

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kelapa

1. Definisi tanaman Kelapa

Kelapa (*Cocos nucifera* L.) merupakan tanaman yang tergolong ke dalam famili Palmae dengan genus *Cocos*. Tanaman ini memiliki dua varietas utama, yaitu varietas genjah dan varietas dalam, yang masing-masing memiliki karakteristik yang berbeda. Kelapa dikenal sebagai salah satu tanaman dengan nilai ekonomi yang tinggi karena hampir seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan. Berbagai bagian tanaman, mulai dari akar, batang, daun, hingga buah, memiliki kegunaan dalam berbagai aspek kehidupan, seperti pangan, industri, dan kebutuhan rumah tangga. Atas dasar manfaatnya yang sangat luas, kelapa sering disebut sebagai *tree of life* atau pohon kehidupan. (Tenda *et al.*, 2015).

Kelapa merupakan tanaman multiguna karena hampir seluruh bagian tanamannya memiliki nilai manfaat bagi kehidupan manusia. Sistem perakaran kelapa menjadi inspirasi dalam pengembangan teknologi konstruksi, yaitu fondasi cakar ayam. Batangnya dimanfaatkan sebagai bahan bangunan dan kayu dengan kualitas menengah, sedangkan daun tua yang telah dikeringkan banyak digunakan sebagai bahan atap rumah. Selain itu, cairan manis yang dihasilkan dari tangkai bunga kelapa, yang dikenal sebagai nira, dapat dikonsumsi sebagai minuman segar, difermentasi menjadi minuman tradisional (tuak), atau diolah lebih lanjut menjadi gula merah maupun gula semut. (Tenda *et al.*, 2015).

Buah kelapa merupakan bagian tanaman yang memiliki nilai ekonomi

paling tinggi. Sabut kelapa, yaitu mesokarp yang tersusun atas serat-serat kasar, dimanfaatkan sebagai bahan bakar, pengisi bantalan kursi, bahan baku pembuatan tali, keset, serta media tanam terutama untuk anggrek. Tempurung atau batok kelapa, yang merupakan bagian endokarp, digunakan sebagai bahan bakar, pengganti gayung, wadah minuman, bahan dasar berbagai kerajinan, arang, karbon aktif, dan asap cair. Daging buah kelapa muda umumnya dikonsumsi sebagai minuman segar, sedangkan air kelapa mengandung berbagai enzim yang berpotensi sebagai penetral racun serta memberikan efek menyegarkan dan menenangkan. (Tenda *et al.*, 2015).

2. Nira Kelapa

Nira kelapa merupakan cairan jernih yang dihasilkan dari tandan bunga kelapa yang belum mekar atau dari tanaman penghasil nira lainnya, seperti aren, siwalan, dan lontar. Dalam kondisi segar, nira memiliki rasa manis, aroma khas yang harum, serta tidak berwarna. Nira kelapa dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan minuman fermentasi (tuak), cuka, minuman segar, maupun diolah menjadi gula merah. (Santoso dkk., 2020).

Tanaman kelapa mulai dapat disadap pada umur sekitar 6–8 tahun dan mampu menghasilkan nira selama kurang lebih 25–30 tahun. Nira kelapa diperoleh melalui penyadapan tandan bunga (mayang) yang telah siap dipanen, yang ditandai dengan tandan bunga yang akan melenting ketika digoyangkan. Sebelum penyadapan dilakukan, tangkai bunga dipukul secara perlahan untuk melunakkan jaringan tandan sehingga mempermudah keluarnya nira. (Tenda *et al.*, 2015).

Proses pengempukan tandan dilakukan sejak bunga masih belum berkembang hingga mencapai fase mekar, dengan lama perlakuan sekitar ± 3

minggu. Setelah bunga berkembang, ujung tandan dipotong sekitar 5 cm dari ujung tangkai bunga sehingga nira mulai keluar dan selanjutnya ditampung dalam wadah berupa lodong bambu. Penyadapan nira dilakukan secara rutin sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari. (Tenda *et al.*, 2015).

Pohon kelapa umumnya menghasilkan nira sekitar 1–2 L pada setiap penyadapan sore hari, sedangkan hasil penyadapan pagi hari berkisar antara 1,5–4 L per mayang yang disadap. Pengambilan nira dilakukan dengan menyadap mayang bunga kelapa yang telah berumur sekitar satu bulan atau telah memasuki fase mekar. Nira yang keluar kemudian ditampung menggunakan bumbung bambu atau jerigen yang dipasang di bawah tangkai bunga. Nira kelapa mudah mengalami fermentasi karena memiliki kandungan sukrosa yang tinggi. Apabila nira tidak segera diolah setelah penyadapan, maka akan terjadi perubahan warna menjadi keruh kekuningan, rasa berubah menjadi asam, serta timbul aroma yang menyengat. Kondisi tersebut disebabkan oleh proses hidrolisis sukrosa menjadi gula reduksi akibat menurunnya derajat keasaman (pH) nira. (Adisetya dkk., 2022).

Jumlah nira yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya kondisi iklim dan umur tanaman kelapa. Keadaan iklim berpengaruh terhadap volume nira yang diperoleh, di mana penyadapan pada musim hujan umumnya menghasilkan nira dalam jumlah lebih banyak dibandingkan dengan musim kemarau. Selain itu, umur pohon kelapa juga memengaruhi produktivitas nira, karena pohon yang berusia lebih muda cenderung menghasilkan nira lebih banyak dibandingkan pohon yang telah berumur tua. (Adisetya dkk., 2022).

B. Tuak

1. Definisi Tuak

Tuak merupakan minuman beralkohol yang dihasilkan dari nira pohon aren maupun pohon kelapa. Kadar alkohol pada tuak umumnya sekitar 4% dan minuman ini cukup populer di kalangan masyarakat Indonesia. Berdasarkan data World Health Organization (WHO) tahun 2017, jumlah konsumsi alkohol di seluruh dunia mencapai sekitar 64 juta orang. Selain itu, tuak juga dapat didefinisikan sebagai minuman hasil fermentasi dari berbagai bahan yang mengandung gula, termasuk cairan bunga yang diperoleh dari tanaman penghasil nira seperti aren dan kelapa yang kemudian mengalami proses fermentasi. (Suryanto dkk, 2016).

Kadar alkohol dalam minuman tuak umumnya berada pada kisaran 4–15%. Konsentrasi alkohol akan terus meningkat selama kandungan gula dalam nira masih tersedia sebagai substrat bagi proses fermentasi. Oleh karena itu, kadar alkohol pada tuak dapat berbeda-beda bergantung pada lamanya waktu fermentasi yang berlangsung. Bahan baku utama dalam pembuatan tuak adalah nira yang berasal dari bunga kelapa. Dalam kondisi segar dan sebelum mengalami fermentasi, nira memiliki rasa manis, tidak berwarna, serta beraroma harum. (Aisyah, 2018).

Proses pembuatan tuak dilakukan melalui fermentasi nira yang diperoleh dari bunga pohon aren atau pohon kelapa yang telah memenuhi syarat untuk disadap. Umumnya, pohon kelapa yang siap disadap berumur sekitar 15 tahun ke atas dengan tinggi mencapai 6–7 meter atau memiliki bunga yang telah siap menghasilkan nira. Proses pembuatan tuak tergolong sederhana karena nira yang diperoleh dari hasil penyadapan tangkai bunga aren atau kelapa

hanya mengalami sedikit tahapan pengolahan sebelum berubah menjadi minuman tuak melalui proses fermentasi. (Suryani, 2019).

Nira kelapa umumnya diperoleh melalui proses penyayatan atau pengirisan pada ujung tandan bunga kelapa. Sebuah wadah kemudian dipasang dan diikat pada pangkal tandan bunga untuk menampung nira yang menetes. Sebelum digunakan, wadah tersebut biasanya diberi seikat serabut sabut kelapa yang berfungsi menghasilkan tuak dengan kualitas alkohol yang baik, memberikan aroma khas, serta menghambat proses fermentasi lanjutan, terutama oksidasi alkohol menjadi asam asetat. Dari hasil penyayatan bunga tersebut, setiap tandan kelapa mampu menghasilkan lebih dari 1 liter nira dalam satu hari. (Rindengan, B., dan Karouw, S. 2018).

Setelah proses penyadapan selesai, nira dikumpulkan dengan menuangkannya ke dalam wadah seperti ember plastik atau jerigen. Nira yang telah terkumpul pada awalnya berwarna putih, bercita rasa manis, dan belum mengandung alkohol karena belum mengalami fermentasi. Selanjutnya, nira yang telah bersih dimasukkan ke dalam botol dan difermentasi selama sekitar 5–6 jam sehingga terbentuk alkohol, kemudian siap dikonsumsi sebagai minuman tuak. (Rindengan, B., dan Karouw, S. 2018).

Tuak merupakan minuman yang dihasilkan dari nira hasil penyadapan bunga aren atau kelapa yang telah mengalami proses fermentasi. Sebelum difermentasi, nira mengandung air sebesar 88,40%, gula 10,27%, protein 0,41%, lemak 0,17%, serta asam-asam organik, seperti asam sitrat, asam tartarat, asam malat, asam suksinat, asam laktat, asam fumarat, dan asam piroglutamat sebesar 0,02%. Setelah proses fermentasi berlangsung, nira berubah menjadi tuak dengan komposisi air 88,8%, protein 0,23%, lemak

0,2%, mineral 0,03%, karbohidrat 11,8%, serta alkohol 4–5% yang dihasilkan dari perombakan gula dalam nira (Noviyanti, 2015). Nira yang baru disadap memiliki rasa manis dengan pH netral sekitar 7, namun pengaruh lingkungan dan aktivitas fermentasi menyebabkan nira mudah terkontaminasi sehingga pH menurun menjadi sekitar 5,34 dan cita rasanya berubah dari manis menjadi asam.

2. Kandungan pada Tuak Kelapa

Berdasarkan hasil uji fitokimia diketahui Tuak kelapa mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yaitu :

a. Saponin

Saponin merupakan salah satu senyawa yang banyak dijumpai pada berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini memiliki gugus polar dan gugus nonpolar dalam strukturnya. Gugus polar berupa glikosil, sedangkan gugus nonpolar terdiri atas steroid atau triterpenoid. Apabila saponin dikocok dengan air, senyawa tersebut akan membentuk misel yang menghasilkan busa. Pada struktur misel, bagian polar berada di permukaan, sedangkan bagian nonpolar mengarah ke bagian dalam. Sifat ini dimanfaatkan sebagai dasar untuk mengidentifikasi keberadaan saponin dalam suatu sampel. Dalam bidang kesehatan, saponin diketahui memiliki aktivitas biologis, seperti menghambat agregasi trombosit dan pembentukan karies gigi. Selain itu, saponin juga berpotensi sebagai senyawa antiinflamasi dan analgesik. Ketika berinteraksi dengan bakteri, saponin dapat merusak dinding sel sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. (Putri dkk., 2020)

b. Fenol

Senyawa fenolik merupakan kelompok senyawa metabolit tumbuhan yang memiliki ciri khas berupa cincin aromatik dengan sedikitnya satu gugus hidroksil. Aktivitas antibakteri senyawa fenolik bekerja melalui mekanisme denaturasi protein sel. Interaksi tersebut dapat memengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang sebagian besar tersusun atas protein. Gangguan terhadap permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma akan mengakibatkan ketidakseimbangan makromolekul serta ion di dalam sel, sehingga pada akhirnya menyebabkan lisis sel bakteri. (Sari dkk., 2022).

c. Terpenoid

Terpenoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa beberapa jenis terpenoid, seperti diterpenoid fitol, monoterpenoid linalool, terpenoid glikosida, dan triterpenoid saponin, memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerja terpenoid sebagai antibakteri berlangsung melalui interaksi dengan protein porin pada membran luar dinding sel bakteri sehingga membentuk ikatan polimer yang kuat dan menyebabkan penurunan permeabilitas dinding sel bakteri. (Sari dkk., 2022).

d. Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di alam. Sebagian besar alkaloid dihasilkan oleh tumbuhan, terutama tumbuhan tingkat tinggi. Senyawa alkaloid tersusun atas unsur karbon, hidrogen, dan nitrogen. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri dilakukan dengan mengganggu pembentukan peptidoglikan yang

merupakan komponen utama dinding sel bakteri, sehingga dinding sel tidak terbentuk secara sempurna dan mengakibatkan kematian sel. Selain itu, alkaloid juga mampu menghambat aktivitas enzim topoisomerase yang berperan penting dalam proses replikasi, transkripsi, dan rekombinasi DNA melalui mekanisme pemotongan serta penyambungan untai tunggal maupun untai ganda DNA. (Sari dkk., 2022).

e. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Senyawa ini mampu menghambat berbagai reaksi oksidasi, baik secara enzimatis maupun nonenzimatis, sehingga berpotensi menghambat atau mencegah pertumbuhan sel kanker. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri meliputi penghambatan sintesis asam nukleat, gangguan terhadap fungsi membran sel, serta penghambatan metabolisme energi. Flavonoid diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat terhadap bakteri Gram positif. Hal ini disebabkan sifat flavonoid yang cenderung polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang juga bersifat polar dibandingkan lapisan lipid pada bakteri Gram negatif yang bersifat nonpolar. Akibatnya, aktivitas penghambatan terhadap bakteri Gram positif menjadi lebih efektif. Kerusakan dinding sel tersebut mengganggu fungsi dinding sel sebagai penentu bentuk dan pelindung sel dari lisis osmotik, sehingga pada akhirnya menyebabkan sel bakteri mengalami lisis. (Sari dkk., 2022).

3. Faktor yang mempengaruhi fermentasi tuak kelapa

a. Bahan Baku

Nira kelapa merupakan bahan utama dalam pembuatan tuak yang sangat menentukan hasil fermentasi. Kandungan gula, terutama sukrosa, menjadi sumber energi bagi mikroorganisme untuk menghasilkan etanol dan asam organik. Nira yang segar, jernih, dan tidak terkontaminasi akan menghasilkan fermentasi yang optimal. Sebaliknya, nira yang sudah tercemar atau kualitasnya menurun dapat menyebabkan fermentasi tidak sempurna serta menghasilkan rasa dan aroma yang tidak diinginkan. Selain itu, pH awal nira yang relatif netral hingga sedikit asam juga mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme selama proses fermentasi (Suryani, 2019).

b. Mikroorganisme

Fermentasi tuak kelapa berlangsung secara alami dengan bantuan mikroorganisme seperti khamir (*Saccharomyces* sp.) dan bakteri asam laktat (*Lactobacillus* sp.). Khamir berperan dalam mengubah gula menjadi etanol melalui proses fermentasi alkohol, sedangkan bakteri asam laktat menghasilkan asam organik yang menurunkan pH. Komposisi, jumlah, dan aktivitas mikroorganisme ini sangat mempengaruhi kecepatan fermentasi, kadar alkohol, serta cita rasa tuak yang dihasilkan (Suryani, 2019).

c. Lingkungan

Faktor lingkungan seperti suhu, pH, dan oksigen sangat berpengaruh terhadap proses fermentasi. Suhu optimal fermentasi berkisar antara 25–30°C, di mana mikroorganisme dapat bekerja secara maksimal. pH yang semakin

asam selama fermentasi akan mempengaruhi jenis mikroorganisme yang dominan. Selain itu, kondisi oksigen juga penting, karena fermentasi alkohol oleh khamir berlangsung secara anaerob, sedangkan keberadaan oksigen dapat mengubah etanol menjadi asam asetat (Suryani, 2019).

d. Suhu

Suhu mempengaruhi aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroorganisme selama fermentasi. Suhu optimal fermentasi umumnya berkisar antara 25–30°C. Pada suhu ini, mikroorganisme seperti *Saccharomyces* sp. dapat bekerja secara maksimal dalam mengubah gula menjadi etanol. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak enzim dan membunuh mikroorganisme, sedangkan suhu rendah memperlambat proses fermentasi (Tamang *et al.*, 2016).

e. pH

pH merupakan faktor penting yang mempengaruhi aktivitas mikroorganisme selama fermentasi. Nira kelapa umumnya memiliki pH mendekati netral, namun selama fermentasi pH akan menurun akibat terbentuknya asam organik seperti asam laktat dan asam asetat. Kondisi pH yang sedikit asam (sekitar 4–6) optimal bagi pertumbuhan khamir dan bakteri fermentatif. pH yang terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan pH yang terlalu tinggi meningkatkan risiko kontaminasi (Tamang *et al.*, 2016).

f. Jumlah oksigen

Ketersediaan oksigen menentukan jalur metabolisme mikroorganisme. Fermentasi alkohol oleh khamir berlangsung secara anaerob, sedangkan keberadaan oksigen dapat menyebabkan oksidasi etanol menjadi asam asetat

oleh bakteri asam asetat. Oleh karena itu, kondisi fermentasi yang minim oksigen diperlukan untuk mempertahankan produksi etanol (Madigan *et al.*, 2018).

g. Waktu fermentasi

Durasi fermentasi mempengaruhi komposisi kimia dan karakteristik sensori tuak kelapa. Semakin lama waktu fermentasi, semakin tinggi kadar etanol dan asam organik yang terbentuk, sehingga rasa menjadi lebih asam. Namun, fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kualitas karena etanol teroksidasi menjadi asam asetat (Tamang *et al.*, 2016).

C. *Staphylococcus aureus*

1. Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Taksonomi dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Firmicutes*

Class : *Cocoid*

Ordo : *Bacillales*

Family : *Staphylococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus aureus* (Hayati, dkk 2016)

2. Morfologi dan fisiologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan keracunan makanan dan gastroenteritis. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri ini memiliki sifat tahan terhadap suhu tinggi. Walaupun sel bakteri dapat mengalami kematian selama proses pemanasan, enterotoksin yang dihasilkannya tetap stabil, bahkan setelah makanan mengalami proses

pendinginan maupun pembekuan. Bakteri ini banyak ditemukan di berbagai lingkungan, seperti udara, air limbah, susu, bahan pangan, serta peralatan makan. Manusia dan hewan merupakan reservoir utama yang berperan sebagai sumber penularan infeksi bakteri tersebut. (Anindita dkk., 2023).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus dan tersusun secara tidak teratur menyerupai gerombolan buah anggur. Bakteri ini mampu tumbuh dengan cepat pada berbagai media kultur serta memiliki aktivitas metabolisme yang tinggi (Suciari dkk., 2017). Diameter sel bakteri berkisar antara 0,8–1,0 μm , bersifat nonmotil, tidak membentuk spora, dan tampak berkelompok saat diamati menggunakan mikroskop. *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri anaerob fakultatif yang mampu tumbuh pada lingkungan dengan maupun tanpa oksigen. Pada media agar, koloni bakteri ini umumnya berbentuk bulat, berdiameter sekitar 1–2 mm, tampak cembung, buram, mengilap, serta memiliki tekstur halus. Warna koloninya bervariasi dari keabu-abuan hingga kuning kecokelatan, sedangkan koloni muda biasanya tampak tidak berpigmen. Bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15–40°C, dengan suhu optimum pertumbuhan sekitar 37°C.

Staphylococcus aureus memiliki karakteristik khas berupa kemampuan menghasilkan pigmen berwarna kuning keemasan. Bakteri ini tumbuh membentuk koloni berbentuk bulat dengan diameter sekitar 2–4 mm serta memiliki permukaan yang halus dan mengilap. Selain itu, *Staphylococcus aureus* mampu membentuk zona berwarna kuning di sekitar media pertumbuhannya yang menunjukkan aktivitas pertumbuhan koloni yang berlangsung secara optimal.

3. Patogenesis Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen penting yang berhubungan dengan faktor virulensi, produksi toksin, kemampuan invasi, serta resistensi terhadap antibiotik (Sihombing & Mantiri, 2022). Struktur bakteri ini memiliki berbagai protein permukaan, seperti protein pengikat laminin dan fibronektin, yang berperan dalam proses adhesi pada sel inang. Protein-protein tersebut berinteraksi dengan matriks ekstraseluler yang terdapat pada permukaan endotel dan epitel. Beberapa strain *Staphylococcus aureus* juga memiliki protein yang mampu berikatan dengan fibrin dan fibrinogen sehingga meningkatkan kemampuan bakteri untuk melekat pada darah maupun jaringan. Di antara berbagai protein adhesin, protein pengikat fibronektin dan fibrinogen merupakan jenis yang paling sering ditemukan. (Husna, 2018).

Faktor virulensi *Staphylococcus aureus*, baik yang berupa struktur sel maupun produk hasil sekresi, saling berinteraksi dalam proses terjadinya infeksi. Bakteri ini memiliki berbagai protein permukaan yang berperan sebagai faktor adhesi, yang dikenal sebagai *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Komponen MSCRAMMs mampu berikatan dengan molekul kolagen, fibronektin, dan fibrinogen sehingga memfasilitasi proses perlekatan bakteri pada jaringan inang. Adhesi terhadap matriks ekstraseluler memiliki peranan penting dalam mempertahankan fungsi normal sel dan jaringan tubuh. Namun, hasil penelitian mikrobiologi modern menunjukkan bahwa mekanisme adhesi matriks juga berkontribusi terhadap proses patogenesis dan perkembangan infeksi. (Husna, 2018).

D. Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang berfungsi menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri melalui gangguan terhadap proses metabolisme sel mikroorganisme yang bersifat merugikan. Senyawa ini dimanfaatkan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri penyebab berbagai penyakit atau kerusakan. Antibakteri dapat diperoleh melalui proses sintesis kimia maupun berasal dari senyawa alami dan anorganik. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu bakteristatik yang menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisidal yang menyebabkan kematian bakteri.

Antibakteri yang bersifat bakteristatik hanya bekerja menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan antibakteri yang bersifat bakterisidal mampu membunuh bakteri secara langsung (Ramadhina dkk., 2019). Selain itu, suatu antibakteri harus memiliki toksisitas selektif, yaitu mampu menghambat atau membunuh mikroorganisme patogen tanpa memberikan efek yang merugikan terhadap sel inang (Purwati dkk., 2020). Beberapa metode yang umum digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri meliputi:

1. Metode difusi

Metode difusi merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri (Nurhayati, Yahdiyani, dan Hidayatulloh, 2020). Secara umum, metode ini bertujuan untuk menentukan tingkat sensitivitas bakteri terhadap suatu antibiotik atau senyawa antibakteri. Prinsip metode difusi didasarkan pada kemampuan senyawa antibakteri berdifusi ke dalam media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Hasil pengujian ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar daerah

aplikasi, yang menandakan adanya zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri (Nurul dkk., 2023).

a. Difusi cakram

Metode difusi cakram dilakukan menggunakan kertas cakram yang telah diimpregnasi atau dijenuhkan dengan senyawa antimikroba. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan kultur mikroba uji, selanjutnya diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 35°C. Setelah masa inkubasi selesai, zona bening yang terbentuk di sekitar cakram diamati untuk mengetahui adanya penghambatan terhadap pertumbuhan mikroba. Besarnya diameter zona hambat yang terbentuk mencerminkan tingkat aktivitas antimikroba terhadap mikroba uji yang digunakan. (Nurhayati, Yahdiyani and Hidayatulloh, 2020).

Tabel 1
Kategori Diameter zona hambat

Diameter zona hambat	Kategori
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat Kuat

Sumber : (Ifora., 2022)

Metode ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain biaya pelaksanaan yang relatif rendah, tingkat fleksibilitas yang tinggi, serta mampu memperlihatkan pertumbuhan bakteri secara jelas. Meskipun demikian, metode ini juga mempunyai beberapa keterbatasan, seperti membutuhkan tenaga tambahan untuk melakukan pengukuran dan pencatatan hasil secara manual. Selain itu, variasi hasil pengujian yang dapat terjadi mengharuskan dilakukannya analisis secara lebih cermat agar diperoleh hasil yang akurat. (Nurul dkk., 2023).

b. Difusi sumuran

Pada metode ini, sumuran dibuat secara tegak lurus pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah serta letak sumuran disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian setiap sumuran diisi dengan sampel yang mengandung senyawa antibakteri untuk diuji. Setelah proses inkubasi selesai, zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran diamati sebagai indikator efektivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. (Nurhayati, Yahdiyani and Hidayatulloh, 2020).

Metode difusi sumuran memiliki beberapa keunggulan, antara lain prosedurnya relatif sederhana, biaya pelaksanaannya ekonomis, tingkat sensitivitasnya tinggi, serta lebih sesuai untuk menguji senyawa yang bersifat kationik. Meskipun demikian, metode ini juga memiliki beberapa keterbatasan, seperti memerlukan pengujian kualitatif tambahan, tingkat reproduktifitas yang relatif rendah, serta adanya sisa media agar yang dapat memengaruhi proses analisis hasil. (Nurul *et al.*, 2023).

2. Metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media cair yang telah ditambahkan senyawa antimikroba. Prinsip metode ini didasarkan pada pengamatan tingkat kekeruhan pada dilusi cair serta penghambatan pertumbuhan mikroorganisme pada dilusi padat. Konsentrasi terendah yang masih mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme ditetapkan sebagai parameter daya hambat atau konsentrasi hambat minimum antibakteri. Metode ini umumnya diterapkan untuk menguji senyawa antibakteri yang mudah larut dalam media atau larutan. (Ronaldo, 2019).

a. Metode dilusi agar cair (broth dilution tes)

Metode ini bertujuan untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) suatu agen antibakteri. Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan kultur bakteri murni pada media cair yang mengandung pengenceran bertingkat dari senyawa antibakteri. Konsentrasi terendah yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai nilai KHM, sedangkan konsentrasi yang mampu membunuh bakteri ditentukan sebagai nilai KBM..

b. Metode dilusi agar padat

Metode ini memiliki prinsip kerja yang hampir sama dengan metode dilusi cair, namun menggunakan media padat sebagai media pertumbuhan. Salah satu keunggulan metode ini adalah kemampuannya untuk menguji beberapa mikroorganisme pada satu konsentrasi antibakteri tertentu. Selain itu, metode ini digunakan untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau kadar bakterisidal minimum. Pengujiannya dilakukan dengan menginokulasikan mikroorganisme uji pada media. (Fitriani dkk., 2019)

3. Metode bioautografi

Metode ini merupakan salah satu teknik yang paling efektif untuk mengidentifikasi senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba, karena posisi bercak senyawa aktif masih dapat dikenali meskipun berada dalam campuran yang kompleks. Teknik ini memungkinkan isolasi senyawa aktif melalui bioautografi lapis tipis dari ekstrak yang diuji, dengan menempatkan senyawa pada permukaan media yang telah diinokulasi menggunakan mikroba target. Dalam prosedurnya, sampel terlebih dahulu dipisahkan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kemudian lempeng KLT dikeringkan untuk

menghilangkan sisa pelarut pengembang, selanjutnya dilakukan uji biologis pada lempeng tersebut. Setelah proses inkubasi selama waktu tertentu, zona hambat akan terbentuk pada nilai R_f tertentu (Mustapa., 2019).