

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. *Black Garlic*

Bawang putih termasuk dalam genus *Allium* dan famili Amaryllidaceae. Nama ilmiah botani untuk bawang putih adalah *Allium sativum* L. Di berbagai daerah atau kelompok etnis di Indonesia. Dalam bahasa Inggris, bawang putih dikenal sebagai garlic, sementara di beberapa negara lain, nama yang digunakan serupa dengan di Indonesia, misalnya bawang putih (Malaysia), bawang (Filipina), dan galik (Papua Nugini) (Rukmana, 2019).

Keanekaragaman flora Indonesia menawarkan peluang besar untuk dikembangkan sebagai sumber bahan alami yang bermanfaat bagi kesehatan. Bawang putih telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional untuk berbagai penyakit. Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan bagian dari keluarga Alliaceae, yang telah dikenal selama berabad-abad dan dibudidayakan untuk berbagai tujuan, termasuk kuliner, medis, dan kegiatan keagamaan. Bawang putih menempati posisi penting di antara sayuran yang berperan dalam menjaga kesehatan manusia (Ayalew *et al.*, 2015). Bawang putih memiliki bau dan rasa yang khas, cara alternatif yang dapat dilakukan untuk menghilangkan sifat khas bawang putih tersebut adalah melalui pengolahan yaitu dengan perlakuan panas (heat treatment) yang mampu meningkatkan rasa dan menciptakan kualitas baru dari bawang putih tanpa menghilangkan komponen zat gizi bawang putih mentah yang dikenal dengan nama *black garlic*. *Black garlic* memiliki warna hitam, ringan karena kandungan bahan keringnya rendah dan mempunyai aroma serta rasa yang tidak terlalu menyengat (sweet-sour), (Nelwida *et al.*, 2019).

#### 1. Klasifikasi Tanaman

|          |                                         |
|----------|-----------------------------------------|
| Kerajaan | : Plantae                               |
| Divisi   | : Spermatophyta                         |
| Kelas    | : Monocotyledonae                       |
| Ordo     | : Liliales (Liliflorae)                 |
| Famili   | : Liliaceae                             |
| Genus    | : <i>Allium</i>                         |
| Spesies  | : <i>Allium sativum</i> (Rukmana, 2019) |



**Gambar 1** *Black Garlic*  
(Dewa Ayu & Ni Nyoman, 2020)

## **2. Morfologi *Black Garlic***

Tanaman ini merupakan jenis herba yang tumbuh lurus hingga ketinggian antara 30 dan 60 cm dan cenderung tumbuh bergerombol. Sistem akarnya terdiri dari serat-serat pendek yang tidak menembus dalam ke dalam tanah. Karena sifat akarnya, bawang putih rentan terhadap kekeringan. Daunnya datar, kecil, halus, tanpa lubang, dan sedikit melengkung ke dalam. Selubung daunnya tipis dan menutupi selubung daun yang lebih muda di bagian dalam, membentuk batang palsu. Selubung daun ini juga melingkupi umbi-umbian kecil di bagian bawah tanaman. Umbi-umbian kecil ini bergabung membentuk umbi yang lebih besar dan bulat. Dasar umbi berbentuk cakram, yang pada dasarnya merupakan batang utama yang tidak sempurna. Dari batang ini, akar serabut tumbuh secara horizontal. Akar serabut ini berfungsi utama untuk menyerap nutrisi dan bukan untuk mencari air di dalam tanah yang dalam (Khairani A, 2018).

## **3. Karakteristik *Black Garlic***

Bawang hitam, yang juga dikenal sebagai bawang hitam, adalah produk makanan fermentasi yang dibuat dari bawang putih yang diproses pada suhu dan kelembapan tertentu. Proses fermentasi ini memicu perubahan pada komposisi nutrisi bawang putih, sehingga bawang hitam memiliki manfaat yang berbeda dan lebih luas. Bawang hitam menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi, baik in vivo maupun in vitro. Produk ini kaya akan polisakarida, memiliki kandungan gula yang rendah, dan mengandung berbagai jenis protein, senyawa fenolik, dan belerang. Kandungan polifenol

dalam bawang putih hitam bahkan enam kali lebih tinggi daripada dalam bawang putih biasa, seperti yang dinyatakan oleh (Lu *et al.*, 2017).

Perubahan fisiko-kimia dari bawang putih menjadi bawang putih hitam cukup mencolok. Secara fisik, bawang putih hitam berwarna coklat gelap hingga hitam, memiliki rasa manis, dan tekstur seperti jelly, seperti yang dijelaskan oleh (Sailah and Miladulhaq, 2021). Rasa pedas yang kuat dari allicin pada bawang putih segar berkurang akibat penurunan kandungan allicin selama fermentasi. Selain itu, proses ini menghasilkan senyawa tambahan, termasuk antioksidan seperti alkaloid bioaktif dan flavonoid. Bawang hitam juga mengalami peningkatan total padatan terlarut, penurunan pH, dan pengurangan kandungan air.

#### **4. Senyawa Bioaktif *Black Garlic***

Profil fitokimia bawang hitam, berdasarkan standar referensi, meliputi senyawa seperti aliin, allicin, S-allyl-L-cysteine (SAC), quercetin, dan asam galat. Di sisi lain, bawang putih segar tidak mengandung SAC, meskipun senyawa ini terdapat dalam jumlah kecil pada bawang putih biasa. Namun, kandungan SAC meningkat 5-10 kali lipat setelah diolah menjadi bawang putih hitam. SAC merupakan senyawa belerang utama yang diidentifikasi pada bawang putih hitam (Pramekamon Lizam & Yingmanee Tragoolpua, 2022).

#### **5. Proses Fermentasi *Black Garlic***

Proses fermentasi bawang hitam dilakukan dengan mengontrol waktu, suhu, dan kelembapan tertentu, yang menghasilkan produk yang ditunjukkan pada. Fermentasi ini berlangsung pada suhu 60°C hingga 90°C dengan kelembapan 80-90% (Kimura *et al.*, 2017). Durasi fermentasi bawang hitam umumnya berkisar antara 21 hingga 22 hari pada suhu 67°C dan kelembapan 90%. Proses ini mengubah warna bawang dari putih menjadi hitam kecokelatan akibat reaksi Maillard. Reaksi Maillard adalah interaksi antara gula reduksi dan asam amino yang dipicu oleh pemanasan (De Cássia Mirela *et al.*, 2017).

Reaksi Maillard memainkan peran krusial dalam pembentukan rasa dan warna pada berbagai produk makanan. Hasil reaksi ini tidak hanya

memberikan rasa dan aroma yang menarik, tetapi juga dapat berfungsi sebagai antioksidan. Reaksi Maillard melibatkan tiga tahap utama: pembentukan glikosilamin, diikuti oleh dehidrasi glikosilamin menjadi turunan furan, redukton, dan senyawa karbonil lainnya, dan akhirnya transformasi furan dan karbonil menjadi senyawa yang membentuk rasa dan warna (Rosida, 2016).

Prosedur pembuatan bawang putih hitam menurut Nelwida *et al.*, (2019) untuk membuat bawang putih hitam, mulailah dengan memilih dan menyortir siung bawang putih yang telah dikupas, pastikan tidak ada yang busuk, dan pilih ukuran yang seragam agar pemanasan merata dan matang secara bersamaan. Bungkus setiap siung bawang putih secara terpisah dengan aluminium foil, lalu letakkan dalam rice cooker (magic com) yang disetel pada suhu sekitar 60°C hingga penuh. Nyalakan rice cooker sesuai dengan durasi fermentasi bawang putih, yaitu sekitar 22 hari. Fermentasi dianggap berhasil jika bawang putih berubah warna menjadi hitam. Setelah itu, keluarkan bawang hitam dari rice cooker dan dinginkan pada suhu ruangan.

#### 6. Manfaat *Black Garlic*

Senyawa aktif yang terdapat dalam bawang hitam memiliki potensi sebagai agen antifungal, antibakteri, dan antioksidan, serta memberikan berbagai manfaat kesehatan lainnya. Aktivitas antioksidan bawang hitam, yang diukur dengan nilai TEAC, meningkat hingga 4,5 kali lipat dibandingkan dengan bawang putih segar. Selain itu, kandungan polifenol meningkat sekitar 4,19 kali dan kandungan flavonoid meningkat hingga 4,77 kali (Kimura *et al.*, 2017).

Dibandingkan dengan bawang putih segar, *black garlic* memiliki rasa yang lebih lembut karena kandungan allicin berkurang selama proses fermentasi. Senyawa ini kemudian berubah menjadi berbagai senyawa antioksidan seperti alkaloid bioaktif dan flavonoid. Perubahan fisiko-kimia ini merupakan faktor utama dalam peningkatan bioaktivitas *black garlic* dibandingkan dengan bawang putih segar (Kimura *et al.*, 2017).

Bawang putih segar mengandung  $\gamma$ -glutamyl-S-allylcysteine (GSAC), yang dapat dihidrolisis dan dioksidasi menjadi alliin. Setelah bawang putih

dihancurkan, dipotong, dikunyah, atau dipanaskan, allicin diubah menjadi allicin oleh enzim allinase. Proses pemanasan juga memicu konversi GSAC menjadi S-allyl cysteine (SAC). Kandungan SAC dalam *black garlic* berperan penting dalam memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif dan membantu mencegah berbagai penyakit degeneratif seperti gangguan kardiovaskular, kanker, stroke, dan penyakit lainnya (Kimura *et al.*, 2017).

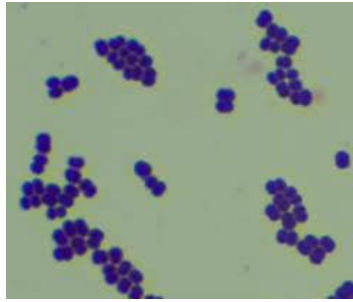
## **B. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* termasuk dalam keluarga Staphylococcaceae. Bakteri ini bersifat Gram-positif, berbentuk bulat, dan umumnya tersusun dalam kelompok yang menyerupai anggur. *Staphylococcus* dapat tumbuh secara optimal pada berbagai media kultur bakteri, baik dalam kondisi aerobik maupun anaerobik, pada suhu 37°C. Pada media padat, koloni yang terbentuk berbentuk bulat dengan permukaan halus, cembung, dan berkilau. Koloni *Staphylococcus aureus* biasanya berwarna abu-abu atau kuning keemasan. Selain menghasilkan pigmen kuning, *Staphylococcus aureus* dapat dibedakan dari spesies *Staphylococcus* lainnya melalui uji koagulase, kemampuan fermentasi mannitol, dan uji deoksiribonuklease (Santosaningsih *et al.*, 2020).

### **1. Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*:**

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| Domain  | : Bacteria              |
| Kingdom | : Eubacteria            |
| Phylum  | : Firmicutes            |
| Class   | : Bacilli               |
| Ordo    | : Bacillales            |
| Family  | : Staphylococcaceae     |
| Genus   | : Staphylococcus        |
| Spesies | : Staphylococcus aureus |

Bakteri *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai patogen yang dapat menyebabkan berbagai infeksi, termasuk endokarditis, infeksi kulit, infeksi saluran kemih, infeksi saluran pencernaan, infeksi pernapasan, dan infeksi aliran darah. *Staphylococcus aureus* dengan sel berbentuk kokus berdiameter 0,5 hingga 1,0 mm (Karimela *et al.*, 2017).



**Gambar 2** Pewarnaan gram stain bakteri *Staphylococcus aureus*  
(Fuad abdilah & Kurniawan, 2022)

## **2. Penyakit Yang Disebabkan Bakteri *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang sering menjadi penyebab berbagai infeksi di seluruh dunia. Infeksi yang ditimbulkannya ditandai dengan kerusakan jaringan dan pembentukan abses yang berisi nanah. Infeksi yang ditimbulkannya bervariasi dari ringan hingga parah.

### **a. Infeksi ringan**

#### **1) Jerawat**

Jerawat adalah kondisi kulit yang sering muncul di wajah, leher, dada, dan punggung. Kondisi ini terjadi akibat produksi minyak kulit yang berlebihan, yang menyebabkan pori-pori tersumbat. Bakteri penyebab jerawat akan tumbuh dalam perpaduan ini dan berkembang biak. Jika tetap dibiarkan, pori-pori yang tersumbat akan membengkak dan mengeluarkan nanah (Wardania, Malfadinata & Fitriana, 2020).

#### **2) Abses (Furunculosis)**

Abses adalah jenis infeksi kulit yang biasanya disebabkan oleh bakteri, terutama *Staphylococcus aureus*.

#### **3) Impetigo**

Impetigo vesikular adalah infeksi piogenik akut pada kulit yang menyerang lapisan luar epidermis dan sangat menular. Penyakit ini disebabkan oleh eksotoksin dari *Staphylococcus aureus* yang masuk melalui luka pada kulit (Imaligy, 2015)

## **b. Infeksi Parah**

### **1) Pneumonia**

Pneumonia adalah peradangan akut yang menyerang jaringan paru-paru, termasuk parenkim, bronkiolus pernapasan, dan alveoli. Sebagian besar kasus pneumonia disebabkan oleh infeksi bakteri, terutama *Staphylococcus aureus*.

### **2) Bakteremia**

Bakteremia adalah kondisi di mana bakteri hidup terdeteksi dalam aliran darah. Kondisi ini dapat berkembang menjadi infeksi berat yang berpotensi menyebabkan sepsis (Holderman *et al.*, 2017).

### **3) Stomatitis Gigi Palsu**

Stomatitis gigi palsu adalah kondisi yang sering dialami oleh pengguna gigi palsu yang dapat dilepas. *Staphylococcus aureus*, bakteri Gram-positif yang secara alami terdapat dalam mikroflora normal, dapat bertindak sebagai pemicu infeksi, termasuk stomatitis gigi palsu (Arum Lintang *et al.*, 2020).

## **3. Patogenesis *Staphylococcus aureus***

Patogenesis *Staphylococcus aureus* berkaitan dengan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit, yang dikenal sebagai patogenisitas. Sifat ini tercermin dalam tingkat virulensinya, yang ditentukan oleh karakteristik struktural, biokimia, dan genetik bakteri tersebut. Selama proses infeksi, komponen ekstraseluler dan dinding sel *S. aureus* bekerja secara bersamaan untuk mengekspresikan faktor virulensi pada berbagai tahap. Pada fase kolonisasi awal, bakteri mengekspresikan adhesin pada dinding sel, seperti protein A, protein pengikat fibrinogen dan fibronectin, serta protein pengikat kolagen yang termasuk dalam kelompok MSCRAMM. Sementara itu, pada tahap infeksi selanjutnya, produksi berbagai toksin berperan dalam penyebaran ke jaringan, termasuk hemolisin, lipase, protease, dan jenis toksin lainnya.

Secara umum, terdapat dua mekanisme utama yang mendasari patogenisitas bakteri dalam menyebabkan penyakit. Yang pertama adalah kemampuan untuk menginvasi, yaitu proses di mana bakteri memasuki

jaringan. Proses ini mencakup kolonisasi awal melalui pelekatan dan perbanyakan, produksi zat ekstraseluler yang mendukung invasi (invasin), serta kemampuan untuk menghindari atau melawan sistem pertahanan inang. Yang kedua adalah kemampuan untuk memproduksi toksin, atau toksigenesis. Bakteri dapat memproduksi dua jenis toksin: eksotoksin dan endotoksin. Beberapa toksin ini dapat bekerja secara langsung di lokasi kolonisasi sekaligus mendukung proses invasi (Muhammad Anas, 2018).

#### 4. Diagnosis Laboratorium

Identifikasi *Staphylococcus aureus* merupakan langkah penting dalam mendiagnosis infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini. Proses identifikasi tersebut melibatkan serangkaian uji laboratorium, termasuk pemeriksaan mikroskopis, uji biokimia, dan kultur bakteri pada berbagai media.

##### a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan langkah pertama dalam identifikasi bakteri. Dalam uji ini, *Staphylococcus aureus* tampak sebagai bakteri berwarna ungu berbentuk kokus (bulat), yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk dalam kelompok Gram-positif. Selain itu, susunan khasnya yang menyerupai buah anggur berfungsi sebagai ciri tambahan yang membantu proses identifikasi mikroskopis.

##### b. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk membedakan genus *Staphylococcus* dari *Streptococcus*. Dalam uji ini, *Staphylococcus aureus* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gelembung gas setelah penambahan larutan hidrogen peroksida. Reaksi ini menunjukkan adanya enzim katalase, yang memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

##### c. Uji Koagulase

Uji koagulase adalah uji spesifik spesies yang sangat penting untuk mengidentifikasi *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini menghasilkan enzim koagulase, yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin, sehingga menghasilkan pembentukan gumpalan. Hasil positif dalam uji ini

merupakan ciri pembeda utama yang membedakan *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya.

d. Kultur pada Media Agar

Uji kultur dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada berbagai media agar untuk mengamati karakteristik pertumbuhannya dan morfologi koloninya. Pada Nutrient Agar, *Staphylococcus aureus* biasanya membentuk koloni berwarna kuning keemasan. Pada Blood Agar, bakteri ini menunjukkan hemolisis beta, yang ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar koloni. Sementara itu, pada Mannitol Salt Agar, *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasi mannitol, sehingga media berubah menjadi kuning. Pengamatan ini sangat membantu dalam mengonfirmasi hasil identifikasi bakteri (Octifani *et al.*, 2024).

## C. Ekstraksi

### 1. Definisi ekstraksi

Proses ekstraksi pada dasarnya melibatkan transfer massa dari komponen padat yang terdapat dalam bahan baku obat ke pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik menembus dinding sel dan kemudian masuk ke ruang di dalam sel tumbuhan tempat zat aktif disimpan. Zat aktif tersebut kemudian larut dalam pelarut organik di luar sel, sebelum akhirnya berdifusi ke dalam pelarut. Siklus ini berulang secara terus-menerus hingga tercapai keseimbangan konsentrasi zat aktif antara bagian dalam dan luar sel.

### 2. Tujuan Ekstraksi

Tujuan utama ekstraksi adalah untuk memperoleh semua zat aktif dan komponen kimia yang terkandung dalam bahan baku obat (bahan baku). Saat menentukan apa yang ingin dicapai dari proses ekstraksi, ada beberapa hal penting yang perlu dipertimbangkan:

a. Mencari Kelompok Senyawa Kimia Tertentu

Ekstraksi dapat dilakukan dengan tujuan khusus untuk menemukan kelompok senyawa sekunder tertentu yang terkandung dalam bahan baku obat, seperti alkaloid atau flavonoid. Cara awal untuk mengetahui hal ini adalah dengan mencari informasi dalam buku atau penelitian (studi literatur). Untuk memastikan hasil yang akurat, ekstrak yang

diperoleh harus diuji lebih lanjut melalui pemeriksaan kimia atau analisis kromatografi yang sesuai dengan jenis senyawa yang dicari.

b. **Metode Pengolahan Asli Organisme (Tumbuhan atau Hewan)**

Dalam pengobatan tradisional, bahan baku obat sering diolah dengan cara direbus atau diseduh dalam air.

### **3. Jenis-Jenis Ekstraksi**

a. **Berdasarkan bentuk substansi dalam campuran**

1) **Ekstraksi Padat-Cair**

Mekanisme ekstraksi ini dimulai dengan adsorpsi pelarut pada permukaan sampel. Proses ini dilanjutkan dengan difusi pelarut ke dalam matriks sampel, yang kemudian melarutkan analit (zat target) melalui interaksi antara analit dan pelarut. Tahap berikutnya melibatkan difusi kompleks analit-pelarut menuju permukaan sampel, diikuti dengan desorpsi (pelepasan) kompleks analit-pelarut dari permukaan sampel ke dalam massa pelarut. Transfer kompleks analit-pelarut ke permukaan sampel terjadi sangat cepat begitu sampel bersentuhan dengan pelarut. Kesuksesan proses ekstraksi ini sangat ditentukan oleh karakteristik bahan alami dan sifat kimia zat yang akan diekstraksi.

2) **Ekstraksi Cair-Cair**

Ekstraksi cair-cair, yang juga dikenal sebagai ekstraksi pelarut, adalah teknik pemisahan yang didasarkan pada prinsip distribusi atau pemisahan analit antara dua pelarut yang tidak saling larut. Metode ini bertujuan untuk memisahkan suatu senyawa dari campuran fase cair menggunakan pelarut cair lainnya. Prinsip utamanya terletak pada perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam dua pelarut yang berbeda. Selain digunakan untuk pemisahan preparatif, teknik ini juga penting dalam pemisahan analitik, misalnya untuk menghilangkan komponen pengganggu dalam analisis kimia, mengkonsentrasikan analit sebelum analisis, atau menghasilkan spesies yang dapat diukur dalam prosedur analitik.

**b. Berdasarkan penggunaan panas****1) Ekstraksi Secara Dingin**

Metode ekstraksi dingin dirancang khusus untuk mengekstrak senyawa dari tanaman obat yang termolabil, yaitu zat-zat yang mudah rusak atau tidak stabil saat terpapar panas. Proses ekstraksi tanpa pemanas ini dapat dilakukan dengan beberapa teknik, termasuk:

**a. Maserasi**

Maserasi adalah teknik ekstraksi yang paling sederhana. Proses ini dilakukan dengan merendam bahan herbal dalam satu pelarut atau campuran beberapa pelarut. Perendaman ini dilakukan selama periode waktu tertentu, pada suhu ruangan, dan harus dilindungi dari paparan cahaya.

**b. Perkolasi**

Perkolasi adalah metode ekstraksi zat aktif secara dingin dengan mengalirkan pelarut secara terus-menerus melalui bahan herbal mentah. Aliran pelarut ini berlangsung selama periode waktu tertentu.

**2) Ekstraksi Secara Panas**

Metode ekstraksi panas hanya diterapkan jika senyawa yang terkandung dalam bahan obat mentah telah dikonfirmasi tahan terhadap suhu tinggi. Beberapa metode ekstraksi yang memerlukan pemanasan meliputi:

**a. Digestasi**

Digestasi adalah teknik ekstraksi dengan prosedur yang mirip dengan macerasi. Perbedaannya terletak pada penggunaan pemanasan suhu rendah, berkisar antara 30°C hingga 40°C. Metode ini umumnya digunakan untuk bahan baku yang diketahui mudah diekstraksi pada suhu di atas suhu ruangan normal.

b. Dekokta

Proses ekstraksi dekokta mirip dengan teknik infus, tetapi terdapat perbedaan dalam durasi pemanasan. Waktu pemanasan untuk dekok lebih lama daripada infus, yaitu 30 menit, dimulai saat cairan mencapai 90°C. Metode ini kini jarang digunakan karena dianggap kurang optimal dalam proses ekstraksi dan tidak dapat diterapkan untuk mengekstrak senyawa termolabil (sensitif panas).

c. Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut pada titik didihnya. Proses ini dilakukan dalam waktu dan volume pelarut yang telah ditentukan, serta melibatkan penggunaan kondensor refluks atau kondensor. Teknik ini biasanya diulang 3 hingga 5 kali pada sisa ekstraksi pertama. Dengan pengulangan ini, refluks dianggap sebagai salah satu proses ekstraksi yang menghasilkan ekstraksi yang cukup sempurna (M Riza, 2022).

#### **D. Uji Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas antibakteri adalah prosedur yang bertujuan untuk menentukan diameter zona sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Secara umum, terdapat berbagai metode yang dapat diterapkan untuk mengevaluasi efektivitas antibakteri suatu senyawa obat.

##### **1. Metode Dilusi**

Metode ini dilakukan dengan mencampurkan zat antimikroba ke dalam media agar, kemudian menanamkan mikroba uji ke dalamnya. Pengamatan hasil menunjukkan apakah mikroba tumbuh atau tidak dalam media. Aktivitas zat antimikroba ditentukan melalui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM). Metode ini berguna untuk mendeteksi jumlah mikroba yang tinggi. Metode dilusi cocok untuk mengisolasi bakteri dari spesimen biologis atau mengidentifikasi bakteri spesifik dalam campuran kompleks. Metode dilusi dibagi menjadi dua jenis, yaitu:

a. Dilusi Cair

Metode Pengenceran Cair adalah teknik yang digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) suatu zat antimikroba.. Prosedur ini melibatkan persiapan serangkaian pengenceran dari sampel yang mengandung populasi bakteri (yang berasal dari spesimen kompleks atau koloni campuran). Agen antimikroba ditambahkan ke medium cair yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Secara teknis, pengenceran cair juga dikenal sebagai pengenceran berurutan yang dilakukan dalam serangkaian tabung. Tabung-tabung ini diisi dengan suspensi atau populasi bakteri pada konsentrasi yang bervariasi. Untuk pengujian, zat yang diduga memiliki aktivitas antibakteri harus diencerkan hingga konsentrasi berurutan tertentu dalam medium cair. Setelah itu, mikroba uji diinokulasi ke dalam media cair dan diinkubasi dalam kondisi waktu dan suhu optimal untuk pertumbuhannya. Hasil uji ini aktivitas antibakteri dinyatakan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) suatu zat antimikroba.

b. Dilusi Padat

Metode dilusi padat menggunakan media padat dalam pengujian. Keuntungan utama metode ini adalah memungkinkan satu konsentrasi agen antibakteri diuji terhadap beberapa jenis bakteri uji secara bersamaan. Dalam praktiknya, zat antibakteri yang telah diencerkan dicampurkan ke dalam medium agar dan dituang ke dalam cawan petri hingga mengeras. Setelah agar mengeras, bakteri uji ditanam (biasanya dengan cara meneteskan atau menggaris) di permukaan medium, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai. Konsentrasi terendah dari larutan antibakteri yang terbukti secara efektif menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

## 2. Metode Difusi

Metode ini merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:

### a. Metode Kirby-Bauer

Kirby-Bauer adalah prosedur yang paling sering digunakan untuk menentukan kemampuan suatu zat dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Teknik ini menggunakan cakram kertas kecil yang diimpregnasi dengan senyawa uji (antimikroba) dan ditempatkan pada media agar yang telah diinokulasi secara merata dengan mikroorganisme. Senyawa aktif dalam cakram akan menyebar ke dalam medium. Jika senyawa tersebut efektif, zona jernih (zona penghambatan) akan terbentuk di sekitar cakram, menandakan area di mana pertumbuhan bakteri telah terhenti. Sebaliknya, area yang keruh menunjukkan bahwa bakteri masih dapat tumbuh. Keunggulan metode ini terletak pada kemudahan penyesuaiannya untuk menguji berbagai jenis senyawa. Cakram yang digunakan tidak hanya dapat berupa antibiotik standar (sebagai perbandingan atau kontrol positif), tetapi juga cakram kosong yang direndam dalam ekstrak alami pada konsentrasi tertentu untuk menguji aktivitasnya.

**Tabel 1** Klasifikasi zona hambat

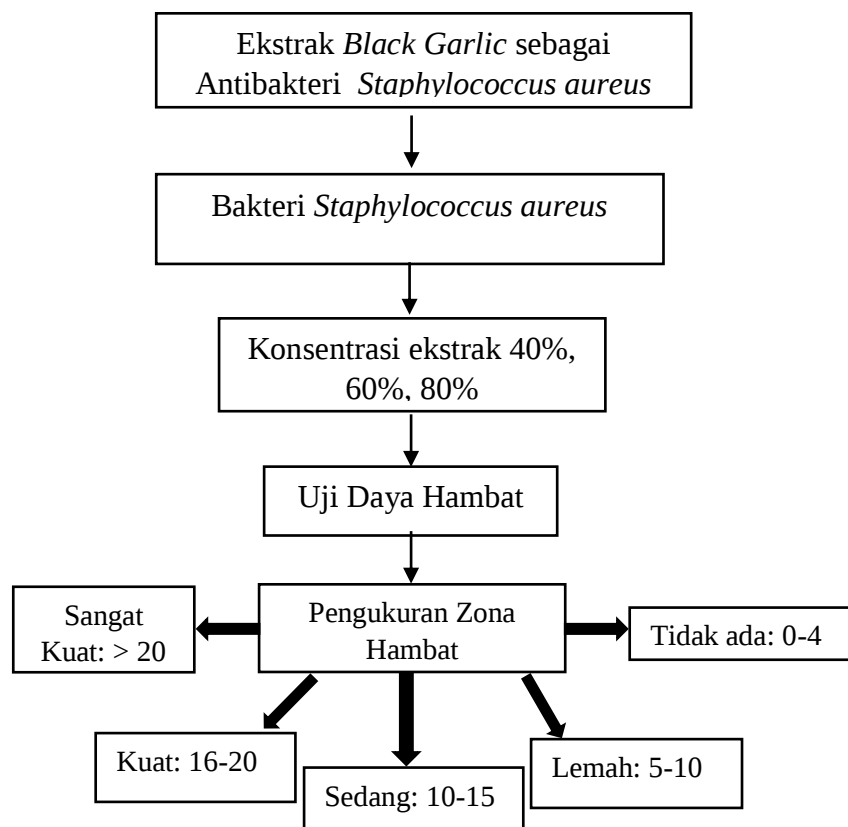
| <b>Luas Zona Hambat<br/>(mm)</b> | <b>Kategori</b> |
|----------------------------------|-----------------|
| >20                              | Sangat kuat     |
| 16-20                            | Kuat            |
| 10-15                            | Sedang          |
| 5-10                             | Lemah           |
| 0-4                              | Tidak ada       |

### b. Metode difusi sumur

Metode difusi sumur adalah teknik uji difusi alternatif yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri suatu senyawa. Dalam prosedur ini, media agar yang telah diinokulasi secara merata dengan bakteri uji

dibuat menjadi lubang atau “sumur” menggunakan alat pemotong media dengan diameter yang telah ditentukan. Sumur-sumur tersebut kemudian diisi dengan larutan yang mengandung senyawa uji, baik senyawa antibakteri murni maupun ekstrak dari bahan alami. Setelah diisi, media diinkubasi pada suhu dan waktu optimal untuk pertumbuhan mikroba. Aktivitas antibakteri senyawa uji ditandai dengan adanya zona jernih (zona penghambatan) di sekitar sumur. Luas atau diameter zona jernih ini merupakan indikator kuantitatif seberapa efektif senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (Rosalina Vivi, 2023).

#### E. Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 3** Kerangka Konsep Penelitian