

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK AKAR
GANTUNG BAJAKAH (*Spatholobus sp.*)
TERHADAP PERTUMBUHAN
Staphylococcus aureus.**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY BAJAKAH AERIAL
ROOTS EXTRACT (*Spatholobus sp.*) ON
Staphylococcus aureus GROWTH.**

NURFADILLAH

N111 16 501



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

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK AKAR GANTUNG
BAJAKAH (*Spatholobus sp.*) TERHADAP PERTUMBUHAN
Staphylococcus aureus.**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY BAJAKAH PROP ROOTS EXTRACT
(*Spatholobus sp.*) ON *Staphylococcus aureus* GROWTH**

SKRIPSI

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

NURFADILLAH

N111 16 501

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK AKAR GANTUNG BAJAKAH
(*Spatholobus sp.*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*.**

* NURFADILLAH

N111 16 501

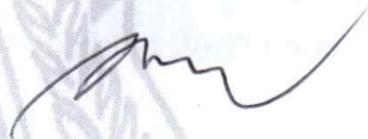
Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



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

Pembimbing Pendamping,



Dra. Rosany Tayeb M.Si., Apt.
NIP. 19561011 198603 2 002

Pada tanggal 10 Juni 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK AKAR GANTUNG
BAJAKAH (*Spatholobus sp.*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
*Staphylococcus aureus.***

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY BAJAKHAERIALROOTS
EXTRACT (*Spatholobus sp.*) ON
Staphylococcus aureus GROWTH**

Disusun dan diajukan oleh

**NURFADILLAH
N111 16 501**

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

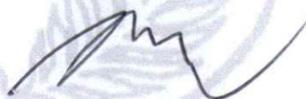
Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



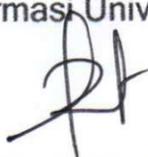
Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt
NIP. 19611111 198703 2 001



Dra. Rosany Tayeb M.Si., Apt
NIP. 19561011 198603 2 002



plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



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

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Akar Gantung Bajakah (*Spatholobus sp.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*." 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, 10 Juni 2021

Yang Menyatakan



Nurfadillah

N11116501

UCAPAN TERIMAKASIH

Segala puji atas Kehadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, berupa kesehatan, kekuatan ilmu yang sempurna dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan dan merampungkan skripsi ini. Syukur Alhamdulillah atas Hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Akar Gantung Bajakah (*Spatholobus sp.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus.*” telah selesai. Skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak kesulitan yang dihadapi, dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa syukur, dengan hormat dan tulus penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi - tingginya kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping atas keikhlasan serta kesabaran 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 Yuyu Mulsiani Evary, S.Si., M.Pharm Sci, Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan perbaikan kepada penulis.
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-sahabat dekat penulis selama berkuliah di Farmasi, Terkhusus untuk Mentari, Irda, Hesty, Ningrum, dan Meli yang menjadi tempat berbagi keluh kesah, canda tawa maupun kesedihan, menolong dan mendukung penulis dalam menyusun skripsi ini.
6. Teman-teman seperjuangan Neostigmine (2016) yang senantiasa menjadi tempat bertukar informasi, berbagi ilmu dan membantu dalam segala hal.

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 H. Burhanuddin Muhammad Lc. dan Ibunda Hj. Nurwahidah. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada suami penulis Andi Muhalim yang senantiasa memberikan doa dan dukungan untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Serta A. Muammar Qaddafi dan A. Fatimah Az-zahrah yang telah menjadi anak yang baik dan soleh. Dan serta saudara penulis dan pihak keluarga suami penulis yang terus memberikan semangat dalam penyelesaian 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, 10 Juni 2021



Nurfadillah

ABSTRAK

NURFADILLAH. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Akar Gantung (Spatholobus sp) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus.* (dibimbing oleh Sartini dan Rosany Tayeb).

Ekstrak tumbuhan dari *Spatholobus sp.* dapat menjadi sumber senyawa antimikroba baru yang memiliki aktivitas penghambat pertumbuhan pada bakteri *S. aureus*. sehingga dapat mengurangi potensi infeksi yang diakibatkan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak akar gantung bajakah (*Spatholobus sp.*) terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Ekstrak etanol akar gantung (*Spatholobus sp.*) di uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dalam *Microplate 48-wells* dan metode difusi menggunakan medium *Mueller Hinton Agar* dengan waktu inkubasi 1x24 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak akar gantung (*Spatholobus sp.*) memiliki KHM > 20 mg/mL (2%) terhadap *S. aureus*. serta memiliki diameter hambat 7,49 mm pada konsentrasi 20% (4mg/disk).

Kata Kunci: Ekstrak akar gantung bajakah, *Staphylococcus aureus*, KHM (Kadar Hambat Minimum), Zona Diameter Hambat.

ABSTRACT

NURFADILLAH. *Antibacterial activity evaluation of Spatholobus sp. prop roots extract on Staphylococcus aureus growth* (guided by Sartini and Rosany Tayeb).

Plant extracts from *Spatholobus sp.* can be a source of new antimicrobial compounds that have growth inhibitor activity on *S. aureus* bacteria. So that it can reduce the potential for infection caused. This research aims to determine the antibacterial activity of *Spatholobus sp.* Extract against *S. aureus*. The etanol extract of *Spatholobus sp.* was tested for its antibacterial activity against clinical isolate of *S. aureus* using mikrodilusi method to determine its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in Microplate 48- wells. The assay was followed with disk diffusion assay in Mueller Hinton Agar for 1 x 24 hours at 37°C using the same test bacteria. The results showed that *Spatholobus sp.* extract had KHM >20 mg/mL (2%) against *S. aureus* and has an inhibitory diameter zone of 7.49 mm at a concentration of 20% (4mg / disc)

Keywords: *Spatholobus sp* extract, *Staphylococcus aureus*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Diameter Inhibitor Zone.

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 Tumbuhan Bajakah	3
II.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
II.3 Ekstraksi	7
II.4 Metode Pengujian Antibakteri	9
BAB III METODE PENELITIAN	
III.1 Alat dan Bahan	13
III.2 Metode Kerja	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Hasil Ekstraksi	18

IV.1 Hasil Penentuan Nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) Ekstrak Akar Gantung Bajakah Dengan Menggunakan Metode Mikrodilusi	19
IV.2 Hasil Penentuan Diameter Hambat Ekstrak Akar Gantung Bajakah Dengan Menggunakan Metode Difusi Padat	21
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	24
V.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Ekstraksi	18
2. Hasil Penentuan Nilai KHM Ekstrak Bajakah Terhadap Pertumbuhan <i>S. aureus</i>	20
3. Hasil Penentuan Diameter Hambat Ekstrak Bajakah dengan Metode difusi padat	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bajakah	3
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Bajakah dengan menggunakan metode mikrodilusi terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	19
4. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Bajakah dengan menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	21
5. Hasil Uji Penegasan	35
6. Dokumentasi Pengambilan Sampel Bajakah	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

	Halaman
1. Skema Kerja Umum	28
2. Skema Kerja Penentuan Nilai KHM Ekstrak Akar Gantung Bajakah (<i>Spatholobus sp.</i>)	29
3. Skema Kerja Penentuan Daya Hambat Ekstrak Akar Gantung Bajakah (<i>Spatholobus sp.</i>)	30
4. Skema Kerja Pengenceran Sampel	31
5. Komposisi Medium	32
6. Gambar	33

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia terkenal dengan kekayaan alam yang melimpah. Salah satu keanekaragaman hayati berpotensi sebagai obat tradisional adalah tanaman bajakah (*Spatholobus sp.*). Bajakah merupakan tumbuhan yang semua bagiannya dapat dimanfaatkan (Ansari, 2012).

Menurut penelitian Maulina 2019, ekstrak metanol akar bajakah mengandung metabolit sekunder diantaranya: alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan fenolat. Ekstrak etanol akar bajakah diidentifikasi mengandung zat alkaloid, flavonoid, dan steroid (Iskandar, 2020). Terdapat 7 senyawa flavonoid yang diisolasi dari tumbuhan *Spatholobus sp.* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi memiliki aktifitas menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* (Park, 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tang (2012), ekstrak etanol bajakah memiliki 17 komponen kimia berupa flavonoid menggunakan instrumen kromatografi kolom. Terdapat 20 senyawa yang diisolasi dari akar gantung tumbuhan *Spatholobus sp.* yang kemudian diujikan terhadap bakteri *S. aureus* diperoleh 2 senyawa flavonoid, yaitu *7-hydroxy-6-methoxy flavanon . f ormononetin* yang dapat menghambat pertumbuhan *S.aureus* (Cho *et al.*, 2017).

Infeksi merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan peningkatan angka kematian (*mortality*) dan angka kesakitan (*morbidity*) di rumah sakit yang dapat menjadi masalah kesehatan di negara maju maupun negara berkembang (Darmadi, 2008). Semakin banyak patogen yang resisten terhadap antimikroba maka akan meningkatkan infeksi nosokomial yang memiliki biaya ekonomi global yang tinggi dalam sistem perawatan kesehatan dunia. Salah satu kasus peningkatan infeksi disebabkan oleh *S. aureus* (Sirijan Santajit and Nitaya Indrawattana, 2016)

Kandungan senyawa kimia pada tumbuhan juga tergantung pada lingkungan tempat tumbuh. Sehingga telah dilakukan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol akar gantung bajakah (*Spatholobus sp.*) dari Sangatta Kalimantan Timur terhadap pertumbuhan *S. aureus*.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol akar gantung bajakah (*Spatholobus sp.*) memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol akar gantung bajakah (*Spatholobus sp.*) dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tumbuhan Bajakah

II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan Bajakah (Tropicos, 1982)

Kingdom : Plantae
Devisio : Spermatophyta
Class : Dicotyledoneae
Subclass : Magnoliopsida
Superordo : Rosanae
Ordo : Fabales
Family : Fabaceae
Genus : *Spatholobus*
Spesies : *Spatholobus suberectus* Dunn.



Gambar 1. Tumbuhan Bajakah (Tropicos, 1982)

II.1.2 Morfologi Tumbuhan

Menurut Ninkaew dan Chantaranonthai (2014) genus *Spatholobus* tumbuh dan tersebar di hutan tropis Indonesia sebanyak 29 spesies. Bajakah pertama kali di temukan pada tahun 1842 oleh ahli botani Jerman yaitu Justus Karl Hasskarl. Bajakah termasuk dalam kategori genus *Spatholobus* yang merupakan tumbuhan merambat di pohon kayu dari suku *Phaseoleae*. Daun bajakah memiliki bentuk yang tajam dengan warna kuning, coklat, dan putih. Memiliki bunga yang kecil dengan variasi warna ungu, merah muda, dan putih. Bajakah tampala banyak ditemukan di tengah hutan Kalimantan (wilayah Indonesia maupun Malaysia). Berdasarkan genusnya, bajakah berkerabat dekat dengan genus *Vigna* yang vegetasi tumbuhnya di Pegunungan Kilimanjaro, Afrika. Sedangkan di Kalimantan, bajakah tumbuh merambat di pohon kayu dengan ketinggian hingga 50 meter (Allen,1981)

II.1.3 Kandungan dan Manfaat

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk (2017) diperoleh 7 isolasi senyawa yang 2 diantaranya dapat menghambat pembentukan *Sortase A* yaitu *formononetin* dan *7-Hydroxy-6-methoxyflavanone*. Tang dkk (2012) telah melaporkan bahwa *Spatholobus suberectus* mengandung senyawa asam, seperti asam protokatekuat dan flavonoid, seperti naringenin. Asam protokatekuat dapat digunakan sebagai agen pelindung melawan penyakit kardiovaskular dan neoplasma.

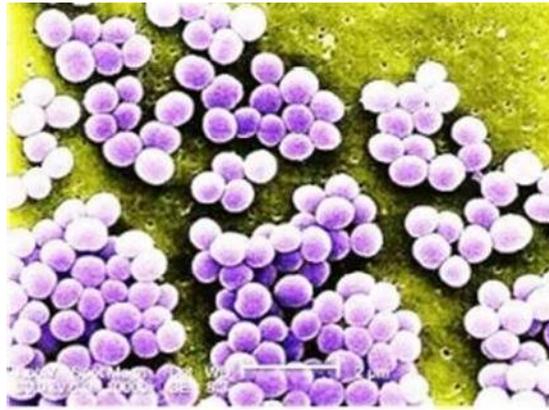
Spatholobus suberectus merupakan salah satu herbal tonik tertua yang telah banyak digunakan selama ratusan tahun sebagai suplemen dalam makanan, minuman serta resep obat (Li dkk, 2015). Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan, bajakah tampala positif pada uji fenolik, flavonoid, tannin dan saponin (Anshari, 2012) sehingga bagian akar gantung bajakah tampala dipercaya mampu menghentikan pendarahan pada luka. Saponin dan tannin dapat merangsang terjadinya *angiogenesis* (Majewska & Gendaszewska, 2011; Li, dkk., 2011) yang termasuk salah satu bagian pada proses penyembuhan luka (Morison, 2003). Ekstrak bajakah memiliki banyak manfaat seperti penghambatan tironase, anti inflamasi, serta mengandung senyawa fenolik, kuinon, dan steroid (Wang dkk, 2006).

II.2 Staphylococcus aureus

II.2.1 Klasifikasi Staphylococcus aureus

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, yaitu (Stierman, 2012):

Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Family : Staphylococcaceae
Genus : Staphylococcus
Spesies : *Staphylococcus aureus*.



Gambar 2. Bakteri *Staphylococcus aureus* (pembesaran 10000x)(Sumber: Stierman, 2012)

II.2.2 Morfologi Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang tumbuh dengan koloni yang khas, dan membentuk paket-paket sel pipih. Bakteri ini biasanya ditemukan pada kulit, saluran pernapasan, dan saluran pencernaan. Karena kemampuannya untuk beradaptasi dengan berbagai kondisi lingkungan, bakteri ini menjadi salah satu penyebab paling umum dari infeksi manusia. *Staphylococcus aureus* tumbuh membentuk rantai dan dapat menyebabkan masalah kesehatan umum seperti sakit tenggorokan, impetigo, penyakit kulit menular, bisul dan infeksi telinga tengah. (Djide dan Sartini, 2014;Lakhundi, 2018).

S. aureus merupakan bakteri gram positif berupa kokus dengan diameter 0,7-1 μm yang tersusun dalam kelompok tidak beraturan seperti anggur, bersifat anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri *S. aureus* tumbuh pada suhu optimum 37°C, dan koloni yang terlihat pada pembedahan agar warna menjadi kuning keemasan. (Montville and Matthews, 2008).

Pertumbuhan dan kelangsungsn hidup bakteri *S.aureus* tergantung pada sejumlah faktor lingkungan seperti suhu, pH, adanya oksigen dan komposisi makanan. Kisaran suhu untuk pertumbuhan bakteri *S.aureus* adalah 20°C - 44°C, dengan optimum 37°C dengan pH pertumbuhan yaitu 7,4. *S.aureus* adalah anaerob fakultatif sehingga dapat tumbuh pada kondisi aerobik dan anaerobik. Namun, pertumbuhan terjadi pada tingkat yang lebih lambat dalam kondisi anaerob (Kumar dkk.,2012).

II.3 Ekstraksi

II.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian senyawa kimia yang terdapat didalam bahan alam atau berasal dari dalam sel dengan menggunakan pelarut dan metode yang tepat (FI IV).

II.3.2 Prinsip Setiap Jenis Ekstraksi

Adapun prinsip setiap teknik ekstraksi, yaitu (Azmir ddk, 2013):

II.3.2.1 Soxhlet

Ekstraktor soxhlet pertama kali diperkenalkan oleh ahli kimia Jerman Franz Ritter Von Soxhlet pada tahun 1879 yang dirancang untuk ekstraksi lipid, akan tetapi untuk saat ini fungsinya tidak terbatas lagi. Ekstraksi Soxhlet telah banyak digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dari berbagai sumber alam. Umumnya, jumlah sampel kering yang digunakan sedikit, lau ditempatkan pada di chamber ekstraksi kemudian ditempatkan dalam labu destilasi yang berisi pelarut tertentu.

Setelah pelarut mencapai batas atas, pelarut akan menuju siphon. Zat terlarut tetap di destilasi pada labu dan pelarut kembali membasahi tanaman. Proses berjalan berulang kali hingga ekstraksi selesai.

II.1.1.1 Maserasi

Maserasi menjadi cara yang populer dan murah untuk mendapatkan minyak esensial dan senyawa bioaktif. Pengadukan sesekali dalam maserasi bertujuan agar meningkatkan difusi, serta menghilangkan larutan pekat dari permukaan sampel untuk membawa pelarut baru ke dalam menstrum (cairan penyari) untuk hasil ekstraksi yang lebih banyak.

II.1.1.2 Hydrodistillation

Hidrodestilasi adalah metode tradisional untuk ekstraksi senyawa bioaktif dan minyak esensial dari tumbuhan. Pelarut organik tidak digunakan dan dapat dilakukan sebelum dehidrasi tanaman. Dalam distilasi air, bahan tanaman dikemas dalam kompartemen diam, lalu ditambahkan air secukupnya dan kemudian dididihkan. Sebagai alternatif, uap langsung diinjeksikan ke dalam sampel. Air panas dan uap berfungsi sebagai bahan utama yang berpengaruh dalam membebaskan senyawa bioaktif jaringan tanaman. Hidrodistilasi melibatkan tiga faktor utama (proses fisikokimia); Hidrodifusi, hidrolisis dan dekomposisi oleh panas.

II.2 Metode pengujian antibakteri

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

II.2.1 Metode difusi

II.2.1.1 Metode difusi agar

Metode disk difusi agar mulai dikembangkan sejak tahun 1940 yang dilakukan dengan menggunakan media agar yang diinokulasikan inokulum mikroorganisme uji.

Kemudian kertas cakram diameter 6 mm yang didalamnya mengandung senyawa uji dengan konsentrasi yang diinginkan diletakkan pada permukaan media agar. Cawan petri tersebut diinkubasi pada kondisi yang sesuai sehingga 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 pengerjaan yang mudah, biaya murah, tidak memerlukan peralatan khusus, dapat menguji banyak mikroorganisme dan agen antimikroba, serta sangat mudah dalam menginterpretasikan hasil yang diperoleh. Adapun kekurangannya dari metode ini yaitu tidak cocok digunakan dalam penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), dan tidak dapat membedakan efek bakterisidal dan efek bakteriostatik (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).

II.4.1.2 Metode Gradien Antimikroba (*E-test*)

Metode gradien antimikroba memiliki prinsip metode dilusi dan metode difusi dalam menentukan nilai KHM. Metode ini digunakan dalam penentuan nilai KHM antibiotik, antifungi, antimikobakteri dan juga untuk mengetahui interaksi dari kombinasi antara dua agen antimikroba. Penentuan nilai KHM yaitu dengan melihat perpotongan antara strip dan elips penghambatan pertumbuhan bakteri (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).

II.4.1.3 Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Bioautografi

Metode KLT-bioautografi terdiri atas metode kontak, bioautografi langsung, dan bioautografi pencelupan (Balouiri, 2015 ; Jorgensen & Turnidge, 2016).

II.2.2 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang tepat dalam menentukan nilai KHM. Dalam metode ini, konsentrasi senyawa antimikroba pada media agar maupun media cair dapat ditentukan, sehingga terdapat beberapa variasi konsentrasi yang dapat diujikan. Metode dilusi secara garis besar terdiri atas metode dilusi cair dan dilusi padat.

II.2.2.1 Metode Dilusi Cair

II.2.2.1.1 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, pengerjaannya manual, resiko terjadinya kesalahan pada pembuatan larutan uji, dibutuhkan banyak reagen serta ruang dalam melakukan metode makrodilusi.

II.2.2.1.2 Metode mikrodilusi

Metode mikrodilusi cair adalah salah satu metode paling dasar untuk menguji aktivitas antibakteri. Metode ini dilakukan dengan menyiapkan pengenceran bertingkat dua dalam media pertumbuhan cair pada *microplate*. Kemudian, setiap sumur diinokulasi dengan mikroorganisme yang disesuaikan dengan standar *McFarland*. Setelah itu, *microplate* diinkubasi dalam kondisi yang sesuai untuk pengujian mikroorganisme. Dibandingkan dengan metode pengenceran lainnya (seperti makrodilusi), kekurangan dari metode ini adalah waktu pengerjaan yang lama, risiko kesalahan dalam penyiapan larutan antimikroba untuk setiap pengujian, dan sejumlah besar medium, reagen dan ruang pengujian. Keuntungan dari metode pengenceran mikro adalah 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.2.2.2 Metode Dilusi Padat

Metode ini dilakukan dalam media agar (agar cair) dalam berbagai konsentrasi yang diinginkan, biasanya menggunakan pengenceran seri bertingkat dan kemudian menginokulasi suspensi mikroorganisme pada permukaan media padat. Hasilnya dapat dilihat pada konsentrasi senyawa antimikroba terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Balouiri. 2015).

Metode ini cocok untuk metode E-test, terutama pada uji 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).