

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Minyak Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.)

1. Definisi

Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) merupakan tanaman potensial penghasil minyak nabati untuk biofuel. Minyak nyamplung merupakan minyak yang berasal dari biji tanaman nyamplung. Kandungan minyak biji nyamplung sangat tinggi, antara 50 – 73%. Mengingat kandungan asam lemak bebas (ALB) minyak nyamplung seringkali lebih tinggi dibandingkan minyak sawit dan minyak nabati bekas, maka minyak nyamplung memiliki kandungan padatan yang lebih tinggi. (Hasibuan, Sahirman and Yudawati, 2013)

2. Kandungan Minyak Nyamplung

Kandungan asam oleat dan asam linoleat utama dalam minyak nyamplung menyumbang 65% dari total asam lemak. Total kandungan asam lemak minyak nyamplung asal NTB adalah 98,70%. Komposisi asam lemak ini sesuai (hampir sama) dengan yang dihasilkan oleh Hasibuan, Sahirman dan Yudawati, (2013) yaitu didominasi oleh asam oleat 35,75 % dan linoleat 29,05 %.

Tabel 1
Komposisi Asam Lemak Minyak Nyamplung

NO	Jenis Asam Lemak	Nilai (%)	
		(a)	(b)
1	Laurat	0,178	-
2	Mirisrat	2,450	0,09
3	Palmitat	15,977	14,60
4	Stearat	12,363	19,96
5	Oleat	46,671	37,57
6	Linoleat	23,667	26,33
7	Linolenat	1,399	0,27

(Sumber : Susila, 2018)

3. Manfaat Minyak Nyamplung

Hampir seluruh bagian atau produk nyamplung dapat dimanfaatkan dalam kehidupan manusia. Bagian dan hasil tanaman berasal dari buah, daun, kayu, bunga dan sari buah nyamplung. Sebagian besar bagian pada pohon nyamplung dapat menghasilkan minyak, tetapi sebagian besar ramuannya ada pada buah dan getahnya. Buah nyamplung yang menghasilkan biji nyamplung merupakan salah satu bahan baku energi terbarukan yang dapat menghasilkan biofuel. Biji nyamplung dapat diolah menjadi produk minyak dan berbagai macam produk turunannya, dengan prospek pemasaran yang menjanjikan. (Susila, 2018)

Minyak nyamplung kasar teridentifikasi komponen steroid, flavonoid, saponin, dan triterpenoid. Pada fraksi cair nyamplung steroid, flavonoid, dan saponin, sementara fraksi padat minyak nyamplung hanya mengandung flavonoid. Minyak nyamplung memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Hasibuan, Sahirman and Yudawati, 2013). Senyawa kumarin dan derivatnya seperti *calophyllolid* dan *inophyllolid* yang terdapat dalam minyak Nyamplung juga berpotensi untuk menghambat pertumbuhan fungi mikroskopis. Minyak dalam bijinya dapat digunakan untuk mengatasi sakit kulit, menumbuhkan rambut dan beberapa penyakit lainnya. (Emilda, 2019)

Penelitian Adewuyi, Fasusi and Oderinde, (2014) juga menunjukkan aktifitas antibakteri dari ekstrak asetonid biji *Calophyllum inophyllum* L.. Minyak biji mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Pseudomonas aeruginosa* serta mampu mematikan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.

4. Pembuatan Minyak Nyamplung

Biji nyamplung yang sudah dipanen, dikeringkan terlebih dahulu di bawah sinar matahari (cukup terik) selama kurang lebih 2 – 3 hari. Setelah itu, proses produksi untuk bahan baku minyak nyamplung diawali dengan pengupasan kulit dan cangkang buah. Daging biji (kernel) yang telah diperoleh dikukus selama 1 – 2 jam, kemudian dijemur hingga kering. Pengeringan dilakukan sampai biji nyamplung berwarna coklat kemerahan. Kegiatan pengeringan ini. Untuk mendapatkan minyak dari biji nyamplung maka dilakukan proses pengepresan. (Susila, 2018)

Masukkan biji buah nyamplung ke dalam oven bersuhu 70°C sampai beratnya konstan dan permukaannya berminyak, lalu dihaluskan menggunakan blender. Biji hasil olahan dilapisi dengan kain saring kemudian dilakukan proses pengepresan hingga keluar minyaknya. Pengepresan mekanik adalah metode ekstraksi minyak atau lemak, terutama untuk bahan bahan yang berasal dari biji – bijian. Pengepresan juga bertujuan untuk mengetahui banyaknya rendemen minyak yang terkandung pada biji buah nyamplung (Sarwono, Erzha and Widarti, 2017)

Proses tahapan pembuatan biokerosin, yaitu memurnikan minyak dengan proses filtrasi, pemisahan getah (*degumming*) dengan asam fosfat 20%, penetralan dengan NaOH 10%, serta proses pencucian dan pengeringan. Berikut beberapa uraian masing-masing tahapan proses tersebut (Susila, 2018) :

- a. *Degumming*, merupakan pemanasan hingga 80°C sambil terus diaduk untuk mendapatkan warna minyak yang cerah dan jernih.

- b. Netralisasi, merupakan pemisahan asam lemak bebas dari minyak hasil degumming dengan cara memanaskan minyak hingga 60°C lalu tambahkan NaOH, dan pisahkan minyak dari sabun dengan memasukkan ke dalam corong.
- c. Pencucian dan pengeringan, bertujuan untuk menghasilkan minyak yang bersih. Tambahkan air hangat pada suhu 40 – 50°C sebanyak 30% lalu dikeringkan dengan memanaskan minyak pada 110 – 120°C sehingga semua air yang ada didalam minyak dapat menguap. Minyak hasil pengeringan disimpan dalam keadaan tertutup untuk mencegah oksidasi oleh udara bebas.

B. Senyawa Metabolit Sekunder

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan dan dapat ditemukan pada daun, ranting, biji dan kulit kayu. Alkaloid berdampak pada bidang kesehatan berupa memicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi nyeri, zat antibakteri, penenang, obat penyakit jantung dan bentuk lainnya. (Aksara, Musa and Alio, 2013)

2. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenolik terbesar di alam. Senyawa tersebut adalah pewarna merah, ungu dan biru, serta pewarna kuning yang terdapat pada tumbuhan (Wahyulianingsih, Handayani and Malik, 2016). Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan. Flavonoid biasanya ditemukan di daun, akar, buah, bunga, batang dan kulit tanaman. Flavonoid dapat sebagai perlindungan diri tumbuhan dari penyakit dan lingkungan sekitarnya, sedangkan fungsi flavonoid pada tubuh manusia adalah mencegah penyakit

kardiovaskuler, karena flavonoid merupakan senyawa fenolik dengan sifat antioksidan yang dapat mencegah radikal bebas reaktif yang menyebabkan kerusakan sel (Ekawati, Suirta and Santi, 2017)

3. Saponin

Sejak lama, saponin banyak terkandung dalam tumbuhan telah digunakan sebagai obat tradisional. (Wink, 2015). Terbentuknya busa yang stabil saat mengekstraksi tanaman atau ekstrak pekat dapat menunjukkan adanya saponin pada tanaman. (Putranti, 2013). Saponin adalah glikosida triterpen, senyawa aktif permukaan yang jika kena air akan menimbulkan busa. Konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah tikus. (Novianti, 2012). Kandungan senyawa saponin pada lulur tradisional dapat digunakan untuk mencegah kulit kering, sengatan matahari, mengurangi bekas jerawat pada kulit, mencegah pertumbuhan rambut pada kulit wajah, mengencangkan kulit bahkan meratakan warna kulit. (Andar Subakti, 2013)

4. Tanin

Tanin adalah metabolit sekunder yang ditemukan dan disintesis oleh tumbuhan. (Hidayah, 2016). Tanin merupakan metabolit sekunder aktif dan diketahui memiliki berbagai khasiat yaitu astringent, anti diare, antibakteri dan antioksidan. (Malangngi, Sangi and Paendong, 2012) Pada produk kosmetika, tanin dapat memiliki antibakteri yang berfungsi sebagai pencegah pertumbuhan bakteri baik untuk sediaan kosmetik maupun untuk pencegahan timbulnya jerawat pada kulit yang disebabkan oleh bakteri. Senyawa tannin dalam lulur dapat mendinginkan, membersihkan, menghilangkan bau yang tidak sedap, dan bersifat sebagai antibakteri (Andar Subakti, 2013)

5. Steroid dan terpenoid

Umumnya, senyawa terpenoid larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya, senyawa ini diekstraksi dengan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan triterpenoid atau steroid yang berbentuk glikosida. (Novianti, 2012) Senyawa ini dapat digunakan sebagai zat pengatur pertumbuhan (seperti seskuiterpen, abisin dan giberelin), karotenoid dapat digunakan sebagai pewarna dan berperan dalam mendorong fotosintesis. Penggunaannya di bidang farmasi biasanya digunakan untuk pembuatan bahan baku atau versi sederhana dari obat-obatan (Tukiran, Suyatno and Hidayati, 2014)

Steroid larut dalam lemak, dengan cincin yang menyatu. Kebanyakan steroid adalah sterol, yang merupakan steroid alkohol. Kolesterol adalah sterol utama dalam jaringan hewan. Kolesterol dan turunan esternya serta lemak rantai panjang merupakan komponen penting dari lipoprotein plasma dan membran luar sel. Membran sel tumbuhan mengandung jenis sterol lainnya terutama stigmasterol yang berbeda dengan kolesterol hanya pada ikatan rangkap antara karbon 22 dan karbon 23. (Putranti, 2013)

6. Kuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dengan kromofor dasar seperti kromofor dasar pada benzokuinon, yang tersusun dari dua gugus karbonil dan dua ikatan rangkap terkonjugas. (Putranti, 2013). Kuinon adalah metabolit sekunder yang dapat mengais radikal bebas yang dapat membahayakan tubuh manusia, dan digunakan dalam sediaan kosmetik seperti *scrub* untuk membersihkan kulit dari radiasi ultraviolet (UV). Paparan sinar ultraviolet dapat menyebabkan edema,

eritema, pembentukan sel luka bakar, proliferasi, immunosupresi, kerusakan DNA, penuaan dini dan produksi melanin. (Wardhani, 2015)

C. Jerawat

1. Definisi

Jerawat adalah salah satu masalah kulit yang paling umum dan dapat mengganggu penampilan seseorang. Jerawat adalah penyakit peradangan kronis yang terjadi di unit kelenjar sebacea. (Madelina and Sulistiyaningsih, 2018). Jerawat (*acne vulgaris*) adalah penyakit inflamasi kulit folikel sebacea kronis yang biasanya terjadi pada masa remaja dan secara klinis bermanifestasi sebagai komedo, *papula* dan *nodule* pada wajah, bahu, leher, dada dan punggung atas. (Kabau, 2012).

2. Klasifikasi

Jerawat sangatlah umum dan dapat ditemui di semua demografi jenis kelamin dan umur. Klasifikasi dari jerawat yaitu (Gunawan, Adipranata and Budhi, 2017) :

- a. *Blackhead* dan *whitehead*, merupakan pori-pori yang tertutup oleh minyak, sel kulit mati, dan bakteri.
- b. *Papules* merupakan pori-pori yang mengalami iritasi cukup parah sehingga menyebabkan munculnya tonjolan kulit merah muda kemerahan. Biasanya jenis jerawat ini tidak terdapat cairan di dalamnya.
- c. *Pustules* menyerupai *Papules* namun dengan cairan nanah kekuningan di tengahnya.

- d. *Nodules* dan *Cysts* merupakan jerawat yang sudah meradang terlalu parah hingga menyebabkan munculnya tonjolan yang besar dan menyebabkan rasa sakit.

Berdasarkan tingkat keparahannya jerawat bisa diklasifikasikan menjadi (Gunawan, Adipranata and Budhi, 2017) :

- a. Jerawat tingkat pertama adalah komedo dan cukup umum ditemui pada remaja.
- b. Jerawat tingkat kedua dapat dilihat dari banyaknya jumlah komedo *whitehead* dengan sebagian *pustules* dan *papules* kecil.
- c. Jerawat tingkat ketiga adalah jenis jerawat yang paling umum ditemui. Jerawat pada kategori ini berupa *papules* dan *pustules* yang mengalami iritasi.
- d. Jerawat tingkat keempat adalah jerawat dengan tingkat keparahan tertinggi, yang dapat dilihat dari adanya *Nodules* dan *Cysts* yang berwarna keunguan hingga kehitaman

3. Etiologi

Penyebab pasti terjadinya Akne Vulgaris dewasa belum dapat dipastikan. Namun beberapa faktor yang berperan dalam munculnya Akne Vulgaris antara lain akibat hipersekresi hormon androgen, meningkatnya sekresi sebum, bertambahnya jumlah *Propionibacterium acnes*, hiperkeratosis yang membentuk mikrokomedo, dan meningkatnya respon inflamasi. (Teresa, 2020)

Menurut Miratunnisa, Mulqie and Hajar (2015), beberapa penjelasan tentang penyebab jerawat antara lain :

- a. Sekresi kelenjar sebaceous yang hiperaktif

Kelenjar sebaceous yang terlalu aktif dapat menyebabkan produksi *lipid* yang berlebihan, yang menyebabkan tingkat *lipid* yang tinggi pada kulit, yang

menyebabkan kulit menjadi berminyak. Jika produksi *lipid* tidak dapat diimbangi dengan pengeluaran yang setara, penumpukan akan terjadi dan menyebabkan penyumbatan pori-pori. Kompresi sebum dapat menyebabkan peradangan dan pembentukan jerawat. Aktivitas kelenjar sebacea dipicu oleh hormon testosteron, Kelenjar sebacea dipicu oleh hormon luteinizing yang meningkat selama menstruasi.

b. Hiperkeratosis pada infundibulum rambut

Hiperkeratosis mudah terjadi pada infundibulum folikel rambut yang menyebabkan sel tanduk menjadi tebal dan menyumbat folikel rambut, serta membentuk komedo. Jika folikel rambut pori tersumbat atau menyempit maka sebum tidak bisa keluar secara normal, akibatnya akan merangsang pertumbuhan bakteri jerawat yang menyebabkan peradangan. Selain itu adanya pengaruh sinar UV dapat menyebabkan jerawat bertambah parah, karena adanya sinar matahari merangsang terjadinya keratinisasi. Jerawat juga bias disebabkan oleh muka yang kotor yang mengakibatkan pori-pori tersumbat.

c. Efek dari bakteri

Kelebihan sekresi dan hiperkeratosis pada infundibulum rambut yang menyebabkan terakumulasinya sebum. Sebum ini yang mengandung banyak timbulnya bakteri jerawat *Propionibacterium acnes*. Enzim lipase yang dihasilkan bakteri menguraikan trigliserida pada sebum menjadi asam lemak bebas, yang menyebabkan inflamasi dan akhirnya terbentuk jerawat.

4. Patofisiologi

Patofisiologi akne dikarenakan oleh empat faktor yang saling berinteraksi yaitu hiperkeratosis folikuler, kolonisasi bakteri, peningkatan sekresi sebum dan inflamasi. Minyak dari kelenjar sebaceous (kelenjar minyak) terlalu aktif, sehingga akan diproduksi minyak yang berlebihan dan mengalir ke pori-pori melalui saluran sebaceous. Kelenjar sebacea terdiri dari sel-sel sebacea yang mensintesis minyak dan menyimpan partikel minyak (Madelina and Sulistiyarningsih, 2018)

Propionibacterium acnes adalah flora normal kulit yang ikut berperan dalam pembentukan jerawat. *Propionibacterium acnes* menghasilkan enzim hidrolitik yang menyebabkan kerusakan folikel polisebasea dan menghasilkan lipase, hialuronidase, protease, lesitinase, dan neurimidase yang mempunyai peranan penting pada proses peradangan. *Propionibacterium acnes* mengubah asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh yang menyebabkan sebum menjadi padat. Apabila produksi sebum bertambah, *Propionibacterium acnes* juga akan bertambah banyak yang keluar dari kelenjar sebacea, karena *Propionibacterium acnes* merupakan pemakan lemak (Hafsari *et al.*, 2015)

D. Propionibacterium acnes

1. Klasifikasi

Propionibacterium acnes merupakan flora normal kulit yang memiliki peranan terbentuknya jerawat. Berikut klasifikasi bakteri *Propionibacterium acnes* (Miratunnisa, Mulqie and Hajar, 2015) :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Actinobacteria</i>
Class	: <i>Actinobacteria</i>
Order	: <i>Actinomycetales</i>
Family	: <i>Propionibacteriaceae</i>
Genus	: <i>Propionibacterium</i>
Spesies	: <i>Propionibacterium acnes</i>

2. Morfologi

Genus *Propionibacterium* ini merupakan bakteri gram positif dengan bentuk basil yang panjangnya bervariasi antara 1 – 1,5µm, bersel tunggal, tidak bergerak, tidak membentuk spora, bersifat anaerobik tetapi tahan terhadap O², katalase positif, dan dapat menfermentasi glukosa, menghasilkan asam propionate dan asetat dalam jumlah yang banyak (Narulita, 2017)

Propionibacterium juga dapat memfermentasikan laktosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, dan beberapa pentose, tetapi kemampuan tersebut bergantung dari spesies. Suhu pertumbuhan bakteri ini pada 30 – 37°C dan beberapa spesies membentuk pigmen. Salah satu spesies dari *Propionibacterium* ini adalah *Propionibacterim acnes*. (Narulita, 2017)

3. Patogenitas

Patogenesis *Propionibacterium acnes* yang utama terfokus pada kemampuan organisme ini untuk memproduksi produk eksoseluler bioaktif dan interaksinya dengan sistem imun. *Propionibacterium acnes* memiliki komponen yang bersifat kemoatraktan (penarikan leukosit oleh suatu kemotaktik faktor) (Beylot *et al.*, 2014)

Unit pilosebacea yang terinfeksi oleh *Propionibacterium acnes* akan menyebabkan timbulnya respon inflamasi, sehingga gambaran klinis yang timbul berupa *papula, pustula, nodul, dan kista*. Selain *acne vulgaris*, *Propionibacterium acnes* juga dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti osteomielitis, peritonitis, infeksi gigi, reumatoid arthritis, abses otak, empiema subdural, keratitis, ulkus kornea, endoftalmitis, sarkoidosis, dan radang prostat. Sedangkan penyakit yang melibatkan infeksi *Propionibacterium acnes* dan terkait alat – alat medis (kateter, *prosthetic joints*, implants, dan lain-lain) yaitu konjungtivitis akibat lensa kontak, *shunt nephritis, shunt-associated central nervous system infections*, dan anaerobic arthritis (Damayanti, 2014)

4. Pengobatan

Dalam tiga puluh tahun terakhir, antibiotik telah banyak digunakan sebagai salah satu metode efektif untuk mengobati akne vulgaris. Terapi antibiotik tidak hanya dapat mengurangi jumlah *Propionibacterium acnes* di kulit, tetapi juga dapat bekerja dengan mengurangi jumlah mediator inflamasi. Saat ini, klindamisin adalah salah satu antibiotik yang paling umum digunakan untuk pengobatan akne vulgaris. Selain itu, tetrasiklin dan eritromisin juga banyak digunakan pada peradangan jerawat. Walaupun tidak menurunkan produksi sebum, namun dapat menurunkan konsentrasi asam lemak bebas dan menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Namun, karena tingginya tingkat resistensi *Propionibacterium acnes*, tetrasiklin dan eritromisin tidak lagi digunakan secara luas. (Nugroho and Widayati, 2013)

E. Pengukuran Aktivitas Antimikroba

1. Metode Dilusi

Uji sensitivitas dilusi memakan banyak waktu, dan penggunaan mereka dibatasi hanya pada kondisi khusus. Uji dilusi kaldu tidak praktis dan hanya digunakan jika dilusi dilakukan dalam tabung uji, tetapi tersedianya rangkaian dilusi kaldu yang sudah jadi untuk berbagai macam obat dalam lempeng mikrodilusi telah sangat memperbaiki sekaligus menyederhanakan metode tersebut. Keuntungan uji dilusi *microboth* adalah memungkinkan dilaporkannya hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat mikroorganisme yang diuji (Brooks, 2013)

Pada metode ini dibagi menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, *minimum inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) dan *minimum bacterial concentration* (MBC) atau kadar bunuh minimum (KBM) dapat ditentukan. Cara yang dilakukan adalah dengan membuat serangkaian pengenceran agen antimikroba pada agen medium cair yang ditambahkan dengan agen mikroba uji. Metode Dilusi Padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keunggulan metode ini ialah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji. (Yusmaniar, Wardiyah and Nida, 2017)

2. Metode Difusi

Metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer) menggunakan piringan yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan

mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. (Saraswati, 2015)

Hasil dari tes kepekaan, mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam dua atau lebih kategori. Hasil dengan tiga klasifikasi yang biasa digunakan, (sensitif, intermediet, dan resisten) seperti pada metode Kirby & Bauer. Ukuran zona jernih tergantung kepada kecepatan difusi antimikroba, derajat sensitifitas mikroorganisme, dan kecepatan pertumbuhan bakteri. Zona hambat cakram antimikroba pada metode difusi berbanding terbalik dengan MIC. Semakin luas zona hambat, maka semakin kecil konsentrasi daya hambat minimum MIC. (Soleha, 2015)

3. Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Antimikroba

Diantara banyak faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba, hal-hal berikut harus dipertimbangkan karena mempengaruhi hasil pemeriksaan secara bermakna (Brooks, 2013) :

a. pH lingkungan

Beberapa obat lebih aktif pada pH asam (misalnya nitrofurantoin), sementara yang lain lebih aktif pada pH basa (misalnya, aminoglikosida, sulfonamida).

b. Komponen medium

Sodium *polyanetholsulfonate* (dalam medium kultur darah) dan detergen anionik lainnya dapat menghambat aminoglikosida. PABA dalam ekstrak jaringan mengantagonis sulfonamida.

c. Kestabilan obat

Pada suhu inkubator, agen antimikroba tertentu kehilangan aktivitasnya. Penisilin mengalami inaktivasi secara lambat, sedangkan aminoglikosida dan siprofloksasin cukup stabil untuk periode yang lama.

d. Besar inokulum

Umumnya, semakin besar jumlah bakteri yang diinokulasi, semakin rendah sensitivitasnya terhadap organisme tersebut.

e. Lama inkubasi

Semakin lama masa inkubasi, semakin besar kemungkinan munculnya mutan yang resisten, atau semakin besar kemungkinan anggota yang paling tidak sensitif terhadap resistansi akan mulai bereproduksi saat obat habis.

f. Sterilisasi alat, media, dan ruangan

Sebelum digunakan, alat wajib disterilkan dalam oven. Gunakan *autoclave* untuk mensterilkan media dan ruangan dapat disterilkan menggunakan sinar UV dan blower yang ada di dalam *biosafety cabinet*.

g. Kepekatan inokulum

Jika inokulum terlalu tipis, bahkan jika sensitivitas organisme tidak berubah, area penghambatan akan melebar. Sebaliknya jika inokulum terlalu pekat maka ukuran zona hambat akan menyempit.

h. Waktu pemasangan cakram

Jika sudah ditanami dengan galur uji lempeng agar, dibiarkan pada suhu ruang lebih lama dari waktu baku, perkembangan inokulum dapat terjadi dapat terjadi sebelum cakram dipasang.

i. Suhu inkubasi

Uji kepekaan biasanya diinkubasi pada suhu 35°C untuk pertumbuhan yang optimal. Jika suhu diturunkan, waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan efektif akan memanjang dan menyebabkan zona terbentuk lebih lebar.

j. Ukuran lempeng, ketebalan media agar, dan pengaturan jarak cakram antimikroba

Uji sensitivitas biasanya dilakukan dengan menggunakan cawan petri berukuran 9-10 cm dan cakram dengan tidak lebih dari 6-7 cakram antibakteri per cawan agar. Zona resistansi yang sangat besar dapat terbentuk pada media yang sangat tipis, dan sebaliknya

4. Pengukuran aktivitas antibakteri

Jika terbentuk zona hambat berupa zona transparan di sekitar kertas cakram maka aktivitas antibakterinya bertanda positif. Bagian yang dihitung dengan kaliper adalah diameter zona hambat yang terbentuk. (Saraswati, 2015) Pengukuran zona hambat ini dilakukan dengan cara mengambil garis horizontal pada zona bening di sekitar disk menggunakan jangka sorong (Novaryatiin, Handayani and Chairunnisa, 2018).

Tabel 2
Klasifikasi Hambatan Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
>20 mm	Sangat Kuat
11-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

(Sumber : Greenwood et al., 1995)