

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman daun *V. amygdalina*

2.1.1 Klasifikasi daun *V. amygdalina*

Klasifikasi tanaman daun *V. amygdalina* menurut (Asante & Wiafe, 2023) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: <i>Vernonia</i>
Species	: <i>Vernonia amygdalina</i>



Gambar 1 Tanaman daun *V. amygdalina*

Sumber: Dokumentasi pribadi

Tanaman daun *V. amygdalina* merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang berasal dari Nigeria tanaman ini umumnya tumbuh di negara beriklim tropis, termasuk di berbagai negara di Asia salah satunya di Indonesia. Umumnya daun *V. amygdalina* ditanam dikebun atau sekitar perumahan yang digunakan sebagai alternatif pengobatan tradisional (Sandy & Vinda Praticia, 2022).



Gambar 2 Daun Afrika kering

Sumber: FHI, 2017

2.1.2 Nama lain daun *V. amygdalina*

Tanaman daun *V. amygdalina* memiliki banyak nama lain di berbagai wilayah, di Indonesia tanaman ini lebih familiar dengan sebutan *daun Afrika* atau *daun pahit*. Di Ghana tanaman ini disebut *Awonwono*, di Nigeria dikenal sebagai *Onugbu*, di Tanzania disebut *Tuntwano* dan di Malaysia dikenal sebagai *Pokok bismillah*. Penyebutan nama yang beragam menunjukkan keberagaman budaya dalam persebaran geografis dari tanaman daun *V. amygdalina* (Asante & Wiawe, 2023).

2.1.3 Morfologi dan karakteristik tanaman daun *V. amygdalina*

Tanaman daun *V. amygdalina* atau *V. amygdalina* merupakan daun yang memiliki ciri khas rasa daun yang pahit. Tanaman ini merupakan semak kecil yang tingginya bervariasi sekitar 3 – 7 m. Secara morfologis, cabang-cabang mudanya memiliki permukaan dan bulu halus. Batang tanaman ini berwarna abu-abu sampai coklat dengan diameter sekitar 40 cm dan tekstur kulit yang halus.

Daun *V. amygdalina* berwarna hijau sedang hingga hijau gelap, tersusun secara berseling. Tangkai daunnya berukuran 24 – 4 cm. helaian daun berbentuk lonjong elips atau lanset dengan ukuran berkisar 10 sampai 15 cm dan lebar antara 4 sampai 5 cm. pangkal daun umumnya meruncing atau membulat sedangkan ujung daun berbentuk meruncing. Tepi daun bergerigi, permukaan daun dilapisi bulu sangat halus dan susunan tulang daunnya menyirip. Bunga *V. amygdalina* tersusun majemuk seperti payung. Mahkota bunga dari daun *V. amygdalina* berbentuk tabung, berwarna keputihan, bersifat kelenjar dan memiliki lobus tegak dengan ukuran Panjang 5-88 mm. Kepala sari benang sari menyatu membentuk tabung dan memiliki pelengkap di ujungnya. Buah daun *V. amygdalina* berukuran 1,5 – 3,5

mm, warnanya coklat hingga hitam, pada ujungnya terdapat bulu pappus yang ukurannya lebih Panjang. Buah ini memiliki jenis perkecambahan epigeal (Earthbone.africa, 2021).



**Gambar 3 Tanaman daun
*V. amygdalina***



**Gambar 4 Tunas muda daun
*V. amygdalina***



**Gambar 5 Permukaan bawah daun
dewasa**

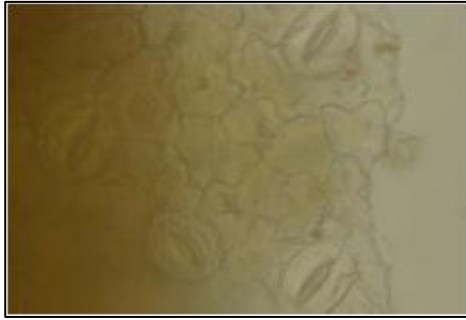


**Gambar 6 Permukaan atas daun
dewasa**

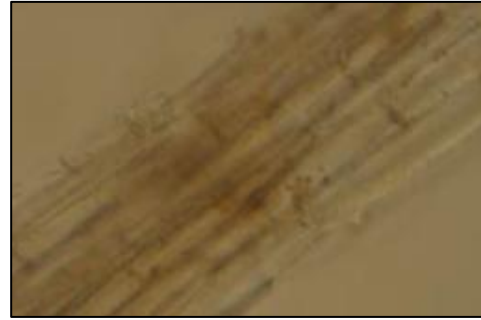
Sumber: Dokumen pribadi

2.1.4 Mikroskopis

Bahan serbuk terdiri dari stomata anomositik yang ditemukan pada epidermis, dengan striae kutikula dan garis sel berkelok-kelok (permukaan abaksial), sel epidermis, sel parenkim, fragmen sel pembuluh spiral, dan tiga jenis trikoma multiseluler sederhana, kelenjar peltate dan kelenjar berbentuk T tidak beraturan (Eathborn.africa, 2021).



Gambar 7 Epidermis bawah dengan stomata



Gambar 8 Sklerenkim daun Afrika

Sumber: FHI, 2017

2.1.5 Syarat Tumbuh

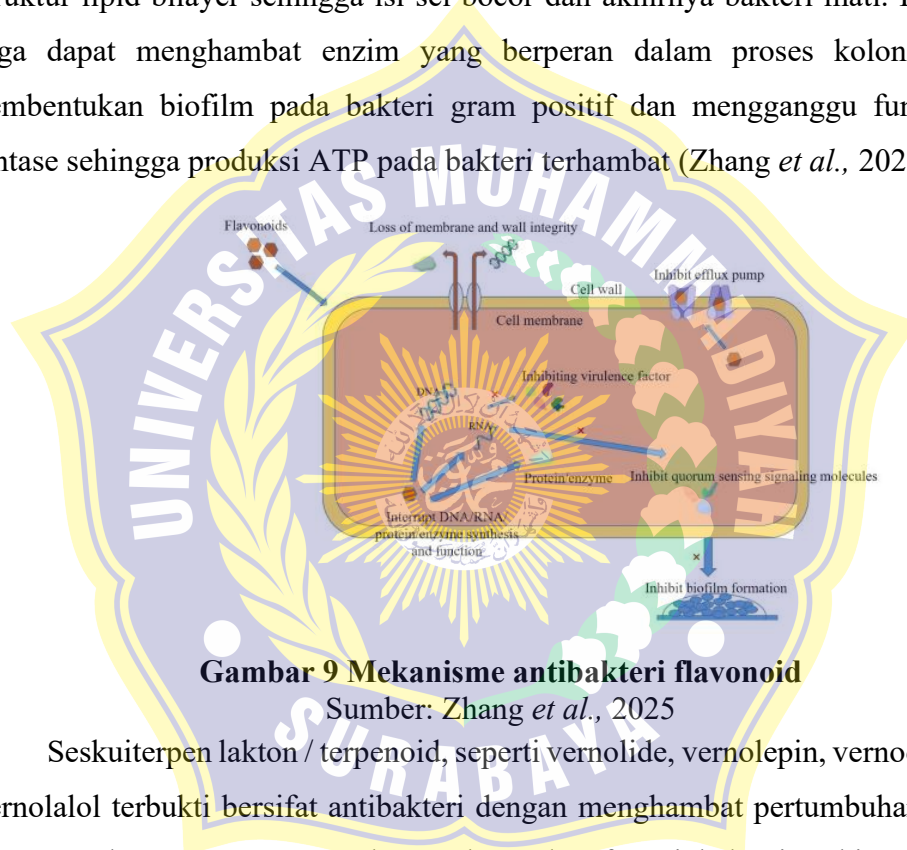
Tanaman daun *V. amygdalina* merupakan salah satu tanaman yang dikenal sangat mudah di budidayakan karena mampu tumbuh dalam berbagai jenis tanah terutama di tanah subur dengan banyak kandungan unsur hara, sehingga budidayanya tidak terlalu bergantung pada jenis tanah. Selain kondisi tanah, faktor pencahayaan juga sangat penting bagi tanaman ini, tanaman daun *V. amygdalina* membutuhkan Cahaya matahari secara penuh untuk mengoptimalkan proses fotosintesisnya. Tanaman daun *V. amygdalina* mampu tumbuh hingga di ketinggian ketinggian 2800 m diatas permukaan laut sehingga cocok di budidayakan di dataran rendah maupun dataran tinggi. Tanaman *V. amygdalina* juga membutuhkan curah hujan yang relatif tinggi. Proses penanaman daun *V. amygdalina* biasanya dilakukan pada musim hujan atau pada tahun kedua dari masa tanam pertama. Penanaman daun *V. amygdalina* biasanya dengan stek batang ataupun dari biji yang dihasilkan dari buahnya. Pemanenan daun *V. amygdalina* juga memiliki teknik tersendiri, di mana pada musim penghujan, pemanenan dapat dilakukan dengan cara memotong bagian pucuk daun, sehingga tunas-tunas baru akan tumbuh dan muncul. Sedangkan pada musim kemarau, teknik panen yang digunakan umumnya dengan mengambil daun secara langsung tanpa pemotongan pucuk, untuk menjaga keberlangsungan hidup tanaman terutama ketika ketersediaan air terbatas (Maris *et al.*, n.d.).

2.1.6 Metabolit Sekunder

Daun *V. amygdalina* mempunyai banyak metabolit sekunder yang dapat bermanfaat bagi kesehatan seperti protein, lemak, serat, asam amino, vitamin, mineral, serta karbohidrat yang merupakan unsur makro dan mikro penting untuk

tubuh. Selain itu, daun ini juga kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, senyawa fenolat, terpen, steroid glikosida, triterpenoid, dan seskuiterpen lakton (Bestari *et al.*, n.d.)

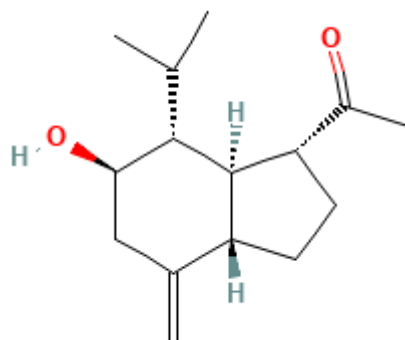
Aktivitas antibakteri flavonoid melalui beberapa mekanisme. Umumnya flavonoid merusak struktur fisik bakteri dan mengganggu proses biologisnya. Salah satu cara kerjanya yaitu dengan menghambat enzim DNA girase, misalnya quercetin yang mampu mencegah replikasi DNA pada bakteri. Selain itu, flavonoid juga dapat berinteraksi dengan membran sel bakteri, menyebabkan gangguan pada struktur lipid bilayer sehingga isi sel bocor dan akhirnya bakteri mati. Flavonoid juga dapat menghambat enzim yang berperan dalam proses kolonisasi dan pembentukan biofilm pada bakteri gram positif dan mengganggu fungsi ATP sintase sehingga produksi ATP pada bakteri terhambat (Zhang *et al.*, 2025)



Gambar 9 Mekanisme antibakteri flavonoid

Sumber: Zhang *et al.*, 2025

Seskuiterpen lakton / terpenoid, seperti vernolide, vernolepin, vernodalin, dan vernolalol terbukti bersifat antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri, terutama dengan cara merusak membran dan fungsi bakteri, sehingga bakteri menjadi tidak aktif dan mati. Selain itu senyawa ini juga diketahui memiliki sifat sitotoksik, yang dapat menghambat pertumbuhan hingga membunuh sel kanker dengan cara mengganggu siklus sel kanker dan menyebabkan kematian sel atau apoptosis (Bestari *et al.*, n.d).



Gambar 10: Struktur kimia seskuiterpen

Sumber: PubChem.com

Senyawa kimia lain yang terkandung dalam daun *V. amygdalina* adalah tanin. Tanin berpotensi sebagai agen antibakteri dengan cara mengendapkan protein bakteri yang dapat mengganggu struktur dan fungsi sel bakteri. Tanin juga menghambat enzim seperti DNA topoisomerase dan reverse transcriptase yang berperan sebagai pembentukan dan replikasi sel baru pada bakteri. Selain itu tanin juga dapat merusak membran sel bakteri, menonaktifkan enzim dan adhesin yang dapat membuat bakteri menempel pada jaringan tubuh serta menyebabkan terganggunya transport protein dalam sel (Sunani & Hendriani, 2023). Adapun parameter standarisasi daun *V. amygdalina* dalam FHI adalah sebagai berikut:

Tabel 1 Parameter standarisasi daun *V. amygdalina*

Sumber: FHI, 2017

Komponen	Kandungan
Susut pengeringan	Tidak lebih dari 10%
Kadar abu total	Tidak lebih dari 11,5%
Kadar abu tidak larut asam	Tidak lebih dari 0,7%
Kadar sari larut air	Tidak kurang dari 18,8%
Kadar sari larut etanol	Tidak kurang dari 11,8%
Kadar flavonoid total	Tidak kurang dari 1,40%

2.1.7 Kegunaan

Daun *V. amygdalina* memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai antioksidan, antidiabetes, antiinflamasi, analgesik, antikanker, antibakteri, antimalaria dan antijamur. Daun Afrika mengandung kelompok senyawa seskuiterpena lakton yang paling banyak diteliti adalah vernolide, vernodalol, vernodalin, vernolepin, dan vernomygdin yang berperan sebagai komponen

antibakteri utama. Aktivitas antibakteri daun *V. amygdalina* bekerja dengan merusak struktur fisik bakteri dan mengganggu proses biologisnya, yaitu dengan menghambat enzim DNA girase, misalnya quercetin yang mampu mencegah replikasi DNA pada bakteri. Aktivitas antiinflamasi dan analgesik daun *V. amygdalina* disebabkan oleh saponin dan seskuiterpen lakton yang menghambat produksi mediator inflamasi seperti prostaglandin dan histamin. daun *V. amygdalina* sebagai antioksidan bekerja dengan menangkap radikal bebas dan meningkatkan kadar enzim antioksidan endogen seperti superoksida dismutase dan katalase. (Bestari *et al.*, n.d).

2.2 Ekstrak dan Metode Ekstraksi

2.2.1 Ekstrak dan jenis ekstrak

Ekstrak tumbuhan adalah hasil dari pemisahan bioaktif dari bahan tanaman dengan beberapa metode seperti maserasi, perkolasi, dll. Proses ini bertujuan untuk memperoleh beberapa senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan untuk kesehatan seperti alkaloid, terpenoid, dan polifenol (Kowalczewski & Zembrzuska, 2023) Menurut Farmakope Indonesia (2015), ekstrak dibagi menjadi:

- a. Ekstrak cair adalah hasil ekstraksi dari bahan alam yang masih mengandung pelarut setelah proses penyarian.
- b. Ekstrak kental adalah ekstrak yang telah melalui proses penguapan sehingga tidak mengandung cairan penyari lagi, namun memiliki konsistensi cair pada suhu kamar.
- c. Ekstrak kering adalah ekstrak yang telah melalui proses penguapan, tidak mengandung pelarut, dan memiliki konsistensi padat atau berwujud kering (Kemenkes, 2020).

2.2.2 Metode ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan atau hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Ekstrak merupakan sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif menggunakan pelarut yang sesuai. Setelah itu, semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi standar yang ditetapkan (Depkes RI, 1995).

1. Ekstraksi Berdasarkan Fase

a. Ekstraksi Padat Cair

Ekstraksi padat – cair atau *leaching* adalah proses transfer zat terlarut dari padatan yang bersifat *inert* kedalam pelarut cair tanpa mengubah struktur kimianya. Pada proses ekstraksi padat cair, zat yang akan di ekstrak harus mempunyai kelarutan yang baik dalam pelarut yang digunakan. Metode ekstraksi padat cair banyak digunakan untuk mengambil komponen tertentu seperti minyak atau senyawa aktif dari bahan alam padat menggunakan pelarut cair. Pemisahan dapat terjadi karena adanya *driving force* atau perbedaan konsentrasi padatan dengan pelarut dan adanya perbedaan kemampuan melarut komponen dalam campuran (Supaya *et al.*, 2020). Proses ekstraksi padat cair secara umum terdiri dari lima tahap yaitu:

- 1). Pelarut berpindah dari bulk solution ke seluruh permukaan padatan (terjadi pengontakan antara pelarut dengan padatan).
- 2). Pelarut berdifusi kedalam padatan, proses ini terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi (*driving force*) antara *solute* dan di pelarut dengan *solute* di padatan.
- 3). *Solute* yang ada dalam padatan larut ke dalam pelarut. Proses ini terjadi karena adanya gaya elektrostatis antar molekul sehingga senyawa yang bersifat polar-polar, atau nonpolar-nonpolar dapat saling berikatan.
- 4). *Solute* berdifusi dari padatan menuju permukaan padatan, disebabkan oleh konsentrasi *solute* dalam pelarut yang berada dalam pori-pori padatan lebih besar daripada permukaan padatan.
- 5). *Solute* berpindah dari permukaan padatan menuju bulk solution. Pada tahap ini, tahanan perpindahan massa *solute* ke bulk solution lebih kecil daripada di dalam padatan. Proses ekstraksi berlangsung hingga kesetimbangan tercapai yang ditunjukkan oleh konsentrasi *solute* dalam *bulk solution* menjadi konstan atau tidak ada perbedaan konsentrasi *solute* dalam bulk solution dengan padatan (*driving force* bernilai nol atau mendekati nol).

b. Ekstraksi Cair – Cair

Ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi atau pemisahan senyawa dengan memindahkan zat terlarut dari suatu pelarut ke pelarut lain yang tidak saling tercampur berdasarkan perbedaan kelarutan senyawa tersebut. Ekstraksi cair cair biasanya menggunakan dua pelarut dengan polaritas yang berbeda, misalnya air dan kloroform atau etil asetat. Prinsip kerja dari metode ini adalah pemanfaatan koefisien partisi (*partition coefficient*), yaitu rasio kelarutan senyawa dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Setelah dikocok dalam corong pisah, zat terlarut akan bermigrasi ke pelarut tempat ia lebih larut, lalu kedua fase akan dipisahkan berdasarkan perbedaan densitas (Putranto, 2020).

Keunggulan dari metode ekstraksi cair cair adalah prosedurnya yang sederhana dan tidak membutuhkan suhu yang tinggi sehingga dapat efektif mengekstraksi senyawa yang mudah menguap atau sensitive terhadap panas. Metode ekstraksi cair cair juga efisien untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutan, terutama dalam tahap pemurnian senyawa alami dari tumbuhan atau bahan organik lainnya. Adapun kekurangan dari metode ini adalah penggunaan pelarut organik yang dapat bersifat toksik dan mudah menguap, memungkinkan terjadinya kehilangan Sebagian senyawa yang akan di ekstrak karena distribusi yang tidak sempurna antara fase cair (Putranto, 2020).

2. Ekstraksi Berdasarkan Teknik

a. Ekstraksi Tunggal

Ekstraksi Tunggal atau *Single Solvent Extraction* (SLE) adalah metode ekstraksi konvensional yang menggunakan satu jenis pelarut untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dari material padat. Kelebihan utama SLE adalah kemudahan operasional, biaya rendah dibanding metode modern, serta kapasitas untuk mengekstrak dalam jumlah besar tanpa memerlukan peralatan khusus. Adapun kelebihan dari metode ini yaitu waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang relatif rendah (Quitério *et al.*, 2022)

b. Ekstraksi Bertingkat

Ekstraksi bertingkat merupakan jenis metode ekstraksi dengan menggunakan dua atau lebih jenis pelarut secara berurutan sesuai dengan

Tingkat kepolaran pelarut. Proses ekstraksi bertingkat dimulai dari pelarut non polar, pelarut semi polar dan pelarut polar. Tujuan dari ekstraksi bertingkat adalah untuk mempermudah pemisahan senyawa yang akan di ekstraksi dengan Tingkat kepolaran yang berbeda. Kelebihan dari metode ekstraksi ini adalah hasil ekstraksi menjadi lebih efektif karena senyawa yang di ekstrak lebih spesifik sesuai dengan kepolaran pelarut masing masing (Amelia *et al.*, 2021)

3. Ekstraksi berdasarkan cara pemanasan

a. Ekstraksi cara dingin

Pada metode ini tidak dilakukan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung dengan tujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak. Beberapa jenis metode ekstraksi cara dingin, yaitu:

1) Maserasi atau Disperse

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut diam atau dengan adanya pengadukan beberapa kali pada suhu ruangan. Metode ini dapat dilakukan dengan cara merendam bahan dengan sekali sekali dilakukan pengadukan. Pada umumnya perendaman dilakukan selama 24 jam, kemudian pelarut diganti dengan pelarut baru. Maserasi juga dapat dilakukan dengan pengadukan secara sinambung (maserasi kinetik). Kelebihan dari metode ini yaitu efektif untuk senyawa yang tidak tahan panas (terdegradasi karena panas), peralatan yang digunakan relatif sederhana, murah, dan mudah didapat. Namun metode ini juga memiliki beberapa kelemahan yaitu waktu ekstraksi yang lama, membutuhkan pelarut dalam jumlah yang banyak, dan adanya kemungkinan bahwa senyawa tertentu tidak dapat diekstrak karena kelarutannya yang rendah pada suhu ruang (Q. W. Zhang *et al.*, 2020)

2) Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi dengan bahan yang disusun secara unggun dengan menggunakan pelarut yang selalu baru sampai prosesnya sempurna dan umumnya dilakukan pada

suhu ruangan. Prosedur metode ini yaitu bahan direndam dengan pelarut, kemudian pelarut baru dialirkan secara terus menerus sampai warna pelarut tidak lagi berwarna atau tetap bening yang artinya sudah tidak ada lagi senyawa yang terlarut. Metode ini yaitu tidak diperlukan proses tambahan untuk memisahkan padatan dengan ekstrak, sedangkan kelemahan metode ini adalah jumlah pelarut yang dibutuhkan cukup banyak dan proses juga memerlukan waktu yang cukup lama, serta tidak meratanya kontak antara padatan dengan pelarut (Q. W. Zhang *et al.*, 2020)

b. Ekstraksi cara panas

1). Ekstraksi refluks

Ekstraksi refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan pada titik didih pelarut tersebut, selama waktu dan sejumlah pelarut tertentu dengan adanya pendingin balik (kondensor). Pada umumnya dilakukan tiga sampai lima kali pengulangan proses pada rafinat pertama. Kelebihan metode refluks adalah padatan yang memiliki tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung dapat diekstrak dengan metode ini. Kelemahan metode ini adalah membutuhkan jumlah pelarut yang banyak.

2). Ekstraksi dengan alat Soxhlet

Ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor). Pada metode ini, padatan disimpan dalam alat soxhlet dan dipanaskan, sedangkan yang dipanaskan hanyalah pelarutnya. Pelarut terdinginkan dalam kondensor, kemudian mengekstraksi padatan. Kelebihan metode soxhlet adalah proses ekstraksi berlangsung secara kontinu, memerlukan waktu ekstraksi yang lebih sebentar dan jumlah pelarut yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi. Kelemahan dari metode ini adalah dapat menyebabkan rusaknya

solute atau komponen lainnya yang tidak tahan panas karena pemanasan ekstrak yang dilakukan secara terus menerus (Q. W. Zhang *et al.*, 2018)

2.2.3 Hal hal yang perlu di perhatikan dalam proses ekstraksi

Hal hal yang mempengaruhi proses ekstraksi menurut (Q. W. Zhang *et al.*, 2018) adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan pelarut dan pola polaritas

Pemilihan pelarut harus sesuai dengan polaritas senyawa target untuk memperoleh kelarutan yang maksimal serta mempertimbangkan aspek selektivitas, biaya, keamanan dan kemampuan menguap.

2. Ukuran partikel dan pra perlakuan material

Partikel yang lebih kecil memperbesar luas permukaan kontak, mempercepat difusi dan menaikkan rendemen. Namun jika terlalu halus dapat menyulitkan filtrasi, menyebabkan efisiensi menurun. Pra-perlakuan seperti pengeringan (moisture <10%) dan penggilingan atau enzimatis meningkatkan membuka jaringan biomassa dan memaksimalkan transfer massa

3. Rasio pelarut terhadap sampel (*solvent to solid ratio*)

Rasio yang tinggi dapat meningkatkan ekstraksi hingga titik jenuh sementara rasio yang rendah bisa mengakibatkan ekstraksi kurang efektif.

4. Suhu dan tekanan ekstraksi

Suhu tinggi dapat meningkatkan kelarutan diffusivitas dan mempercepat proses. Namun suhu yang berlebih dapat merusak senyawa yang sensitif terhadap panas atau termolabil.

5. Durasi ekstraksi

Waktu ekstraksi dapat mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang di ekstrak. Semakin lama waktu ekstraksi, maka hasil ekstraksi akan meningkat karena senyawa aktif memiliki lebih banyak waktu untuk larut dalam pelarut. Namun jika waktu ekstraksi terlalu lama dapat terjadi degradasi/kerusakan senyawa akibat paparan suhu, oksigen atau reaksi kimia lainnya.

6. Kondisi material

Kualitas bahan seperti jenis bahan, kematangan dan kondisi kesehatan tanaman serta waktu pemanenan juga mempengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam tanaman

7. Metode ekstraksi

Metode ekstraksi tradisional biasanya membutuhkan banyak pelarut dan waktu ekstraksi yang lebih lama. Sementara metode modern dapat memberikan efisiensi yang lebih tinggi, pelarut yang lebih sedikit dan selektivitas yang lebih baik.

2.3 Pelarut

Pelarut merupakan zat utama yang digunakan untuk melarutkan senyawa aktif dari tumbuhan atau hewan agar senyawa tersebut dapat terpisah dari komponen lainnya. Proses ekstraksi juga mempertimbangkan prinsip polaritas pelarut dengan senyawa yang akan di ekstraksi (*like dissolves like*) agar pelarut dapat menembus struktur spesifik bahan yang akan di ekstraksi. Pemilihan pelarut juga mempertimbangkan beberapa hal diantaranya keamanan bagi lingkungan, biaya produksi, viskositas serta titik didih yang memungkinkan pemisahan pelarut secara mudah tanpa merusak senyawa aktif (Ponphaiboon *et al.*, 2023). Adapun beberapa pelarut yang umum digunakan dalam proses ekstraksi antara lain:

2.3.1 Etanol

Etanol (C_2H_5OH) adalah salah satu pelarut bio-solvent atau pelarut yang biasanya dihasilkan dari fermentasi bahan yang kaya akan gula seperti bit gula dan sereal. Kelebihan dari etanol adalah bahan yang biodegradable, harganya relative murah dan mudah didapatkan. Dalam ekstraksi bahan alam, etanol sering dipilih karena relatif aman digunakan, tidak toksik dibandingkan pelarut petrokimia seperti n-heksana, dan telah disetujui penggunaannya dalam industri makanan, farmasi, dan kosmetik. Salah satu keunggulan utama etanol adalah sifatnya yang mudah menguap, sehingga sisa pelarut dalam ekstrak dapat dihilangkan dengan cepat melalui penguapan tanpa meninggalkan residu berbahaya. Etanol juga memiliki kemampuan menembus dinding sel tanaman, sehingga mempercepat pelepasan senyawa aktif ke dalam larutan. Keefektifannya sebagai pelarut dapat ditingkatkan melalui pencampuran dengan air, misalnya etanol 70%, yang terbukti lebih optimal dalam mengekstrak senyawa fenolik dan flavonoid karena keseimbangan polaritas

antara etanol dan air yang memudahkan penetrasi dan pelarutan senyawa bioaktif dari jaringan tanaman (Chemat *et al.*, 2021).

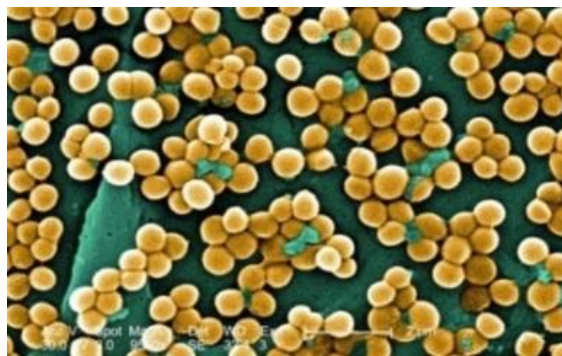
2.4 Methicillin Resisten *Staphylococcus Aureus* (MRSA)

Methicillin-resistant S. aureus (MRSA) merupakan salah satu strain dari *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. Tidak hanya terhadap antibiotik dari golongan betalaktam, MRSA juga resisten terhadap antibiotik golongan non-betalaktam seperti makrolida (misalnya eritromisin), antibiotik penghambat sintesis protein (seperti tetrasiklin dan kloramfenikol), serta golongan kuinolon. Secara struktur, antibiotik betalaktam memiliki cincin khusus yang berperan dalam mengikat *penicillin-binding protein* (PBP), yaitu protein yang terlibat dalam pembentukan peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga kerja antibiotik ini mampu menghambat sintesis dinding sel. Namun, resistensi terhadap betalaktam dapat terjadi akibat enzim betalaktamase yang mampu menghancurkan cincin betalaktam atau karena afinitas antibiotik yang rendah terhadap PBP (Qolbaini *et al.*, 2021).

2.4.1 Morfologi dan Fisiologi

Secara mikroskopis, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) termasuk bakteri gram positif berbentuk bulat (kokus), yang tidak memiliki kemampuan bergerak (nonmotil) dan tidak membentuk spora. Bentuk bakteri ini kokus sel tunggal, berpasangan, atau dalam rantai pendek, namun cenderung membentuk kelompok menyerupai anggur (Algammal *et al.*, 2020)

Sebagai bakteri gram positif, MRSA memiliki dinding sel yang tebal dan tersusun atas peptidoglikan, yang berfungsi melindungi sel dari sistem imun inang seperti sistem komplemen maupun tekanan osmotik. *S. aureus* dapat memproduksi protein A, yang memiliki kemampuan spesifik untuk berikatan dengan bagian Fc dari imunoglobulin G (IgG). Komponen utama penyusun dinding sel bakteri ini adalah peptidoglikan, yang berperan penting dalam mempertahankan bentuk sel serta memberikan stabilitas struktural. Selain itu, *S. aureus* juga menghasilkan berbagai macam racun dan enzim yang berperan dalam proses infeksi (faktor virulensi), seperti enzim katalase, koagulase, faktor koagulasi, hyaluronidase, serta enzim betalaktamase dan lainnya (Algammal *et al.*, 2020).



Gambar 11 Morfologi MRSA
Sumber: Diseroad *et al.*, 2023

2.4.2 Mekanisme Resistensi Bakteri MRSA

Methicillin-resistant S. aureus (MRSA) merupakan salah satu strain dari *Staphylococcus aureus* yang telah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan betalaktam maupun non-betalaktam. Pada jenis MRSA yang resisten terhadap antibiotik non-betalaktam, mekanisme resistensinya disebabkan oleh perubahan struktur pada reseptor molekul target atau melalui sistem pompa efluks, yaitu mekanisme aktif yang mengeluarkan senyawa antibiotik dari dalam sel, sehingga efektivitasnya berkurang (J. Liu *et al.*, 2016). Resistensi terhadap antibiotik betalaktam terjadi akibat adanya duplikasi enzim penisilin oleh *Penicillin Binding Protein* (PBP), khususnya PBP2 dan PBP2a. Dalam kondisi normal, antibiotik betalaktam akan menghambat kerja PBP2, namun pada bakteri MRSA, PBP2a tetap aktif meskipun dalam keberadaan antibiotik tersebut. Hal ini menyebabkan sintesis dinding sel tetap berlangsung. PBP2a sendiri dikodekan oleh gen *mecA*, yang merupakan bagian dari elemen genetik stabil yang disebut *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec). Keberadaan gen *mecA* dan SCCmec inilah yang berperan penting dalam mekanisme resistensi MRSA terhadap metisilin, karena menurunkan kemampuan antibiotik untuk berikatan dengan target protein (J. Liu *et al.*, 2016)

2.4.3 Gen resistensi *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA)

Resistensi terhadap antibiotik pada *Staphylococcus aureus* yang dikenal sebagai MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) disebabkan oleh keberadaan gen *mecA*. Gen ini merupakan bagian dari elemen genetik yang dikenal sebagai *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec), yang merupakan unsur DNA kromosomal bergerak (*mobile genetic element*). Gen *mecA* mengkode protein *Penicillin-Binding Protein 2a* (PBP2a), yaitu enzim alternatif yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam seperti metisilin, sehingga

sintesis dinding sel tetap dapat berlangsung meskipun bakteri terpapar antibiotik tersebut. Dengan adanya PBP2a, MRSA menjadi resisten terhadap hampir semua antibiotik β -laktam (J. Liu *et al.*, 2016)

Adanya *mecA* dalam SCCmec tidak hanya memungkinkan resistensi antibiotik, tetapi juga memungkinkan penyebaran gen resistensi antar strain bakteri melalui proses rekombinasi. SCCmec terdiri dari beberapa bagian penting, yakni kompleks *mec*, kompleks *ccr* (*cassette chromosome recombinase*), dan gen tambahan seperti transposon. Elemen ini dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu tipe I hingga XIV, yang masing-masing menunjukkan perbedaan dalam ukuran (sekitar 21–67 kb), struktur genetik, serta tingkat resistensi yang ditimbulkan. Regulasi ekspresi *mecA* sendiri dikendalikan oleh sistem dua komponen *mecI-mecR1*. Ketika sel mendeteksi adanya antibiotik β -laktam, gen regulator *mecR1* akan menginaktivasi *mecI*, sehingga memungkinkan gen *mecA* aktif dan memproduksi (J. Liu *et al.*, 2016).

Seiring berkembangnya penggunaan antibiotik generasi baru, beberapa strain MRSA bahkan menunjukkan mutasi pada PBP2a yang semakin meningkatkan resistensi, misalnya terhadap ceftaroline dan cefoxitin. Mutasi pada situs pengikatan antibiotik dapat menurunkan efektivitas terapi dan memperberat pengendalian infeksi. Oleh karena itu, deteksi gen *mecA* melalui metode PCR menjadi sangat penting dalam diagnosa laboratorium untuk memastikan adanya strain MRSA, baik pada pasien rawat inap maupun di lingkungan komunitas. Pemahaman yang mendalam mengenai struktur SCCmec, peran gen *mecA*, serta mekanisme ekspresinya sangat penting untuk mendukung pengembangan strategi terapi dan mencegah penyebaran MRSA secara luas (Silva *et al.*, 2021)

2.4.4 Patofisiologis MRSA

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu patogen oportunistik yang mampu menimbulkan berbagai jenis penyakit infeksi, di antaranya:

1. *Diabetic Foot Ulcer (DFU)*

Infeksi ulkus diabetikum (DFU) yang disebabkan oleh (MRSA) merupakan komplikasi serius pada pasien diabetes mellitus. Luka kronis akibat gangguan sirkulasi darah dan kerusakan saraf perifer menciptakan

lingkungan ideal bagi kolonisasi bakteri, termasuk MRSA. Bakteri ini membawa gen *mecA* yang mengkode protein PBP2a, sehingga menjadikan antibiotik golongan β -laktam seperti methicillin, oksasilin, dan cefoxitin tidak efektif (Sugireng & Rosdarni, 2020).

Setelah mengkolonisasi luka, MRSA melepaskan berbagai faktor virulensi seperti termonuklease (*nuc*), leukocidin, dan protease yang merusak jaringan dan memicu respons inflamasi kronis. Akumulasi sitokin dan perekrutan neutrofil secara berlebihan menghambat proses penyembuhan dan meningkatkan risiko terjadinya nekrosis. Kondisi ini memperparah infeksi dan dikaitkan dengan peningkatan kejadian osteomielitis serta amputasi ekstremitas bawah. Sebuah studi di Tiongkok bahkan menunjukkan bahwa infeksi DFU akibat MRSA memiliki risiko osteomielitis sebesar 46,9% dan risiko amputasi sebesar 40,8% dibandingkan dengan DFU tanpa MRSA (Qi *et al.*, 2024).

2. Pneumonia nosokomial

Infeksi pneumonia nosokomial yang disebabkan oleh (MRSA) kerap terjadi di lingkungan rumah sakit, terutama pada pasien dalam perawatan jangka panjang dan memiliki riwayat penggunaan antibiotik β -laktam sebelumnya. Strain MRSA memiliki gen *mecA* yang mengekspresikan protein PBP2a dengan afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam seperti methicillin dan cefoxitin, sehingga terapi antibiotik tersebut tidak efektif. Genetik resistensi ini menjadikan MRSA multiresisten, bahkan terhadap kelas lain seperti makrolida, lincosamida, fluoroquinolon, dan aminoglikosida. Setelah masuk ke saluran pernapasan, MRSA melepaskan berbagai faktor virulensi yang merusak epitel bronkial dan parenkim paru, memicu inflamasi berat. Respon inflamasi ini memperparah kerusakan jaringan dan mengganggu fungsi gas exchange, sehingga memperburuk gejala klinis dan meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien (Defres *et al.*, 2019).

3. Bakteriemia dan sepsis

MRSA dapat menyebabkan bakteremia ketika bakteri ini berhasil memasuki aliran darah melalui luka atau penggunaan alat invasif kemudian

menyebar dan berkembang biak dalam sirkulasi sistemik. Strain MRSA mengandung gen *mecA* yang menyandi protein PBP2a dengan afinitas rendah terhadap antibiotik β -laktam, sehingga membuat golongan antibiotik seperti methicillin dan cefoxitin menjadi tidak efektif terhadap infeksi MRSA. Dalam darah, MRSA menghasilkan berbagai faktor virulensi seperti α -hemolisin, leukocidin Panton-Valentine, dan protease yang secara langsung merusak sel inang dan merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Aktivasi sistem imun ini menyebabkan kerusakan endotel vaskular, kebocoran kapiler, hipotensi, dan gangguan perfusi organ, yang merupakan karakteristik utama dari sepsis. Kemampuan MRSA untuk membentuk biofilm juga menambah ketahanan terhadap fagositosis dan antibiotik, sehingga infeksi menjadi persisten dan risiko berkembangnya sepsis meningkat (Wari Rahman *et al.*, 2023)

4. Endokarditis

Infeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dapat memicu endokarditis infeksi melalui proses adhesi dan pembentukan biofilm pada permukaan katup jantung, terutama pada katup yang rusak atau prostetik. Adhesi awal terjadi via protein adhesin seperti ClfA, ClfB, dan fibronectin-binding proteins yang berikatan dengan fibrinogen dan fibronectin pada permukaan endotel rusak. Setelah terlekat, MRSA mengekspresikan gen-gen biofilm seperti *icaADBC*, *agr*, *sarA*, dan *sae*, membentuk matriks polisakarida interseluler (PIA) yang melindungi bakteri dari fagositosis dan antibiotik. Saat biofilm matang, bakteri melepaskan faktor virulensi seperti α -hemolisin dan leukocidin Panton-Valentine yang menyebabkan kerusakan sel endotel dan memicu pelepasan sitokin proinflamasi (IL-1 β , IL-6, TNF- α), menghasilkan “storm inflamasi” yang memperparah kerusakan jaringan jantung dan memicu emboli septik serta disfungsi organ sistemik. Vegetasi bakteri kemudian dapat terlepas (dispersal), menyebabkan septic emboli ke otak, paru atau organ lain, serta meningkatkan risiko syok septik dan kegagalan organ multipel. Kemampuan MRSA membentuk biofilm dan mengatur virulensinya secara genetik

menjadikannya salah satu penyebab utama endokarditis dengan mortalitas tinggi (Kaushik *et al.*, 2024).

5. Infeksi kulit dan jaringan lunak

Infeksi *Staphylococcus aureus* resisten methicillin (MRSA) merupakan penyebab utama infeksi kulit dan jaringan lunak seperti abses, selulitis, furunkel, impetigo, dan fasciitis nekrotikan. Proses patogenesis dimulai dengan kolonisasi permukaan kulit yang rusak maupun intact skin, terutama oleh strain komunitas (CA-MRSA) yang mengandung elemen genetik ACME untuk bertahan hidup di kulit. MRSA melekat pada jaringan menggunakan protein adhesin (MSCRAMMs) seperti ClfA, ClfB, dan fibronectin-binding proteins yang mengikat fibrinogen dan matriks ekstraseluler, yang menjadi langkah awal kolonisasi dan pembentukan biofilm (Gordon & Lowy, 2018).

Setelah menempel, MRSA mengatur ekspresi gen biofilm seperti *icaADBC*, *agr*, *sarA*, dan *sae*, membentuk matriks polisakarida interseluler (PIA). Biofilm ini menciptakan lingkungan yang resisten terhadap fagositosis dan antibiotik sehingga infeksi menjadi persisten dan rentan berulang. Secara simultan, MRSA memproduksi berbagai toksin sitolitik—seperti α -hemolisin (Hla), γ -hemolisin, leukocidin Panton-Valentine (PVL), phenol-soluble modulins (PSMs), dan enzim seperti protease dan lipase yang merusak sel inang dan jaringan serta memperparah peradangan lokal. Secara klinis, toksin seperti PVL dan PSM menyebabkan nekrosis jaringan, meningkatkan eksudat purulen, dan memicu perekrutan neutrofil yang berlebihan serta respon sitokin inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α . Hal ini menghasilkan lesi kulit yang meradang, sakit, dan sulit sembuh, khususnya pada CA-MRSA yang agresif. Faktor-faktor ini secara kolektif menjelaskan mengapa SSTIs oleh MRSA sering membutuhkan intervensi bedah (incision & drainage), rawat jalan atau rawat inap yang lebih intensif, serta penggunaan antibiotik lini kedua yang lebih kuat seperti linezolid atau daptomycin (Linz *et al.*, 2023).

2.4.5 Tatalaksana MRSA

Menurut *Clinical Practice Guidelines* yang dikeluarkan oleh *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), penanganan MRSA diklasifikasikan berdasarkan jenis infeksi yang ditimbulkan, mulai dari infeksi kulit dan jaringan

lunak (*skin and soft tissue infections/SSTI*), infeksi darah (bakteremia), pneumonia, infeksi tulang dan sendi, hingga infeksi sistem saraf pusat. Pada kasus infeksi kulit dan jaringan lunak, seperti abses, furunkel, atau selulitis, prosedur utama yang dianjurkan adalah insisi dan drainase. Pemberian antibiotik hanya diperlukan apabila infeksi tergolong berat, melibatkan area yang sulit ditangani, menyebar luas, atau terjadi pada pasien dengan gangguan imunitas (C. Liu *et al.*, 2021).

Antibiotik oral yang direkomendasikan untuk kasus MRSA meliputi clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX), doxycycline atau minocycline, serta linezolid. Jika diperlukan cakupan untuk bakteri lain seperti streptokokus beta hemolitik, maka clindamycin dapat digunakan sendiri, atau TMP-SMX dan tetrasiklin dapat dikombinasikan dengan antibiotik betalaktam seperti amoxicilin. Rifampisin tidak dianjurkan digunakan sebagai terapi tunggal maupun kombinasi karena belum terbukti menambah efektivitas terapi.

Pilihan utama Untuk pasien yang dirawat inap dengan infeksi jaringan lunak berat, seperti luka terbuka infeksius, selulitis meluas, atau luka bakar yang terinfeksi meliputi vancomycin, linezolid, daptomycin, telavancin, atau clindamycin intravena, disertai debridemen jika diperlukan. Durasi terapi pada umumnya antara 7 hingga 14 hari, tergantung pada respon klinis pasien. Jika infeksi berkembang menjadi bakteremia atau endokarditis, terapi menjadi lebih kompleks.

Pada kasus bakteremia yang tidak disertai komplikasi seperti endokarditis atau abses organ, pemberian vancomycin atau daptomycin dilakukan minimal selama dua minggu. Apabila infeksi tergolong kompleks atau sudah mengenai katup jantung, terapi dilakukan selama enam minggu. Penggunaan antibiotik tambahan seperti gentamicin atau rifampicin dalam kasus ini tidak direkomendasikan karena tidak meningkatkan hasil terapi dan dapat menimbulkan efek samping.

Pada infeksi MRSA yang menyerang paru-paru, terutama pneumonia berat yang disertai efusi pleura atau abses paru, pengobatan empiris harus segera diberikan. Terapi lini pertama adalah vancomycin intravena, linezolid, atau clindamycin, jika sensitivitas bakteri terhadap obat tersebut telah dikonfirmasi. Durasi pengobatan bervariasi antara 7 hingga 21 hari tergantung pada tingkat keparahan infeksi dan respons klinis pasien. Jika terjadi komplikasi seperti

empyema, tindakan drainase cairan pleura juga harus dilakukan sebagai bagian dari terapi.

Infeksi tulang seperti osteomielitis memerlukan pendekatan terapeutik yang melibatkan kombinasi antara tindakan bedah (debridemen) dan pemberian antibiotik jangka panjang. Antibiotik seperti vancomycin, daptomycin, atau kombinasi TMP-SMX dan rifampisin, linezolid, maupun clindamycin dapat digunakan tergantung sensitivitas dan kondisi klinis pasien. Lama terapi bisa mencapai delapan minggu atau lebih, terutama pada infeksi kronis atau jika tindakan pembedahan tidak memungkinkan dilakukan secara optimal.

Pada infeksi menyerang sistem saraf pusat, seperti meningitis atau abses otak, maka terapi antimikroba diberikan secara agresif. Vancomycin intravena tetap menjadi pilihan utama, kadang dikombinasikan dengan rifampisin. Obat alternatif lainnya adalah linezolid dan TMP-SMX, terutama jika terdapat resistensi atau kontraindikasi terhadap vancomycin. Pada kasus infeksi berat seperti abses subdural atau abses spinal, tindakan pembedahan untuk drainase sangat penting dilakukan untuk menunjang keberhasilan terapi.

Selain strategi pengobatan aktif terhadap infeksi, edukasi kepada pasien terkait kebersihan pribadi, seperti mencuci tangan, mengganti perban luka secara rutin, dan tidak berbagi barang pribadi, menjadi bagian dari intervensi nonfarmakologis yang penting. Jika infeksi berulang terus terjadi, maka prosedur dekolonisasi dapat dilakukan, misalnya dengan pemberian salep mupirocin intranasal selama lima hingga sepuluh hari serta mandi menggunakan antiseptik seperti chlorhexidine atau larutan pemutih yang diencerkan.

Dalam hal pemantauan kadar antibiotik, khususnya vancomycin, direkomendasikan pemantauan kadar *trough* serum, terutama pada pasien dengan infeksi berat, gangguan fungsi ginjal, atau obesitas. Dosis yang disarankan adalah antara 15–20 µg/mL untuk memastikan efektivitas terapi. Penggunaan dosis loading juga dapat dilakukan untuk mempercepat pencapaian konsentrasi terapeutik, terutama pada pasien dengan sepsis berat atau pneumonia.

2.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Metode utama yang dapat digunakan sebagai pengukuran aktivitas antimikroba adalah sebagai berikut:

2.5.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan salah satu teknik kualitatif yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri suatu senyawa atau ekstrak. Prinsip dasar metode ini adalah kemampuan senyawa antimikroba untuk berdifusi ke dalam medium padat dan menghambat pertumbuhan bakteri di sekitarnya. Dua teknik utama dalam metode difusi adalah difusi cakram (*disk diffusion*) dan difusi sumur (*well diffusion*). Pada metode cakram, kertas cakram steril yang telah ditetesi larutan uji diletakkan di atas permukaan agar yang telah diinokulasi bakteri. Sementara pada metode sumur, larutan uji dimasukkan ke dalam sumur kecil yang dilubangi pada agar. Setelah inkubasi, zona bening di sekitar cakram atau sumur menunjukkan adanya aktivitas antibakteri, yang diukur sebagai diameter zona hambat dalam satuan milimeter. Keunggulan dari metode difusi terletak pada prosedurnya yang sederhana, cepat, dan tidak memerlukan peralatan canggih. Metode ini cocok untuk skrining awal senyawa antibakteri dan bisa digunakan untuk membandingkan efektivitas beberapa sampel dalam waktu yang sama. Selain itu, teknik ini hemat biaya dan mudah diaplikasikan di berbagai laboratorium mikrobiologi. Keterbatasan dari metode ini antara lain tidak memberikan nilai konsentrasi penghambat minimum (MIC) secara pasti, sehingga tidak dapat mengukur potensi antibakteri secara kuantitatif. Selain itu, efektivitas metode difusi sangat tergantung pada kemampuan senyawa untuk berdifusi dalam medium agar (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan salah satu pendekatan kuantitatif yang paling banyak digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro*. Metode ini bertujuan untuk menentukan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), yaitu konsentrasi terkecil dari suatu agen antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji secara visual. Dalam praktiknya, metode ini dapat dilakukan melalui dua pendekatan utama, yaitu *broth dilution* dan *agar dilution*. Pada *broth dilution*, senyawa antibakteri diuji dalam medium cair dalam seri konsentrasi dua kali lipat, lalu diinokulasi dengan suspensi bakteri yang telah distandarisasi dan diinkubasi selama 16–20 jam. Sementara itu, pada *agar dilution*, senyawa antibakteri dicampurkan ke dalam agar dengan konsentrasi bertingkat dan

kemudian diinokulasi dengan titik inokulum mikroba. Kedua metode ini memberikan hasil berupa nilai MIC yang dapat dievaluasi secara visual dengan melihat adanya pertumbuhan atau tidaknya mikroba dalam media uji. Keunggulan dari metode dilusi adalah sifatnya yang kuantitatif dan akurat dalam menentukan MIC, sehingga sangat berguna untuk membandingkan potensi antimikroba dari berbagai senyawa. Metode ini juga telah distandarisasi oleh lembaga seperti CLSI dan EUCAST, sehingga hasilnya dapat direproduksi dengan baik di berbagai laboratorium. Selain itu, *broth microdilution* dapat dilakukan dalam mikropate 96 sumur sehingga hemat ruang dan bahan. Beberapa kelemahan metode ini antara lain proses persiapan yang lebih kompleks dan membutuhkan keterampilan teknis yang baik agar hasilnya valid. Metode ini juga kurang cocok untuk senyawa yang memiliki warna pekat atau tidak larut dalam media cair, karena bisa mengganggu visualisasi hasil (Balouiri *et al.*, 2016).

Menurut CLSI (*Clinical AND Laboratory Standar Institute*) 2018, kategori diameter zona hambat dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Tabel 2 Kategori diameter zona hambat

Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Respon Hambat Bakteri
≥ 20 mm	<i>Susceptible</i>
15 – 19 mm	<i>Intermediate</i>
≤ 14 mm	<i>Resistant</i>

2.6 Uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk menentukan konsentrasi terendah dari suatu agen antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara visual. Metode yang paling umum digunakan dalam penentuan MIC adalah *broth microdilution*, yaitu dengan melakukan pengenceran berurutan dari senyawa antibakteri dalam media cair dalam *microplate* 96 sumur. Setiap sumur kemudian diinokulasi dengan suspensi bakteri yang telah distandarisasi (biasanya 5×10^5 CFU/mL), kemudian diinkubasi pada suhu 35 ± 2 °C selama 16–20 jam. Setelah inkubasi, sumur diperiksa secara visual untuk mendeteksi adanya pertumbuhan bakteri, dan KHM ditentukan sebagai konsentrasi terendah dari agen uji yang tidak menunjukkan kekeruhan atau

pertumbuhan mikroba. Keunggulan metode ini terletak pada kemampuannya memberikan hasil yang presisi dan kuantitatif, sangat bermanfaat dalam evaluasi efektivitas antimikroba baru, serta sudah distandarisasi oleh lembaga seperti CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Selain itu, metode ini memungkinkan pengujian dalam skala besar secara efisien dan dapat dikombinasikan dengan pembacaan otomatis melalui mikroplate reader. Namun demikian, terdapat beberapa kekurangan yang memungkinkan terjadinya “*skipped well*”, yaitu ketika terjadi pertumbuhan bakteri tidak berurutan pada konsentrasi serial yang seharusnya menurun, yang dapat mempersulit interpretasi hasil. Selain itu, kesalahan dalam persiapan media, standar inokulum, atau pencampuran senyawa uji juga dapat memengaruhi keakuratan hasil (Yusuf *et al.*, 2020).

2.7 Antibiotik dan Mekanisme Kerja Antibakteri

2.7.1 Antibiotik

Antibiotik adalah senyawa kimia yang diproduksi oleh mikroorganisme, seperti bakteri atau jamur, yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, khususnya bakteri. Antibiotik bekerja secara selektif, yaitu hanya menargetkan mikroba penyebab penyakit tanpa merusak sel inang manusia. Antibiotik digunakan sebagai terapi utama untuk mengatasi infeksi bakteri, dan penggunaannya telah terbukti secara signifikan menurunkan angka kematian akibat penyakit infeksi sejak awal abad ke-20. Meskipun awalnya antibiotik berasal dari mikroorganisme alami, kini banyak antibiotik juga dikembangkan secara semi-sintetik atau sintetis di laboratorium untuk meningkatkan efektivitas, stabilitas, dan mengurangi efek samping. Adapun pengujian antibiotik dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa kualitas dan mutu antibiotik yang digunakan dalam pengobatan memenuhi persyaratan yang telah ditentukan (Al-Tawfiq *et al.*, 2022)

2.7.2 Prinsip Kerja Antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri bervariasi tergantung dari struktur kimia dan target biologis senyawa. Beberapa antibiotik bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri, seperti golongan β -laktam yang menargetkan enzim transpeptidase. Antibiotik lain bekerja dengan mengganggu fungsi membran sel, menghambat sintesis protein di ribosom, atau menginterferensi proses replikasi DNA dan RNA. Salah satu contohnya yaitu aminoglikosida dapat mengganggu

pembacaan mRNA, sedangkan kuinolon menghambat aktivitas DNA girase. Beberapa senyawa baru bahkan dikembangkan untuk menargetkan jalur metabolisme esensial yang belum tersentuh oleh antibiotik konvensional. Senyawa antibakteri tidak hanya berasal dari mikroorganisme, tetapi juga dari sintesis kimia maupun tanaman (Anggita *et al.*, 2022).

Prinsip kerja antimikroba menurut (Anggita, *et al.*, 2022) adalah sebagai berikut:

a. pH lingkungan

Beberapa obat menunjukkan efektivitas lebih tinggi pada kondisi pH tertentu, misalnya nitrofurantoin yang lebih aktif dalam suasana asam, sedangkan aminoglikosida dan sulfonamid bekerja lebih baik pada kondisi pH yang bersifat basa.

b. Komponen medium

Media mempengaruhi ukuran zona hambat dengan cara mempengaruhi laju pertumbuhan mikroorganisme, laju difusi obat antimikroba, serta efektivitas obat tersebut. Zat seperti sodium polyanetholsulfonate yang terdapat dalam medium kultur darah dan detergen anionik dapat menurunkan efek aminoglikosida. Selain itu, protein serum pengikat penisilin pada tingkat yang bervariasi, mulai dari sekitar 40% pada metisilin hingga mencapai 98% pada dikloksasilin.

c. Kestabilan Obat

Beberapa agen antimikroba kehilangan efektivitasnya saat disimpan pada suhu inkubator. Penisilin mengalami penurunan aktivitas secara bertahap, sementara aminoglikosida dan siprofloksasin tetap cukup stabil dalam jangka waktu yang panjang.

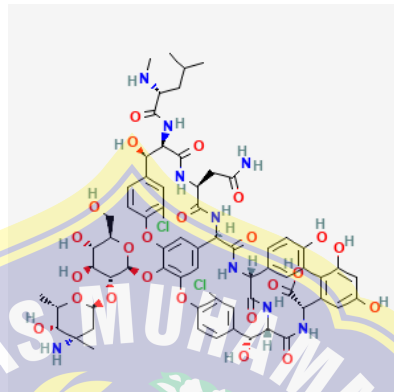
d. Lama Inkubasi

Semakin lama waktu inkubasi, peluang munculnya mutan yang resisten semakin meningkat, atau peluang bagi mikroorganisme yang kurang sensitif terhadap antimikroba untuk berkembang biak juga semakin besar karena konsentrasi obat yang menurun.

e. Aktivitas Metabolik Mikroorganisme

Secara umum, mikroorganisme yang sedang aktif dan tumbuh dengan cepat cenderung lebih rentan terhadap efek obat dibandingkan dengan yang berada dalam kondisi istirahat. Mikroorganisme yang secara metabolik tidak aktif dan mampu bertahan dalam paparan obat yang lama mungkin tetap menghasilkan keturunan yang benar-benar peka terhadap obat tersebut.

2.7.3 Vancomycin



Gambar 12 Struktur kimia vancomycin

Sumber: PubChem.com

Vancomycin merupakan antibiotik golongan glikopeptida yang memiliki struktur molekul kompleks dan berat molekul 1.449,3 g/mol. Senyawa ini diproduksi secara alami oleh mikroorganisme *Amycolatopsis orientalis* dan termasuk dalam kelompok peptida non-ribosomal bercabang trisisik. Struktur kimianya disusun oleh 66 atom karbon, 75 atom hidrogen, 2 atom klorin, 9 atom nitrogen, dan 24 atom oksigen ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$), vancomycin sangat kompleks secara stereokimia dan memiliki banyak gugus fungsional aktif. Dengan struktur tersebut, vancomycin memiliki banyak gugus hidroksil dan amino, yang membentuk 19 donor dan 25 akseptor ikatan hidrogen. Vancomycin sangat polar dan bersifat hidrofilik dengan nilai TPSA (*Topological Polar Surface Area*) yang $\pm 531 \text{ \AA}^2$, sehingga senyawa ini memiliki kesulitan dalam menembus membran biologis seperti membran sel eukariotik.

Kelarutan vancomycin dalam air tinggi, terutama dalam bentuk garam hidrokloridanya (Vancomycin HCl), yaitu 120 mg/mL. Sifat ini memungkinkan vancomycin diformulasikan dalam bentuk sediaan larutan untuk injeksi. Namun, karena molekulnya yang sangat polar dan ukurannya yang besar, logP vancomycin adalah -2.7, menunjukkan bahwa senyawa ini hampir tidak memiliki kelarutan

dalam pelarut nonpolar, sehingga tidak efektif diserap melalui saluran pencernaan. Vancomycin relatif stabil dalam bentuk bubuk kering, namun dalam bentuk larutan, senyawa ini rentan mengalami degradasi kimia seperti deamidasi pada residu asparagin dan pembentukan senyawa degradasi seperti CDP-1.

Mekanisme kerja vancomycin spesifik terhadap bakteri yaitu dengan menghambat biosintesis dinding sel bakteri secara langsung. Target utama dari vancomycin adalah dipeptida terminal D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) yang terdapat pada prekursor peptidoglikan, yaitu *lipid II*. Peptidoglikan adalah komponen utama yang membentuk dinding sel bakteri gram-positif, memberikan kekuatan struktural serta melindungi dari tekanan osmotik lingkungan. Vancomycin bekerja dengan berikatan secara non-kovalen melalui lima titik ikatan hidrogen terhadap gugus D-Ala-D-Ala ini, sehingga menghalangi akses enzim transglukosilase dan transpeptidase terhadap substrat mereka. Kedua enzim tersebut sangat krusial dalam proses polimerisasi dan cross-linking dari peptidoglikan. Akibat terhambatnya enzim-enzim ini, penyusunan dinding sel menjadi tidak sempurna, membuat bakteri rentan terhadap tekanan lingkungan dan akhirnya mengalami lisis seluler (Stogios & Savchenko, 2020)

Struktur trisiklik aromatik vancomycin menciptakan ruang molekuler yang secara spasial tepat untuk mengakomodasi D-Ala-D-Ala. Selain itu, vancomycin juga memiliki kemampuan mengumpul di lokasi pertumbuhan dinding sel, yang menyebabkan konsentrasi lokal obat meningkat dan membuat interaksi antibakterinya menjadi lebih efektif. Aktivitas ini bersifat bakterisidal, terutama terhadap bakteri yang sedang aktif tumbuh dan membelah. Sebaliknya, efektivitasnya akan menurun pada sel yang sedang tidak aktif secara metabolik atau dalam fase dorman (Stogios & Savchenko, 2020)