

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Belimbing Wuluh

1. Sistematika Tanaman

Sistematika belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menurut Suryaningsih (2016) :

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Oxalidales*
Famili : *Oxalidaceae*
Genus : *Averrhoa*
Spesies : *Averrhoa bilimbi* L.



Gambar 1. Buah belimbing wuluh (Nalendra Yogeswara, 2021)

2. Habitat Tanaman

Belimbing wuluh, dikenal dengan nama ilmiah *Averrhoa bilimbi* L. (Gendrowati, 2015), berasal dari Kepulauan Maluku dan saat ini tersebar luas di seluruh Indonesia. Selain itu, tanaman ini juga dapat tumbuh di beberapa negara seperti Malaysia, Myanmar, Filipina, dan Sri Lanka. Belimbing wuluh termasuk dalam keluarga *Oxalidaceae* dan memiliki sejumlah nama lokal yang berbeda, seperti Selemeng (Gayo), Asom, Belimbing, Balimbingan (Batak), Belimbing Asam (Melayu), Balimbieng (Minangkabau), Balimbeng (Flores), Limeng, Selimeng, Thilimeng (Aceh), Malimbi (Nias), Balimbing (Lampung), Calingcing, Balingbing (Sunda), Blingbing Buloh (Bali), Limbi (Bima), Bhalingbhing Bulu (Madura), Libi (Sawu), dan Belerang (Sangi) (Harbie, 2015). Belimbing wuluh dapat tumbuh pada ketinggian antara 5 hingga 500 meter di atas permukaan laut, dan memiliki keunggulan sebagai tanaman tropis yang mampu berbuah sepanjang tahun (Rahayu, 2013).

3. Morfologi Buah Belimbing Wuluh

Tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tanaman dengan tinggi 10 sampai 15 meter (Gendrowati, 2015). Tanaman ini memiliki banyak cabang, benjolan banyak dan batang tegak. Belimbing wuluh memiliki daun berbentuk menyirip dan berjumlah ganjil, beraneka ragam dan memiliki anak keturunan daun sebanyak 21-45 pasang. Bentuk daun persegi panjang runcing, permukaan daun rata, bagian atas terlihat cerah tetapi bagian bawah terlihat buram atau tidak cerah. Bunganya berbentuk bintang kecil, seperti malai, berwarna ungu kemerahan, panjang kelopak 10-30 mm dan biasanya tumbuh pada cabang dan batang. Biji belimbing wuluh berbentuk pipih. Buah belimbing wuluh memiliki bentuk lonjong berwarna hijau dengan panjang 4-6,5 cm dan memiliki rasa yang asam (Alhassan & Ahmed, 2016).

4. Kandungan Kimia Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh merupakan sumber alami yang kaya akan vitamin C, yang bermanfaat untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Tanaman ini juga mengandung komponen kimia seperti asam oksalat dan kalium (Rahmasari *et al.*, 2020). Buah belimbing wuluh memiliki tingkat keasaman dan kandungan air yang sangat tinggi, sehingga konsumsi buah ini jarang dilakukan, dan buah ini memiliki masa simpan yang relatif pendek (Windyastari, 2012). Hasil analisis fitokimia dari buah belimbing wuluh mengungkapkan keberadaan senyawa oksalat, flavonoid, fenol, dan pektin (Herlih, 1993) dalam (Rahayu, 2013). Buah belimbing wuluh mengandung sejumlah senyawa yang memiliki sifat antibakteri, termasuk flavonoid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid, dan alkaloid.

4.1 Flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang paling melimpah di alam. Senyawa-senyawa flavonoid dapat ditemukan dalam semua bagian tumbuhan, termasuk daun, kulit, buah, kayu, bunga, dan biji. Tindakan flavonoid melibatkan pembentukan senyawa kompleks yang memiliki kemampuan untuk merusak membran sel dengan mengganggu fungsi membran sel, menghalangi permeabilitas membran sel, menghambat enzim pada bakteri yang mempengaruhi fungsi membran sel, serta menghambat pertukaran energi dengan menggunakan oksigen oleh bakteri (Rijayanti, 2014). Beberapa senyawa yang dapat diisolasi dari flavonoid meliputi flavon, flavonol, isoflavon, dan dihidroflavon (Hamdanah, 2015).

4.2 Saponin. Saponin merupakan salah satu jenis senyawa dalam bahan alami yang bersifat amfifilik dan mampu mengurangi tegangan permukaan. Saponin juga memiliki sifat anti-inflamasi. Mekanisme kerja saponin adalah dengan memicu kebocoran protein dan enzim dalam sel serta mengurangi tegangan pada permukaan dinding sel, yang kemudian mengakibatkan peningkatan permeabilitas sel dan potensial keluarnya zat-zat intraseluler dari dalam sel bakteri (Warganegara & Restina, 2016). Saponin juga dapat mengandung senyawa tertentu, seperti saponin triterpena (Fahrurnnidah, 2015).

4.3 Tanin. Tanin merupakan senyawa golongan fenol yang bersifat polar. Tanin bekerja dengan cara bereaksi dengan membran sel untuk mencegah enzim antibakteri, mencegah pertumbuhan bakteri dan mematikan enzim genetik pada bakteri (Saputra & Anggriani, 2016).

4.4 Steroid/triterpenoid. Steroid merupakan senyawa alami yang diambil dari bahan tumbuhan melalui proses destilasi untuk menghasilkan minyak atsiri. Senyawa ini dapat ditemukan dalam tumbuhan berbiji dalam bentuk glikosida. Steroid termasuk dalam kelompok lipid yang berasal dari senyawa jenuh yang disebut cyclopentanoperhydrophenanthrene yang terdiri dari empat cincin. Dalam jaringan tumbuhan, senyawa steroid dikenal sebagai fitosterol, sementara dalam jaringan hewan, senyawa ini dikenal sebagai kolesterol.

4.5 Alkaloid. Alkaloid adalah senyawa-senyawa yang memiliki struktur kimia berupa cincin heterosiklis, memiliki sifat basa, dan umumnya terdapat dalam tanaman (Sumarjo, 2009). Cara kerja alkaloid adalah dengan menghambat komponen pembentuk peptidoglikan pada sel bakteri. Hal ini mengakibatkan pembentukan lapisan dinding sel yang tidak lengkap karena sel bakteri kehilangan peptidoglikan, sehingga dinding sel hanya menutupi membran sel. Dampaknya adalah kerusakan pada dinding sel, yang menghambat pertumbuhan sel bakteri dan akhirnya menyebabkan kematian bakteri. (Retnowati *et al.*, 2011).

Tabel 1. Kandungan Asam Organik Buah Belimbing Wuluh (Hertanto, 2012)

Asam Organik	Jumlah (meq asam / 100 g total padatan)
Asam asetat	1,6 – 1,9
Asam sitrat	92,6 – 133,8
Asam format	0,4 – 0,9
Asam laktat	0,4 – 0,12
Asam oksalat	5,5 – 8,9
Sedikit asam malat	

Tabel 2. Hasil uji identifikasi senyawa belimbing wuluh (Nur, 2019)

Golongan senyawa	Hasil	Keterangan
Saponin	Terbentuk busa yang stabil	-
Flavonoid	Terbentuk larutan merah, jingga atau kuning	+
Alkaloid	Terbentuk endapan putih hingga kuning menggunakan pereaksi Mayer, sedangkan terbentuk endapan jingga coklat menggunakan Dragendorff.	-
Terpen	Warna merah, biru atau hijau	+
Tanin	Terbentuk warna hijau violet dengan pereaksi FeCl_3 , terbentuk endapan putih dengan pereaksi Gelatin 10%	-
Glikosida	Terbentuk warna hijau atau biru dan warna ungu pada batas cairan	-

Keterangan :

+ : Ada senyawa metabolit

- : Tidak ada senyawa metabolit

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah materi alami kering yang digunakan dalam bidang pengobatan dan belum mengalami proses pengolahan apapun (Farmakope Indonesia Edisi III). Istilah simplisia digunakan untuk merujuk pada bahan obat yang masih dalam keadaan murni atau asli (Gunawan, 2010).

2. Pencucian dan pengeringan simplisia

Tujuan pencucian adalah untuk memusnahkan zat pengotor yang terdapat pada simplisia. Simplisia dicuci dengan air mengalir yang bersih karena air yang digunakan untuk mencuci sangat mempengaruhi jenis dan jumlah bakteri awal pada simplisia. Pencucian pada simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air mengalir sebaiknya dilakukan sesegera mungkin (Melinda, 2014).

Pengeringan adalah suatu tahapan terpenting dalam menjaga konsistensi senyawa pada simplisia. Tahapan pengeringan mempengaruhi kualitas produk yang akan digunakan (Mahaputra *et al*, 2009). Pengeringan bisa dilakukan dengan dua cara, yaitu pengeringan alamiah (terpapar sinar matahari langsung atau di angin-anginkan) dan pengeringan buatan dengan instrument (Melinda, 2014). Menunda reaksi enzimatis dan menurunkan kadar air simplisia dapat menghalangi terjadinya penurunan mutu atau kerusakan simplisia (Prastowo, 2013).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Zat aktif yang terkandung dalam bahan atau tanaman bisa diambil melalui suatu proses yang disebut ekstraksi. Ekstraksi merupakan metode pengambilan zat aktif yang dapat larut dalam suatu pelarut cair, sehingga zat tersebut bisa dipisahkan dari bahan yang tidak larut (Depkes RI, 2017). Proses ekstraksi ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang nantinya dapat digunakan dalam pembuatan berbagai formulasi. Menurut Kemenkes RI (2000), ekstrak adalah produk dalam bentuk padat, cair, atau kering yang diperoleh dari tumbuhan atau hewan melalui proses ekstraksi yang tepat, dan tanpa terpapar langsung oleh sinar matahari.

2. Metode Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang sederhana, dimana simplisia direndam dalam pelarut selama periode tertentu, pada suhu kamar, dan dihindari paparan cahaya. Proses ekstraksi dengan metode maserasi melibatkan penggunaan pelarut yang sesuai, kemudian maserat dipisahkan dari ampas melalui penyaringan dan diikuti dengan penguapan. Menurut Istiqomah (2013), metode maserasi memiliki kelebihan karena tidak memerlukan pemanasan, yang berarti tidak ada degradasi bahan alami, dan proses ekstraksi dengan metode ini dianggap mudah dan sederhana.

D. Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu senyawa berdasarkan sifat kepolarannya. Proses fraksinasi dilakukan dengan mengekstrak senyawa dari ekstrak menggunakan dua jenis pelarut yang tidak dapat mencampur. Pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi harus mampu menguap, memiliki kelarutan yang rendah dalam air, dan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi (Purba, 2017). Pelarut yang sering digunakan mencakup *n*-heksana, etil asetat, dan air. *N*-heksana digunakan untuk mengekstrak lipid dan senyawa yang bersifat non polar, sementara etil asetat digunakan untuk mengekstrak senyawa semi polar, dan air digunakan untuk mengekstrak senyawa polar. Proses pemisahan fraksi yang berbeda dimulai dengan melakukan fraksinasi bertahap terhadap ekstrak pekat menggunakan berbagai jenis pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda. Senyawa yang tidak bersifat polar akan larut dalam pelarut yang juga tidak bersifat polar, sedangkan

senyawa polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar. (Mutiasari, 2012).

E. Pelarut

1. Etanol

Etanol sering dipilih sebagai pelarut dalam ekstraksi karena dianggap sebagai pelarut yang ideal, terutama untuk mengekstraksi senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin, flavonoid, dan alkohol (Arifianti *et al.*, 2014). Etanol dipilih karena memiliki kemampuan untuk menembus membran sel dengan mudah, mudah menguap, bersifat netral, tersedia secara luas, jarang terdapat kuman pada etanol dengan konsentrasi di atas 20%, tidak beracun, dan memerlukan suhu pemanasan yang lebih rendah untuk pemekatan. Selain itu, etanol juga memiliki sifat mudah terbakar karena memiliki titik didih sekitar 78,4°C. (Tiwari *et al.*, 2011).

2. *n*-Heksana

Pelarut *n*-heksana adalah zat cair non polar yang bersifat bening, tidak dapat bercampur dengan etanol, tidak memiliki warna, mudah terbakar, dan memiliki aroma ringan seperti eter atau minyak bumi. Pelarut ini juga mudah menguap dan umumnya tidak larut dalam air, namun dapat larut dalam etanol. Senyawa-senyawa polar seperti fenilpropanoid, terpenoid, dan sterol dapat larut dalam pelarut *n*-heksana (Tiwari *et al.*, 2011). Titik didih pelarut *n*-heksana berkisar antara 65-70°C (Susanti *et al.*, 2012).

3. Etil Asetat

Etil asetat adalah cairan bening yang tidak memiliki warna dan memiliki aroma yang khas seperti buah. Pelarut ini mampu larut dalam 15 bagian air dan dapat bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Etil asetat memiliki karakteristik sebagai pelarut semi polar, yang memungkinkannya untuk mengekstraksi senyawa aglikon dan glikon flavonoid. Selain itu, etil asetat juga efektif dalam mengekstraksi senyawa dari berbagai kelompok, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.*, 2013). Pelarut etil asetat memiliki titik didih yang relatif rendah, yaitu sekitar 77°C. (Susanti *et al.*, 2012).

4. Air

Air adalah pelarut yang sering digunakan karena sifatnya yang universal. Penggunaan air sebagai pelarut umumnya dipilih karena

mudah diakses, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan merupakan zat alami. Namun, air hanya mampu melarutkan senyawa yang memiliki sifat polar dan ionik. Penggunaan air sebagai pelarut sering dianggap kurang efisien karena dapat mengakibatkan bahan aktif dalam simplisia larut bersamaan dengan senyawa-senyawa lain yang tidak diperlukan, sehingga bisa menghambat proses ekstraksi. (Tiwari *et al.*, 2011).

F. *Staphylococcus aureus*

1. Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Syahrurahman *et al.*, 2010 adalah sebagai berikut :

Domain : *Bacteria*
 Kingdom : *Eubacteria*
 Ordo : *Eubacteriales*
 Famili : *Micrococcaceae*
 Genus : *Staphylococcus*
 Spesies : *Staphylococcus aureus*

2. Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif dengan bentuk bulat dan diameter berkisar antara 0,7 hingga 1,2 μm . Bakteri ini memiliki bentuk menyerupai kelompok buah anggur, tidak membentuk spora, tidak memiliki kemampuan bergerak, dan termasuk dalam bakteri anaerob fakultatif (Kristiani, 2018). Keunggulan *Staphylococcus aureus* terletak pada ketahanannya yang kuat, karena tidak membentuk spora, sehingga mampu bertahan hidup dalam media pertumbuhan seperti agar miring selama berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Suhu pertumbuhan optimalnya adalah pada 37°C, dan pembentukan pigmen terbaik terjadi pada suhu ruangan (20-25°C). Koloni *Staphylococcus aureus* biasanya berwarna abu-abu hingga kuning keemasan, berbentuk bulat, permukaannya halus, terlihat dengan jelas, dan mengkilap. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Jawetz *et al.* (2008) menunjukkan bahwa lebih dari 90% isolat klinis *Staphylococcus aureus* menghasilkan kapsul polisakarida, yang berperan dalam mengendalikan virulensi bakteri ini.

3. Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bagian dari flora normal yang dapat ditemukan pada kulit manusia, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan. Bakteri ini juga tersebar di udara dan lingkungan sekitar

kita. Meskipun merupakan bagian alami dari tubuh, *Staphylococcus aureus* dapat menjadi penyebab peradangan kulit dan kerusakan organ ketika kekebalan tubuh terganggu. Kemampuan bakteri ini untuk berkembangbiak dan menyebar di jaringan dapat menyebabkan penyakit (Talaro, 2008).

Patogenisitas *Staphylococcus aureus* bergantung pada produksi toksin, yang hanya dapat berfungsi jika bakteri tersebut berhasil menembus dan bertahan dalam tubuh inang. Pada tahap awal infeksi, koagulasi memiliki peran penting sebagai faktor virulensi dengan melindungi bakteri dari fagositosis, yang pada gilirannya memungkinkan bakteri untuk menginfeksi dan berkembang biak (Smith *et al.*, 1947). Produksi koagulasi dapat terdiri dari dua jenis, yaitu koagulasi yang bebas dan koagulasi yang terikat. Bakteri yang mampu menghasilkan koagulasi memiliki potensi untuk menjadi patogen yang invasif. (Jawetz *et al.*, 2001).

G. Antibakteri

1. Pengertian antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dan bahkan membunuh bakteri patogen (Paju *et al.*, 2013). Antibakteri memiliki sifat untuk menghentikan proses kehidupan mikroorganisme dalam konsentrasi yang relatif rendah (Jawetz *et al.*, 2007). Untuk menilai aktivitas antibakteri, pengujian biasanya dilakukan secara *in vitro* dengan tujuan menentukan konsentrasi antibakteri dalam cairan tubuh atau jaringan, mengidentifikasi daya penghambatan bakteri dalam larutan, serta menilai sensitivitas mikroorganisme terhadap obat.

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri dalam pengujian *in vitro* mencakup pH lingkungan, durasi inkubasi, jumlah bakteri yang diuji, stabilitas obat, dan aktivitas metabolik organisme dalam lingkungan tersebut (Andries *et al.*, 2014). Secara umum, senyawa antibakteri bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri, menghambat sintesis protein, memodifikasi permeabilitas membran, atau mengganggu fungsi enzim. (Pelezar dan Chan, 2008) dalam Septiani *et al.*, (2017).

2. Mekanisme antibakteri

Cara antibakteri bekerja untuk menghentikan pertumbuhan mikroorganisme diklasifikasikan sebagai berikut :

2.1 Menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri memiliki peran yang signifikan dalam menjaga struktur sel bakteri itu sendiri. Senyawa-senyawa yang memiliki kemampuan untuk merusak dinding sel bakteri akan mengakibatkan degradasi dinding sel tersebut, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi bentuk dan struktur sel bakteri, bahkan dapat menyebabkan kematian sel bakteri tersebut. Beberapa jenis antibiotik yang mampu menghambat dinding sel bakteri termasuk penisilin, sefalosporin, dan vankomisin. (Mashita, 2014).

2.2 Mengganggu atau merusak membran sel. Membran sel memiliki peran penting dalam mengendalikan pergerakan nutrisi dan metabolit ke dalam serta keluar dari sel bakteri. Fungsi utama dari membran sel adalah memfasilitasi aktivitas biosintesis dan proses respirasi di dalam sel. Ada beberapa antibiotik yang memiliki kemampuan untuk merusak membran sel, termasuk nistatin dan makrolida. (Ratnasari, 2017).

2.3 Mengganggu biosintesis asam nukleat. Siklus kehidupan sel sangat dipengaruhi oleh proses replikasi DNA di dalam sel. Beberapa antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein yakni antibiotik golongan kuinolon dan rifampisin (Sandika *et al.*, 2017).

2.4 Menghambat sintesis protein. Sintesis protein adalah rangkaian proses yang melibatkan transkripsi (DNA dikonversi menjadi mRNA) dan translasi (mRNA diartikan menjadi protein). Antibakteri yang memiliki kemampuan untuk mengganggu proses ini akan menghambat sintesis protein. Beberapa antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein termasuk tetrasiklin, kloramfenikol, dan aminoglikosida. (Sandika *et al.*, 2017).

3. Uji aktivitas antibakteri

3.1. Metode difusi. Metode difusi cakram merupakan metode yang paling umum digunakan dalam menentukan sensitivitas antibiotik. Dalam metode cakram (tes Kirby & Bauer), cakram yang mengandung senyawa antibakteri ditempatkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Ini memungkinkan senyawa antibakteri untuk berdifusi ke dalam media agar selama periode inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya hambatan dalam pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba yang terkandung dalam cakram tersebut (Pratiwi, 2008). Ukuran zona bening ini berkaitan dengan jumlah mikroba yang ditambahkan pada kertas cakram (Bonang, 1992).

Metode difusi memiliki kelebihan karena merupakan metode yang mudah dan cepat, dan dapat digunakan untuk menguji banyak antibiotik sekaligus pada satu jenis bakteri. Namun, kelemahannya adalah bahwa metode ini tidak dapat memberikan informasi kuantitatif tentang Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari senyawa antibakteri tersebut (Setianingrum, 2010).

3.2. Metode dilusi. Metode dilusi merupakan prosedur pengenceran yang digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Dalam metode ini, senyawa antimikroba dilarutkan dalam media cair atau padat dengan konsentrasi yang semakin berkurang. Media ini kemudian diinokulasi dengan bakteri yang diuji, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya adalah pengamatan terhadap konsentrasi tertentu di mana bakteri yang diuji tidak dapat berkembang (KHM) atau konsentrasi di mana tidak ada pertumbuhan bakteri sama sekali (KBM).

Keuntungan utama dari metode dilusi adalah bahwa ini memberikan hasil yang kuantitatif, yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk menghentikan pertumbuhan atau membunuh bakteri (Purba, 2017). Namun, metode ini memiliki kekurangan karena sulit dalam pengamatan, tidak praktis, dan memerlukan peralatan yang cukup banyak. (Jawetz *et al.*, 2012).

H. Amoksisilin

Antibiotika merupakan alat utama dalam penanganan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu antibiotik yang sering digunakan adalah amoksisilin. Amoksisilin termasuk dalam kelompok penisilin, yang dimodifikasi dengan penambahan gugus amino tambahan ke struktur penisilin untuk mengatasi resistensi antibiotik. Secara struktural, amoksisilin serupa dengan ampicilin, dengan perbedaan utama berupa adanya gugus hidroksil dalam cincin benzena. Amoksisilin memiliki efikasi yang lebih tinggi daripada penisilin terhadap bakteri gram positif dan beberapa bakteri gram negatif.

I. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah metode yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam suatu zat. Proses pemisahan

dilakukan dengan menggunakan berbagai pelarut dengan polaritas yang berbeda, yang menghasilkan larutan dengan sifat pemisahan yang baik serta ciri khas yang berbeda. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengonfirmasi hasil yang diperoleh dari analisis fitokimia. Oleh karena itu, uji KLT hanya dijalankan pada kelompok senyawa yang telah menunjukkan hasil positif dalam skrining fitokimia, yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid (Marliana *et al.*, 2005; Hilmi *et al.*, 2013).

Untuk mengevaluasi komponen kimia dalam fraksi, uji KLT mencakup pengamatan bercak pada plat KLT di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Penentuan jenis senyawa dilakukan dengan menyemprotkan plat KLT menggunakan beberapa reagen. Senyawa kimia yang dianalisis dalam ekstrak meliputi alkaloid, fenol, terpenoid, dan flavonoid dengan menggunakan reagen Dragendorff, FeCl₃, dan vanilin asam sulfat secara berurutan. (Allen *et al.*, 2017).

Tabel 3. Fase gerak, pembanding dan pereaksi semprot setiap golongan senyawa

Golongan Senyawa	Fase gerak	Senyawa pembanding	Pereaksi Semprot
Alkaloid	6:4	Piperin	Dragendorff
Flavonoid	3:1:1	Kuersetin	Uap ammonia/sitroborat
Saponin	4:1	Sapogenin	SbCl ₃
Tanin	4:1:5	Asam Galat	FeCl ₃
Steroid/triterpenoid	6:4	Stigmasterol	Lieberman-burchard

J. Landasan Teori

Tanaman yang digunakan dalam pengobatan tradisional harus mematuhi standar mutu yang ditetapkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), yang mencakup kriteria kualitas, efikasi, dan keselamatan. Dalam konteks penelitian ini, tanaman yang dipakai adalah buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), yang telah terbukti memiliki manfaat dalam mengobati berbagai kondisi seperti batuk rejan, jerawat, hipertensi, perdarahan gusi, sariawan, masalah gigi, gangguan pencernaan, dan peradangan. (Parikesit, 2011; Soebiyanto, 2008).

Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) mengandung berbagai senyawa seperti flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid, dan alkaloid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri flavonoid terkait dengan kemampuannya untuk membentuk senyawa kompleks yang dapat merusak membran sel dengan mengganggu fungsi membran tersebut. Tanin, di sisi lain, bekerja

sebagai agen antibakteri dengan cara mengikat protein, yang menghambat pembentukan dinding sel bakteri. Saponin berperan dengan mengurangi tegangan permukaan yang memudahkan penetrasi senyawa antibakteri ke dalam membran sel bakteri, berikatan dengan lipid dan menyebabkan kerusakan pada membran dan kematian sel. (Tiwari *et al.*, 2011). Steroid mempunyai kemampuan untuk melisiskan protein karena mampu membentuk ikatan polimer yang kuat.

Penelitian yang dilakukan oleh Rahmiati pada tahun 2017 menunjukkan bahwa ekstrak buah belimbing wuluh memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 25% v/v, dengan diameter zona hambat sebesar 10,1 mm. Namun, pada penelitian lain yang dilakukan pada tahun yang sama, penelitian tersebut menyatakan bahwa efektivitas buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 10% mampu memberikan zona hambat sebesar 21,6 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 28,6 mm terhadap *Staphylococcus epidermidis*. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Sandoram pada tahun 2019 juga mencatat bahwa ekstrak dari daun dan buah belimbing wuluh memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari buah belimbing wuluh memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 250 µg/ml.

Penelitian ini menggunakan berbagai jenis pelarut, termasuk *n*-heksana, etil asetat, dan air. Penggunaan *n*-heksana pada proses ekstraksi senyawa yang mengandung minyak atsiri dapat mengakibatkan kontak antara senyawa bakteri dan minyak atsiri, yang dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri karena adanya minyak dan lemak dalam ekstrak heksana. Etil asetat digunakan untuk menarik senyawa yang termasuk dalam kelompok flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin.

Proses maserasi adalah metode ekstraksi yang melibatkan perendaman bahan simplisia dalam pelarut yang sesuai, dan pelarut yang digunakan diganti pada setiap tahap ekstraksi hingga selesai. Kelebihan dari metode maserasi adalah prosesnya sederhana, tidak memerlukan pemanasan, dan menggunakan peralatan yang relatif mudah ditemukan (berdasarkan Depkes RI, 1986). Selain itu, fraksinasi

merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan kelompok senyawa utama berdasarkan sifat polaritasnya (Mukhriani, 2014).

Pengujian aktivitas antibakteri pada fraksi buah belimbing wuluh dilakukan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi digunakan untuk mengidentifikasi ekstrak atau fraksi yang paling aktif berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan. Sementara itu, metode dilusi digunakan untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

K. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pertama, ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, dapat ditentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi etil asetat yang paling efektif dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923..