sifat mudah terbakar dan penggunaan berulang-ulang bisa menyebabkan kulit teriritasi serta membahayakan kesehatan kulit. Karena kekurangan tersebut maka perlu ditambahkan bahan lain supaya tetap efektif tanpa efek samping misalnya bahan alami lidah buaya atau hidrogen peroksida dan gliserin. Proses pembuatan yang dilakukan berdasarkan anjuran WHO untuk 1 Liter *Handsanitizer* yaitu alkohol 96 % sebanyak 833 mL ditambahkan gliserol 98 % sebanyak 14,5 mL, H_2O_2 sebanyak 41,7 mL dan akuades dimasukkan ke wadah yang bersih lalu diaduk rata (Sumarsih, 2021).

Persyaratan formulasi *Handsanitizer* contohnya untuk sediaan gel yaitu dengan penambahan Carbopol 940 menghasilkan sediaan putih, gel semisolid, pH 4,6 sampai 6,3 dan viskositas 2000 hingga 4000 cps. pH *Handsanitizer* perlu diperhatikan dengan pH kulit manusia yaitu 4,5 sampai 6,5 karena jika tidak optimal maka bisa menyebabkan iritasi pada kulit. Syarat mutu untuk *handsanitizer* berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI 2588:2017) yaitu (BSN, 2017).

Tabel 1. Syarat Mutu *Handsanitizer* (BSN, 2017)

No.	Kriteria Uji	Satuan	Syarat
1	pH	-	4-10
2	Total bahan aktif	% fraksi massa	Min. 10
3	Bahan yang tidak larut dalam etanol	% fraksi massa	Maks. 0,5
4	Alkali bebas (dihitung sebagai NaOH)	% fraksi massa	Maks. 0,05
5	Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)	% fraksi massa	Maks. 1
6	Cemaran Mikroba Angka Lempeng Total	Koloning	Maks. 1×10^3

6. Formulasi dan Evaluasi

Kegiatan evaluasi dengan cara pengaruh hasil sifat fisik dan stabilitas dari sediaan. Nilai kestabilan dalam sediaan farmasetika maupun kosmetik dengan waktu singkat dilakukan dengan uji stabilitas yang dipercepat supaya diperoleh informasi dalam waktu sesingkat mungkin. Pengujian dilakukan secara umum meliputi organoleptik, homogenitas, pengukuran pH, dan daya sebar (Mamahit dkk., 2019).

Berdasarkan SNI 2588:2017 diketahui evaluasi formulasi *Handsanitizer* meliputi organoleptik, homogenitas, pH, pola penyemprotan dan efektivitas (Mosse dkk., 2021). Organoleptik dinilai dari visual dan bau yaitu bentuk setengah padat, warna sesuai spesifikasi awal pembuatan dan bau tidak tengik. Homogenitas secara umum dilihat ada tidaknya gumpalan pada sediaan saat dituang ke gelas objek dan diratakan (Baizuroh dkk., 2020).

Pola penyemprotan dilakukan untuk melihat besarnya diameter penyemprotan pada sediaan bentuk spray. Hasil pola yang dihitung rata-rata diameter dari diameter terpanjang dan terpendek (Martono dan Suharyani

dkk., 2018). Faktor pola penyemprotan dipengaruhi dari karakteristik formula, jarak penyemprotan dan viskositas sediaan yang diketahui semakin besar jarak penyemprotan maka pola yang dihasilkan semakin besar (Isabella dan Azizah, 2021). PH berpengaruh pada tingkat keasaman atau kebasaan dari sediaan dan yang baik yaitu 4,5-6,5 atau pH kulit manusia. Hasil pH jika kurang akan mengakibatkan iritasi dan jika lebih menyebabkan kulit bersisik (Sandi dan Musfirah, 2018).

7. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri patogen bersifat invasif, terdapat koagulasi, terjadi hemolisis, meragikan manitol dan mencairkan gelatin serta bisa hidup pada media dengan pH 7,2 sampai 7,4. Bakteri ini termasuk nonmotil dan karakteristik biokimia yakni pewarnaan Gram positif, mengalami oksidase, memproduksi indol, negatif terhadap sitrat dan positif katalase (Rahmaningsih dkk., 2012). Bakteri ini memiliki ciri-ciri bentuk bulat seperti buah anggur yang berukuran diameter 0,7 sampai 1,2 μm . Bakteri ini biasanya berkelompok tidak teratur, tapi tidak membentuk spora, fakultatif, anaerob, dan tidak bergerak. Bakteri ini bisa hidup optimum pada suhu 37°C tapi jika suhu kamar yakni 20 sampai 25°C akan membentuk pigmen dari abu-abu hingga kuning keemasan, menonjol dan berkilau (Rianti dkk., 2022).



Gambar 14. Bakteri *Staphylococcus aureus* (Abdullah dan Munadirah, 2021)

Bakteri ini termasuk flora normal yang bisa ditemukan pada manusia terutama bagian kulit, hidung, dan tenggorokan. Pertumbuhannya baik pada bahan pangan khususnya jika pengelolaan makanannya kurang bersih. Makanan yang tercemar bakteri ini akan mengalami keracunan enterotoksin seperti kejang pada perut dan muntah-muntah (Fhitryani dkk., 2017).

8. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri spesies dari famili Pseudomonodaceae dengan genus *Pseudomonas* (Yilmaz, 2017). Bakteri ini dapat tumbuh pada media yang memiliki pH 5,3 sampai 9,7 dengan suhu 15°C hingga 30°C. Hal lain dari bakteri ini yakni bisa mengurai senyawa protein, dan karbohidrat, serta senyawa organik seperti CO₂ dan amsireg

oniak (Rahmadian dkk., 2018). Ciri khas bakteri ini yaitu berbentuk batang, bergerak dengan flagella, aerob, terlihat tunggal atau ganda dan kadang bentuk rantai pendek. Sifat bakteri ini menjadi patogenik ketika berada di tempat dengan daya tidak normal seperti selaput lendir dan kulit yang jaringannya rusak (Widowati dkk, 2019).

Bentuk *Pseudomonas aeruginosa* bisa berukuran $0,6 \times 2 \mu\text{m}$ lalu bakteri ini juga bisa tumbuh baik pada $37\text{-}42^{\circ}\text{C}$. Sifat bakterinya yaitu aerobik obligat yang tumbuh dengan cepat pada berbagai tipe media dan bisa berada dalam orang sehat yang sifatnya saprofit. Bakteri ini membuat manusia sakit dengan ketahanan tubuh yang tidak normal dan menyebabkan infeksi sekunder pada luka, luka bakar, juga merupakan penyebab diare pada bayi dan infeksi saluran kemih (Wuryanti dan Murnah, 2009).

Pengujian biokimia atau kultur bakteri ini yakni bisa hidup pada media biasa, tidak mengurai gula, pengujian katalase dan oksidase positif. Identifikasi bakteri ini positif ketika motilitas, Simmon's Citrate, Arginin dihidrolisa, gelatinase, reduksi nitrat dan pertumbuhan suhu 42°C . Hasil identifikasi bakteri negatif saat pengujian O N P G tes, D-Nase, Amylase, Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, Aesculine hydrolysa (Soemarno, 2000). Identifikasi secara mikrobiologi biasanya menggunakan media selektif seperti *Cetrimide*, *Cephaloridine*, *Fucidin*, *Nalidixic acid*, *Phenanthroline* dan *Irgasan* (Yilmaz, 2017). Hasil positif dari identifikasi pada media selektif maka ada pigmen piosianin atau pigmen pioverdin berupa warna biru dan kehijau-hijauan (Sulviana dkk., 2017).

9. Pengujian Antibakteri

Aktivitas antibakteri dapat dipelajari menggunakan beberapa metode diantaranya metode dilusi, metode difusi agar, dan metode percampuran antara difusi dan dilusi. Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antibakteri dan memiliki 3 cara yaitu metode sumuran,

metode cakram, dan metode silinder. Metode difusi memiliki prinsip kerja senyawa antibakteri terdifusi ke dalam media padat yang terdapat mikroba uji telah diinokulasikan (Nurhayati dkk., 2020).

Metode difusi cakram caranya yaitu kertas cakram (*paper disc*) sebagai media untuk menyerap bahan antimikroba dijenuhkan ke dalam bahan uji. Caranya kertas cakram diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan biakan mikroba uji, lalu diinkubasikan selama 18 sampai 24 jam suhu 35°C dalam inkubator. Area atau zona bening di sekitar kertas cakram diamati untuk diketahui ada tidaknya pertumbuhan mikroba dan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Kelebihan dari metode cakram yaitu dapat dilakukan pengujian dengan lebih cepat pada penyiapan cakram (Nurhayati dkk., 2020).

Amoksilin

B. Hipotesis

1. Hasil senyawa metabolit sekundernya yaitu flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan steroid.
2. Kadar flavonoid dari ekstrak daun belimbing wuluh yaitu $85,63 \pm 0,01$ QE/ mg ekstrak.
3. Pengujian antibakteri pada ekstrak daun belimbing wuluh terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu diperkirakan ukuran zona hambat 28 mm dan *Pseudomonas aeruginosa* yaitu diperkirakan ukuran zona hambat 20 mm.
4. Hasil evaluasi sediaan *handsanitizer* yaitu pengujian organoleptik yaitu warna sedikit kehijauan, bau biasa saja, bentuk cair. Homogenitas yaitu homogen, pH sekitar 5 dan pola penyemprotan lebih dari 10 mm diameternya.

5. Pengujian antibakteri pada sediaan *handsanitizer spray* terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu diperkirakan ukuran zona hambat 28 mm dan *Pseudomonas aeruginosa* yaitu diperkirakan ukuran zona hambat 20 mm.

