

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumbuhan Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC.)

Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) merupakan bagian tanaman yang paling banyak dimanfaatkan dan menjadi ciri khas flora Sumatera Utara dari famili *Rutaceae*. Tumbuhan ini tumbuh liar di daerah pegunungan sekitar Danau Toba seperti Angkola, Mandailing, Dairi, dan Toba Holbung. Masyarakat Batak mengenalnya sebagai rempah aromatik tradisional dengan rasa getir khas yang mampu merangsang produksi air liur (Anggraeni, 2020). Secara morfologis, buah Andaliman termasuk dalam tipe buah bumbung dengan ukuran kecil (± 4 mm), berwarna hijau saat muda dan berubah menjadi merah keunguan ketika matang. Setiap bumbung berisi satu biji berwarna hitam mengilap dengan permukaan halus hingga agak keriput. Perikarp buah mengandung kelenjar minyak besar dan menonjol yang menghasilkan aroma jeruk yang lembut namun tajam. Kandungan senyawa volatil dan trigeminal aktif pada minyak atsirinya berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba, sehingga selain digunakan sebagai bumbu, buah ini juga berpotensi sebagai bahan obat tradisional (Newanti dkk., 2017).

1. Klasifikasi

Adapun klasifikasi tanaman Andaliman menurut Ompusunggu & Irawati, (2021) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida

Ordo : Rutales
Famili : Rutaceae
Genus : Zanthoxylum
Spesies : Zanthoxylum acanthopodium



Gambar 1. Tumbuhan Andaliman
(Sumber : Budi Sutomo & dotnet, 2011)

2. Morfologi

Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) merupakan tanaman perdu berduri dari famili *Rutaceae* yang tumbuh dengan tinggi antara 2 hingga 5 meter. Batangnya tampak hijau hingga hijau kemerahan dengan bercak putih di beberapa bagian, dan bentuk tajuknya bisa bulat, menjulang, atau memanjang tergantung kondisi tumbuhnya. Pada batang dan cabang terdapat duri berwarna coklat dengan bentuk cekung hingga sangat cekung serta panjang sekitar 6–40 mm. Daunnya majemuk menyirip dengan bentuk bulat telur, lanset, atau jorong, berukuran 12–21 cm panjang dan 6–16 cm lebar. Permukaan daun terasa kasar dengan tepi bergerigi, serta berwarna hijau muda hingga hijau tua. Bunga Andaliman berukuran kecil, berwarna kuning muda sampai kuning kemerahan, dan tumbuh di sekitar duri. Buahnya berbentuk bulat kecil berdiameter 3–6 mm, hijau saat muda dan berubah

merah ketika masak, dengan aroma tajam dan rasa getir khas. Di dalam setiap buah terdapat satu biji bulat yang berwarna putih muda lalu menghitam saat tua.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi, Andaliman memiliki dua genotipe utama, yaitu Simanuk dan Sihorbo. Genotipe Simanuk ditandai dengan duri lebih panjang dan aroma buah yang tajam, sedangkan Sihorbo memiliki duri lebih pendek namun aromanya lebih kuat. Variasi bentuk dan karakter tersebut menunjukkan adanya keragaman morfologi dan genetik pada tanaman Andaliman yang tumbuh di berbagai daerah di Sumatera Utara (Simbolon dkk., 2018).

3. Manfaat

Tanaman Andaliman merupakan salah satu tanaman yang memiliki berbagai manfaat, terutama dalam bidang kesehatan karena kandungan senyawa aktifnya. Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) mengandung enam jenis senyawa metabolit sekunder utama, yaitu fenolik, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan alkaloid (Saragih & Arsita, 2019). Senyawa-senyawa tersebut memberikan berbagai aktivitas biologis, seperti antibakteri, antimikroba, antivirus, antioksidan, dan antikanker. Adapun mekanisme antibakteri pada masing-masing senyawa tersebut yaitu (Putri dkk., 2022) :

a. Fenolik

Senyawa fenolik bekerja dengan mendenaturasi protein sel bakteri, yang menyebabkan gangguan aktivitas metabolik dan akhirnya mengakibatkan kematian sel. Fenol dapat bereaksi dengan protein pada dinding maupun membran sel, merusak permeabilitas, dan menyebabkan kebocoran isi sel.

b. Flavonoid

Flavonoid berperan sebagai antibakteri dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan intraseluler, sehingga merusak membran sel dan menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler penting. Gugus hidroksil pada struktur flavonoid juga dapat mengganggu transportasi nutrisi dan komponen organik, yang berakibat pada efek toksik terhadap bakteri dan menghambat pertumbuhannya.

c. Tanin

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri berhubungan dengan kemampuannya dalam mengganggu fungsi penting pada sel mikroba. Senyawa ini dapat menonaktifkan adhesin, yaitu komponen yang berperan dalam proses perlekatan bakteri pada permukaan sel inang. Selain itu, tanin juga mampu mendenaturasi enzim dan menghambat proses transportasi protein pada lapisan dalam sel bakteri, sehingga aktivitas metabolisme terganggu dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat.

d. Triterpenoid

Senyawa triterpenoid bekerja dengan berinteraksi dengan membran lipid, menyebabkan kebocoran pada liposom, menurunkan integritas membran, dan mengubah morfologi membran sel. Efek ini menjadikan membran rapuh dan akhirnya mengalami lisis.

e. Alkaloid

Alkaloid memiliki mekanisme antibakteri melalui penghambatan sintesis dinding sel, yang menyebabkan sel bakteri tidak dapat membentuk dinding

pelindungnya dengan sempurna. Akibatnya, sel akan lisis dan mati. Selain itu, beberapa alkaloid juga dapat mengganggu pembentukan DNA dan RNA bakteri.

Tabel 1

Data Skrining Fitokimia Serbuk dan Ekstrak Buah Andaliman

No.	Jenis Metabolit Sekunder	Reagen	Pustaka (Shaikh & Patil, 2020)	Serbuk		Ekstrak	
				Pengamatan Biji	Pengamatan Daging	Pengamatan Biji	Pengamatan Daging
1.	Alkaloid	Dragendroff	Endapan orange	+	+	+	+
		Mayer	Endapan putih	+	+	+	+
		Bouchardat	Endapan merah kecoklatan	+	+	+	+
2.	Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	Pewarnaan merah/kuning/jingga	-	+	+	+
3.	Terpenoid	Asam Asetat Glasial + Asam Sulfat	Endapan coklat kemerahan	+	+	+	+
4.	Tanin	FeCl ₃ 1%	Pewarnaan biru gelap	+	+	+	+
5.	Saponin	-	Busa	-	-	-	-

Sumber : Reny Salim (2024)

Tabel 2

Data Serapan dan Persen Inhibisi Ekstrak Terhadap DPPH

No.	Konsentrasi (ppm)	DPPH (35 ppm)	Serapan		Persen	
			DPPH +EB	DPPH +ED	Inhibisi EB	Inhibisi ED
1	30	0,656	0,385	0,414	41,31	36,89
2	40	0,656	0,365	0,385	44,36	41,31
3	50	0,656	0,34	0,337	48,17	48,62
4	60	0,656	0,321	0,295	51,07	55,03
5	70	0,656	0,301	0,256	54,11	60,97

Sumber : Reny Salim (2024)

B. *Cutibacterium Acnes*

1. Klasifikasi

Cutibacterium acnes awalnya diklasifikasikan dalam genus *Bacillus* dengan nama *Bacillus acnes*, kemudian berubah menjadi *Corynebacterium acnes*, dan selanjutnya dipindahkan ke genus *Propionibacterium* karena kemampuannya

menghasilkan asam propionat melalui metabolisme anaerob. Berdasarkan pembaruan taksonomi, kini bakteri tersebut dikategorikan dalam genus *Cutibacterium* (Cheirini dkk., 2025).

Kingdom : Bacteria
Filum : Actinobacteria
Kelas : Actinobacteria
Ordo : Propionibacteriales
Famili : Propionibacteriaceae
Genus : Cutibacterium
Spesies : Cutibacterium acnes (sebelumnya dikenal Propionibacterium acne)



Gambar 2. *Cutibacterium acnes*
Sumber: Wikipedia

2. Morfologi

Cutibacterium acnes, yang sebelumnya dikenal sebagai *Propionibacterium acnes*, merupakan bakteri berbentuk batang dengan sifat pleomorfik, Gram positif, tidak membentuk spora, dan hidup secara anaerob. Bakteri ini termasuk dalam filum *Actinobacteria* dan secara alami menjadi bagian dari flora normal pada kulit, rongga mulut, serta saluran pencernaan manusia. Umumnya tidak berbahaya, namun dalam kondisi tertentu dapat berperan sebagai patogen yang menyebabkan infeksi.

Cutibacterium acnes dapat diisolasi menggunakan berbagai media kultur seperti *blood agar*, *brucella*, *chocolate*, maupun *brain heart infusion*, baik dalam kondisi aerobik maupun mikroaerofilik. Bakteri ini banyak ditemukan pada area wajah dan bagian atas tubuh yang memiliki banyak kelenjar sebacea, karena lingkungan tersebut kaya lipid dan mendukung pertumbuhannya yang bersifat anaerob. Bentuk morfologinya memungkinkan *C. acnes* beradaptasi dengan baik pada lingkungan kulit yang berminyak, terutama di dalam folikel rambut dan pori-pori, sementara sifat pleomorfiknya membantu bakteri ini menyesuaikan diri dengan berbagai kondisi mikro di permukaan kulit (Mawardi dkk., 2021).

3. Patogenisitas

Cutibacterium acnes merupakan bakteri Gram positif anaerob fakultatif yang hidup di kulit manusia, terutama pada area kaya lipid seperti wajah dan punggung. Bakteri ini memanfaatkan lipid dari sebum melalui enzim lipase yang menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol, yang kemudian dapat memicu komedogenesis dan respon inflamasi lokal. Kolonisasi berlebih oleh *C. acnes* pada folikel rambut menstimulasi pelepasan sitokin inflamasi seperti IL-1 melalui aktivasi *NLRP3 inflammasome*. Selain itu, faktor CAMP dan porfirin yang dihasilkan bakteri turut memperkuat inflamasi, terutama yang berhubungan dengan jerawat (Coenye et al., 2022).

Kemampuan *C. acnes* membentuk biofilm menjadi kunci patogenisitasnya karena melindungi bakteri dari sistem imun dan meningkatkan resistensi terhadap antibiotik (Coenye et al., 2022). Struktur biofilm yang tersusun atas polisakarida, protein, dan DNA ekstraseluler membuat infeksi bersifat kronis dan sulit diatasi. Selain menyebabkan jerawat, *C. acnes* juga dapat menimbulkan infeksi pada

implan medis dan jaringan dalam, yang sulit didiagnosis karena pertumbuhannya lambat. Penggunaan antibiotik jangka panjang dapat memicu resistensi, terutama pada populasi yang membentuk biofilm. Secara keseluruhan, patogenesis *C. acnes* melibatkan kolonisasi folikel, aktivasi inflamasi, pembentukan biofilm, dan variasi faktor virulensi yang membuatnya sulit diberantas.

C. Jerawat (*Acne vulgaris*)

1. Definisi

Acne vulgaris adalah penyakit kulit inflamasi kronis yang memengaruhi unit pilosebacea, yaitu gabungan folikel rambut, batang rambut, dan kelenjar sebacea (Tarigan dkk., 2019). Penyakit ini ditandai dengan munculnya komedo, papula, pustula, nodul, hingga kista pada area yang kaya kelenjar sebacea seperti wajah, dada, punggung, dan bahu. *Acne vulgaris* bersifat multifaktorial dan idiopatik, dengan faktor pemicu utama berupa peningkatan produksi sebum, penebalan folikel (hiperkeratinisasi), kolonisasi bakteri *Cutibacterium acnes*, serta peradangan kulit.

Faktor risiko yang berperan antara lain stres, penggunaan kosmetik komedogenik, dan konsumsi makanan tinggi glikemik. *Acne vulgaris* berdampak pada kesehatan mental penderitanya. Banyak pasien, terutama remaja, mengalami kecemasan, rasa rendah diri, hingga depresi. Dalam jangka panjang, jerawat dapat menimbulkan hiperpigmentasi dan jaringan parut yang berpotensi menurunkan kualitas hidup (Yulinar Maulida & M. Mimbar Topik, 2024).

2. Etiologi dan Patogenesis *Acne Vulgaris*

Acne vulgaris merupakan penyakit inflamasi kronis pada unit pilosebacea yang timbul akibat interaksi berbagai faktor intrinsik dan ekstrinsik (Sibero dkk.,

2019). Faktor intrinsik yang berperan meliputi peningkatan produksi sebum, hiperkeratinisasi folikel rambut, kolonisasi bakteri *Cutibacterium acnes*, serta proses inflamasi yang kompleks. Selain itu, faktor genetik, hormonal, dan ras turut memengaruhi tingkat kerentanan seseorang terhadap jerawat. Sementara itu, faktor ekstrinsik meliputi stres psikologis, paparan lingkungan lembap, penggunaan kosmetik berbahan minyak, pola makan dengan indeks glikemik tinggi, konsumsi obat-obatan tertentu seperti kortikosteroid dan litium, serta kebersihan kulit yang kurang terjaga. Kebiasaan seperti merokok dan paparan polusi udara juga dapat memperburuk kondisi kulit. Oleh karena itu, *acne vulgaris* dapat dipahami sebagai hasil interaksi multifaktorial antara faktor hormonal, lingkungan, dan gaya hidup seseorang (Sibero dkk., 2019; Wahyuni & Topik, 2023).

3. Secara patogenetik, *acne vulgaris* berkembang melalui empat mekanisme utama, yaitu peningkatan produksi sebum, hiperkeratinisasi folikel, kolonisasi *C. acnes*, dan proses inflamasi (Wahyuni & Topik, 2023). Peningkatan sekresi sebum dipicu oleh aktivitas hormon androgen, terutama dihidrotestosteron (DHT), yang merangsang kelenjar sebacea menghasilkan minyak berlebih. Akibatnya, terjadi hiperkeratinisasi folikel, yaitu penumpukan keratin dan sel epitel yang menyumbat saluran folikel dan membentuk komedo tertutup (*whitehead*) maupun terbuka (*blackhead*). Kondisi sumbatan tersebut menciptakan lingkungan anaerob yang mendukung pertumbuhan *C. acnes*. Bakteri ini menghasilkan enzim lipase yang menguraikan trigliserida sebum menjadi asam lemak bebas, yang kemudian memicu pelepasan mediator inflamasi seperti IL-1 β , IL-8, dan TNF- α . Respons imun terhadap rangsangan tersebut menimbulkan peradangan lokal berupa papula, pustula, hingga nodul.

Selain itu, ketidakseimbangan mikrobioma kulit serta perubahan komposisi sebum turut memperparah proses inflamasi. Dengan demikian, patogenesis *acne vulgaris* merupakan hasil interaksi kompleks antara aktivitas hormon, kolonisasi mikroorganisme kulit, serta respons imun yang berlebihan terhadap rangsangan lokal (Sibero dkk., 2019; Wahyuni & Topik, 2023)eran

Cutibacterium acnes* dalam *Acne vulgaris

Cutibacterium acnes (sebelumnya dikenal sebagai *Propionibacterium acnes*) merupakan bakteri Gram positif anaerob yang secara alami hidup sebagai flora normal pada kulit, khususnya di area yang kaya akan kelenjar sebacea seperti wajah dan punggung. Dalam kondisi normal, bakteri ini berperan menjaga keseimbangan mikrobiota kulit dengan menghasilkan asam lemak dari sebum yang membantu mempertahankan pH kulit tetap asam. Namun, pada keadaan tertentu, *C. acnes* dapat berubah menjadi patogen oportunistik yang memicu terjadinya *acne vulgaris*. (Dréno et al., 2018)

Penelitian menunjukkan bahwa timbulnya jerawat tidak ditentukan oleh banyaknya jumlah *C. acnes*, melainkan oleh ketidakseimbangan mikrobiota kulit serta dominasi filotipe tertentu. Bakteri ini juga mampu membentuk biofilm, yaitu lapisan pelindung yang membuatnya lebih resisten terhadap fagositosis dan antibiotik. Dengan demikian, peran *C. acnes* dalam patogenesis *acne vulgaris* lebih dipengaruhi oleh faktor virulensi, variasi genetik, dan kemampuannya membentuk biofilm, bukan oleh jumlah bakteri semata (Dréno et al., 2018).

D. Ekstraksi

1. Definisi

Ekstraksi adalah teknik pemisahan senyawa dari suatu campuran dengan memanfaatkan pelarut yang tepat hingga tercapai keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan di dalam jaringan tanaman (Mukhriani, 2014). Hasil awal proses ini umumnya masih berupa campuran kompleks, sehingga perlu dilakukan pemurnian lanjutan untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik. Proses ekstraksi berperan penting dalam penemuan dan isolasi senyawa bioaktif, serta dalam pengumpulan metabolit sekunder untuk keperluan karakterisasi maupun studi metabolomik.

2. Metode Ekstraksi

Dalam isolasi senyawa aktif dari bahan alam, tersedia berbagai metode ekstraksi yang dipilih berdasarkan sifat sampel dan tujuan penelitian. Beberapa metode yang dapat digunakan meliputi:

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi konvensional yang banyak digunakan karena prosedurnya sederhana, tidak memerlukan pemanasan, serta mampu menjaga stabilitas senyawa aktif (Fahiroh dkk., 2025). Proses ini bekerja melalui difusi, ketika pelarut menembus dinding sel dan melarutkan metabolit sekunder hingga tercapai keseimbangan. Efektivitasnya dipengaruhi oleh jenis pelarut, ukuran partikel, lama perendaman, dan pengadukan, dengan etanol 70–96% sebagai pelarut yang paling umum digunakan. Hasil rendemen dapat bervariasi tergantung karakteristik bahan dan kondisi ekstraksi. Meski ada metode modern

yang lebih cepat, maserasi tetap digunakan karena praktis, ekonomis, dan mampu menghasilkan ekstrak dengan komposisi fitokimia yang stabil dan representatif.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah metode ekstraksi konvensional yang dilakukan dengan melewatkan pelarut secara kontinu melalui serbuk simplisia sehingga komponen aktif larut dan keluar dalam bentuk perkolat. Perkolasi mampu menghasilkan ekstrak dengan kandungan fitokimia yang lengkap seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin (Dwiyanti dkk., 2025). Proses diawali dengan pembasahan simplisia untuk mengembangkan jaringan sel, kemudian bahan dimasukkan ke perkolator dan dialiri pelarut dengan laju tetesan tertentu hingga seluruh senyawa terekstraksi. Metode ini lebih efisien dibanding maserasi karena aliran pelarut terus menerus menjaga perbedaan konsentrasi, sehingga difusi senyawa berlangsung optimal.

c. Refluks

Refluks merupakan teknik ekstraksi yang memanfaatkan pemanasan campuran simplisia dan pelarut pada suhu didih pelarut, di mana uap yang terbentuk dikondensasikan kembali sehingga pelarut tidak hilang selama proses. Kondisi pemanasan yang stabil ini memungkinkan ekstraksi berlangsung lebih efektif, karena senyawa aktif dapat larut dengan cepat dan lebih sempurna dibandingkan metode perendaman biasa. Metode ini umumnya menghasilkan rendemen tinggi dan komposisi fitokimia yang lebih lengkap, namun tidak direkomendasikan untuk bahan yang mengandung senyawa sensitif panas karena paparan suhu tinggi dapat menyebabkan kerusakan atau degradasi (Dwiyanti dkk., 2025).

d. Soxhletasi

Metode *Soxhlet* merupakan teknik ekstraksi panas yang memanfaatkan siklus pemanasan dan pengembunan pelarut secara berulang dalam sistem tertutup. Pelarut dipanaskan hingga menguap, lalu dikondensasikan kembali dan menetes ke ruang berisi simplisia. Ketika volume larutan mencapai batas tertentu, ekstrak kembali ke labu pemanas sehingga pelarut segar terus kontak dengan bahan. Siklus ini menghasilkan proses pelarutan senyawa aktif yang lebih optimal, meskipun membutuhkan waktu relatif lama. *Soxhlet* diketahui mampu menghasilkan rendemen tinggi dan profil fitokimia yang baik, namun tidak direkomendasikan untuk bahan yang mengandung senyawa sensitif panas karena prosesnya berlangsung pada suhu mendidih pelarut (Dwiyanti dkk., 2025).

e. Infusa

Infusa merupakan teknik ekstraksi yang memanfaatkan air panas untuk melarutkan senyawa aktif dari simplisia. Prosedurnya dilakukan dengan memanaskan bahan dalam air pada suhu hampir mendidih selama jangka waktu tertentu, kemudian memisahkan ekstraknya melalui penyaringan. Karena prosesnya sederhana dan tidak melibatkan pelarut organik, metode ini banyak diterapkan pada bahan yang mudah terekstraksi oleh air dan tetap stabil saat dipanaskan. Infusa paling efektif untuk senyawa polar yang tahan terhadap suhu tinggi, namun kurang cocok untuk komponen yang sensitif panas atau yang tidak dapat larut dalam air (Dwiyanti dkk., 2025).

f. *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE)

Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) merupakan teknik ekstraksi modern yang memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk mempercepat pelepasan senyawa

aktif dari bahan. Gelombang ini menimbulkan kavitasi, yaitu terbentuk dan pecahnya gelembung mikro yang mampu merusak dinding sel sehingga pelarut lebih mudah masuk dan senyawa bioaktif keluar dengan cepat. Proses UAE bekerja pada suhu rendah hingga sedang, sehingga sangat sesuai untuk mengekstraksi komponen yang sensitif panas. Metode ini menawarkan keunggulan berupa waktu ekstraksi yang singkat, kebutuhan pelarut yang lebih sedikit, serta efisiensi tinggi. Namun, penggunaan intensitas ultrasonik yang berlebihan berpotensi merusak struktur beberapa senyawa (Dwiyanti dkk., 2025).

g. *Microwave-Assisted Extraction* (MAE)

Microwave-Assisted Extraction (MAE) merupakan teknik ekstraksi modern yang menggunakan energi gelombang mikro untuk mempercepat keluarnya senyawa aktif dari simplisia. Gelombang mikro menghasilkan pemanasan cepat dan merata pada pelarut serta bahan, sehingga meningkatkan tekanan dalam sel dan menyebabkan dinding sel pecah, membuat senyawa bioaktif lebih mudah larut. Metode ini dinilai sangat efisien karena dapat mempersingkat waktu ekstraksi, meningkatkan rendemen, dan mengurangi penggunaan pelarut. MAE juga dapat digunakan untuk senyawa yang agak sensitif terhadap panas apabila pengaturan daya dan waktu pemanasan dilakukan secara tepat. Namun, jika intensitas gelombang mikro terlalu tinggi, beberapa senyawa dapat mengalami kerusakan atau degradasi (Dwiyanti dkk., 2025).

E. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Definisi

Uji daya hambat antibakteri merupakan metode *in vitro* yang digunakan untuk mengevaluasi kemampuan suatu senyawa — baik ekstrak alami, metabolit sekunder, maupun zat murni — dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme. Pengujian ini berperan penting dalam menilai potensi antimikroba suatu bahan dan menjadi langkah awal dalam pengembangan agen antimikroba atau obat baru (Balouiri et al., 2016).

2. Metode

a. Metode Difusi

Metode ini bekerja dengan prinsip difusi senyawa antimikroba ke dalam medium padat berupa agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Aktivitas antibakteri dapat diamati melalui terbentuknya zona bening atau zona hambat di sekitar sumber zat uji. Dalam penerapannya, terdapat beberapa variasi metode difusi yang umum digunakan, yaitu :

a) Metode difusi cakram (*Kirby-Bauer*)

Teknik menggunakan cakram kertas berdiameter sekitar 6 mm yang telah direndam dalam larutan uji, kemudian ditempatkan di atas permukaan agar. Adanya zona bening di sekitar cakram menandakan aktivitas antibakteri.

b) Metode difusi sumur (*Agar Well Diffusion Method*)

Metode dengan cara memasukkan larutan uji ke dalam sumur kecil (*well*) yang dibuat pada media agar. Teknik ini lebih sesuai untuk pengujian ekstrak cair atau minyak esensial karena memungkinkan penggunaan volume sampel yang lebih besar.

b. Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan salah satu teknik uji aktivitas antimikroba. Prinsip dasar metode ini adalah melakukan pengenceran bertingkat (*serial dilution*) terhadap larutan uji untuk memperoleh berbagai konsentrasi, kemudian setiap konsentrasi diuji terhadap mikroorganisme target. Hasil pengujian akan menunjukkan konsentrasi minimum yang dapat menghambat (Kadar Hambat Minimum/KHM) maupun membunuh (Kadar Bunuh Minimum/KBM) pertumbuhan mikroorganisme (Munira & Nasir, 2023). Beberapa variasi metode dilusi yang umum digunakan antara lain sebagai berikut:

a) Metode dilusi cair (*Broth Dilution Method*)

Metode dilusi cair dilakukan dengan cara membuat pengenceran bertingkat dari larutan uji ke dalam media cair seperti *Nutrient Broth* atau *Mueller Hinton Broth*. Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan kejernihan media, di mana media yang tetap jernih menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (indikasi KHM), sedangkan media yang keruh menandakan bakteri masih tumbuh. Metode ini memungkinkan penentuan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) secara akurat dan sering dilanjutkan dengan penanaman pada media padat untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Teknik ini dipilih karena memberikan hasil yang lebih homogen dan sensitif terhadap interaksi antara senyawa uji dan mikroorganisme (Munira & Nasir, 2023).

b) Metode dilusi padat (*Agar Dilution Method*)

Metode dilusi padat dilakukan dengan mencampurkan larutan uji ke dalam media padat seperti *Mueller Hinton Agar* dalam berbagai konsentrasi. Setelah media memadat, permukaannya diinokulasi dengan suspensi bakteri uji, lalu

diinkubasi selama waktu tertentu. Hasil pengamatan didasarkan pada ada atau tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada permukaan media. Konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM). Metode ini sering digunakan untuk pengujian senyawa padat atau yang stabil pada suhu tinggi, serta mampu memberikan hasil yang lebih representatif terhadap aktivitas antimikroba di permukaan padat (Munira & Nasir, 2023).

Tabel 3
Kategori Zona Hambat

Kategori Zona Hambat	Diameter Zona Hambat
Lemah	< 5 Mm
Sedang	5 - < 10 Mm
Kuat	10-20 Mm
Sangat Kuat	> 20 Mm

Sumber : (Purba dkk., 2023)