

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jeruk Bali

Nama lain untuk Jeruk Bali, juga dikenal sebagai *Citrus grandis* (L.) Osbeck, diklasifikasikan menjadi *C. Maxima* (Burm.) Merr., *C. decumana* L., *C. aurantium* var. *grandis* L., dan *C. aurantium* var. *grandis* L. Tanaman ini termasuk dalam famili Rutaceae, subfamili Aurantioideae var. *decumana* L., genus *Citrus*, sub suku (subtribe) *Citrinae*. Buah hesperidium mereka memiliki kulit keras dan kaku di bagian dalam buah dan kantong jus (Niyomdham, et al., 2018).



Gambar 2.1 Buah jeruk bali (*C. Maxima*) (Sumber :Dokumen pribadi)

2.1.1 Klasifikasi Ilmiah

Secara ilmiah, tumbuhan jeruk bali diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (tumbuhan)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (berkeping dua/dikotil)
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Familia	: <i>Rutaceae</i> (suka jeruk-jerukan)
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus maxima</i>

2.1.2 Morfologi tanaman jeruk bali

Pohon tingginya antara 3 dan 10 meter, dengan ranting berduri dan duri berbentuk paku pendek. Helaian daun berbentuk ellipitis, bulat, atau memanjang, dengan ujung tumpul atau meruncing tumpul, dan sering melekok ke dalam lemah, dengan tepi beringgit melekok ke dalam. Tangkai daun berukuran antara 0,5 dan 3,5 cm panjangnya. Mahkota bunga yang berwarna putih atau kuning. Buah bola atau bola bertekanan berdiameter 4 hingga 7,5 cm, berwarna kuning kotor, orange, atau hijau dengan kuning, dengan kulit tebal 0,3 hingga 0,5 cm, dan daging buah berwarna kuning muda, orange kuning, atau kemerah-merahan, dengan gelembung yang bersatu (Backer, 2021).

2.1.3 Manfaat dan kandungan buah jeruk bali

Jeruk bali mengandung asam folat, vitamin B, provitamin A, vitamin B1, dan B2. Komponen tambahan seperti likopen, pektin, dan flavonoid Kulit luar jeruk bali banyak mengandung kelenjar minyak, dan juga mengandung senyawa metabolit sekunder yang mencegah kanker, mengurangi risiko penyakit jantung, melancarkan saluran pencernaan, menjaga kesehatan kulit, menghindari kontipasi, mengurangi kolesterol, dan anemia.

2.2 Jeruk Lemon

Salah satu anggota keluarga sitrus, lemon memiliki kulit kuning cerah dan rasa asam manis yang khas. Lemon memiliki banyak nutrisi yang tidak hanya enak dan segar, tetapi juga baik untuk tubuh. Nama ilmiah buah jeruk adalah Citrus limon, dan jenis buah ini memiliki rasa yang kuat dan asam. Di Indonesia, jeruk limun juga disebut buah jeruk atau limun. Itu dapat tumbuh dengan baik. Kulit buah, bunga, daun, dan sari jeruk lemon adalah bagian tanaman yang sering digunakan (Nurlaelly, 2016).



Gambar 2.2 Buah jeruk lemon(*C.limon*) (Foto: Sumber pribadi)

2.2.1 Klasifikasi ilmiah

Secara ilmiah, tumbuhan jeruk lemon diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (tumbuhan)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (berkeping dua/dikotil)
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Familia	: <i>Rutaceae</i> (suka jeruk-jerukan)
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus limon</i>

2.2.2 Morfologi tanaman lemon

Batang atau dahan ini memiliki bentuk tegak, bulat, bercabangsimpodial, runcing, hijau dengan cabang-cabang yang tidak berduridan batang yang lebar 1-1,5 mm. Daun hijau dengan ujung dan pangkal yang meruncing dan tepi rata, tunggal, berseling, lonjong. Batang biasanya memiliki permukaan halus dan sedikit berminyak, dengan panjang 7–8 cm dan lebar 4–5 cm. Bunga majemuk dengankelopak berbentuk bintang hijau dan tangkai daun segitiga panjang 1-1,5 cm. Sarang silindris panjang ± 1 cm, benang sari berbentuk ginjal berwarna kuning, kepala putik bulat dan kuning, dan mahkotaserabut lima berbentuk bintang putih kekuningan. Bunga ini juga memiliki mahkota serabut lima berbentuk bintang.

kulit buah lemon kasar, warna oranye-kuning, dengan bentuk agak bulat, panjangnya 5-8 cm, tebal cangkangnya 0,5 hingga 0,7 cm, dan sedikit menonjol di bagian bawahnya. Lemon berkualitas tinggi memiliki warna kuning tua yang padat, daging tebal, dan permukaan kulit yang halus dan mengkilat. Saat matang, warnanya menjadi lebih ringan. Rasa khas lemon diberikan oleh 5% asam sitrat yang terkandung dalam lemon, yang memiliki pH sekitar 2-3 (Backer, 2021).

2.2.3 Manfaat dan kandungan buah jeruk lemon

Jeruk lemon, atau *citrus limon L.*, memiliki sifat antimikroba. Air perasan jeruk lemon mengandung flavonoid, asam sitrat, tanin, vitamin (C, A, B1, dan P), dan mineral (magnesium dan kalium). Setiap 100 gram jeruk lemon mengandung 29 kalori, 1,1 gram protein, 0,3 gram lemak, 2,9 gram gula alami, dan 2,9 gram serat. Flavonoid dan asam sitrat memiliki sifat antimikroba. (Nurlaeli, 2018).

2.3 Jeruk Limau

Jeruk limau, juga dikenal sebagai *Citrus hystrix D.C.*, adalah tanaman asli Indonesia yang dapat ditanam di pekarangan rumah. Jeruk limau tidak membutuhkan perawatan khusus untuk tumbuh dan berbuah sepanjang tahun. Bumbu khas Indonesia dan sambal biasanya menggunakan jeruk limau di beberapa tempat. Sari jeruk limau biasanya diambil untuk diminum. Jeruk limau, yang berasal dari famili Rutaceae dan genus Citrus, memiliki banyak manfaat. Salah satunya adalah minyak atsirinya, yang mencegah perkembangan bakteri (Nareswari, 2022).



Gambar 2.3 Buah jeruk limau (*Citrus hystrix* D.C.) (Sumber : Foto Pribadi)

2.3.1 Klasifikasi ilmiah

Secara ilmiah, tumbuhan jeruk limau diklasifikasikan sebagai berikut:

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *Sapindales*

Familia : *Rutaceae*

Genus : *Citrus*

Spesies : *Citrus amblycarpa* (Hassk.) Ochse

2.3.2 Morfologi tanaman jeruk limau

Jeruk limau adalah pohon berbentuk perdu kecil yang tingginya sekitar 1-2 meter. Buahnya kecil-kecil, berukuran 2-3 cm, dan memiliki daun majemuk yang hijau, tipis, dan beraroma wangi. Saat buahnya masih hijau, buahnya berubah menjadi kuning. Kulitnya tebal, berkerut, dan beraroma wangi, dan dadinya putih dan asam (Yuzami dkk 2018).

2.3.3 Manfaat dan kandungan buah jeruk limau

Masyarakat di seluruh dunia sering menggunakan jeruk limau untuk pengobatan berbagai penyakit. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa tanaman genus *Citrus* memiliki sifat antioksidan, hepatoprotektif, kardiovaskular,

antibakteri, antiinflamasi, antitumor, dan antiviral. Senyawa antimikroba, seperti limonen dan linalool dan mirsen terdapat dalam kulit jeruk limau dan memiliki kemampuan untuk menghentikan pertumbuhan bakteri udara dengan merusak membran sel bakteri. Kulit jeruk limau (*Citrus hystrix* D.C.) mempengaruhi jumlah mikroba udara yang ada di ruangan berpendingin (Amaliyah and Purnomo 2020).

2.4 Minyak Atsiri

Minyak atsiri, juga dikenal sebagai minyak penting atau volatil, adalah senyawa yang mudah menguap pada suhu kamar yang berasal dari tanaman aromatik seperti daun, bunga, buah, kulit batang, dan akar. Saat ini, minyak atsiri telah dikembangkan dan diekspor dari Indonesia. Ini termasuk kayu manis, kulit buah jeruk, cengkeh, pala, akar wangi, kayu manis, lada, kayu putih, cendana, serai wangi, dan kenanga. Menurut Richards, semua bahan-bahan yang disebutkan di atas, termasuk bagian daun, Minyak atsiri dapat dihasilkan dari bunga, buah, batang, dan akar (Ray 2023).

Minyak atsiri biasanya tidak berwarna ketika segar dan murni tanpa pencemar; ini adalah jenis minyak yang mengandung komponen volatil dengan karakteristik tertentu, sehingga pengambilan dan penyimpanannya harus dilakukan dengan baik. Namun, selama penyimpanan yang lama, minyak atsiri dapat teroksidasi, menyebabkan pembentukan resin dan warna yang lebih tua. Minyak atsiri harus disimpan dalam wadah kaca gelap dan dilindungi dari paparan cahaya. Sifat-sifat yang terkenal dari minyak atsiri berasal dari berbeda-beda komponen senyawa. Aroma minyak esensial sangat berbeda tergantung pada jenis dan intensitas masing-masing komponennya. Memiliki bau yang khas, biasanya menandakan bau tanamannya. Tergantung pada jenis komponennya, memiliki rasa getir, kadang-kadang berasa tajam, menggigit, memberi kesan hangat sampai panas atau dingin ketika terasa di kulit (Saepuloh and Suherkiman 2021).

2.5 Jerawat

Jerawat adalah kondisi kulit yang sering terjadi pada usia remaja hingga

dewasa, yang ditandai dengan munculnya bintik, jerawat, pustula, komedo, dan kista di wajah, leher, lengan, dada, dan punggung. Karena jerawat mempengaruhi kesehatan mental seseorang dan cara mereka melihat, menilai, dan bereaksi terhadap keadaan dan situasinya, jerawat dapat mempengaruhi kualitas hidup mereka (Wahdaningsi and Fauziah n.d,2021).

Karena kurangnya perawatan, kulit sering menumpuk kotoran dan sel kulit mati. Ini terutama berlaku pada kulit yang memiliki tingkat reproduksi minyak yang tinggi. Akibatnya, saluran rambut, atau folikel, tersumbat, yang mengakibatkan pembentukan komedo. Jerawat disebabkan oleh bakteri jerawat yang bersentuhan dengan kotoran dan sel kulit mati yang menumpuk. Jika jerawat tidak diobati, mereka akan menjadi bengkak, yang berarti mereka membesar dan memerah. Ketika peradangan meningkat, sel darah putih mulai muncul di permukaan kulit dalam bentuk nanah yang disebut pustula (Mitsui 2018). Menurut (Mitsui 2018), jerawat memiliki tiga penyebab, di antaranya:

a. Sekresi dari kelenjar sebaseus yang sangat aktif

Lipid dibuat di dermis kulit oleh kelenjar sebaseus. Lipid dibawa ke permukaan kulit melalui pembuluh darah berlemak dan bermuara pada pori-pori. Ketika produksi lipid tidak seimbang dengan pengeluaran, penumpukan terjadi dan menyebabkan pori-pori tersumbat. Kelenjar sebaceous hiperaktif menghasilkan lebih banyak lipid, yang menyebabkan kulit berminyak. Sebum yang bertekanan menyebabkan peradangan dan meningkatkan jumlah jerawat yang muncul. Hormon testosteron mengatur aktivitas kelenjar sebaceous, jadi banyak jerawat di wajah, dada, dan punggung pada remaja berusia 10–16 tahun. Produksi lipid pada wanita meningkat saat menstruasi akan datang.

b. Hiperkeratosis pada infundibulum rambut

Kondisi yang sering terjadi pada Hiperkeratosis, yang menyebabkan sel tanduk menebal dan menyumbat folikel rambut, adalah penyebab infundibulum folikel rambut, menyebabkan flek hitam. Saat pori-pori folikel

rambut menyempit atau tersumbat, sebum tidak dapat keluar dengan lancar. Akibatnya, ini menyebabkan bakteri jerawat berkembang biak yang mengakibatkan perkembangan peradangan. Selain itu, sinar matahari, yang merangsang keratinisasi, juga dapat menyebabkan jerawat menjadi lebih parah. Ini juga dapat menyebabkan jerawat kotor di wajah yang menyumbat pori-pori.

2.6 Bakteri

Bakteri juga merupakan makhluk hidup bersel tunggal yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dengan alat bantu mikroskop. Beberapa kelompok bakteri bertanggung jawab untuk menginfeksi dan menyebabkan penyakit, sedangkan kelompok lain dapat menguntungkan industri, makanan, dan pengobatan (Rini & Rohmah, 2020). Menurut Setiabudy (2017), mekanisme kerja antibakteri terdiri dari:

a. Menghambat sintesis dinding sel

Mekanisme ini bergantung pada variasi dalam struktur dinding sel prokariotik yang terdiri dari peptidoglikan. Antibakteri dengan sifat menghambat sintesis dinding sel hanya berfungsi pada sel yang sedang membelah dan tidak berfungsi pada sel yang tidak membelah.

b. Mengubah protein dan asam nukleat molekul

Mekanisme ini bergantung pada fakta bahwa kelangsungan hidup sel bergantung pada kemampuannya untuk mempertahankan molekul protein dan asam nukleat dalam kondisi alaminya. Kondisi atau zat yang mengubah kondisi ini, seperti denaturasi protein dan asam nukleat, merusak sel sehingga tidak dapat diperbaiki lagi.

c. Mencegah pembentukan asam nukleat

Mekanisme ini bergantung pada penghambatan proses replikasi dan transkripsi DNA. Rusaknya asam nukleat DNA atau RNA karena radiasi, bahan kimia, atau pemanasan menyebabkan sel mati karena sel tidak dapat melakukan sintesis atau replikasi enzim.

d. Menghambat sintesis metabolit esensial

Mekanisme ini bergantung pada fakta bahwa senyawa yang memiliki bentuk yang mirip dengan substrat enzim menghalangi aktivitas enzimatis mikroorganisme. Ratusan spesies bakteri hidup di pasir, salju, atau es hingga lautan, dibandingkan dengan makhluk hidup lainnya (Maryati dkk, 2019). Bakteri seperti *P. acne* dan *S. epidermidis* adalah contoh bakteri patogen yang menyebabkan jerawat pada manusia (Darmadi, 2018).

2.6.1 *Propionibacterium Acnes*

Salah satu *Propionibacterium acnes* adalah flora normal kulit gram-positif yang sering ditemukan pada jerawat. Sering dianggap sebagai patogen oportunistik, *Propionibacterium acnes* menyebabkan banyak penyakit dan terkait dengan berbagai jenis inflamasi (Trisuci et al., 2020). Bakteri *Propionibacterium acnes* memiliki ciri-ciri seperti basil gada atau bermanik-manik, Bakteri ini berukuran 0,5–0,8 µm dan tinggi 3–4 µm, dengan bentuk terkadang bulat atau kokoid, dan berbentuk batang atau basil dengan panjang dengan ujung melengkung dan basil dengan pewarnaan yang tidak rata. Bakteri ini dapat menghasilkan asam lemak bebas yang dapat menyebabkan peradangan pada jaringan yang terkena (Salahudin et al., 2020). Berikut ini klasifikasi dari bakteri *Propionibacterium acnes* (Miratunnisa, Mulqie, and Hajar 2015):

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Actinobacteria</i>
Kelas	: <i>Actinobacteria</i>
Ordo	: <i>Actinomycetales</i>
Familia	: <i>Propionibacteriaceae</i>
Genus	: <i>Propionibacterium</i>
Spesies	: <i>Propionibacterium acnes</i>

Propionibacterium acnes adalah kelompok bakteri yang tidak menghasilkan spora, atau benang gram positif yang berbentuk batang ia menghasilkan lipase selama proses jerawat, yang mengekstraksi asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam

lemak ini memiliki kemampuan untuk merusak jaringan dan menyebabkan jerawat (Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2012).

2.6.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis adalah bakteri gram positif yang terdapat pada kulit dan dapat menyebabkan infeksi oportunistik kekebalan tubuh yang lemah (Nuryastuti, 2019). Patogenitas *Staphylococcus epidermidis* merupakan efek gabungan dari berbagai macam metabolit yang dihasilkannya. *Staphylococcus epidermidis* memproduksi toksin atau zat racun memudahkannya untuk menempel dimana-mana, termasuk di permukaan alat-alat yang terbuat dari plastik atau kaca. Lendir tersebut membuat *Staphylococcus epidermidis* lebih tahan terhadap fagositosis dan beberapa antibiotika tertentu (Sinaga, 2004). Menurut Maftuhah *et al.*, (2015), bakteri *Staphylococcus epidermidis* merupakan patogen yang sering menyebabkan infeksi kulit (luka) pada manusia. Secara alami bakteri ini hidup di membran kulit dan membran mukosa manusia. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* sebenarnya merupakan salah satu flora normal pada kulit, tetapi apabila bakteri ini berada tidak pada organ semestinya dandidukung oleh kondisi tertentu (imunitas tubuh menurun, kurangnya sanitasi), maka bakteri tersebut bersifat oportunistik (penyebab infeksi).

Klasifikasi *staphylococcus epidermidis* Menurut Jawetz *et al* (2010):

Divisio : *Eukariota*

Class : *Schizomycetes*

Ordo : *Eubacterials*

Family : *Micrococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus epidermidis*

2.7 Antibiotik

Antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat mikroba jenis lain. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Sifat toksisitas selektif absolute belum atau mungkin tidak akan diperoleh:

- a. Berdasarkan aktivitasnya antibiotik dibagi menjadi 2 golongan, yaitu: Antibiotik spektrum kerja luas (*Broad Spectrum*), yaitu antibiotik yang dapat mematikan bakteri gram positif dan negatif yang termasuk antibiotik broad spektrum ialah: Tetraskilin, kloramfenikol, Ampisilin, Sulfonamid, Sefalosporin.

Antibiotik spektrum kerja sempit (*Narrow Spectrum*), yaitu antibiotik yang hanya memiliki aktivitas terhadap beberapa jenis bakteri saja, yang termasuk golongan ini adalah: penisilin G, Streptomisin, Neomisin, Basitrasin.

- b. Mekanisme kerja antibiotik dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :
 - 1) Antibiotik yang menghambat metabolisme sel bakteri penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial antara lain dengan adanya kompetitor berupa antimetabolit yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamide, trimetropin, asarn p – aminosalisilat (PAS) mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteristatik.
 - 2) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri, dinding sel bakteri terdiri dari polipeptida glikan, obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin.
 - 3) Antibiotik yang merusak membran plasma sel bakteri: membran plasma bersifat semi permeabel dan mengendalikan transport berbagai metabolit ke dalam dan keluar. Gol antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini ialah: polimiksin, golongan polien, serta berbagai antimikroba kemoterapeutik. Polomiksin sebagai senyawa ammonium-kuarterner dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada

fospolipid membran sel mikroba.

- 4) Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel bakteri merupakan golongan antibiotik yang gol aminonya tergabung dalam ikatan glikosida, obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah golongan aminoglikosida makrolit, linkomisin, tetrasklin dan kloramfenikol.
- 5) Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. Penghambatan pada asam nukleat berupa penghambatan terhadap transkripsi dan replikasi mikroorganisme. Contoh: golongan quinolon dan rifampisin.

2.7.1 Antibiotik pembanding

Kloramfenikol merupakan antibiotik berspektrum luas yang tidak hanya mengobati penyakit akibat infeksi bakteri gram negatif, namun juga bereaksi pada bakteri gram positif (Okunye *et al.*, 2020). Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif karena antibiotik kloramfenikol memiliki aktivitas sebagai bakteristatik maupun bakterisida tergantung dari jenis mikroba patogen dan konsentrasi obat. Mekanisme kloramfenikol adalah dengan cara menghambat sintesis protein bakteri. Antibiotik ini merupakan antibiotik spektrum luas bakteri gram positif dan gram negatif namun tidak memiliki aktivitas terhadap virus, ragi ataupun jamur (Jamila, 2015).

2.8 Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.8.1 Uji aktivitas antibakteri

Tujuan pemeriksaan fungsi antibakteri adalah untuk mengembangkan metode pengobatan yang efektif dan aman saat digunakan. Senyawa antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu aktivitas pertumbuhan bakteri atau mikroorganisme, yang dapat digunakan untuk penelitian. Pengujian ini mengukur jumlah bakteri atau mikroorganisme yang tumbuh dengan menggunakan agen antibakteri.

Metode difusi dan pengenceran dapat digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri. Uji difusi disk, juga dikenal sebagai uji difusi disk, mengukur diameter area bening atau zona terang, yang menunjukkan adanya respons yang menghalangi

perkembangan bakteri oleh zat antibakteri yang terkandung dalam ekstrak. Jumlah bakteri yang diperlukan untuk mengevaluasi kepekaan atau sensitivitas adalah 10–108 CFU/mL (Hermawan dkk., 2020) Metode uji aktivitas antibakteri yang paling umum adalah dua: Tujuan dari Uji aktivitas antibakteri digunakan untuk mengetahui seberapa peka suatu bahan antibakteri terhadap bakteri tertentu.

a) Metode dilusi/ pengenceran

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) suatu senyawa digunakan dalam metode dilusi untuk mengukur seberapa tahan dia terhadap aktivitas mikroba (Fatisa, 2013). Jumlah zat antimikroba yang dimasukkan ke dalam medium bakteriologi padat atau cair dapat dihitung dengan menggunakan teknik pengenceran (Nuraina2015). Kelebihan metode ini adalah dapat menyajikan data kuantitatif yang menunjukkan jumlah zat antimikroba tertentu yang diperlukan untuk menghalangi mikroorganisme yang diuji (Jawetz, et al 2008). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) suatu senyawa digunakan dalam metode dilusi untuk menentukan seberapa tahan dia terhadap aktivitas mikrobial (Fatisa, 2013). Teknik pengenceran dapat digunakan untuk menghitung jumlah zat antimikroba yang ditambahkan ke dalam medium bakteriologi padat atau cair (Nuraina, 2015). Kelebihan dari teknik ini adalah dapat menyajikan data kuantitatif yang menunjukkan jumlah zat antimikroba tertentu yang diperlukan untuk menghalangi mikroorganisme yang diuji (Jawetz et al., 2007). Metode ini diklasifikasikan menjadi tiga metode: penapisan lempeng agar, pengenceran tabung, dan turbidimetri (Ratnasari, 2019). Dimungkinkan untuk menghitung nilai absorbansi setelah perlakuan inkubasi dikurangi absorbansi sebelum perlakuan inkubasi untuk mengetahui cara mengumpulkan data dari metode dilusi. Apabila tidak ada kekeruhan bakteri ($OD_{bakteri} < 0$) konsentrasi terendah penghambat pertumbuhan bakteri atau KHM didapat Uji lanjutan di mana beberapa mililiter suspensi ditambahkan ke media padat atau cair, digunakan untuk menentukan nilai KBM. Ini dilakukan selama 12 hingga 18 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Hasil perhitungan dapat disesuaikan dengan jenis media uji yang

digunakan, misalnya media cair, nilai KBM dapat dihitung dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis ($\lambda = 480 \text{ nm}$) untuk mengukur absorbansi (OD). Konsentrasi terendah ekstrak dengan OD = 0 (tanpa kekeruhan) menunjukkan bahwa KBM atau MBC (Minimum Bacteridal Concentration) telah diperoleh (Lennete et al., 1991 dalam Fatisa, 2013).

b) Metode Difusi

Metode difusi menggunakan pengujian difusi cakram. Komponen fisik dan kimia, seperti sifat medium, kemampuan difusi, ukuran molekuler, dan stabilitas obat, memengaruhi metode ini (Jawetz et al., 2018). Tiga metode difusi berbeda adalah cetak lubang, difusi kertas cakram disk, dan difusi silinder gelas. Dari ketiga metode tersebut, metode difusi dengan uji cakram adalah yang paling banyak digunakan. Untuk melakukan uji cakram, kertas cakram filter dipenuhi dengan bahan antimikroba tertentu dan diletakkan di atas medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan organisme yang akan diuji. Untuk mengetahui hasil inkubasi kertas cakram anda dapat mengukur diameter zona jernih yang terletak di sekitar cakram. Ini menunjukkan kekuatan antimikroba untuk menghentikan mekanisme uji (Nuraina 2015). Dalam metode difusi padat, pengujian sumuran juga dilakukan dengan cawan petri yang ditanami dengan organisme uji pada medium agar. Silinder gelas digunakan untuk membuat lubang pada permukaan medium tersebut. Untuk memungkinkan senyawa antimikroba masuk ke dalam lubang yang terbentuk pada medium, lubang tersebut kemudian dimasukkan ke dalam inkubator. Proses inkubasi menyebabkan zona penghambatan pertumbuhan organisme yang diuji di sekitar lubang di medium untuk menunjukkan potensi antimikroba. Ukuran diameter zona hambat di sekitar lubang menunjukkan kemungkinan keberadaan senyawa antimikroba (Rahayu, 2017).

2.8.2 Kategori daya hambat

- > 20 mm : Sangat Kuat
- 10 – 20 mm : Kuat
- 5 – 10 mm : sedang
- < 5 mm : Lemah

Menurut Davis dan Stout (1971) Ada empat kategori daya hambat, yaitu kategori zona hambat lebih besar atau sama dengan 20 mm (≥ 20 mm) sangat kuat, zona hambat antara 10-20 mm kuat, zona hambat sedang berkisar antara 5-10 mm, dan zona hambat kurang dari ≤ 5 mm, berarti aktivitas anti bakterinya lemah.

2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu cara pemisahan campuran zat menggunakan sebuah lapisan tipis bahan penyerap, berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi, campuran yang akan dipisahkan dari suatu zat ditotolkan berupa bercak atau pita pada salah satu ujung penyerap rapat yang berisi cairan pengembang (fase gerak) kemudian dengan bantuan cairan rambatan digerakkan ke ujung lain sampai batas tertentu, batas ini disebut batas rambat. Istilah – istilah dalam kromatografi Lapis Tipis:

- 1) Bahan penyerap (fase diam)
Bahan penyerap disebut juga fase diam atau stationer. Penyerap yang umum adalah silica gel, aluminium oksida, selulosa dan turunannya
- 2) Cairan rambat (fase gerak) merupakan suatu campuran yang terdiri dari satu atau beberapa campuran pelarut, berupa zat organik yang mudah menguap disebut fase gerak karena ia merambat perlahan lahan dari ujung lempeng menuju ujung lain karena ada gaya kapiler.
- 3) Jarak rambat adalah mulai dari titik penotolan sampai batas cairan merambat.
- 4) Cara mendeteksi dilakukan sebelum atau sesudah disemprot dengan larutan pereaksi dengan sinar biasa dan sinar UV 254 .
- 5) Jarak bercak adalah jarak antara titik penotolan dengan sesuatu bercak dibandingkan dengan jarak rambat jarak ini disingkat dengan Rf.

2.10 KLT-Bioautografi

Metode bioautografi menggunakan KLT untuk menunjukkan ada atau tidaknya aktivitas biologi pada senyawa yang dihasilkan dari pemisahan. Metodenya terdiri dari menempelkan kromatogram langsung pada media yang telah terinokulasi mikroba uji. Setelah mikroba uji diinkubasi dalam jangka waktu tertentu, kromatogram yang ditampakan bercaknya kemudian diukur untuk mengidentifikasi efek antimikroba. Menggabungkan penggunaan kromatografi lapis tipis dengan respons mikroorganisme, metode ini juga menggabungkan fitur dari prosedur bioautografi yang didasarkan pada teknik difusi agar, di mana senyawa antimikroba ditransfer dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji secara merata. Zona hambatan di sekitar titik KLT ditempelkan pada media untuk melacak hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu senyawa aktif dalam bahan yang diperiksa menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji menciptakan zona hambatan. Dalam praktik Untuk memasukkan mikroorganisme yang sensitif terhadap antibiotik ke dalam cawan Petri kromatogram diletakkan pada permukaan media setelah diinkubasi selama lima belas hingga dua puluh jam pada suhu sekitar 37 °C zona jernih akan muncul pada lapisan media agar yang mengandung antibiotik. Lapisan mikroorganisme di media agar akan menjadi buram, dan zona jernih akan berdifusi di bawahnya.

KLT- Bioautografi dapat dibagi atas 3 kelompok yaitu:

a. Bioautografi Langsung

Metode ini berfungsi dengan menyemprotkan mikroorganisme uji peka ke permukaan kromatografi lapis tipis (KLT), yang telah dibersihkan dari sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatografi. Selanjutnya, inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu yang diatur.

b. Bioautografi kontak

Difusi senyawa yang telah terpisah dengan kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis (KLT) adalah dasar metode ini. Mikroorganisme yang tahan terhadap zat antimikroba yang diuji diinkubasi di atas permukaan medium

Nutrien Agar dengan lempeng kromatografi. Lempeng kromatografi diambil dari permukaan medium setelah 15–30 menit setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu zat antimikroba berdifusi ke dalam media agar dari lempeng kromatografi menghentikan pertumbuhan bakteri sampai noda permukaan yang menghentikan perkembangan mikroorganisme uji muncul, ini akan menghentikan pertumbuhan bakteri ini akan membentuk area yang jernih.

c. Bioautografi Pencelupan

Dalam praktik, setelah lempeng kromatografi dielusi, mereka dimasukkan ke dalam cawan petri sehingga permukaannya tertutup oleh medium, yang merupakan "lapisan dasar". Setelah medium memadat, mikroba uji dimasukkan ke dalam "lapisan biji" medium yang telah disuspensikan. Kemudian dipanaskan pada suhu dan waktu yang tepat.

Keuntungan dan kelebihan bioautografi

Keuntungan :

- a. Dapat mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antibiotik
- b. Dapat digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang belum diketahui mekanismenya.
- c. Merupakan metode yang sederhana dan mudah dilakukan, cepat dalam pengerjaannya

Kerugian:

- a. Tidak bisa digunakan untuk senyawa yang tidak mempunyai aktivitas membunuh atau menghambat mikroorganisme.
- b. Hasil tidak valid karena kemungkinan adanya kontaminan dari luar atau karena zat yang diidentifikasi tidak mengandung khasiat antibakteri