

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri koliform yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* merupakan bakteri enterik atau bakteri yang dapat hidup dan bertahan di dalam saluran pencernaan. Beberapa *strain* bakteri ini memberikan manfaat bagi manusia, misalnya mencegah kolonisasi bakteri patogen pada pencernaan manusia. Namun, ada beberapa kelompok lain yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia, yang dikenal sebagai *Escherichia coli* patogen. *Escherichia coli* patogen pertama kali teridentifikasi pada tahun 1935 sebagai penyebab diare (Winiarti dkk, 2018).

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Prokaryotae*

Divisi : *Gracilicutes*

Kelas : *Scotobacteria*

Ordo : *Eubacteriales*

Famili : *Enterobacteriaceae*

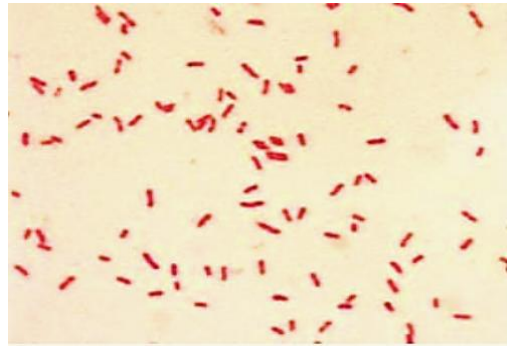
Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli* (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.2 Morfologi

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan ukurannya berkisar antara 1,0 hingga 1,5 μm x 2,0 hingga 6,0 μm , *Escherichia coli* dapat bersifat non-motil atau motil dengan flagela, bersifat fakultatif anaerob dan dapat tahan pada media yang miskin nutrisi. Karakteristik biokimia lainnya adalah kemampuannya untuk memproduksi indol, kurang mampu memfermentasi sitrat, bersifat negatif pada analisis urease dan tumbuh baik pada *Mac Conkey Agar* (MCA) dengan koloni berbentuk bulat dan cembung, halus dengan tepian yang nyata serta memfermentasi laktosa. Bakteri *Escherichia coli* sering ditemukan di

saluran pencernaan manusia dan hewan. Berdasarkan susunan fisiologisnya, bakteri *Escherichia coli* dapat bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang sulit. *Escherichia coli* berkembang biak di tanah, air tawar, dan air asin (Rahayu *et al.* 2018).



Gambar 2.1 Bakteri *E.coli* di bawah mikroskop perbesaran 100×
(Sumber: Mahon CR *et al.*, 2015)

2.1.3 Patogenitas

Kemampuan organisme untuk memicu penyakit disebut sebagai patogenitas (Yusnita dkk., 2022). Bakteri *Escherichia coli* dapat menimbulkan tanda-tanda penyakit jika bakteri tersebut mampu menyusup ke dalam tubuh inang dan mampu beradaptasi serta bertahan hidup di dalam tubuh manusia, kemudian menyerang sistem imun dan akhirnya menimbulkan penyakit. Seperti mikroorganisme patogen lainnya, proses patogenesis ini terjadi dalam beberapa tahap. Tahapan tersebut adalah kolonisasi pada titik tertentu di bagian sel permukaan usus (sel mukosa), pembelahan sel, perusakan sel usus, melintasi sel usus dan memasuki aliran darah, penambatan ke organ target dan akhirnya menyebabkan kerusakan organ. Sifat patogenik *Escherichia coli* dikelompokkan ke dalam beberapa jenis berdasarkan pada mekanisme patogenitas, virulensi, dan sindrom klinis yang ditimbulkan. Seperti telah disebutkan sebelumnya, berdasarkan patogenitasnya, *Escherichia coli* dibedakan ke dalam enam jenis yaitu:

A. Enterotoksigenik *Escherichia coli* (ETEC)

Diare pada manusia dan hewan disebabkan oleh *Escherichia coli* enterotoksigenik. Jalur oral-feses merupakan cara penyebaran *Escherichia coli* enterotoksigenik. Makanan atau air di sekitar yang terkontaminasi ETEC relatif tinggi biasanya merupakan sumber penularan ETEC ke bayi atau anak-anak.

B. *Enteropatogenik Escherichia coli* (EPEC)

Enteropatogenik Escherichia coli (EPEC) merupakan bakteri penyebab diare dan biasanya dijumpai di negara-negara berkembang. Bakteri ini dapat menyebabkan diare parah pada bayi yang berlangsung lebih dari dua minggu dan dapat berakibat fatal jika anak tersebut mengalami dehidrasi berat. Ciri utama EPEC adalah kemampuannya untuk merusak mikrovili usus, yang menyebabkan luka (menempel-menipis) di sistem pencernaan.

C. *Enterohemoragik Escherichia coli* (EHEC)

Enterohemoragik Escherichia coli merupakan salah satu jenis *Escherichia coli* penyebab diare atau kolitis berdarah pada manusia yang berujung pada sindrom hemolitik uremik (*Hemolytic Uremic Syndrom/HUS*). Sindrom HUS adalah penyebab dari gagal ginjal akut pada anak-anak dan kematian pada orang dewasa.

D. *Enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvasif Escherichia coli teridentifikasi pertama kali pada tahun 1944. Van den Beld dan Reubsaet (2018) menyatakan bahwa strain EIEC memiliki beberapa ciri biokimia seperti strain *Escherichia coli* patogen lainnya tetapi EIEC juga memiliki kemampuan sebagai penyebab disentri dengan mekanisme invasi yang sama seperti *Shigella*.

E. *Enteroagregatif Escherichia coli* (EAEC)

Enteroagregatif Escherichia coli teridentifikasi pertama kali pada tahun 1983 dan diketahui sebagai penyebab diare pada tahun 1987. Jenis bakteri ini berhubungan erat dengan diare akut pada anak-anak dan merupakan penyebab dari kasus diare *traveller* kedua setelah ETEC.

F. *Difusi Adheren Escherichia coli* (DAEC)

Difusi Adheren Escherichia coli adalah penyebab diare pada anak usia 18 bulan hingga 5 tahun. Adanya DAEC dalam tubuh orang dewasa (saluran pencernaan) tidak mengakibatkan gejala infeksi (asimtomatik) berbanding terbalik dengan anak-anak, hal tersebut karena anak-anak dibawah 5 tahun masih memiliki struktur dan fungsi epitel usus yang belum kokoh (Rahayu dkk., 2018).

2.1.4 Penanganan Infeksi Bakteri *Escherichia coli*

Salah satu pilihan pengobatan untuk infeksi bakteri adalah antibiotik. Jika antibiotik diberikan dengan tepat, antibiotik akan bekerja sebaik mungkin. Pemberian antibiotik rasional biasanya sesuai indikasi, dosis, interval, durasi, dan harga. Peneliti Hilda dan Berliana (2015) menyatakan bahwa salah satu antibiotik yang masih sensitif adalah Ciprofloxacin sedangkan antibiotik yang telah resisten pada beberapa jenis bakteri termasuk *Escherichia coli* antibiotik golongan beta laktam seperti ampicillin dan penicillin, dan golongan lainnya seperti erythromycin, tetracycline, dan nitrofurantoin. Ciprofloxacin adalah antibiotik kelas fluoroquinolone yang diperoleh secara sintetis. Ciprofloxacin efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif dan gram positif dengan cara mencegah proses replikasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA/Asam nukleat deoksiribosa) yaitu dengan mengikatkan diri pada suatu enzim yang disebut *DNA gyrase* (sebuah tipe II *topoisomerase*) yang mengakibatkan kerusakan ganda pada kromosom bakteri (Cempakasari dkk., 2024).

Antibiotik juga merupakan salah satu obat yang kerap kali menimbulkan efek samping dalam penggunaan jangka panjang. Bila dosis kecil sudah dapat menyebabkan efek samping, sehingga memberikan keraguan dalam pengobatan karena menyebabkan tingkat keberhasilan terapi yang bervariasi (Ratman, Untari & Robiyanto, 2019). James Collins, seorang insinyur medis di Institut Teknologi Massachusetts di Cambridge, toksisitas antibiotik memunculkan pemahaman bahwa antibiotik tidak hanya membahayakan mikroba, tetapi juga bisa merusak sel manusia (Kabbani *et al.*, 2018). Antibakteri alternatif sangat diperlukan dari ekstrak tanaman dengan senyawa kimia flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid/steroid yang berguna sebagai antibakteri (Satriyani, 2021).

2.2. Tanaman Kelor

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Beragam jenis tumbuhan yang tumbuh berpotensi memberikan manfaat bagi kehidupan manusia, satu di antaranya yaitu kelor (Adisty dkk., 2024). Kelor (*Moringa oleifera*) dikenal sebagai *The Miracle Tree* atau pohon ajaib karena secara alamiah terindikasi merupakan sumber gizi yang berkhasiat sebagai obat dengan kandungan gizi yang berbeda dengan tanaman pada umumnya. Setiap bagian dari

tanaman kelor dapat dimanfaatkan secara efektif (Paliwa dkk., 2018). Kelor merupakan tanaman yang berasal dari kaki gunung Himalaya bagian barat laut India dan Pakistan. Tanaman kelor sudah umum dikenal dan tersebar ke Asia Tenggara sehingga kelor dapat dengan baik beradaptasi di lingkungan tropis, termasuk di Indonesia (Dani *et al.*, 2019).



Gambar 2.2 Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*)
(Sumber: shutterstock.com)

Terdapat berbagai nama tanaman kelor pada setiap daerah di Indonesia yaitu kelor di daerah Sunda, Jawa, Lampung, dan Bali, Maronggih di Madura, Moltong di Flores, Kelero di Bugis, Ongga di daerah Bima, Murong atau Barunggai di daerah Sumatera dan Hauf di wilayah Timur (Dani *et al.*, 2019). Salah satu bagian dari tanaman ini yang sudah banyak diteliti kandungan gizi dan manfaatnya adalah daunnya. Daun kelor diyakini dapat dimanfaatkan sebagai bahan alami antibakteri karena memiliki senyawa kimia seperti saponin, tanin, dan flavonoid yang mempunyai mekanisme kerja merusak membran sel bakteri enteropatogen dengan meningkatkan permeabilitas dari dinding sel bakteri hingga bakteri lisis (Kenconoaji, 2019).

2.2.1 Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman kelor Menurut Integrated Taxonomic Information System (2017), adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Subdivisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Ordo : *Brassicales*

Familia : *Moringaceae*
Genus : *Moringa*
Spesies : *Moringa oleifera* Lamk

2.2.2 Morfologi

Tanaman kelor merupakan pohon berkayu lunak yang berdiameter 30 cm. Daun tanaman kelor berukuran kecil, berbentuk telur, menyirip tidak sempurna, dan sebesar ujung jari. Anak daunnya berbentuk oval atau oval terbalik, panjang 1-3 cm, lebar 4 mm hingga 1 cm, dengan tepi rata, pangkal membulat, dan ujung tumpul. Warnanya berkisar antara hijau hingga hijau kecokelatan. Bagian dalam akar berwarna kuning pucat dengan garis-garis kecil, tetapi berkilau dan melintang, dan kulit akarnya memiliki rasa dan aroma yang menyengat dan pedas. Kayunya berwarna coklat muda atau krem berserat, sebagian besar terpisah, akarnya sendiri tidak keras, bentuknya tidak beraturan, dan permukaan luar kulitnya cukup licin dengan permukaan bagian dalam yang agak berserat (Marhaeni, 2021).

Dengan sinar matahari yang cukup, suhu rata-rata 25 hingga 30°C sangat ideal untuk pembentukan daun dan polong biji. Ketinggian hingga 600 meter di atas permukaan laut dan curah hujan tahunan 1.000 hingga 2.000 milimeter cocok untuk pertumbuhan kelor. Meskipun lebih mudah tumbuh di tanah berpasir, kelor relatif toleran terhadap banyak jenis tanah. Kelor tumbuh subur pada tanah dengan pH netral tetapi dapat bertahan pada pH tanah 4,5–9 (Kurniawan, 2019).

2.2.3 Kandungan Kimia

Dalam daun kelor terdapat beberapa kandungan kimia, diantaranya flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid/steroid serta mengandung protein, zat besi, vitamin, mineral, kalsium, zink, dan fosfor (Rachmawati dkk., 2019). Tanaman kelor memiliki salah satu kandungan yang paling berkhasiat adalah antioksidan, terutama pada bagian daunnya yang mengandung antioksidan tinggi yaitu vitamin E (α -tokoferol) (Yulis S, 2019). Daun kelor mengandung zat kimia aktif yang juga memiliki sifat antimikroba. Kandungan flavonoid pada daun kelor memiliki kemampuan untuk merusak membran sitoplasma bakteri, sehingga menyebabkan pelepasan metabolit penting, inaktivasi sistem enzim bakteri, dan akhirnya kematian bakteri (Susanty *et al.*, 2019). Alkaloid berfungsi sebagai

antibakteri dengan mengganggu fungsi komponen peptidoglikan dalam sel bakteri. Hal ini mencegah dinding sel bakteri tetap utuh dan mengakibatkan kematian sel (Anggraini *et al.*, 2019).

Tanin merupakan zat lain yang ditemukan dalam daun kelor. Dengan mengurangi ukuran dinding sel dan mengganggu permeabilitas sel, zat kimia tanin menghentikan pertumbuhan bakteri. Sel tidak dapat tumbuh dengan baik dikarenakan permeabilitas terganggu, sehingga pertumbuhannya terhambat atau mati (Sujana *et al.*, 2024). Dengan memecah membran sel, molekul saponin juga memiliki sifat antimikroba. Pelarut polar atau semipolar dapat digunakan untuk mengekstrak saponin, yang merupakan bahan kimia polar yang ditemukan pada tanaman. Daun kelor juga mengandung senyawa kimia terpenoid. Terpenoid berfungsi sebagai antibakteri dengan bereaksi dengan protein transmembran yang disebut porin pada membran di luar dinding sel bakteri dan menciptakan ikatan polimer kuat yang merusak porin. Ketika porin, yang berfungsi sebagai titik masuk dan keluar bahan kimia, rusak, permeabilitas dinding sel bakteri menurun. Hal ini menghilangkan nutrisi bakteri, yang menghambat atau membunuh perkembangan bakteri (Putri *et al.*, 2023).

2.2.4 Manfaat

Tanaman kelor telah digunakan sejak jaman dahulu sebagai obat untuk mencegah ataupun menyembuhkan berbagai penyakit karena manfaatnya (Hidayati, 2021). Masyarakat ataupun ahli obat tradisional dari beberapa daerah di Indonesia seringkali memanfaatkan beberapa ramuan berbahan baku kelor untuk menyembuhkan luka, beri-beri, demam, gangguan kulit, pegal linu, kurang darah dan lain-lain. Beberapa pemanfaatan tradisional saat ini telah dilakukan penelitian ilmiahnya berdasarkan uji praklinik dan diantaranya sampai ke tahap uji klinik. Berdasarkan data saintifikasi khasiat atau aktivitas farmakologi kelor adalah sebagai penyembuh luka, antianemia, antiinflamasi, antipiretik, analgetik, antimikroba dan lain sebagainya (BPOM, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh M Fajri yang berjudul “*The potential of Moringa oleifera as immune booster against COVID 19*” terbukti bahwa daun kelor ini telah dimanfaatkan untuk obat herbal tradisional dari sejak dulu, daun kelor juga ditemukan sebagai bahan makanan untuk menghindari malnutrisi. Dalam jurnalnya

jua menyatakan daun kelor memiliki fungsi sebagai antidiuretik, antipiretik, antiinflamasi, antikanker dan antibakteri.

2.3. Simplisia

Simplisia merupakan bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum diolah dengan cara apapun, dengan kata lain berupa bahan yang telah dikeringkan (Aulia dkk., 2024). Tiga golongan simplisia berdasarkan asal bahan bakunya yaitu simplisia nabati yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan, simplisia hewani yang berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana (Rosmini dkk., 2021). Afriliah dkk., (2022) menyatakan bahwa kualitas simplisia dipengaruhi oleh bahan baku simplisia dan proses pembuatannya. Pembuatan simplisia dapat dibagi menjadi beberapa tahapan yaitu:

1. Pengumpulan bahan simplisia

Panen daun dilakukan saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, ditandai dengan tanaman yang berbunga atau buah mulai masak. Dianjurkan pucuk daun dipanen pada saat telah berwarna hijau tua.

2. Sortasi basah

Pemilahan hasil panen ketika tanaman masih segar atau sesaat setelah panen disebut sebagai tahapan sortasi basah. Sortasi berguna untuk memisahkan simplisia dengan campuran benda lain seperti tanah atau kerikil, rumput-rumputan, bahan tanaman lain atau bagian lain dari tanaman yang tidak diperlukan dan bagian tanaman yang rusak.

3. Pencucian

Pencucian daun kelor bermanfaat untuk membersihkan kotoran, tanah, mikroba dan pestisida yang melekat pada simplisia. Tahapan sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi kualitas simplisia.

4. Pengubahan bentuk

Pengubahan bentuk bentuk simplisia bertujuan untuk memperluas permukaan bahan baku. Perluasan permukaan bahan baku dapat diperoleh melalui proses perajangan dengan pisau atau dengan mesin hingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang diharapkan.

5. Pengerinan

Proses ini bertujuan untuk menurunkan kadar air agar tidak mudah ditumbuhi mikroba, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan kandungan zat aktif simplisia dan mempermudah proses pengolahan selanjutnya. Pengerinan daun kelor dapat dilakukan dengan beberapa teknik pengerinan antara lain:

a. Pengerinan di bawah sinar matahari secara tidak langsung

Sinar ultra violet dari matahari dapat menyebabkan kerusakan zat aktif dalam daun dan biji kelor yaitu senyawa flavonoid. Keuntungan cara ini adalah biaya yang hemat namun kelemahannya adalah sangat bergantung pada cuaca.

b. Pengerinan di tempat teduh

Teknik pengerinan ini memanfaatkan udara alami untuk penguapan air. Cara ini dapat menjaga aroma dan warna asli daun dan biji kelor. Waktu yang relatif lama karena penguapan air lebih lambat dan berpotensi tumbuhnya kapang-khamir merupakan kelemahan teknik ini.

c. Pengerinan dengan oven

Pengerinan dengan oven dapat diatur pada suhu 30-60°C, namun untuk simplisia daun, suhu sebaiknya tidak lebih dari 50°C. Proses ini lebih baik dilakukan pada kelembaban 30-60%. Paparan dengan suhu tinggi dapat mengurangi kualitas bahan yang dihasilkan karena terjadi perubahan biokimia pada bahan serta biaya tinggi karena perlu pasokan energi, hal ini merupakan kelemahan dari teknik pengerinan ini (BPOM, 2016).

6. Sortasi kering

Sortasi kering merupakan tahapan pemilihan bahan setelah melalui proses pengerinan. Sortasi kering bertujuan untuk menghilangkan simplisia yang terlalu gosong atau rusak.

7. Pengepakan dan penyimpanan

Tahapan yang dilakukan setelah tahap pengerinan dan sortasi kering adalah pengepakan. Tahapan ini berfungsi untuk penyimpanan simplisia dalam wadah khusus guna menghindari kotoran dan debu bercampur dengan simplisia (Maslahah, N. 2024).

2.4. Ekstrak

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV, ekstrak kering merupakan sediaan yang dibuat dari tumbuhan atau hewan dengan cara pemekatan dan pengeringan ekstrak cair hingga mencapai kadar yang diinginkan dengan menggunakan metode yang memenuhi syarat. Sedangkan ekstrak merupakan sediaan kental yang dibuat dengan mengekstrak senyawa aktif dari simplisia tumbuhan atau hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian seluruh atau hampir seluruh pelarut diuapkan dan sisa massa atau serbuk diolah hingga memenuhi standar yang ditetapkan. Dengan penambahan bahan tambahan yang tidak berbahaya, penyusunan sediaan sering ditentukan oleh jumlah komponen aktif (Dewi & Farida, 2021).

2.5. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pengambilan zat aktif dari suatu tanaman, hewan, atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang tepat. Pemilihan pelarut yang tepat merupakan langkah krusial dalam prosedur ekstraksi. Dengan mempertimbangkan sejumlah kriteria, termasuk kemampuan mengekstraksi, pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat mengekstrak sebagian besar metabolit sekunder yang dibutuhkan dalam simplisia. Pelarut lebih disukai untuk melarutkan senyawa-senyawa yang tingkat kepolarannya sama dalam simplisia, sesuai dengan konsep *like dissolves* (Dewatisari, 2020). Pelarut adalah cairan yang memiliki kemampuan untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Larutan pekat akan terdorong keluar akibat zat aktif terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses ini akan terus berulang hingga konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel seimbang (Agustien, GS, & Susanti, S. 2022).

Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Etil Asetat Daun Kelor

No	Senyawa Kimia	Hasil Pengamatan	Kesimpulan
1	Flavonoid	Terbentuk warna kuning	+
2	Alkaloid	Terbentuk endapan bewarna jingga	+
3	Tanin	Tidak terdapat perubahan warna	-
4	Saponin	Terbentuk buih yang stabil	+
5	Terpenoid	Terbentuk lapisan cincin warna ungu	+

Sumber: (Tutik *et al.*, 2018)

Keterangan: (+) = terdapat golongan senyawa
(-) = tidak terdapat golongan senyawa

Etil asetat digunakan sebagai pelarut dalam penelitian ini. Zat kimia yang memiliki sifat antibakteri, termasuk flavonoid, alkaloid, saponin, dan terpenoid, dapat diekstraksi menggunakan pelarut semipolar. Karena etil asetat merupakan pelarut semipolar dengan toksisitas minimal, ia dapat menarik zat polar dan nonpolar dari daun kelor. Cairan bening, tidak berwarna dengan aroma yang unik, etil asetat digunakan sebagai pelarut untuk tinta, perekat, dan resin. Koefisien dispersi etil asetat lebih besar daripada etanol (Nst, SLA, & Sutri, R. 2015).

2.6. Maserasi

Berdasarkan pada sifat dan tujuannya, ekstraksi dapat dilakukan dengan sejumlah cara ekstraksi panas dan dingin (Syamsul *et al.*, 2020). Sementara maserasi, perkolasi, dan sokletasi digunakan untuk ekstraksi dingin, refluks dan destilasi uap digunakan untuk ekstraksi panas (Mubarokah *et al.*, 2023). Maserasi merupakan teknik ekstraksi yang umum dalam penelitian. Teknik ini sering digunakan karena lebih mudah diolah, tidak memerlukan peralatan yang mahal, dan tidak melibatkan pemanasan, sehingga kandungan kimia simplisia yang akan diekstraksi aman. Menurut Handoyo (2020), maserasi merupakan prosedur penghilangan simplisia dengan merendamnya dalam pelarut sambil diaduk sering pada suhu kamar.

2.7. Uji Aktivitas Antibakteri

Untuk mengetahui apakah antibiotik antibakteri dapat menghambat bakteri uji, digunakan uji aktivitas antibakteri (Widyaningsih dan Nugrahani, 2019). Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat (Maryadi, Yusuf, dan Farida, 2017). Metode difusi dan dilusi sering digunakan untuk menilai aktivitas antibiotik (Zada, 2021).

2.7.1 Metode Difusi

Metode ini menggunakan kemampuan difusi senyawa antimikroba pada plat agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji untuk mengetahui tingkat aktivitas bakteri. Hasil pengamatan akan berupa terbentuk atau tidaknya

zona hambat di sekitar bahan antimikroba pada titik tertentu selama masa inkubasi. Salah satu teknik yang sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri adalah metode difusi. Ada dua cara umum untuk menggunakan pendekatan ini, yaitu:

A. Metode Difusi Cakram

Kertas cakram digunakan dalam prosedur ini sebagai media untuk menyerap zat antimikroba yang jenuh dengan zat uji. Setelah agar terinfeksi mikroorganisme uji, kertas plat diletakkan di atasnya dan diinkubasi selama 18 hingga 24 jam pada suhu 35°C. Ada atau tidaknya perkembangan mikroba ditentukan dengan melihat area bening atau area di sekitar plat kertas. Metode difusi cakram memiliki kelebihan yaitu lebih hemat biaya, praktis, dan tidak memerlukan peralatan khusus (Nurhayati *et al.*, 2020).

B. Metode Sumuran

Teknik ini melibatkan pembuatan lubang pada agar padat yang telah diinokulasikan bakteri uji pada sudut tegak lurus. Lubang-lubang tersebut diisi dengan sampel yang akan dievaluasi setelah jumlah dan penempatannya dimodifikasi untuk memenuhi tujuan penelitian. Pertumbuhan bakteri dipantau setelah inkubasi untuk menentukan apakah ada zona penghambatan.

Tabel 2.2 Kategori daya hambat bakteri menurut Davis-Stout

Daya hambat bakteri	Kategori
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

Sumber: (Sakul dkk, 2020)

2.7.2 Metode Dilusi

Metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan zat anti mikroba dengan media agar, yang selanjutnya diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh adalah tumbuh tidaknya mikroba pada media tersebut. Aktivitas zat anti mikroba ditentukan dengan melihat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang merupakan konsentrasi terkecil zat anti mikroba uji yang

masih memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji. Metode ini terdiri dari dua metode, yaitu:

A. Dilusi Cair

Metode ini digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Langkah-langkah yang digunakan dalam pengujian ini adalah zat anti mikroba yang akan digunakan diencerkan terlebih dahulu kemudian direaksikan dengan mikroba yang diuji (Hasanah, 2022).

B. Dilusi Padat

Metode ini digunakan untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Langkah-langkah yang digunakan dalam pengujian ini adalah membuat media agar yang diisi dengan zat antibakteri kemudian diinokulasikan dengan mikroba yang diuji (Hasanah, 2022).