

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

Psidium guajava L., juga dikenal sebagai jambu biji adalah tanaman buah tropis atau perdu yang berasal dari Brazil dan telah menyebar ke seluruh Nusantara. Jambu batu, jambu klutuk, dan jambu siki adalah nama lain dari jambu biji (Rahma dkk., 2023). Tanaman ini didistribusikan ke beberapa negara di Asia Selatan, termasuk India dan Sri Lanka. Diperkirakan terdapat sekitar 150 kultivar dan spesies tanaman ini di seluruh dunia (Napitupulu dkk., 2021).

1. Klasifikasi tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Menurut sistematika botani, tanaman jambu biji diklasifikasikan dalam taksonomi sebagai berikut (Rahma dkk., 2023):

Kingdom : *Plantae*
Sub Kingdom : *Tracheobionta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Sub Divisi : *Spermatophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Sub Kelas : *Rosidae*
Ordo : *Myrtales*
Famili : *Myrtaceae*
Genus : *Psidium*
Spesies : *Psidium guajava* L.



Gambar 1 Tanaman Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

(Sumber: Rahma dkk., 2023)

2. Morfologi tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Daun jambu biji berbentuk tunggal, mengeluarkan aroma khas saat diremas, dan tersusun berhadapan dengan pertulangan menyirip. Bentuk daun umumnya lonjong, tetapi dapat bervariasi menjadi jorong atau bundar telur terbalik, tergantung faktor genetik dan lingkungan (Wahyuni dkk., 2022).

Benang sari bunga jambu biji berwarna putih dengan kepala sari berwarna krem dan putik berwarna putih kehijauan dengan kepala putik bercuping. Panjang benang sari 0,5-1,2 cm dengan jumlah 180-600, yang melekat di pangkal kepala sari. Jumlah benang sari bertambah seiring peningkatan diameter bunga (Fadhilah dkk., 2018).

Jambu biji memiliki batang berbentuk segi empat berwarna coklat, permukaan licin dengan kulit tipis. Akarnya tunggang dengan percabangan kecil berwarna putih kecoklatan, yang berfungsi menyerap hara tanah. Buahnya bertipe buni yang dapat dimakan, kulit halus atau kasar, berbentuk bulat, serta memiliki variasi ukuran, warna dan daging yang bergantung pada varietasnya (Rahma dkk., 2023).

3. Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

a. Kandungan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dikenal kaya akan senyawa aktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Penelitian menunjukkan bahwa daun ini memiliki aktivitas antibakteri yang efektif melawan beberapa bakteri patogen, aktivitas antioksidan yang melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas, serta aktivitas antiinflamasi yang mampu meredakan peradangan. Selain itu, daun jambu biji bersifat antimutagenik sehingga dapat mencegah mutasi genetik berbahaya, bersifat analgesik yang dapat meredakan nyeri, dan memiliki efek antidiabetes yang membantu mengatur kadar gula darah. Daun ini juga mempercepat penyembuhan luka, memiliki efek antikanker yang menghambat pertumbuhan sel kanker tertentu, dan bersifat antijamur yang efektif melawan beberapa infeksi jamur (Antara, 2019).

b. Senyawa metabolit sekunder daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Tumbuhan menghasilkan senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan herbal (Putri dkk., 2023). Senyawa metabolit primer merupakan senyawa esensial yang dihasilkan oleh tumbuhan dan berperan penting dalam proses metabolisme sel serta dalam seluruh proses sintesis dan perombakan zat untuk mempertahankan hidupnya. Metabolit primer terdiri dari karbohidrat, protein, dan lemak. Sementara itu, metabolit sekunder adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh tumbuhan, namun tidak memiliki fungsi langsung dalam proses fotosintesis, pertumbuhan, respirasi, transportasi zat terlarut, translokasi, sintesis protein, asimilasi nutrisi, diferensiasi, maupun dalam pembentukan karbohidrat, protein, dan lipid (Nuraeni dan Darwiati, 2021). Daun

jambu biji mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder, antara lain tanin, triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, dan minyak atsiri (Niken dkk., 2022).

1) Tanin

Tanin adalah senyawa fenolik yang memberikan rasa pahit dan sepat, mampu menggumpalkan protein atau senyawa organik lain seperti asam amino dan alkaloid. Tanin, kaya akan gugus hidroksil dan karboksil, membentuk ikatan kompleks dengan protein dan makromolekul lain. Senyawa ini ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan, berperan melindungi tumbuhan dari herbivora dan hama, serta mengatur metabolisme tumbuhan (Julianto, 2019). Tanin dalam daun jambu biji memiliki efek antibakteri dengan cara mengecilkan membran, menonaktifkan enzim, dan merusak dinding sel (Niken dkk., 2022).

2) Triterpenoid

Triterpenoid adalah metabolit sekunder dari terpenoid dengan kerangka karbon C₃₀ asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini bisa bersifat siklik atau asiklik dan sering mengandung gugus alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Triterpenoid memiliki aktivitas farmakologis, seperti antivirus, antibakteri, antiinflamasi, penghambat kolesterol, dan antikanker. Selain itu, tumbuhan dengan kandungan triterpenoid bernilai ekologis karena sifat antijamur, insektisida, dan antivirusnya (Hidayah dkk., 2023). Triterpenoid sering digunakan karena kualitas aromatiknya, namun dalam daun jambu biji berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri (Niken dkk., 2022).

3) Flavonoid

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenolik terbesar di alam dengan kerangka C₆-C₃-C₆. Variasi hidroksilasi, alkoksilasi, dan glikosilasi menyebabkan

keanekaragamannya. Lebih dari 2000 jenis flavonoid telah diidentifikasi, seperti antosianin, flavonol, dan flavon. Senyawa ini umumnya terkumpul di vakuola sel tumbuhan, meskipun sintesisnya terjadi di luar vakuola (Julianto, 2019). Senyawa flavonoid dalam daun jambu biji dapat merusak sel bakteri, mengubah sifat protein, dan menghambat pertumbuhan bakteri (Niken dkk., 2022).

4) Saponin

Senyawa ini menghasilkan efek pembentukan busa permanen saat dikocok dengan air. Senyawa ini juga dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah. Contoh senyawa glikosida saponin adalah liquorice, yang memiliki aktivitas sebagai ekspektoran dan antiinflamasi (Julianto, 2019). Senyawa saponin dalam daun jambu biji memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif (Niken dkk., 2022).

5) Alkaloid

Alkaloid adalah metabolit sekunder penting dalam tumbuhan, biasanya hadir berupa campuran beberapa alkaloid utama dan sedikit alkaloid lain. Senyawa ini umumnya pahit, bersifat basa lemah, sulit larut dalam air, tetapi mudah larut dalam pelarut organik seperti dietil eter dan kloroform. Beberapa alkaloid memiliki warna, seperti berberin (kuning) dan garam sanguinarine (merah tembaga). Alkaloid mengandung nitrogen dalam strukturnya dan disintesis dari asam amino. Sebagian besar memiliki inti kerangka piridin, kuinolin, isoquinolin, atau tropan, yang memengaruhi fisiologi manusia dan hewan (Julianto, 2019). Senyawa alkaloid dalam daun jambu biji dapat memblokir struktur peptidoglikan dalam sel bakteri (Niken dkk., 2022).

6) Minyak atsiri

Minyak atsiri, yang juga dikenal sebagai minyak eteris (*ethereal oil* atau *volatile oil*), dihasilkan dari tumbuhan. Minyak ini mudah menguap pada suhu kamar tanpa terurai, memiliki rasa pahit, aroma khas sesuai dengan tumbuhan penghasilnya, umumnya larut dalam pelarut organik, dan tidak larut dalam air. Sebagian besar minyak atsiri memiliki sifat antibakteri dan antijamur yang kuat (Sari dkk., 2023). Minyak atsiri dalam daun jambu biji dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mencegah perkembangan penuh struktur membran sel, yang menyebabkan kematian sel bakteri (Niken dkk., 2022).

B. *Staphylococcus aureus*

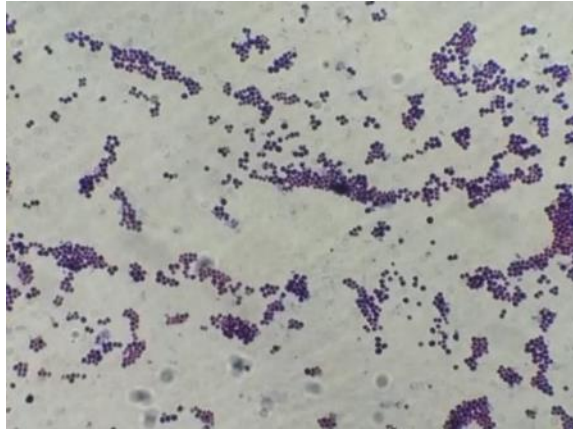
Staphylococcus aureus merupakan bakteri flora normal pada tubuh manusia, namun dalam jumlah tertentu dapat bersifat patogen dan menyebabkan berbagai penyakit infeksi, termasuk pada saluran pencernaan (Fauzi dkk., 2023). Bakteri *Staphylococcus aureus* juga terdapat pada kulit dan saluran pernapasan, serta dapat tersebar di udara dan lingkungan sekitar (Anjani, 2024). Salah satu penyakit pada saluran pencernaan yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* adalah diare (Fauzi dkk., 2023).

1. Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Taksonomi bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan *The Integrated Taxonomic Information System* (Anjani, 2024):

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Staphylococcales</i>

Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*



Gambar 2 *Staphylococcus aureus*

(Sumber: Hayati dkk., 2019)

2. Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif berbentuk bulat dengan diameter 0,7-1,2 μm , tersusun tidak teratur seperti buah anggur, tidak membentuk spora, anaerob fakultatif, dan tidak bergerak. Suhu optimum pertumbuhannya 37°C, namun pada suhu kamar (20-25°C) bakteri menghasilkan pigmen abu-abu hingga kuning keemasan. Koloninya berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau (Rianti dkk., 2022).

3. Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri komensal yang menjadi salah satu penyebab infeksi pada manusia. Sifat komensalnya yang dominan cenderung menyebabkan infeksi lebih sering dibandingkan dengan bakteri nonkomensal. Kemampuan bakteri ini meningkat ketika jumlah koloninya bertambah dan sistem kekebalan tubuh inang melemah. Hal ini dapat memicu berbagai penyakit karena

bakteri ini mampu beradaptasi dengan baik pada berbagai jaringan, seperti jaringan lunak, tulang, sendi, saluran pernapasan, pembuluh darah, kulit, dan kuku. Ketika sel endotel rusak, sel tersebut menjadi reseptor bagi infeksi yang dapat menyebabkan abses dan diare. Enterotoksin yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah penyebab utama diare, yang terjadi akibat interaksi enterotoksin dengan sistem saraf enterik, saraf yang terdapat di dinding saluran pencernaan, sehingga menyebabkan inflamasi usus dan diare (Purba, 2024).

4. Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antimikroba

Staphylococcus aureus memiliki strain yang resisten terhadap golongan antibiotik β -laktam, termasuk antibiotik metisilin, seperti *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Rahman dkk., 2023). Resistensi ini disebabkan oleh perubahan genetik akibat penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Suyasa dan Mastra, 2020). MRSA pertama kali ditemukan pada tahun 1961, tidak lama setelah antibiotik tersebut digunakan secara klinis. Sejak saat itu, MRSA menyebar luas baik di lingkungan rumah sakit maupun masyarakat. MRSA muncul karena gen *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) yang diperoleh dari *Staphylococcus aureus* yang rentan terhadap *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA). SCCmec membawa gen *mecA*, yang mengode PBP2a, memberikan resistensi terhadap antibiotik β -laktam, serta gen *ccr* yang mengatur integrasi dan eksisi SCCmec. SCCmec juga mengandung elemen genetik lain, seperti urutan penyisipan, transposon, dan plasmid (Widyastriana dkk., 2021).

C. Diare

Diare adalah penyakit menular dengan gejala buang air besar lebih dari tiga kali sehari, ditandai dengan perubahan bentuk dan konsistensi tinja menjadi lunak

hingga cair, serta disertai muntah. Diare dapat menyebabkan dehidrasi akibat kehilangan banyak cairan, bahkan dapat berujung pada kematian (Lusida dkk., 2023; Rosalina dan Nurmaulawati, 2024).

1. Klasifikasi diare

Berdasarkan durasinya, diare dibagi menjadi (Anggraini dan Kumala, 2022):

a. Diare akut

Diare akut atau gastroenteritis, yaitu diare yang muncul secara tiba-tiba dengan gejala seperti mual, muntah, demam, dan nyeri perut, berlangsung kurang dari 14 hari. Sekitar 80% kasus disebabkan oleh virus, sedangkan infeksi bakteri lebih sering menyebabkan diare berdarah.

b. Diare kronik

Diare kronik ditandai dengan keluarnya tinja yang cair dengan elektrolit berlebih, peningkatan frekuensi buang air besar, dan konsistensi tinja yang semakin lembek, berlangsung lebih dari 14 hari.

c. Diare persisten

Diare persisten dimulai dari diare akut, tetapi berlangsung lebih dari 14 hari. Penyebab utamanya adalah infeksi bakteri atau parasit.

2. Etiologi diare

Penyebab diare dapat dibagi menjadi beberapa faktor, salah satunya adalah faktor infeksi. Infeksi dapat disebabkan oleh bakteri seperti *Aeromonas sp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, dan *Vibrio cholerae*. Selain itu, infeksi juga dapat disebabkan oleh virus seperti Astrovirus, Koronavirus, Adenovirus enterik, dan

Rotavirus. Infeksi parasit juga berperan dalam penyebab diare, yang mencakup cacing perut seperti *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, dan *Ancylostoma duodenale*, jamur seperti *Candida albicans*; serta protozoa seperti *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Balantidium coli*, dan *Cryptosporidium*. Selain faktor infeksi, diare juga dapat disebabkan oleh faktor malabsorpsi. Malabsorpsi karbohidrat terjadi karena intoleransi terhadap disakarida (laktosa, maltosa, sukrosa) dan monosakarida (glukosa, fruktosa, galaktosa). Selain itu, malabsorpsi lemak dan malabsorpsi protein juga dapat menyebabkan diare (Anggraini dan Kumala, 2022).

3. Patogenesis diare

Patogenesis diare akut yang disebabkan oleh bakteri dibagi menjadi dua. Pertama, bakteri noninvasif, yaitu bakteri yang memproduksi toksin dan hanya melekat pada mukosa usus halus tanpa merusaknya. Kedua, bakteri invasif yang menimbulkan kerusakan dinding usus berupa nekrosis dan ulserasi, disertai diare yang mengandung lendir dan darah (Setyawan dan Setyaningsih, 2021).

Staphylococcus aureus, sebagai bakteri komensal, sering menjadi penyebab infeksi pada manusia. Kemampuan bakteri ini meningkat ketika jumlah koloninya bertambah dan sistem kekebalan tubuh inang melemah. Bakteri ini mampu menyerang berbagai jaringan, seperti jaringan lunak, tulang, sendi, saluran pernapasan, pembuluh darah, kulit, dan kuku. Enterotoksin yang dihasilkan dapat memicu diare melalui interaksi dengan sistem saraf enterik, menyebabkan inflamasi usus (Purba, 2024).

Selain itu, diare juga dapat disebabkan oleh virus, yang masuk ke dalam tubuh melalui makanan dan minuman. Virus menyerang sel epitel usus halus

menggantikannya dengan enterosit muda, sehingga mengganggu fungsi penyerapan cairan dan makanan. Akibatnya, zat tersebut terdorong keluar, menyebabkan diare yang disertai gejala lain seperti demam, nyeri perut, dan dehidrasi (Setyawan dan Setyaningsih, 2021).

D. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dengan pelarut untuk mendapatkan ekstrak murni atau ekstrak yang hanya mengandung komponen tertentu (Sari dkk., 2021). Ekstrak merupakan sediaan pekat yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Berdasarkan konsistensinya, ekstrak dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu ekstrak cair (kadar air >30%), kental (kadar air 5-30%), dan kering (kadar air <5%) (Riyanto dan Haryanto, 2023). Terdapat beberapa metode ekstraksi, yang terbagi menjadi ekstraksi dingin, seperti perkolasi dan maserasi, serta ekstraksi panas, seperti soxhletasi, destilasi, reflux, dekokta, dan infusa (Maryam dkk., 2023).

1. Ekstraksi dingin

a. Perkolasi

Metode ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu diperbarui, dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga seluruh senyawa aktif terlarut secara optimal. Metode ini memerlukan waktu dan pelarut yang lebih banyak. Uji perkolat dengan pereaksi spesifik dapat memastikan hasil ekstraksi sempurna (Aprilyanie dkk., 2023).

b. Maserasi

Metode ekstraksi simplisia dengan cara merendamnya dalam pelarut pada suhu kamar, sehingga kerusakan atau degradasi metabolit dapat diminimalkan.

Dalam proses maserasi, terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel, sehingga pelarut perlu diganti secara berkala. Kinetik merupakan metode ekstraksi yang melibatkan pengadukan selama maserasi, sedangkan digesti adalah teknik maserasi yang dilakukan pada suhu lebih tinggi dari suhu kamar, yaitu antara 40-60°C (Aprilyanie dkk., 2023).

2. Ekstraksi panas

a. Soxhletasi

Metode ekstraksi menggunakan pelarut organik pada suhu didih dengan bantuan alat soxhlet. Dalam proses ini, simplisia dan ekstrak ditempatkan di labu yang terpisah. Pemanasan menyebabkan pelarut menguap, kemudian uap tersebut masuk ke labu pendingin. Hasil kondensasi akan jatuh ke atas simplisia, sehingga ekstraksi berlangsung secara terus-menerus dengan jumlah pelarut yang tetap. Metode ini dikenal sebagai ekstraksi kontinu (Aprilyanie dkk., 2023).

b. Destilasi

Metode ekstraksi dengan menguapkan senyawa bersama air sebagai pelarut. Dalam proses pendinginan, senyawa dan uap air akan mengalami kondensasi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi (Aprilyanie dkk., 2023).

c. Reflux

Metode ekstraksi menggunakan pelarut pada suhu titik didih selama jangka waktu tertentu, dengan jumlah pelarut yang terbatas dan relatif konstan berkat adanya pendingin balik. Proses reflux biasanya dilakukan berulang kali (3-6 kali) pada residu pertama untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang lebih optimal. Namun, metode ini dapat menyebabkan penguraian senyawa yang tidak tahan panas (Aprilyanie dkk., 2023).

d. Infusa

Larutan cair yang dihasilkan dengan mengekstraksi simplisia nabati menggunakan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Aprilyanie dkk., 2023).

e. Dekokta

Metode ekstraksi yang serupa dengan infusa, namun dilakukan dengan waktu yang lebih lama, yaitu selama 30 menit, dan suhunya mencapai titik didih air (Aprilyanie dkk., 2023).

E. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri merupakan suatu metode yang digunakan untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri terhadap zat antibakteri, serta untuk mengidentifikasi senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri. Manfaat dari uji ini adalah untuk menemukan pengobatan yang efektif dan efisien dengan mempertimbangkan hasil metabolisme sekunder (Anjarsari dan Lestari, 2022).

Aktivitas suatu antibakteri dapat diamati melalui beberapa metode, yaitu difusi dan dilusi. Metode difusi terdiri dari difusi cakram dan sumuran, sedangkan metode dilusi terdiri dari dilusi padat dan cair. Secara umum, tujuan metode difusi adalah untuk mengetahui sensitivitas suatu bakteri terhadap antibiotik, sedangkan metode dilusi bertujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Nurul dkk., 2023).

1. Metode difusi

a. Difusi cakram (*disc*)

Prinsip metode difusi cakram adalah menempatkan cakram kertas yang mengandung senyawa antibakteri tertentu pada media agar yang telah diinokulasi

dengan mikroba uji. Senyawa antibakteri tersebut kemudian berdifusi ke dalam media agar, dan pengamatan dilakukan terhadap terbentuknya zona hambat berupa daerah bening di sekitar cakram kertas, yang menunjukkan efektivitas senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Burhan dkk., 2022).

Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang mengandung senyawa antibakteri pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 16-24 jam, lalu diamati zona bening di sekitar cakram kertas dan diukur menggunakan jangka sorong. Selanjutnya, diameter zona hambat yang diperoleh dibandingkan dengan standar sensitivitas untuk menentukan apakah bakteri tersebut tergolong sensitif, resisten, atau intermediet terhadap senyawa yang diuji (Nurhayati dkk., 2020).

Kelebihan metode difusi cakram antara lain proses pengujian yang cepat, biaya yang digunakan relatif terjangkau, kemudahan dalam pelaksanaan karena tidak memerlukan keahlian khusus. Namun, metode ini memiliki kekurangan, yaitu sulit diterapkan pada mikroorganisme yang perkembangannya lambat, serta zona bening yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh kondisi inkubasi, inokulum, dan ketebalan medium (Intan dkk., 2021).

b. Difusi sumuran (*hole/cup*)

Prinsip metode sumuran adalah membuat sumur atau lubang kecil pada media agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji, lalu memasukkan larutan antibakteri ke dalam sumur tersebut. Senyawa antibakteri kemudian akan berdifusi ke dalam media agar, dan pengamatan dilakukan terhadap terbentuknya zona hambat berupa daerah bening di sekitar sumur, yang menunjukkan efektivitas senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Burhan dkk., 2022).

Metode ini dilakukan dengan menambahkan senyawa antibakteri ke dalam lubang atau sumur yang telah dibuat pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 16-24 jam, lalu diamati zona bening di sekitar lubang atau sumur dan diukur menggunakan jangka sorong. Selanjutnya, diameter zona hambat yang diperoleh dibandingkan dengan standar sensitivitas untuk menentukan apakah bakteri tersebut tergolong sensitif, resisten, atau intermediet terhadap senyawa yang diuji (Nurhayati dkk., 2020).

Kelebihan metode difusi sumuran antara lain lebih sensitif, lebih mudah untuk mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena isolat beraktivitas tidak hanya di permukaan agar, tetapi hingga ke bagian bawah. Namun, metode ini memiliki kelemahan, yaitu media sangat rentan terhadap kontaminasi saat pembuatan lubang dan penambahan sampel, karena cawan perlu sering dibuka dibandingkan dengan metode difusi cakram (Retnaningsih dkk., 2019).

2. Metode dilusi

a. Dilusi padat

Prinsip kerja metode dilusi padat adalah melakukan serangkaian pengenceran agen antimikroba pada media cair hingga diperoleh beberapa konsentrasi berbeda, lalu mencampurkannya ke dalam media kultur yang kemudian diinokulasi dengan bakteri dan diinkubasi. Hasil pengujian diperoleh dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri (Burhan dkk., 2022).

Metode ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran dari senyawa antibakteri, yang kemudian dicampur dengan media NA cair pada suhu 45-50°C. Setelah itu, campuran tersebut dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan

hingga memadat lalu diinokulasi dengan bakteri uji. Selanjutnya, cawan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri (Nurul dkk., 2023).

Kelebihan metode dilusi padat antara lain mudah dilaksanakan, memberikan hasil yang jelas mengenai pertumbuhan bakteri pada berbagai konsentrasi, dan memungkinkan penggunaan media agar yang lebih efisien. Namun, metode ini memiliki kelemahan, yaitu tantangan dalam menjaga suhu agar tetap pada 45-50°C, di mana ketidaktepatan suhu dapat mengurangi efektivitas antibakteri. Selain itu, pembacaan titik akhir sering kali tidak mudah dilakukan, dan metode ini bisa sangat melelahkan jika tidak menggunakan otomatisasi (Munira dan Nasir, 2023).

b. Dilusi cair

Prinsip metode dilusi cair adalah melakukan serangkaian pengenceran agen antimikroba pada media cair hingga diperoleh beberapa konsentrasi berbeda, kemudian setiap konsentrasi sampel ditambahkan suspensi bakteri dan diinkubasi. Hasil pengujian diperoleh dengan melihat ada atau tidaknya kekeruhan, apabila larutan dalam tabung mulai terlihat jernih maka pertumbuhan bakteri mulai terhambat (Nurul dkk., 2023).

Metode ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran dari senyawa antibakteri, yang kemudian dicampur dengan media NB cair pada suhu 45-50°C. Setelah itu, campuran tersebut diinokulasi dengan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya, diamati ada atau tidaknya kekeruhan, apabila larutan dalam tabung mulai tampak jernih, maka pertumbuhan bakteri mulai terhambat (Munira dan Nasir, 2023).

Kelebihan metode dilusi cair antara lain lebih sederhana, memerlukan lebih sedikit media agar dibandingkan dengan metode dilusi padat, serta interaksi lebih tinggi antara bakteri dan bahan uji sehingga meningkatkan efektivitas pengujian. Namun, metode ini memiliki kelemahan, yaitu konsentrasi bahan uji yang diperoleh terbatas pada rentang tertentu, sehingga potensi daya hambatan pada konsentrasi rendah mungkin tidak terdeteksi. Selain itu, proses pengenceran dapat meningkatkan risiko kesalahan dalam distribusi sampel, yang dapat memengaruhi keakuratan hasil (Nurul dkk., 2023).

3. Faktor yang memengaruhi diameter zona hambat

Perbedaan diameter zona hambat yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor yang memengaruhi diameter zona hambat meliputi suhu inkubasi, waktu inkubasi, ketebalan media, pH media, volume bahan uji, dan konsentrasi bahan uji (Wilapangga dan Syaputra, 2018).

a. Suhu inkubasi

Suhu inkubasi dapat memengaruhi diameter zona hambat. Inkubasi yang optimal dilakukan pada suhu 35-37°C. Suhu di bawah 35°C, terutama pada cawan yang ditumpuk lebih dari dua lapis, dapat memperbesar zona hambat, sementara suhu di atas 37°C dapat menghambat difusi ekstrak secara optimal.

b. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi berpengaruh terhadap diameter zona hambat. Waktu inkubasi perlu disesuaikan dengan kecepatan pertumbuhan bakteri, karena zona hambat mulai terbentuk dalam beberapa jam pertama setelah bakteri diinokulasi pada media agar dan dapat diamati segera setelah bakteri mulai tumbuh.

c. Ketebalan media

Ketebalan media agar yang berbeda dapat memengaruhi kecepatan difusi zat uji ke dalam agar, sehingga berdampak pada diameter zona hambat. Ketebalan agar yang ideal adalah sekitar 4 mm. Jika ketebalannya kurang dari 4 mm, ekstrak akan berdifusi lebih cepat, sedangkan jika ketebalannya lebih dari 4 mm, ekstrak akan berdifusi lebih lambat.

d. pH media

Perbedaan pH media dapat memengaruhi jumlah zat uji yang berdifusi ke dalam media agar. Selain itu, pH juga memengaruhi pertumbuhan bakteri, karena setiap jenis bakteri memiliki pH optimal untuk tumbuh dengan baik.

e. Volume bahan uji

Volume bahan uji dapat memengaruhi diameter zona hambat. Semakin besar volume bahan uji yang digunakan, semakin luas diameter zona hambat yang dihasilkan. Hal ini terjadi karena volume bahan uji yang lebih besar memungkinkan senyawa aktif berdifusi lebih luas dalam media agar.

f. Konsentrasi bahan uji

Konsentrasi bahan uji dapat berpengaruh pada diameter zona hambat. Semakin tinggi konsentrasi bahan uji yang digunakan, semakin luas diameter zona hambat yang dihasilkan. Hal ini terjadi karena konsentrasi bahan uji yang lebih tinggi memiliki jumlah komponen zat aktif yang lebih besar.