

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Bunga Gemitir (*Tagetes erecta* L.)

1. Klasifikasi dan morfologi bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.)

Bunga gemitir atau marigold (*Tagetes erecta* L.) termasuk ke dalam famili *Asteraceae* dan tersebar luas di berbagai wilayah dunia dengan beragam varietas, serta banyak dimanfaatkan sebagai tanaman hias (Singh *et al.*, 2020).

Menurut Plants of the World Online (POWO, 2024) klasifikasi marigold atau gemitir dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Filum : *Streptophyta*
Kelas : *Equisetopsida*
Subkelas : *Magnoliidae*
Ordo : *Asterales*
Famili : *Asteraceae*
Genus : *Tagetes*
Spesies : *Tagetes erecta*



Gambar 1 Bunga Gemitir (*Tagetes erecta* L.)
(Sumber: POWO, 2024)

Bunga gemitir atau marigold (*Tagetes erecta* L.) merupakan tanaman berbunga semusim (*annual herb*) yang banyak dibudidayakan di daerah beriklim tropis dan subtropis. Tanaman ini dapat berkembang biak di tanah yang memiliki pH netral, memiliki drainase yang baik, serta membutuhkan intensitas sinar matahari yang cukup dan kondisi lingkungan yang relatif hangat. Marigold umumnya tumbuh optimal pada suhu berkisar antara 20°C hingga 30°C, dengan curah hujan tahunan yang cukup untuk mendukung pertumbuhan vegetatif dan generatifnya (Singh *et al.*, 2020).

Secara morfologi, tanaman marigold dapat mencapai tinggi sekitar 50–80 cm atau setara dengan satu hingga lima kaki. Daunnya berwarna hijau tua dengan panjang berkisar antara 5–17 cm, berbentuk menyirip dan memiliki tepi daun yang bergigi jarang atau bergelombang. Permukaan daun dan batang ditutupi oleh bulu-bulu halus yang menjadi salah satu ciri khas tanaman ini. Marigold dibudidayakan secara luas di berbagai negara seperti Asia, India, Cina, serta wilayah lain yang memiliki iklim tropis hingga subtropis karena kemudahan adaptasi dan nilai ekonominya yang cukup tinggi (Singh *et al.*, 2020).

Bunga marigold memiliki tampilan yang mencolok dengan warna yang cerah, antara lain putih, kuning, jingga (orange), kuning keemasan, atau kombinasi warna ganda. Warna-warna tersebut dipengaruhi oleh kandungan pigmen karotenoid yang cukup tinggi pada mahkota bunga. Bentuk bunga marigold umumnya menyerupai pompon atau bulat dengan susunan mahkota bunga rangkap, sehingga memberikan kesan bunga yang penuh dan padat. Diameter bunga berkisar antara 7–10 cm dan dapat muncul secara tunggal maupun tersusun dalam malai (Kurniati, 2021).

2. Kandungan metabolit sekunder bunga gemitir

Senyawa fitokimia merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan dan berperan dalam perlindungan terhadap patogen serta memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sebagai antimikroba (Luciana dkk., 2025). Marigold yang dikenal secara lokal sebagai bunga gemitir merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan karena memiliki beragam guna. Selain sebagai tanaman hias, bunga ini dilaporkan memiliki aktivitas biologis, antara lain sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan antikarsinogen (Kurniati, 2021).

Tanaman bunga gemitir memiliki berbagai kandungan senyawa metabolit sekunder, terutama terkonsentrasi di bagian bunganya. Bunga *Tagetes erecta* L. mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, senyawa fenolik dan alkaloid, yang memiliki potensi sebagai agen antibakteri untuk menangani infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen (Rahmani dkk., 2023).

a. Flavonoid

Flavonoid menunjukkan aktivitas antibakteri melalui efek bakteriolitik, penghambatan sintesis protein, DNA dan RNA, serta pembentukan kompleks dengan protein ekstraseluler maupun protein terlarut. Mekanisme tersebut mengakibatkan kerusakan membran sel bakteri yang berujung pada keluarnya komponen intraseluler (Nababan *et al.*, 2020). Kerusakan membran ini dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menonaktifkan sistem enzim bakteri. Akibatnya, nukleotida dan asam amino keluar dari sel, sementara masuknya molekul aktif ke dalam sel terhambat, yang pada akhirnya dapat menimbulkan kematian bakteri.

Flavonoid dapat ditemukan di berbagai sumber alami, termasuk buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, teh, kakao dan anggur (Khan *et al.*, 2021). Senyawa ini juga memiliki potensi antibakteri terhadap berbagai patogen, termasuk bakteri resisten seperti *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Vancomycin-resistant Enterococci* (VRE), bahkan mampu meningkatkan kembali sensitivitas bakteri terhadap antibiotik tertentu seperti colistin (Song *et al.*, 2021).

b. Fenolik

Senyawa fenolik adalah metabolit sekunder yang secara luas terdapat pada tumbuhan dan mempunyai satu atau lebih gugus fenol dalam strukturnya. Senyawa ini dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme gangguan terhadap struktur dan fungsi sel bakteri (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

Mekanisme kerja senyawa fenolik sebagai antibakteri terutama terjadi melalui kerusakan membran sel bakteri. Senyawa fenolik dapat berinteraksi dengan membran sel meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga memicu kebocoran komponen intraseluler yang esensial bagi kelangsungan hidup bakteri. Kerusakan ini menyebabkan bakteri tidak mampu mempertahankan keseimbangan sel dan akhirnya mengalami kematian (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

c. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa basa yang ada tanaman dan memiliki sifat antibakteri. Mekanisme kerjanya meliputi perusakan struktur peptidoglikan di dinding sel bakteri, yang menyebabkan pembentukan dinding sel yang tidak sempurna dan hanya tersisa membran. Ketidake sempurnaan ini mengganggu pertumbuhan bakteri dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (Nor dkk., 2018).

3. Manfaat tanaman bunga gemitir

Bunga marigold atau gemitir (*Tagetes erecta* L.) memiliki berbagai manfaat biologis dan fungsional yang telah dibuktikan melalui penelitian ilmiah. Ekstrak bunga marigold menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan, misalnya dalam bentuk hidrogel ekstrak etanol daun yang efektif menghambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sehingga potensial sebagai bahan aktif dalam sediaan terapeutik (Edy dkk., 2019). Selain itu, bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) dikenal kaya akan senyawa antioksidan, termasuk flavonoid dan phenolic, yang menunjukkan aktivitas menangkap radikal bebas dalam uji DPPH dengan nilai IC50 yang kuat, sehingga menjadikan bunga ini sumber antioksidan potensial untuk aplikasi farmasi dan pangan (Merdana *et al.*, 2024).

Kandungan karotenoid dan nutrisi lainnya pada bunga *T. erecta* juga dapat dimanfaatkan sebagai komponen pakan ternak unggas untuk meningkatkan kandungan nutrisi, khususnya di dataran rendah (Irawan dkk., 2024). Lebih lanjut, bunga marigold juga dapat berperan sebagai mikrohabitat bagi musuh alami hama karena struktur bunganya yang menarik organisme penekan hama di lahan pertanian, sehingga mendukung strategi pengendalian hama terintegrasi (Susanti dkk., 2025).

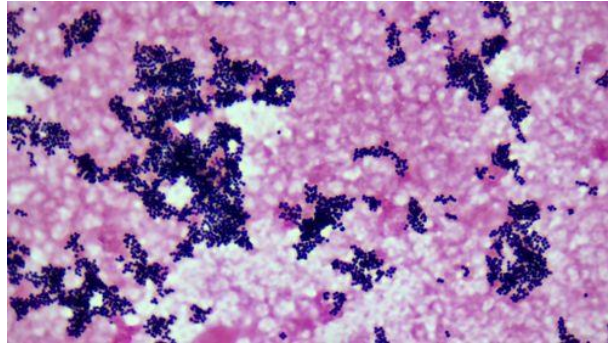
B. *Staphylococcus aureus*

1. Klasifikasi dan morfologi

Menurut Integrated Taxonomic Information System (2023), *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan secara taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Subkingdom	: <i>Posibacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>

Kelas : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*



Gambar 2 *Staphylococcus aureus*
(Sumber: Integrated Taxonomic Information System, 2023)

Secara morfologis, *Staphylococcus aureus* memiliki bentuk kokus dengan ukuran sekitar 0,5–1,0 μm dan bakteri ini berkumpul dalam kelompok yang tidak teratur menyerupai anggur karena proses pembelahan sel terjadi di berbagai arah. Dalam pewarnaan Gram, bakteri ini berwarna ungu, menunjukkan adanya dinding sel yang ketebalannya tinggi dan kaya akan peptidoglikan, ini merupakan ciri khas dari bakteri Gram-positif (Taylor *et al.*, 2025).

Selain dari karakter morfologinya, *Staphylococcus aureus* memiliki karakteristik biologis yang memperkuat kemampuannya untuk bertahan hidup dan virulensinya. Bakteri ini ditandai dengan aktivitas katalase positif, yang memfasilitasi pemecahan hidrogen peroksida sehingga dapat melindungi sel dari tekanan oksidatif yang ditimbulkan oleh sistem imun inang. *Staphylococcus aureus* juga menunjukkan koagulase positif, sebuah fitur penting yang berkontribusi pada

pembentukan lapisan fibrin di sekitar sel bakteri dan mendukung penghindaran proses fagositosis (Cheung *et al.*, 2021)

Kemampuan fakultatif anaerob memungkinkan *Staphylococcus aureus* untuk berkembang baik dalam lingkungan aerobik maupun anaerobik, memperlihatkan adaptasinya terhadap beragam situasi di dalam jaringan tubuh manusia. Selain itu, *Staphylococcus aureus* memiliki toleransi yang tinggi terhadap peningkatan kadar garam, sehingga mampu bertahan hidup dan membentuk koloni pada permukaan kulit (Taylor *et al.*, 2025). Koloni *Staphylococcus aureus* biasanya berwarna kuning keemasan karena produksi pigmen karotenoid, yang berfungsi sebagai ciri fenotipik serta sebagai mekanisme perlindungan dari radikal bebas dan respons imun inang (Cheung *et al.*, 2021).

2. Patogenisitas *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram-positif yang biasa dikenal sebagai bagian dari flora normal pada kulit, hidung dan saluran pernapasan manusia. Meskipun umumnya tidak berbahaya, bakteri ini dapat berubah menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai infeksi dari infeksi kulit sampai penyakit sistemik karena memiliki faktor virulensi yang kuat, termasuk protein permukaan yang memfasilitasi adhesi, toksin yang merusak sel dan kemampuan membentuk biofilm untuk melindungi diri dari pertahanan tubuh dan obat-obatan (Di Bella *et al.*, 2025).

Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai penyakit, antara lain bakteremia, endokarditis infektif, infeksi kulit dan jaringan lunak seperti impetigo, folikulitis, furunkel, karbunkel, selulitis, *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, osteomielitis, artritis septik, infeksi pada alat prostetik, infeksi saluran pernapasan bawah seperti

pneumonia dan empiema, gastroenteritis, meningitis, sindrom syok toksik, serta infeksi saluran kemih (Taylor *et al.*, 2022).

Staphylococcus aureus diketahui mampu menghasilkan toksin eksfoliatif, yaitu toksin yang menyerang lapisan kulit bagian luar. Toksin ini berperan penting dalam terjadinya *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSSS), suatu kondisi yang diindikasikan dengan pengelupasan kulit secara luas menyerupai kulit tersiram air panas. Secara mekanisme, toksin eksfoliatif bekerja dengan merusak protein perekat antar sel kulit, khususnya desmoglein-1, sehingga ikatan antar sel epidermis melemah dan menyebabkan kulit mudah terkelupas. Akibat kerusakan tersebut, lapisan kulit terluar terpisah dari jaringan di bawahnya dan menimbulkan lepuhan serta deskuamasi yang luas, terutama pada bayi dan anak-anak (Mishra *et al.*, 2016). Sejumlah penelitian terbaru menunjukkan bahwa toksin eksfoliatif seperti ETA (*Exfoliative Toxin A*) dan ETB (*Exfoliative Toxin B*) merupakan faktor utama yang berkontribusi terhadap manifestasi klinis SSSS pada pasien yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* (Kurnia Fitri & Subagio, 2025).

Salah satu toksin utama yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah enterotoksin, yang dapat menimbulkan gejala keracunan makanan berupa diare, mual, muntah dan kram perut. Keracunan makanan akibat *Staphylococcus aureus* umumnya terjadi setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi bakteri tersebut. Bakteri ini dapat berkembang dengan baik pada bahan pangan tinggi protein, seperti daging dan produk olahan susu, terutama apabila penyimpanan makanan tidak memenuhi standar higiene (Arisanti dkk., 2018). Selain itu, *Staphylococcus aureus* dikenal memiliki kemampuan untuk memproduksi enterotoksin yang tahan panas, sehingga toksin yang terbentuk dalam makanan

tidak sepenuhnya dinetralkan melalui proses memasak atau pemanasan kembali. Mengonsumsi makanan yang mengandung enterotoksin ini mengakibatkan keracunan makanan dengan gejala yang muncul dalam waktu relatif cepat setelah makanan tersebut dikonsumsi (Pexara *et al.*, 2018).

C. Simplisia

1. Definisi dan jenis-jenis simplisia

Simplisia adalah bahan alami kering yang digunakan untuk pengobatan tradisional tanpa pemrosesan lebih lanjut. Proses pengeringan bisa dilakukan dengan pengeringan di bawah cahaya matahari, pengeringan alami, atau pengeringan oven pada suhu maksimum 60°C, kecuali apabila ada ketentuan yang berbeda (Farmakope Herbal, 2022). Pengeringan herba di tempat teduh umumnya menghasilkan bahan yang lebih baik daripada pengeringan di bawah sinar matahari langsung. Namun, metode ini membutuhkan waktu pengeringan yang relatif lebih lama (Orphanides *et al.*, 2016). Kadar aktivitas antioksidan menurun seiring kenaikan suhu dan durasi pengeringan sinar matahari dibandingkan tempat teduh (Luliana dkk., 2016). Hal ini disebabkan karena flavanoid rentan terhadap pemanasan sehingga mudah rusak pada suhu yang tinggi (Widayanti dkk., 2023).

Ada tiga kategori simplisia, yaitu simplisia tumbuhan, simplisia hewan dan simplisia mineral (pelikan) (Endarini, 2016).

a. Simplisia nabati

Simplisia nabati merujuk pada jenis salah satu simplisia yang diambil dari tanaman, mencakup semua bagian dari tanaman, bagian tertentu, serta getah atau eksudatnya. Umumnya, simplisia nabati adalah hasil dari budidaya tanaman obat yang telah menjalani proses pascapanen serta persiapan dasar agar siap digunakan

sebagai bahan untuk obat herbal. Jenis simplisia ini bisa dikonsumsi dalam bentuk serbuk yang diseduh seperti jamu, dicacah atau direbus untuk diminum, atau diproses lebih lanjut menjadi obat farmasi seperti ekstrak, hasil separasi, atau produk yang sudah dimurnikan (Endarini, 2016).

b. Simplisia hewani

Simplisia hewani merupakan jenis simplisia yang berasal dari hewan, baik dalam bentuk hewan secara keseluruhan, bagian tertentu dari tubuhnya, maupun substansi yang dihasilkan oleh hewan, selagi masih dalam keadaan alami dan belum menjadi senyawa kimia murni.

c. Simplisia pelikan (mineral)

Simplisia pelikan (mineral) merupakan jenis simplisia yang datang dari sumber mineral yang belum mengalami proses pengolahan ataupun hanya melalui proses sederhana dan belum berubah menjadi bentuk zat kimia yang murni.

2. Aturan mutlak dan pedoman bahan baku obat tradisional

Ketentuan mengenai simplisia merupakan keharusan yang harus dipenuhi agar bisa dipakai sebagai bahan awal dalam obat tradisional. Berdasarkan BPOM RI tahun 2019, parameter baku simplisia meliputi:

- a. Kandungan air : kurang dari 10%
- b. Jumlah total kuman hidup : kurang dari 5×10^7 unit/gram
- c. Jumlah jamur dan ragi : di bawah 5×10^5 koloni/gram
- d. Kuman penyakit : tidak terdeteksi (negatif)
- e. Racun aflatoxin : di bawah 30 bagian per juta

Cara memanen dan mengolah simplisia sangat berdampak pada mutu bahan tersebut, termasuk susunan zat kimianya, tingkat kotoran dan juga daya tahannya (Endarini, 2016).

Berdasarkan pedoman Materia Medika Indonesia, mutu simplisia sebagai bahan baku obat tradisional dinilai berdasarkan beberapa tolok ukur berikut:

a. Keakuratan jenis (menentukan spesies tumbuhan)

Keakuratan jenis merupakan tolok ukur mutu simplisia yang sangat krusial karena memiliki hubungan langsung dengan keamanan dan khasiat obat tradisional. Simplisia harus berasal dari spesies tumbuhan yang benar sesuai dengan ketentuan Farmakope Herbal Indonesia. Penentuan keakuratan jenis dilakukan melalui pemeriksaan makroskopik yang meliputi bentuk, warna dan ciri fisik simplisia, serta pemeriksaan mikroskopik berupa irisan melintang atau serbuk simplisia. Apabila diperlukan, dapat dilakukan uji penanda sederhana untuk memastikan identitas bahan. Pemenuhan keakuratan jenis bertujuan untuk mencegah kesalahan penggunaan bahan baku yang dapat memengaruhi mutu dan keamanan obat tradisional.

b. Kebersihan (bebas dari cemaran baik secara kimia maupun mikroba)

Kebersihan merupakan salah satu parameter mutu simplisia yang harus dipenuhi sebelum digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Simplisia harus bebas dari cemaran yang berbahaya baik secara kimia maupun mikrobiologi, seperti hama atau serangga, kotoran hewan, bahan asing, serta cemaran mikroba yang melebihi batas yang ditetapkan. Kebersihan simplisia perlu diperhatikan karena adanya cemaran dapat menurunkan mutu, keamanan dan stabilitas bahan selama penyimpanan. Oleh karena itu, pengendalian kebersihan simplisia menjadi bagian

penting dalam proses standardisasi bahan baku obat tradisional sesuai dengan ketentuan yang berlaku (BPOM RI, 2019).

c. Aturan penstabilan

Aturan untuk menjaga stabilitas obat herbal meliputi pengemasan yang tepat, kondisi penyimpanan dan metode transportasi untuk mempertahankan kualitas fisik dan stabilitas senyawa aktif di dalamnya. Obat herbal harus disimpan dalam kemasan yang bersih dan tertutup rapat yang tidak bereaksi dengan zat lain dan melindunginya dari dampak lingkungan seperti cahaya, udara dan kelembapan. Lebih lanjut, penyimpanan pada suhu dan kelembapan yang tepat diperlukan untuk mencegah kerusakan senyawa aktif, pertumbuhan mikroorganisme dan kerusakan fisik selama periode penyimpanan. Transportasi dilakukan dengan hati-hati untuk mencegah kualitas obat herbal memburuk akibat guncangan, paparan suhu tinggi, atau kelembapan yang berlebihan. Pengelolaan aspek-aspek pengemasan, penyimpanan dan transportasi ini sangat penting untuk menjaga stabilitas serta kualitas obat herbal sebagai bahan dasar pengobatan tradisional (Ningrat dkk., 2025).

D. Ekstraksi

1. Definisi ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah fundamental untuk memisahkan isi senyawa aktif dari sumber alami dengan menggunakan pelarut yang tepat yang sesuai dengan prinsip kelarutan. Ada beberapa hal yang mempengaruhi suksesnya ekstraksi, termasuk temperatur dan durasi ekstraksi, seperti yang dijelaskan oleh Handayani dkk. (2019). Di samping itu, perbandingan antara bahan dan pelarut juga berperan

penting dalam menentukan seberapa banyak rendemen yang dihasilkan, sebagaimana diungkapkan oleh (Tutik dkk., 2022).

2. Metode ekstraksi

a. Metode dingin

1) Maserasi

Maserasi adalah ekstraksi dengan merendam simplisia yang telah dihaluskan ke dalam pelarut. Proses ini biasanya berlangsung selama tiga hari pada suhu 15–20°C dengan pengadukan atau pengocokan berulang, kemudian disaring. Kelebihan metode ini adalah penggunaan sampel yang relatif sedikit.

2) Maserasi kinetik

Metode ini mirip dengan maserasi, namun dilakukan dalam waktu singkat (6–24 jam) dengan pengadukan terus-menerus menggunakan alat mekanik pada suhu ruang agar pelarut lebih meresap ke dalam jaringan simplisia.

3) Maserasi sonikasi (ekstraksi ultrasonik)

Maserasi sonikasi memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan frekuensi di atas 20.000 Hz. Prinsipnya adalah meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman sehingga transfer massa lebih cepat. Hasil ekstraksi dipengaruhi oleh frekuensi, kapasitas alat dan durasi sonikasi.

4) Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan melarutkan simplisia menggunakan pelarut melalui tiga tahap: pengembangan bahan, maserasi sementara dan aliran pelarut melalui kolom untuk memperoleh ekstrak.

b. Metode panas

1) Refluks

Refluks menggunakan pelarut yang dipanaskan hingga mendidih dengan volume tetap, dilengkapi alat pendingin balik untuk menjaga pelarut tetap terkondensasi selama ekstraksi.

2) Digesti

Digesti adalah ekstraksi maserasi yang dilakukan secara berkelanjutan dengan pengadukan pada suhu lebih tinggi, biasanya antara 40–50°C.

3) Infus

Infus dilakukan dengan merendam simplisia dalam air mendidih (96–98°C) selama 15–20 menit untuk mengekstrak senyawa larut panas.

4) Dekok

Dekok menggunakan air panas pada suhu sekitar 90°C selama 30 menit hingga diperoleh larutan ekstrak yang diinginkan.

5) Sokletasi (soxhlet)

Sokletasi diterapkan pada bahan yang tahan panas, dengan menempatkan simplisia di dalam kantong kertas saring dalam alat Soxhlet secara berulang hingga senyawa target terekstraksi optimal.

6) Seduhan

Seduhan adalah metode paling sederhana, dilakukan dengan merendam simplisia dalam air panas selama 5–10 menit (Marjoni, 2016).

E. Metode Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode baku yang mampu mengontrol berbagai variabel yang berpotensi memengaruhi hasil uji. Di Amerika Serikat, pengujian antimikroba mengacu pada pedoman Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dengan memanfaatkan mikroorganisme uji standar serta antibiotik pembanding yang telah ditetapkan. Metode-metode ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi antibakteri suatu senyawa sekaligus menentukan tingkat kepekaan mikroorganisme terhadap agen antimikroba. Secara umum, penentuan aktivitas antibakteri dikaji melalui dua pendekatan utama, yaitu metode dilusi dan metode difusi.

1. Metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengonfirmasi aktivitas antimikroba suatu sampel, khususnya ketika hasil uji difusi menunjukkan zona hambat yang kurang konsisten. Keunggulan metode ini adalah satu konsentrasi senyawa antimikroba dapat digunakan untuk menguji beberapa jenis mikroorganisme. Parameter utama yang diamati meliputi Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (Sari dkk., 2022).

Metode dilusi terbagi menjadi dua cara, yaitu:

a. Dilusi cair

Dilakukan menggunakan media cair seperti *Nutrient Broth* (NB) dengan membuat seri pengenceran senyawa antimikroba, kemudian ditambahkan mikroorganisme uji untuk menentukan nilai KHM.

b. Dilusi padat

Dilakukan dengan pencampuran agen antimikroba ke dalam media agar yang telah diinokulasi mikroba, ini umumnya digunakan untuk menetapkan nilai KBM (Fitriana dkk., 2020).

2. Metode difusi

Metode difusi digunakan untuk menilai tingkat sensitivitas mikroorganisme pada senyawa antimikroba. Teknik yang paling sering diterapkan adalah metode cakram kertas, di mana media agar yang telah diinokulasi mikroba uji diberi cakram kertas yang mengandung zat antimikroba. Terbentuknya zona bening di sekitar cakram menandakan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan mikroba. Metode ini memiliki kelebihan berupa prosedur yang sederhana, tidak memerlukan peralatan khusus, serta fleksibel dalam pemilihan senyawa uji (Fitriana dkk., 2020)

Metode difusi dapat dilakukan melalui beberapa teknik, antara lain:

a. Metode silinder

Metode ini dilakukan dengan cara meletakkan silinder gelas steril di atas permukaan agar yang telah mengandung suspensi mikroba dan kondisi media yang sudah mengeras, kemudian silinder gelas tersebut diisi dengan bahan uji dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 18–24 jam. Selanjutnya, diameter zona hambat yang muncul akan diukur. Teknik ini memungkinkan volume zat uji diketahui secara pasti, namun memiliki risiko gelas silinder terguling atau terjatuh.

b. Metode perforasi (sumuran)

Dilakukan dengan mencampurkan media agar cair bersuhu 45–50°C dengan suspensi mikroba dalam cawan petri, kemudian setelah memadat dibuat lubang menggunakan perforator pada media untuk meneteskan bahan uji. Media diinkubasi

pada suhu 37°C selama 18–24 jam dan zona hambat diukur. Metode ini menghasilkan ketebalan media yang relatif seragam, tetapi lubang yang terbentuk terkadang tidak konsisten.

c. Metode cakram kertas

Kertas cakram yang telah diresapi senyawa antimikroba dengan konsentrasi tertentu digunakan, lalu diletakkan di atas permukaan agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam, diameter zona hambat diukur. Dalam metode ini, ekstrak pada cakram akan berdifusi dan zat aktif yang terkandung di dalamnya akan menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona bening yang terbentuk menunjukkan semakin besar aktivitas penghambatannya (Dewi *et al.*, 2019). Metode ini memiliki keunggulan dalam kemudahan pengendalian jumlah zat uji, meskipun bersifat semi-kuantitatif karena difusi zat aktif ke dalam agar tidak selalu merata.

Pembagian kelompok kategori diameter zona hambat dapat ditampilkan dalam tabel berikut:

Tabel 1
Kategori Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat	Respons hambat bakteri
≤ 5 mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat Kuat

(Sumber: Davis and Stout, 1971 dikutip dalam Sumilat, 2019).