

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ROSELLA TERHADAP BAKTERI *Enterobacter cloacae* DAN *Acinetobacter baumannii*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY ROSELLA EXTRACT ON BACTERIA *Enterobacter cloacae* AND *Acinetobacter baumannii*

Disusun dan diajukan oleh

AYU SRI MULYANI BASUKI

N011 17 1041



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ROSELLA TERHADAP
BAKTERI *Enterobacter cloacae* DAN *Acinetobacter baumannii***

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY ROSELLA EXTRACT ON BACTERIA
Enterobacter cloacae AND *Acinetobacter baumannii***

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**AYU SRI MULYANI
N011 17 1041**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ROSELLA TERHADAP
BAKTERI *Enterobacter cloacae* DAN *Acinetobacter baumannii***

AYU SRI MULYANI BASUKI

N011 17 1041

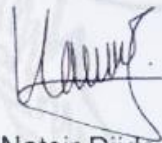
Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. Sartini, M. Si., Apt
NIP. 19611111 198703 2 001

Pembimbing Pendamping,



Nana Juniarti Natsir Djide, S. Si., M. Si., Apt.
NIP. 19900602 201504 2 002

Pada tanggal 11 /02/2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ROSELLA TERHADAP BAKTERI *Enterobacter cloacae* DAN *Acinetobacter baumannii*

Disusun dan diajukan oleh

AYU SRI MULYANI BASUKI
N011 17 1041

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
pada tanggal 13/07/2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan


Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001

Pembimbing Pendamping



Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19900602 201504 2 002



Koordinator Program Studi,

Prizati Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Ayu Sri Mulyani
NIM : N011171041
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rosella Terhadap Bakteri *Enterobacter cloacae* dan *Acinetobacter baumannii*" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 11 Februari 2021
Yang Menyatakan

METERAI
TEMPEL
4E E8AHF837349679
6000
ENAM RIBU RUPIAH
Ayu Sri Mulyani

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, berkat rahmat, petunjuk dan anugerahNya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulisan skripsi ini memiliki banyak kendala dan hambatan selama proses penyelesaiannya, namun berkat dukungan serta bantuan dari berbagai pihak sehingga penulis mampu untuk menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada

1. Ibu Prof.Dr.Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing pendamping yang sangat baik dalam memberikan bimbingan, arahan, ilmu, dan waktu yang diluangkan untuk penulis selama melakukan penelitian ini sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan sangat baik
2. Ibu Dr.Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan koreksi dan arahan untuk penelitian dan perbaikan skripsi ini.
3. Dekan dan Wakil Dekan, para dosen, serta staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang mewadahi peneliti untuk menyelesaikan penelitian
4. Seluruh laboran di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, khususnya Ibu Haslia yang selalu memberikan bantuan kepada penulis dan tempat berbagi cerita penulis selama melakukan penelitian.


5. Sahabat seperjuangan dalam melaksanakan penelitian, Hardiana Lestari yang selalu menemani peneliti dalam mengerjakan penelitian dan berbagi ilmu setiap harinya.
6. Sahabat-sahabat dekat penulis selama berkuliah di Farmasi, Terkhusus untuk Harfiana Suardi, Jumalia, Rifdah Aulia, Farhan Zulfadly, Uswati Niswah dan Hamita Esa Putri yang menjadi tempat berbagi keluh kesah, canda tawa maupun kesedihan, menolong dan mendukung penulis dalam menyusun skripsi ini.
7. Teman-teman korps asisten Laboratorium Mikrobiologi Terkhusus Sri Resky Handayani, Geoni Maleso Todingan, Selin Ariani Pabisa, Ananda Pratiwi, Luthfiyah Fitriani Pelu, Usmanengsi, Hikmatul Khaeriyah, Muh.Azhar, Anisah dan Kadek Saka Dwipayanti yang senantiasa menjadi tempat bertukar informasi, berbagi ilmu dan membantu dalam segala hal.
8. Kepada teman-teman angkatan saya CLOSTRIDIUM (2017) Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang menjadi tempat berbagi canda tawa dan terima kasih atas kebersamaan yang terjalin selama ini.
9. Kepada teman-teman Kabinet Karya (BEM KEMAFAR-UH) priode 2019-2020 Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang menjadi tempat saya berbagi pengalaman organisasi dan canda tawa selama Priode kepengurusan berlangsung.

Sukma Dewi, dan Indah Sartiani yang selalu memberi motivasi penulis dalam penulisan skripsi ini.

Skripsi ini terselesaikan oleh penulis tidak ada artinya tanpa bantuan material, moral, semangat, doa, dorongan dari kedua orang tua yang tiada henti-hentinya mengalir kepada penulis. Rasa Terima Kasih Penulis Hanturkan kepada Ayahanda Ir. H. Basuki Ammade dan Ibunda Hj. Suriani Ahmad. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada saudara penulis Noor Alfaadila dan Moh.Rifqy Saif Al-Din yang senantiasa memberikan semangat dan doa untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa terdapat banyak kekurangan sehingga skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga akan tercipta karya yang lebih baik lagi. Semoga Karya yang lebih baik lagi. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Makassar, 11 Februari 2021



Ayu Sri Mulyani B

ABSTRAK

AYU SRI MULYANI . *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kelopak bunga Rosella Terhadap Bakteri Enterobacter cloacae dan Acinetobacter baumannii.* (dibimbing oleh Sartini dan Nana Juniarti).

Prevalensi kasus resistensi antimikroba yang disebabkan *Acinetobacter baumannii* dan *Enterobacter cloacae* semakin meningkat di Indonesia disertai minimnya antimikroba yang masih sensitif terhadap kedua patogen tersebut. Ekstrak tanaman—salah satunya dari Rosella—dapat menjadi sumber senyawa antimikroba baru baik untuk penggunaan tunggal maupun kombinasi dengan antibiotika yang telah resisten. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. cloacae* dan *A. baumannii*. Ekstrak air kelopak bunga rosella di uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dalam *microplate 24 wells* dan metode difusi menggunakan medium *Mueller Hinton Agar* dengan waktu inkubasi 1x24 jam suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella memiliki KHM >2%, dan pada uji difusi sampai konsentrasi 20% (4 mg/disc) tidak menunjukkan penghambatan pertumbuhan *E. cloacae* dan *A. baumannii*. Dapat disimpulkan bahwa *ekstrak rosella* tidak memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *E. cloacae* dan *A. baumannii*.

Kata Kunci: Ekstrak Kelopak Bunga Rosella, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, KHM (Kadar Hambat Minimum).

ABSTRACT

AYU SRI MULYANI. *Antibacterial activity evaluation of Roselle Calyx Extract on bacteria Enterobacter cloacae and Acinetobacter baumannii (guided by Sartini and Nana Juniarti).*

The prevalence of cases of antimicrobial resistance caused by *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* increases in Indonesian, while the number of sensitive antimicrobial against these pathogens decreases. Therefore, sourcing new antimicrobial compounds from natural product—including Roselle—either for single use or in combination with resistant antibiotic becomes an alternative. This research aims to determine the antibacterial activity of Roselle Calyx Extract against *E. cloacae* and *A. baumannii*. The water extract of Roselle calyx was tested for its antibacterial activity against clinical isolate of *E. cloacae* and *A. baumannii* using microdilution method to determine its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in microplate 24-wells. The assay was followed with disc diffusion assay in Mueller Hinton Agar for 1 x 24 hours at 37°C using the same test bacteria. The results showed that Rosella Calyx extract had MIC >2% and did not show inhibition of the growth of *E. cloacae* and *A. baumannii* in disc diffusion test. In conclusion, rosella calyx extract did not have antibacterial activity on *E. cloacae* and *A. baumannii*.

Keywords: Roselle Calyx Extract, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	2
I.3 Tujuan Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 Tanaman Rosella	3
II.2 Enterobacter cloacae	5
II.3 Acinetobacter baumannii	7
II.4 Metode Pengujian Antibakteri	8
BAB III METODE PENELITIAN	
III.1 Alat dan Bahan	13
III.2 Metode Kerja	13

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
IV.1 Hasil Penentuan Nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) Ekstrak Rosella Terhadap bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> dan <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
IV.2 Hasil Penentuan Diameter Hambat Ekstrak Rosella Dengan Menggunakan Metode Difusi Padat	19
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	21
V.1 Kesimpulan	21
V.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	22
LAMPIRAN	25

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil Penentuan Nilai KHM Ekstrak Rosella Terhadap Bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> dan <i>Acinetobacter Baumannii</i>	17
2. Hasil Penentuan Diameter Hambat Ekstrak Rosella dengan Metode difusi padat	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rosella	3
2. Enterobacter cloacae	5
3. Acinetobacter baumannii	7
4. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Rosella dengan menggunakan metode mikrodilusi terhadap bakteri <i>E.cloacae</i>	29
5. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Rosella dengan menggunakan metode mikrodilusi terhadap bakteri <i>A.baumannii</i>	29
6. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Rosella dengan menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri <i>E.cloacae</i> (a) replikasi 1 (b) replikasi 2 (c) replikasi 3	30
7. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Rosella dengan menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri <i>A.baumannii</i> (a) replikasi 1 (b) replikasi 2 (c) replikasi 3	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Umum	25
2. Skema Kerja Uji Aktivitas Antibakteri Menggunakan Metode Mikrodilusi	26
3. Komposisi Medium	27
4. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak	28
5. Gambar	29

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Acinetobacter baumannii merupakan salah satu bakteri penyebab meningitis, infeksi luka, dan infeksi saluran kemih yang telah menunjukkan resistensi terhadap beberapa golongan antibiotika (Abdallah, 2016). *Multidrug resistant* (MDR) *A. baumannii* menyebabkan kematian mencapai 17-46% (Tjoa dkk. 2013). Selain bakteri *A.baumannii*, menurut WHO, bakteri *Enterobacter cloacae* juga menjadi penyebab dari infeksi nosokomial yang menyebabkan kematian mencapai 6,67% dan juga resistensi terhadap beberapa antibiotika termasuk karbapenem (Blu dkk. 2015). Bakteri *A. baumannii* dan *E. cloacae* resisten terhadap beberapa antibiotika, yaitu antibiotika golongan penisillin, sefalosporin generasi pertama dan kedua, beta laktam monosiklik, aminoglikosida, dan kuinolon (Ayu, 2019; Deni dkk. 2019).

Penggunaan bahan alami sangat disarankan karena memiliki efek samping minimal dan aman untuk tubuh. Salah satunya adalah rosella terutama bagian kelopak bunganya yang banyak mengandung polifenol, asam-asam organik, dan polisakarida, polifenol yang terkandung dalam kelopak bunga rosella antara lain yaitu antosianin, asam protokatekuat dan gossepetin (Djide dkk, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Timothy dkk. (2017) menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam

kelopak bunga rosella diantaranya antosianin dan asam protokatekuat. Asam protokatekuat dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Klebisella pneumonia*, *Pseudomonas aeroginosa*, dan *Acinetobacter baumannii* (Timothy dkk, 2017). Diketahui pada konsentrasi 10%, 7,5%, 5% dan 10% ekstrak rosella dapat menghambat bakteri *P. gingivalis* (bakteri Gram negatif) dan *S. sanguis* (bakteri Gram positif) (Indriani dkk. 2018).

Namun, saat ini belum diketahui aktivitas antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella terhadap bakteri *A. baumannii* dan *E. cloacae*. Sehingga, penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *E. cloacae* dan *A. baumannii* dilakukan.

I.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah ekstrak kelopak bunga rosella dapat menghambat pertumbuhan *E.cloacae* dan *A. baumannii* ?

I.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella dalam menghambat pertumbuhan *E.cloacae* dan *A.baumannii*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tanaman rosella

II.1.1 Taksonomi tanaman rosella

Saat ini terdapat lebih dari 100 varietas rosella yang tersebar diseluruh dunia. Tetapi rosella yang sering dijumpai orang adalah rosella merah. Dalam taksonomi tumbuhan, rosella merah diklasifikasikan sebagai berikut (Haidar, 2017):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Devisio	: Spermatophyta
Subdiviso	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvaceales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.
Varietas	: <i>Hibiscus Sabdariffa</i> Varietas sabdariffa L.



Gambar 1. Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Nurnasari.E, 2017)

II.1.2 Morfologi tanaman

Rosella merupakan tanaman semusim yang tumbuh tegak bercabang, batangnya bulat, tegak, berkayu, dan berwarna kemerah-merahan. Daunnya tunggal. Berbentuk bulat telur. Pertulangan menjari dan letaknya berseling dan pinggirannya bergerigi panjang dan 6-15 cm dan lebarnya 5-8 cm. Warna daun bervariasi, dari hijau gelap sampai kemerahan. Tangkai daun bulat berwarna hijau, dengan panjang 4-7 cm. Jika sudah dewasa, tanaman ini akan mengeluarkan bunga berwarna merah yang ujungnya berwarna agak gelap. Bunga ini dilengkapi dengan benang sari dan putik. Biji terdapat dalam cangkang, yang dilindungi oleh semacam kelopak lembut berwarna merah. Bagian bunga dan biji inilah yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Bunga rosella bertipe tunggal yaitu hanya terdapat satu kuntum bunga pada setiap tangkai bunga. Setiap bunga mempunyai 8-11 helai kelopak yang berbulu dengan panjang 1 cm, pangkal saling berketatan dan berwarna merah. Mahkota bunga rosella berwarna merah sampai kuning dengan warna yang lebih gelap (Nurnasari. Khuluq, 2018).

II.1.3 Kandungan dan manfaat

Rosella sebagai obat herba memiliki banyak manfaat. Hal ini dikarenakan kandungan berbagai zat penting yang dimilikinya. Rosella mengandung berbagai senyawa berkhasiat seperti, antioksidan, asam esensial, beta karoten, potassium, zat besi dan berbagai jenis vitamin. Selain kelopak bunga, daun, buah dan bijinya juga berperan sebagai

diuretik, antisariawan, dan pereda nyeri. Rosella memiliki kandungan antioksidan tinggi yang sangat dibutuhkan, semakin pekat warna merah pada kelopak bunga rosella, semakin tinggi kandungan antosianin (antioksidan). Antosianin yang berperan menjaga kerusakan sel akibat penyerapan sinar ultraviolet berlebih. Kelopak bunga rosella dapat diambil sebagai bahan minuman segar berupa sirup, teh, selai dan jenis minuman lainnya, terutama dari tanaman yang berkelopak bunga tebal, yaitu rosella merah. Kelopak bunga tersebut mengandung vitamin C, vitamin A, dan asam amino. Asam amino yang diperlukan tubuh, 18 diantaranya terdapat dalam kelopak bunga rosella, termasuk arginine dan lisin yang berperan dalam proses peremejaan sel tubuh. Selain itu, rosella juga mengandung protein dan kalsium. Kelopak bunga rosella juga diketahui membantu melancarkan peredaran darah dengan mengurangi derajat kekentalan darah. Hal ini terjadi karena adanya asam organik, polisakarida dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kelopak bunga rosella (Nurnasari. Khuluq, 2018).

II.2 *Enterobacter cloacae*

II.2.1 Klasifikasi *Enterobacter cloacae*



Gambar 2. *Enterobacter cloacae* (Warren, 2020)

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Negibacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Enterobacter*
Spesies : *Enterobacter cloacae* (Anonim, 2020)

II.2.2 Morfologi *Enterobacter cloacae*

Enterobacter adalah bakteri gram negatif. Bakteri genus ini memiliki bentuk batang yang pendek dan bagian ujung membulat, tebal 0,5-1,5 μm . memiliki banyak flagella, memiliki kapsul, dan bakteri ini termasuk bakteri motil (Pana, 2012).

Bakteri *Enterobacter* termasuk ke dalam bakteri anaerob fakultatif (dapat tumbuh dengan ada atau tidak adanya oksigen). Suhu pertumbuhannya yaitu 37°C. Selain itu bakteri ini mudah tumbuh pada media umum (Pana, 2012).

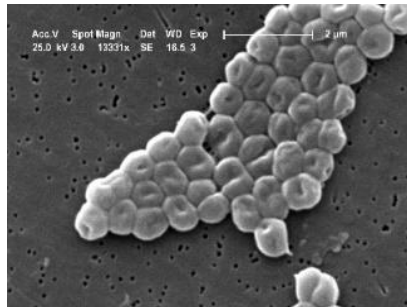
II.2.3 Patogenitas *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae menjadi penyebab infeksi nosokomial dalam tubuh. Patogenitasnya berkaitan dengan kemampuannya membentuk biofilm dan mensekresikan berbagai sitotoksin (enterotoksin, hemolisin, racun pembentuk pori). *Enterobacter cloacae* juga resistensi terhadap

beberapa golongan antibiotik seperti ampicillin, amoksisilin-asam klavulanat, sefalotin dan cefoksitin (Davini-Regli and Pagès, 2015) .

II.3 *Acinetobacter baumannii*

II.3.1 Klasifikasi *Acinetobacter baumannii*



Gambar 3. *Acinetobacter baumannii* (Joly-Guillou, 2015)

- Kingdom : Bacteria
- Subkingdom : Negibacteria
- Filum : Proteobacteria
- Kelas : Gammaproteobacteria
- Ordo : Pseudomonadales
- Famili : Morexellaceae
- Genus : *Acinetobacter*
- Spesies : *Acinetobacter baumannii* (Anonim, 2020)

II.3.2 Morfologi *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter adalah bakteri Gram negatif, bakteri non motil, berbentuk bulat dan basil. Tebal 1.5-2.5 μm . mudah tumbuh dimedia umum. Tidak memfermentasi gula. Oksidasi negatif, dan reduksi negatif. Umumnya ditemukan dilingkungan rumah sakit menyebabkan infeksi nosokomial (Joly-Guillou, 2015).

II.3.3 Patogenitas *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii menjadi penyebab utama infeksi nosokomial dan pneumonia dalam tubuh. dan menjadi penyebab yang tinggi terhadap penyakit invasif. Patogenisitasnya berhubungan dengan porin, polisakarida kapsuler dan lipopolisakarida, protein pengikat penisilin, sistem akuisisi logam dan sistem sekresi protein (Mahendra, 2016)

II.4 Metode pengujian antibakteri

Secara umum, metode pengujian aktivitas antibakteri terdiri atas dua yaitu metode difusi dan metode dilusi. Kedua metode terdiri dari (Balouiri, 2015):

II.4.1 Metode difusi

Metode Difusi terdiri atas tiga yaitu:

II.4.1.1 Metode difusi agar

Metode disk difusi agar dilakukan dengan menggunakan media agar yang diinokulasikan inokulum mikroorganisme uji. Kemudian kertas cakram (diameter 6 mm) yang mengandung senyawa uji dengan konsentrasi yang diinginkan diletakkan pada permukaan media agar. Cawan petri tersebut diinkubasi pada kondisi yang sesuai dan agen antimikroba akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.

Keuntungan metode disk difusi agar dibandingkan dengan metode lain adalah mudah, murah, tidak memerlukan peralatan khusus, dapat

menguji banyak mikroorganisme dan agen antimikroba, serta sangat mudah dalam menginterpretasikan hasil yang diperoleh. Namun kekurangannya yaitu metode ini tidak cocok digunakan dalam penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), dan tidak dapat membedakan efek bakterisidal dan efek bakteristatik (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).

II.4.1.2 Metode gradien antimikroba (*E-test*)

Metode gradien antimikroba menggabungkan antara prinsip metode dilusi dan metode difusi dalam menentukan nilai KHM. Metode ini digunakan dalam penentuan nilai KHM antibiotik, antifungi, antibakteri dan juga untuk mengetahui interaksi dari kombinasi antara dua agen antimikroba. Nilai KHM ditentukan dengan melihat perpotongan antara strip dan elips penghambatan pertumbuhan bakteri.

II.4.1.3 Metode kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi

Metode KLT-bioautografi terdiri atas metode kontak, bioautografi langsung, dan bioautografi pencelupan.

II.4.2 Metode dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang sangat cocok digunakan dalam menentukan nilai KHM, karena pada metode ini dapat diperkirakan konsentrasi senyawa antimikroba pada media agar maupun media cair. Metode dilusi secara garis besar terdiri atas metode dilusi cair dan dilusi padat.

II.4.2.1 Metode dilusi cair

Metode Dilusi Cair terbagi atas dua yaitu:

II.4.2.1.1 Metode makrodilusi

Metode makrodilusi digunakan dalam volume yang besar dalam tabung yang menggunakan medium cair dengan volume minimum 2 mL. Lalu tabung diinokulasikan dengan inokulum yang setara dengan standar 0,5 McFarland dan diinkubasi pada kondisi yang sesuai.

Kerugian metode makrodilusi dibandingkan dengan mikrodilusi adalah melelahkan, dilakukan secara manual, resiko terjadinya kesalahan pada pembuatan larutan uji, dibutuhkan banyak reagen serta ruang dalam melakukan metode ini dan metode ini umumnya tidak praktis untuk pengujian di sebagian besar laboratorium mikrobiologi klinis (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).

II.4.2.1.2 Metode mikrodilusi

Metode mikrodilusi dapat digunakan untuk mengukur secara kualitatif dan kuantitatif aktivitas antimikroba terhadap bakteri maupun fungi. Nilai KHM dinyatakan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (Balouiri, 2015).

Metode mikrodilusi cair merupakan salah satu metode paling dasar dalam pengujian aktivitas antimikroba. Metode ini dilakukan dengan menyiapkan pengenceran berkelipatan dua ke dalam media pertumbuhan cair pada *microplate*. Kemudian pada setiap *well* diinokulasikan dengan

mikroba yang telah disesuaikan dengan standar McFarland. Setelah itu, *well microplate* diinkubasi pada kondisi yang sesuai dengan mikroorganisme uji. Jika dibandingkan dengan metode dilusi lain seperti makrodilusi, kerugian dari metode makrodilusi yaitu membutuhkan waktu yang lama, beresiko terjadinya kesalahan dalam penyiapan larutan antimikroba pada setiap uji, dan juga dibutuhkan banyak media, reagen, dan ruang dalam pengujiannya. Kelebihan metode mikrodilusi yaitu lebih sensitif (Balouiri. 2015; Jorgensen & Turnidge., 2016).

Penentuan nilai KHM dari suatu antimikroba dapat dilakukan dengan menggunakan perangkat untuk membaca pengujian mikrodilusi dan mencatat hasil dengan baik dalam membedakan pertumbuhan mikroorganisme di dalam *well* dan dengan menggunakan reagen warna. Beberapa reagen warna yang dapat digunakan yaitu seperti reagen garam-garam tetrazolium dan resazurin (Balouiri. 2015).

II.4.2.2 Metode dilusi padat

Metode dilusi padat dilakukan dengan berbagai konsentrasi yang diinginkan ke dalam media agar (agar cair), yang biasa menggunakan pengenceran seri berlipat ganda dan di atas permukaan media padat diinokulasikan suspensi mikroba. Hasilnya dapat dilihat dari konsentrasi terendah senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini cocok jika digunakan dengan metode *E-test*, khususnya dalam pengujian antibakteri gram positif dan gram negatif.

Jika dibandingkan dengan metode dilusi lain seperti dilusi cair kontaminasi mikroba atau heterogenitas populasi lebih mudah dideteksi dengan metode dilusi agar daripada dengan metode dilusi cair. Kerugian utama dari metode dilusi agar yaitu membutuhkan waktu yang lama (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).