

BAB V

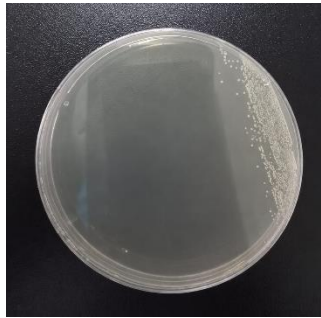
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik objek penelitian

Isolat *Staphylococcus aureus*, dengan kode ATCC 25923 yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar. Secara morfologi, bakteri ini berbentuk kokus (bulat), tersusun bergerombol menyerupai buah anggur, termasuk bakteri Gram positif, bersifat fakultatif anaerob, serta memiliki dinding sel peptidoglikan tebal sehingga rentan terhadap senyawa yang bekerja merusak membran dan dinding sel (Lee *et al.*, 2018).

Pada media kultur MHA, koloni *Staphylococcus aureus* umumnya berbentuk bulat, permukaan halus dan mengkilap, berwarna krem, serta memiliki tepi koloni rata.



Gambar 7 Koloni *Staphylococcus aureus* pada MHA
(Sumber: dokumen pribadi)

2. Karakteristik sampel bahan uji penelitian

a. Simplisia bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.)

Bunga gemitir yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perkebunan Desa Tembuku, Kabupaten Bangli. Secara morfologi, tanaman bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.) memiliki tinggi sekitar 50–100 cm dengan batang bulat

berwarna hijau dan bercabang. Daun majemuk menyirip dengan tepi bergerigi, ujung meruncing, serta berwarna hijau tua dan memiliki aroma khas. Memiliki bunga majemuk berbentuk bulat padat menyerupai pompon dengan diameter sekitar 5–10 cm, tersusun atas mahkota bunga berwarna kuning hingga oranye cerah.

Hasil preparasi sampel menunjukkan bahwa dari 4,2 kg bunga gemitir segar diperoleh simplisia kering berbentuk serbuk sebanyak 296 gram. Simplisia yang dihasilkan berwarna jingga tua keemasan pekat. Hasil standarisasi simplisia menunjukkan kadar air sebesar 2,267%.



Gambar 8 Tanaman Bunga Gemitir (*Tagetes erecta* L.)
(Sumber: dokumen pribadi)

b. Ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.)

Hasil ekstraksi menunjukan bahwa sebanyak 100 gram serbuk simplisia bunga gemitir menghasilkan ekstrak kental dengan berat akhir sebesar 30 gram berwarna coklat dan beraroma khas.



Gambar 9 Ekstrak Kental Bunga Gemitir (*Tagetes erecta* L.)
(Sumber: dokumen pribadi)

c. Hasil perhitungan berat rendemen

Perhitungan persentase rendemen dilakukan terhadap simplisia, di mana rendemen merupakan perbandingan antara berat ekstrak kering yang diperoleh dengan berat awal sampel (Rahadyana dkk., 2024). Hasil perhitungan tersebut dinyatakan dalam bentuk persentase sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{30}{100} \times 100\% \\ &= 30\%\end{aligned}$$

Hasil perhitungan menunjukkan persentase rendemen diperoleh sebesar 30%.

3. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri

Staphylococcus aureus

Pada pengujian daya hambat yang telah dilakukan menggunakan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20%, diperoleh hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang disajikan pada Tabel 5.

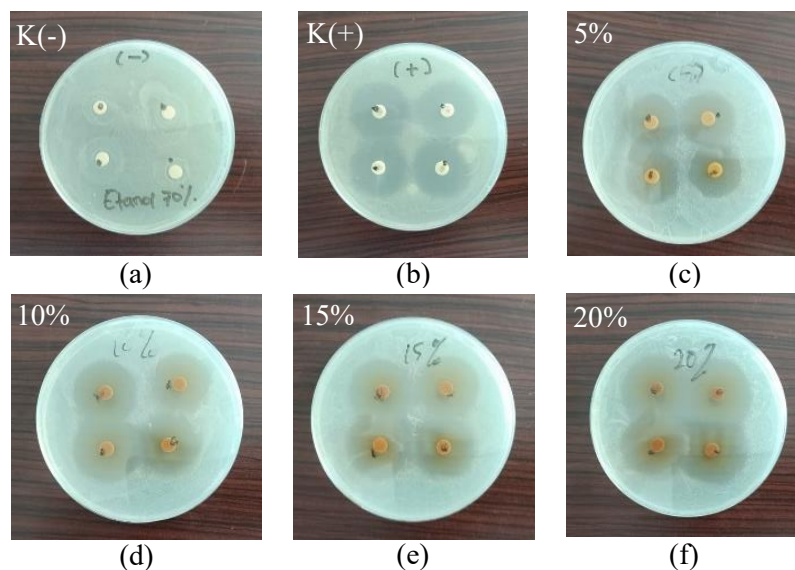
Tabel 5
Diameter Zona Hambat Pertumbuhan
Staphylococcus aureus

No	Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata (mm)	Kategori
		1	2	3	4		
1	Kontrol Negatif	0	0	0	0	0	Lemah
2	Kontrol Positif	25,5	25,8	25,6	25	25,47	Sangat kuat
3	Ekstrak 5%	21,1	21,6	22,7	21,20	21,65	Sangat kuat
4	Ekstrak 10%	24,1	24,1	24,3	24	24,12	Sangat kuat
5	Ekstrak 15%	24,2	24,6	25,4	24,1	24,58	Sangat kuat
6	Ekstrak 20%	29,2	29	28,7	28,8	28,92	Sangat kuat

Berdasarkan data pada Tabel 5, diperoleh rata-rata diameter zona hambat pada kontrol positif cakram antibiotik kloramfenikol 30 μg sebesar 25,47 mm, sedangkan kontrol negatif yang menggunakan etanol 70% tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat (0 mm).

Rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 5% adalah 21,65 mm, pada 10% sebesar 24,12 mm, pada 15% sebesar 24,58 mm, dan pada 20% sebesar 28,92 mm. Berdasarkan klasifikasi daya hambat, seluruh perlakuan termasuk dalam kategori sangat kuat.

Berikut adalah gambar zona hambat pada media MHA dari pengulangan pertama hingga keempat ekstrak etanol bunga gemitir terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*:



Gambar 10 Zona Hambat (a) Zona hambat kontrol negatif, (b) Zona hambat kontrol positif kloramfenikol 30 μg (c) Zona hambat konsentrasi 5%, (d) Zona hambat konsentrasi 10%, (e) Zona hambat konsentrasi 15%, (f) Zona hambat konsentrasi 20%.

4. Analisis data

a. Uji normalitas *Shapiro-Wilk*

Diameter zona hambat selanjutnya dianalisis melalui pengaplikasian software statistik. Tahapan awal analisis meliputi pengujian normalitas data dengan metode *Shapiro-Wilk*. Hasil pengujian normalitas tersebut yakni:

Tabel 6
Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok Perlakuan	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	Sig.
K (+)	.926	4	.556
5%	.863	4	.209
10%	.895	4	.406
15%	.880	4	.338
20%	.963	4	.798

Hasil uji normalitas pada Tabel 6 menunjukkan nilai signifikansi (Sig.) $\geq 0,05$. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa data diameter zona hambat pada seluruh kelompok perlakuan berdistribusi normal. Dengan terpenuhinya syarat normalitas, maka analisis dapat dilanjutkan ke uji homogenitas.

b. Uji homogenitas *Levene*

Penelitian ini menggunakan uji homogenitas yaitu uji *Levene*, dengan hasil uji pada tabel berikut.

Tabel 7
Uji Homogenitas *Levene*

No	Diameter Zona Hambat	<i>Levene</i> <i>Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	Sig.
1	<i>Based on Mean</i>	2.898	5	18	.043
2	<i>Based on Median</i>	1.796	5	18	.164
3	<i>Based on Median and with adjusted df</i>	1.796	5	7.244	.229
4	<i>Based on trimmed mean</i>	2.607	5	18	.061

Berdasarkan Tabel 7 hasil uji *Levene Statistic* didapatkan nilai Sig. 0,043 $p \leq 0,05$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa seluruh data kelompok perlakuan tidak homogen. Karena data berdistribusi tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA (Welch)*.

c. Uji *One Way Anova (Welch)*

Penelitian ini menggunakan uji *One Way ANOVA (Welch)* untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambat antar kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA (Welch)*, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p \leq 0,05$), menunjukkan adanya perbedaan diameter zona hambat secara signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian dianalisis dengan uji *Post Hoc Games-Howell* untuk mengetahui pasangan kelompok yang memiliki perbedaan signifikan.

d. Uji *Post Hoc Games-Howell*

Hasil uji *One Way ANOVA (Welch)* yang menunjukkan perbedaan signifikan, maka dilakukan uji lanjut menggunakan metode *Games-Howell*. Adapun hasilnya disajikan pada tabel berikut.

Tabel 8
Uji *Post Hoc Games-Howell*

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	Keterangan
K (-)	K (+)	.000	$p < 0,05$
	5%	.000	$p < 0,05$
	10%	.000	$p < 0,05$
	15%	.000	$p < 0,05$
	20%	.000	$p < 0,05$
K (+)	5%	.003	$p < 0,05$
	10%	.012	$p < 0,05$
	15%	.245	$p > 0,05$
	20%	.000	$p < 0,05$
5%	10%	.028	$p < 0,05$
	15%	.007	$p < 0,05$
	20%	.001	$p < 0,05$
10%	15%	.693	$p > 0,05$
	20%	.000	$p < 0,05$
15%	20%	.001	$p < 0,05$

Berdasarkan tabel hasil uji *Post Hoc Games-Howell*, dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi (Sig.) yang diperoleh menunjukkan sebagian besar pasangan kelompok memiliki nilai $p \leq 0,05$, yang berarti terdapat perbedaan zona hambat secara signifikan antar kelompok. Kontrol negatif dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan (kontrol positif, konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20%) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Kontrol positif menunjukkan perbedaan signifikan dengan kontrol negatif, konsentrasi 5%, 10%, dan 20%, namun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 15%.

Pada konsentrasi 5%, terdapat perbedaan signifikan dengan seluruh kelompok yang diuji. Konsentrasi 10% menunjukkan perbedaan signifikan dengan kontrol

negatif, kontrol positif, konsentrasi 5% dan konsentrasi 20%, namun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 15%.

Selanjutnya, konsentrasi 15% memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol negatif, konsentrasi 5%, dan 20%, tetapi tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kontrol positif dan konsentrasi 10%. Sementara itu, konsentrasi 20% menunjukkan perbedaan signifikan terhadap seluruh kelompok lainnya, baik kontrol maupun konsentrasi perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak memengaruhi besarnya zona hambat yang dihasilkan.

B. Pembahasan

1. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai strain uji untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak bunga gemitir terhadap bakteri Gram positif. Strain ATCC 25923 merupakan strain standar yang umum digunakan pada pengujian sensitivitas antimikroba karena memiliki karakteristik yang stabil dan telah terstandarisasi. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus, tersusun bergerombol menyerupai buah anggur, bersifat fakultatif anaerob, serta mampu menghasilkan pigmen berwarna kuning keemasan pada media tertentu. Bakteri ini juga bersifat katalase positif dan koagulase positif sehingga termasuk salah satu bakteri patogen penting penyebab berbagai infeksi pada manusia (CLSI, 2023).

Penggunaan strain ATCC 25923 bertujuan untuk memperoleh hasil pengujian yang valid, konsisten, dan dapat dibandingkan dengan penelitian lain karena strain ini sering digunakan sebagai kontrol kualitas dalam uji sensitivitas antibiotik

metode difusi cakram. Selain itu, strain ini memiliki pertumbuhan yang baik dan mampu menghasilkan zona hambat yang jelas sehingga memudahkan proses pengamatan dan pengukuran daya hambat antibakteri.

2. Ekstraksi bunga gemitir (*Tagetes erecta* L)

Bunga gemitir yang digunakan dalam penelitian ini memiliki karakteristik segar, berwarna kuning-oranye, tidak mengalami kerusakan fisik, serta bebas dari kontaminasi jamur maupun serangga. Berdasarkan hasil pengujian, simplisia bunga gemitir memiliki kadar air sebesar 2,267%, sehingga telah memenuhi persyaratan mutu simplisia karena berada di bawah batas maksimum 10% (BPOM RI, 2019). Sortasi basah berperan dalam mengurangi kontaminasi kotoran dan mikroba pada simplisia segar sehingga dapat mendukung kualitas bahan (Shufyani dkk., 2024). Kadar air yang rendah menunjukkan bahwa simplisia memiliki stabilitas yang baik selama penyimpanan dan risiko pertumbuhan mikroorganisme maupun jamur menjadi lebih kecil. Selain itu, kadar air yang memenuhi standar juga dapat membantu mempertahankan kualitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

Ekstraksi bunga gemitir pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 70% dan menghasilkan ekstrak kental sebanyak 30 gram dengan nilai rendemen sebesar 30%. Nilai rendemen tersebut termasuk kategori baik karena melebihi 10% (Ramadhani M. dkk., 2024). Tingginya rendemen menunjukkan bahwa pelarut etanol 70% mampu menarik senyawa metabolit sekunder dalam jumlah cukup besar dari bunga gemitir. Karena sifat etanol 70% yang semi-polar sehingga efektif melarutkan berbagai senyawa bioaktif, seperti flavonoid, fenolik, tanin, dan saponin.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa etanol 70% menghasilkan kandungan fitokimia yang lebih tinggi dibandingkan etanol 96% (Efianti *et al.*, 2025).

Metode maserasi merupakan teknik ekstraksi sederhana dan ekonomis tanpa pemanasan yang mampu menjaga stabilitas senyawa aktif sensitif panas melalui proses difusi senyawa dari simplisia ke pelarut hingga tercapai keseimbangan konsentrasi (Arifin dkk., 2025). Pada penelitian ini digunakan perbandingan bahan dan pelarut sebesar 1:10, karena rasio pelarut berpengaruh terhadap efektivitas ekstraksi (Noviyanty dkk., 2019). Penambahan pelarut dapat meningkatkan hasil ekstrak, namun penggunaan berlebihan dapat menurunkan efektivitas ekstraksi akibat tercapainya kesetimbangan fase padat dan cair (Teresa dkk., 2016).

Nilai rendemen ekstrak juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis pelarut, rasio bahan dan pelarut, ukuran partikel simplisia, serta kandungan metabolit sekunder pada bahan. Rendemen yang tinggi pada penelitian ini menunjukkan bahwa proses ekstraksi berlangsung secara optimal sehingga senyawa aktif yang terkandung dalam bunga gemitir dapat terekstraksi dengan baik.

3. Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

a. Diameter zona hambat antibiotik kloramfenikol

Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan antibiotik kloramfenikol 30 µg terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram pada media *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Penggunaan kontrol positif bertujuan untuk memvalidasi seluruh tahapan pengujian, meliputi kualitas media, homogenitas suspensi bakteri, serta ketepatan proses inokulasi dan inkubasi.

Kloramfenikol sering dipilih sebagai kontrol positif dalam uji antibakteri karena merupakan antibiotik spektrum luas yang efektif terhadap bakteri Gram-

positif dan Gram-negatif serta menghasilkan zona hambat yang jelas dan konsisten dalam metode difusi cakram (Andhiarto dkk., 2020). Kloramfenikol bekerja dengan menghambat pembentukan ikatan peptida pada ribosom 50S sehingga mengganggu sintesis protein bakteri (Yu & Zeng, 2024). Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rata-rata diameter zona hambat sebesar 25,47 mm. Menurut kriteria Clinical and Laboratory Standards Institute, diameter ≥ 18 mm dikategorikan sebagai sensitif (CLSI, 2020), sehingga menunjukkan bahwa bakteri uji masih peka terhadap antibiotik.

Zona hambat yang termasuk kategori sensitif ini juga menunjukkan bahwa media MHA yang digunakan mampu mendukung difusi antibiotik dengan baik serta prosedur pengujian telah dilakukan secara tepat. Dengan demikian, kontrol positif tidak hanya sebagai pembanding, tetapi juga sebagai indikator keberhasilan keseluruhan metode yang digunakan.

b. Diameter zona hambat kontrol negatif

Sebagai bagian dari penelitian, kontrol negatif menggunakan disk kosong yang ditetesi etanol 70% dan diuji pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Tujuan dari kontrol negatif adalah untuk menunjukkan bahwa pelarut, etanol 70%, yang digunakan selama proses ekstraksi tidak memiliki sifat antibakteri yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Nilai dari kontrol negatif memberikan jaminan bahwa pelarut tidak memberikan sifat antibakteri yang berkontribusi terhadap pembentukan zona hambat, sehingga hasil yang diperoleh berasal dari senyawa aktif yang sedang diuji (Jungjunan dkk., 2023).

Semua pengulangan menunjukkan diameter rata-rata 0 mm. Ini menunjukkan bahwa etanol 70% tidak memiliki sifat antibakteri selama pengujian difusi cakram.

Zona hambatan yang diperoleh pada kontrol aktif menunjukkan bahwa senyawa aktif dari ekstrak sampel bukan berasal dari pelarut.

Tidak terbentuknya zona hambat pada kontrol negatif juga mengindikasikan bahwa media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dan prosedur pengujian telah dilakukan dengan baik tanpa kontaminasi dan variabel lain yang akan menyebabkan menghambatnya pertumbuhan bakteri.

c. Diameter zona hambat ekstrak bunga gemitir konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%

Berdasarkan hasil penelitian, terjadi peningkatan diameter zona hambat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.). Rata-rata diameter zona hambat yang diperoleh berturut-turut sebesar 21,65 mm pada konsentrasi 5%; 24,12 mm pada konsentrasi 10%; 24,58 mm pada konsentrasi 15%; dan 28,92 mm pada konsentrasi 20%. Menurut klasifikasi Davis and Stout (1971) yang dikutip dalam Sumilat (2019), seluruh hasil tersebut termasuk dalam kategori sangat kuat. Peningkatan diameter zona hambat menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak dengan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Pola tersebut menunjukkan adanya *dose-dependent effect*, yaitu peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan aktivitas antibakteri (Abbas *et al.*, 2021). Fenomena ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi dan kandungan senyawa aktif, kemampuan difusi senyawa pada media agar, ukuran molekul, polaritas, serta sensitivitas bakteri terhadap senyawa antibakteri (Balouiri *et al.*, 2016). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka jumlah senyawa aktif yang berdifusi ke media agar juga semakin besar sehingga lebih banyak sel bakteri yang

terpapar senyawa antibakteri (Lingga *et al.*, 2021). Hal ini sejalan dengan penelitian Sarmira dkk. (2021) yang menyatakan bahwa semakin luas zona hambat yang terbentuk maka aktivitas antibakteri suatu zat umumnya semakin besar. Temuan penelitian ini juga didukung oleh penelitian Jirna dan Ratih (2021) yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak dapat meningkatkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri.

Peningkatan aktivitas antibakteri pada setiap konsentrasi ekstrak menunjukkan bahwa daya hambat yang terbentuk berkaitan dengan kandungan metabolit sekunder di dalam bunga gemitir. Ini didukung penelitian yang dilakukan Rahmani dkk. (2023) melaporkan bahwa bunga gemitir mengandung flavonoid, fenolik, dan alkaloid. Studi pustaka lain juga menunjukkan bahwa bunga gemitir mengandung flavonoid, fenolik, alkaloid serta karotenoid (Santi, 2021). Sehingga kombinasi senyawa bioaktif tersebut diduga berkontribusi terhadap terbentuknya daya hambat pada penelitian ini, meskipun uji fitokimia secara langsung tidak dilakukan.

Berbagai metabolit sekunder tersebut diketahui memiliki mekanisme kerja antibakteri yang berbeda-beda terhadap sel bakteri. Flavonoid dapat merusak membran sel bakteri dan mengganggu fungsi enzim sehingga menyebabkan keluarnya metabolit penting dari dalam sel (Nababan *et al.*, 2020). Senyawa fenolik bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel yang menyebabkan kebocoran komponen intraseluler hingga berakhir pada kematian sel (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019). Alkaloid dapat menghambat pembentukan peptidoglikan sehingga dinding sel bakteri tidak terbentuk secara sempurna (Nor dkk., 2018).

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram-positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal namun tidak memiliki membran luar, sehingga senyawa

antibakteri lebih mudah berinteraksi dengan sel bakteri (Lee *et al.*, 2018). Faktor ketahanan bakteri juga dapat memengaruhi daya hambat karena *Staphylococcus aureus* mampu mengembangkan resistensi melalui modifikasi target dan produksi enzim penginaktivasi antibiotik (Lee *et al.*, 2018). Namun, senyawa dalam ekstrak tanaman tetap dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena bekerja melalui berbagai mekanisme. Luo *et al.* (2024) melaporkan bahwa flavonoid dapat berinteraksi dengan berbagai komponen sel bakteri sehingga berkontribusi terhadap daya hambat yang dihasilkan. Selain itu, karotenoid juga diketahui memiliki aktivitas biologis yang mendukung aktivitas antibakteri tanaman (Crupi *et al.*, 2023). Dengan demikian, aktivitas antibakteri ekstrak bunga gemitir diduga berasal dari interaksi berbagai metabolit sekunder dengan mekanisme kerja yang beragam.

Selain itu, kandungan metabolit sekunder pada tanaman juga dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman. Bunga gemitir yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Desa Tembuku, Bangli yang memiliki udara sejuk dan berada di dataran tinggi. Kondisi lingkungan selama pertumbuhan tanaman diketahui dapat memengaruhi produksi metabolit sekunder sebagai bentuk adaptasi dan mekanisme pertahanan tanaman (Isah, 2019). Selain itu, faktor lingkungan seperti ketinggian tempat juga dapat memengaruhi biosintesis senyawa bioaktif (Yang *et al.*, 2018). Oleh karena itu, kondisi tempat tumbuh tanaman berpotensi memengaruhi kandungan senyawa aktif dan aktivitas antibakteri ekstrak yang dihasilkan.

Perbedaan kandungan senyawa aktif dan kemampuan difusi ekstrak terlihat pada konsentrasi 20% yang menghasilkan diameter zona hambat terbesar di antara seluruh konsentrasi ekstrak yang diuji. Hasil tersebut menunjukkan bahwa

peningkatan konsentrasi ekstrak masih diikuti oleh peningkatan aktivitas antibakteri. Pada metode difusi cakram, luas zona hambat dipengaruhi oleh jumlah senyawa aktif yang berdifusi ke media agar serta sifat fisikokimia senyawa, seperti polaritas, ukuran molekul, kelarutan, dan viskositas (Balouiri *et al.*, 2016). Kontrol positif kloramfenikol dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding standar untuk memastikan metode pengujian antibakteri berjalan dengan baik.

Senyawa dengan polaritas tinggi umumnya lebih mudah larut dalam media berair sehingga dapat berdifusi lebih cepat pada media agar. Selain itu, molekul dengan ukuran lebih kecil akan lebih mudah menyebar dan menghasilkan zona hambat yang lebih luas dibandingkan molekul berukuran besar (Balouiri *et al.*, 2016). Viskositas ekstrak juga memengaruhi proses difusi, di mana ekstrak yang terlalu kental cenderung mengalami hambatan penyebaran pada media agar sehingga diameter zona hambat dapat menjadi lebih kecil meskipun kandungan metabolit sekundernya lebih tinggi (Eloff, 2018). Oleh karena itu, pola peningkatan zona hambat tidak selalu berlangsung secara linear pada setiap rentang konsentrasi.

Tidak adanya perbedaan signifikan antara konsentrasi 10% dan 15% diduga disebabkan oleh kemampuan difusi senyawa aktif dalam media agar yang masih relatif serupa pada kedua konsentrasi tersebut, sehingga peningkatan zona hambat belum terlihat secara berbeda. Kondisi ini menunjukkan adanya kejenuhan difusi (*diffusion saturation*) pada rentang konsentrasi tersebut. Kejenuhan difusi dapat dipengaruhi oleh ukuran molekul, polaritas, dan kelarutan senyawa yang memengaruhi penyebaran senyawa aktif dalam media agar (Balouiri *et al.*, 2016). Selain itu, viskositas ekstrak yang lebih tinggi dapat menghambat proses difusi senyawa aktif sehingga penyebarannya menjadi kurang optimal (Eloff, 2018).

Interaksi antar metabolit sekunder dalam ekstrak kasar (*crude extract*) juga dapat memengaruhi proses difusi dan aktivitas antibakteri (Jeong *et al.*, 2023). Pada penelitian ini, kondisi tersebut menyebabkan konsentrasi 10% dan 15% menghasilkan diameter zona hambat yang relatif sama meskipun konsentrasi ekstrak meningkat.

Interval konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20% pada penelitian ini telah mampu menunjukkan adanya kecenderungan hubungan dosis-respons yang ditandai dengan peningkatan diameter zona hambat seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak (Balouiri *et al.*, 2016). Namun, interval konsentrasi tersebut belum sepenuhnya menggambarkan kurva dosis-respons secara detail karena pola peningkatan zona hambat tidak berlangsung secara konsisten pada setiap rentang konsentrasi. Pada metode difusi cakram, diameter zona hambat tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa aktif, tetapi juga dipengaruhi oleh kemampuan difusi senyawa dalam media agar (Balouiri *et al.*, 2016). Oleh karena itu, interval konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini sudah cukup menunjukkan kecenderungan hubungan dosis-respons, tetapi belum mampu menggambarkan kurva dosis-respons secara menyeluruh.

Meskipun pola peningkatan zona hambat tidak berlangsung secara sepenuhnya konsisten pada setiap rentang konsentrasi, peningkatan diameter zona hambat kembali terlihat pada konsentrasi 20%. Hal tersebut menunjukkan bahwa jumlah senyawa aktif yang berdifusi ke media agar pada konsentrasi 20% masih mampu meningkatkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Dengan demikian, konsentrasi 20% masih termasuk dalam pola *dose-dependent effect* karena peningkatan konsentrasi ekstrak tetap diikuti oleh peningkatan aktivitas antibakteri.

Perbedaan diameter zona hambat antara ekstrak bunga gemitir dan kloramfenikol menunjukkan adanya perbedaan karakteristik kedua bahan uji. Kloramfenikol merupakan senyawa murni yang bekerja secara spesifik dengan menghambat sintesis protein pada subunit ribosom 50S bakteri (Katzung, 2018). Sebaliknya, ekstrak bunga gemitir merupakan ekstrak kasar yang mengandung berbagai senyawa aktif dengan mekanisme kerja yang beragam, seperti merusak membran sel, meningkatkan permeabilitas sel (Chen *et al.*, 2024), dan menghambat pembentukan biofilm (Luo *et al.*, 2024). Kombinasi berbagai senyawa tersebut diduga memberikan efek sinergis terhadap aktivitas antibakteri (Jeong *et al.*, 2023).

Metode difusi cakram yang digunakan dalam penelitian ini dapat menunjukkan adanya kecenderungan hubungan dosis-respons melalui perbedaan diameter zona hambat, namun metode ini belum sepenuhnya mampu menggambarkan kekuatan antibakteri secara kuantitatif. Hasil zona hambat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kemampuan difusi senyawa, ketebalan media agar, homogenitas inokulum, kemampuan penyerapan cakram, dan kestabilan proses difusi dalam media (Balouiri *et al.*, 2016). Selain itu, interval konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini telah mampu menunjukkan kecenderungan hubungan dosis-respons, namun belum dapat menggambarkan kurva dosis-respons secara lebih detail pada setiap rentang konsentrasi.

Oleh karena itu, metode difusi cakram lebih tepat digunakan sebagai uji skrining awal aktivitas antibakteri. Untuk mengetahui kekuatan antibakteri serta hubungan dosis-respons secara lebih detail, diperlukan metode kuantitatif seperti uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM/MIC) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM/MBC) yang dapat menentukan konsentrasi efektif minimum dalam

menghambat maupun membunuh bakteri secara langsung (CLSI, 2020). Penelitian ini juga masih terbatas pada pengujian secara *in vitro*, sehingga efektivitas dan keamanan ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.) dalam tubuh belum dapat diketahui secara pasti. Aktivitas antibakteri yang diperoleh pada media laboratorium belum tentu memberikan efek yang sama pada kondisi biologis yang lebih kompleks. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lanjutan seperti uji toksisitas, uji *in vivo*, dan uji stabilitas sebelum ekstrak dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antibakteri alami atau terapi komplementer.

Secara keseluruhan, ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.) menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *in vitro*. Aktivitas tersebut diduga dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder, kemampuan difusi ekstrak dalam media agar, serta interaksi berbagai senyawa aktif dengan mekanisme kerja yang berbeda terhadap sel bakteri.

4. Perbedaan zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak bunga gemitir terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan adanya perbedaan daya hambat ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* L.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi. Untuk menilai signifikansi perbedaan tersebut, data dianalisis menggunakan uji normalitas, homogenitas, dan uji perbedaan antar kelompok.

Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk*, data terdistribusi normal ($p \geq 0,05$). Namun, uji homogenitas menunjukkan varians tidak homogen ($p < 0,05$), sehingga analisis dilanjutkan menggunakan *Welch ANOVA*. Hasil uji ini menunjukkan nilai

signifikansi $p \leq 0,05$, yang berarti terdapat perbedaan diameter zona hambat antar kelompok perlakuan.

Kontrol negatif berbeda signifikan dengan seluruh kelompok perlakuan, menegaskan bahwa tidak terdapat daya hambat pada kontrol tersebut. Dengan demikian, zona hambat yang terbentuk pada kelompok perlakuan dapat dikaitkan dengan aktivitas ekstrak maupun kontrol positif.

Kontrol positif menunjukkan perbedaan signifikan terhadap beberapa konsentrasi perlakuan, yaitu 5%, 10%, dan 20%, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 15% ($p > 0,05$). Hal ini menandakan bahwa pada konsentrasi 15%, daya hambat ekstrak seukuran dengan kloramfenikol dalam kondisi pengujian yang digunakan.

Hasil uji lanjutan *Games-Howell* menunjukkan bahwa konsentrasi 5% berbeda signifikan dengan seluruh kelompok lain, menunjukkan daya hambat yang relatif lebih rendah dibandingkan konsentrasi lainnya. Konsentrasi yang berdekatan, seperti 10% dan 15%, tidak menunjukkan perbedaan signifikan, menandakan bahwa peningkatan konsentrasi pada rentang tersebut belum cukup memberikan perubahan daya hambat yang nyata. Meskipun demikian, seluruh konsentrasi ekstrak dan kontrol positif termasuk dalam kategori daya hambat sangat kuat, meskipun ukuran zona hambatnya berbeda secara statistik.

Secara keseluruhan, ekstrak etanol bunga gemitir memiliki efek antibakteri signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*. Peningkatan konsentrasi ekstrak secara bertahap meningkatkan daya hambatnya, dengan konsentrasi 20% menunjukkan efek antibakteri terkuat dengan diameter zona hambat 28,92 mm, lebih besar daripada semua perlakuan lain. Analisis statistik menggambarkan bahwa terdapat

perbedaan daya hambat pada berbagai konsentrasi ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.