

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan jenis penyakit yang menjadi permasalahan utama dalam kesehatan. Bakteri adalah salah satu mikroorganisme patogen yang dapat menyebabkan infeksi, dan manusia termasuk makhluk hidup yang rentan terhadap infeksi bakteri. Infeksi saluran pernafasan adalah salah satu jenis infeksi yang dapat disebabkan oleh bakteri. Menurut penelitian kesehatan Indonesia tahun 2013, sekitar 40 juta orang atau 25% setiap tahunnya menderita infeksi saluran pernafasan. Selain itu, pada Riset Kesehatan Dasar Indonesia tahun 2018 melaporkan prevalensi infeksi saluran pernafasan terutama *faringitis* sebesar 9,3% (Prasetyo & Utami, 2023). *Necrotizing fasciitis* adalah infeksi langka jaringan lunak yang mengancam jiwa yang dikenal sebagai penyakit pemakan daging atau sindrom bakteri pemakan daging. Penyakit ini dapat menyebar dengan cepat hingga menimbulkan peradangan dan nekrosis mulai dari fascia, otot, dan lemak subkutan. Menurut studi literatur yang dilakukan Hernandez pada tahun 2017, diperoleh total 29 kasus *necrotizing fasciitis* dimana 17 orang (59%) adalah laki-laki dan 12 orang (41%) adalah perempuan dengan rata-rata usia sekitar 46 tahun (Kesuma & Nurdian, 2018). Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada saluran pernafasan dan jaringan lunak adalah *Streptococcus pyogenes* (Karimah & Oktaviani, 2023).

Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah salah satu bakteri yang paling sering menginfeksi manusia. *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram positif yang termasuk dalam kelompok *Streptococcus* grup A. Bakteri gram positif merupakan bakteri yang setelah diwarnai akan mempertahankan zat pewarna kristal violet dikarenakan dinding sel bakteri gram positif tersusun atas peptidoglikan yang lebih tebal sehingga mampu mempertahankan warna ungu dari kristal violet. Pewarnaan gram adalah teknik pewarnaan yang dilakukan

untuk mengidentifikasi bakteri, pada bakteri gram positif menunjukkan warna ungu (Amin *et al.*, 2023).

Streptococcus pyogenes adalah flora normal dari spesies *Streptococcus* yang ada di saluran pernafasan, dapat menyebabkan infeksi jika pertahanan tubuh inang terganggu dan jika organisme dapat melewati pertahanan konstitutifnya. Bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat menyerang kerongkongan yang menyebabkan nyeri saat menelan sehingga terjadi *faringitis* atau radang tenggorokan. Selain itu bakteri *Streptococcus pyogenes* juga dapat menyebabkan penyakit *rheumatic heart disease* (RHD), bakteremia, selulitis, meningitis, pneumonia, dan *necrotizing fasciitis* (Savitri *et al.*, 2019).

Untuk mengobati infeksi bakteri, antibiotik dapat digunakan sebagai agen terapi. Antibiotik golongan β -laktam seperti penisilin, amoksisilin, dan sefalosporin generasi pertama dapat digunakan untuk mengobati infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes*. Jika terjadi alergi dalam penggunaan penisilin maka makrolida generasi baru dapat digunakan sebagai alternatif pilihan (Savitri *et al.*, 2019). Golongan makrolida yang dapat digunakan sebagai pengobatan untuk pasien yang hipersensitivitas terhadap penisilin pada infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* yaitu eritromisin. *Streptococcus pyogenes* resisten terhadap beberapa antibiotik termasuk azitromisin, tetrasiklin, sulfonamida, dan basitrasin (Savitri *et al.*, 2019).

Resistensi bakteri adalah suatu keadaan bakteri patogen menjadi kebal terhadap antibiotik. Ketika bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik, terapi menjadi kurang efektif. Resistensi antibiotik adalah ketika mikroba penyebab penyakit tidak lagi dapat dibunuh dengan antibiotik (Aji, 2020). Penggunaan antibiotik secara bebas di masyarakat dengan dosis dan lama pemberian yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Dengan demikian diperlukan eksplorasi agen antibakteri baru, salah satunya yang berasal dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang banyak dieksplorasi dalam penemuan antibiotik baru adalah rumput laut (Agustin *et al.*, 2019).

Rumput laut merupakan salah satu alternatif bahan alam, dapat digunakan untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Rumput laut *Gracilaria* sp. adalah jenis rumput laut alga merah kelas *Rhodophyceae* dengan kandungan metabolit sekunder yang dapat membunuh bakteri, umumnya berbentuk talus rumpun dan bercabang (Yudiasuti *et al.*, 2018). Rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) merupakan salah satu rumput laut yang tumbuh dengan baik di perairan Bali. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) mengandung metabolit sekunder yang dapat menghasilkan berbagai metabolit bioaktif dengan sifat antibakteri, antivirus, dan antijamur. Selain metabolit sekunder, rumput laut merah juga mengandung metabolit primer yaitu karagenan, yang terbukti memiliki aktivitas antibakteri (Agung *et al.*, 2019 ; Kaimudin *et al.*, 2020).

Karagenan adalah hasil ekstraksi dari rumput laut dan merupakan senyawa polisakarida dari alga merah yang memiliki sifat antibakteri (Kaimudin *et al.*, 2020). Senyawa polisakarida yang terdapat pada karagenan alga merah mengandung sulfat. Sulfat pada karagenan berfungsi sebagai agen pengkelat yang berinteraksi dengan ion logam (metal). Terjadinya pengkelatan ion logam (metal) pada bakteri akan mengganggu proses pertumbuhan sel dan pembentukan biofilm bakteri (Azeman *et al.*, 2020). Karagenan dari rumput laut memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa mikroorganisme seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Briones *et al.*, 2014). Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, menunjukkan hasil bahwa karagenan dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dengan konsentrasi 1 mg/mL, 5 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, dan 100 mg/mL dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klebsiella pneumonia* dalam kategori zona hambat kuat dan sangat kuat (Darmawan, 2023 ; Sari, 2023 ; Yanti, 2023 ; Sari, 2023). Pada penelitian lainnya, menunjukkan aktivitas antibakteri dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dengan konsentrasi 1% dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Vibrio* sp. dalam kategori zona hambat sedang (Pratiwy *et al.*, 2022).

Beberapa penelitian menunjukkan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) memiliki sifat antibakteri. Dengan mempertimbangkan latar belakang ini, diperkirakan bahwa karagenan dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) juga memiliki sifat antibakteri dan daya hambat terhadap *Streptococcus pyogenes*. Oleh karena itu, peneliti melakukan pengujian terkait aktivitas antibakteri pada karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*?
2. Berapakah konsentrasi optimum karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) yang menghasilkan zona hambat terbesar terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.
2. Untuk mengetahui berapa konsentrasi optimum karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) yang menghasilkan zona hambat terbesar terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan referensi dalam penelitian ilmu farmasi dan untuk perkembangan ilmu pengetahuan lebih lanjut mengenai pemanfaatan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dalam menghambat aktivitas bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi alternatif informasi kepada masyarakat mengenai pemanfaatan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.)

sebagai alternatif dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*, sehingga dapat meningkatkan nilai guna dan nilai ekonomi dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut Merah (*Gracilaria* sp.)



Sumber : Murdinah (2013, Gambar 2.1)

Gambar 2.1 Rumput Laut Merah (*Gracilaria* sp.)

Rumput laut adalah tumbuhan laut yang tergolong dalam makroalga bentik yang hidup melekat di dasar perairan. Menurut taksonominya, rumput laut tergolong dalam divisi *Thallophyta*. Rumput laut dalam kelompok ini memiliki karakteristik yang tidak dapat dibedakan antara bagian akar, batang, dan daun. Berdasarkan kandungan pigmen, rumput laut dibedakan menjadi tiga kelas yaitu rumput laut hijau (*Chlorophyta*), rumput laut merah (*Rhodophyta*), dan rumput laut cokelat (*Phaeophyta*). Rumput laut tergolong sebagai tumbuhan tingkat rendah karena seluruh bagian tumbuhan disebut talus. Talus dapat terdiri dari banyak sel (multiseluler) atau hanya satu sel (uniseluler). Talus rumput laut memiliki ragam bentuk seperti gepeng, pipih, bulat kantong, bulat tabung, dan rambut (Sarita *et al.*, 2021).

Gracilaria sp. adalah jenis rumput laut merah yang telah banyak dikembangkan di wilayah perairan Indonesia. Rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) memiliki dinding sel yang mengandung selulosa, agar, karagenan, porpiran, furcellaran serta pigmen fikobilin, terdiri dari fikoeiretrin dan fikosianin yang

menjadi sumber karbohidrat tinggi dalam makanan. Karena nilai ekonominya yang tinggi dan memiliki daya toleransi terhadap lingkungan, jenis rumput laut ini sangat potensial untuk dibudidayakan. Sekitar 70% wilayah nusantara di Indonesia memiliki potensi untuk usaha budidaya laut, termasuk budidaya rumput laut. Jenis rumput laut yang potensial untuk dibudidayakan adalah *Eucheuma* sp. dan *Gracilaria* sp. Indonesia adalah produsen *Gracilaria* sp. terbesar di dunia. Laju produksi rumput laut *Gracilaria* sp. paling tinggi di dunia sekitar 7-13% dibandingkan dengan yang lain, dan dapat meningkat hingga 20% setiap hari. Oleh karena itu, *Gracilaria* sp. menjadi spesies rumput laut merah yang banyak ditemukan di tambak dan dapat dibudidayakan dengan sukses di Indonesia (Andriani *et al.*, 2021).

Salah satu wilayah yang memiliki potensi untuk budidaya rumput laut merah adalah Bali. Beberapa kabupaten di Bali yang memiliki potensi untuk budidaya rumput laut meliputi Buleleng, Jembrana, Badung, dan Karangasem. Klungkung juga salah satu Kabupaten di Bali terkenal potensial dalam pertanian rumput laut, tepatnya di Kecamatan Nusa Penida. Desa Suana, Desa Batununggul, dan Desa Ped. Sekitar 60% penduduknya bekerja sebagai petani rumput laut. Jumlah lahan yang digunakan untuk budidaya rumput laut mencapai 45% dari luas pantai. Kondisi perairan pantai di Kecamatan Nusa Penida dan jenis pantai yang landai mendukung budidaya rumput laut (Sari & Dewi, 2017).

2.1.1 Klasifikasi dan morfologi rumput laut merah (*Gracilaria* sp.)



Sumber : Wirawan *et al.*, (2021 Gambar 2.2)

Gambar 2.2 Talus Rumput Laut Merah

Salah satu jenis rumput laut merah yang paling umum ditemukan di perairan Indonesia adalah *Gracillaria* sp. (Aisa *et al.*, 2020). *Gracilaria* sp. biasanya dapat hidup di substrat padat seperti kayu, batu, dan karang mati. Rumput laut ini tumbuh terutama di daerah perairan dangkal dengan iklim sedang hingga tropis. *Gracilaria* sp. di Indonesia disebut dengan berbagai nama, seperti bulung sangu (Bali), bulung embulung (Jawa, Bali), bulung tombong putih (Labuhan haji, Lombok), janggut dayung (Bangka) dan sango-sango atau dongi-dongi (Sulawesi) (Aisa *et al.*, 2020).

Klasifikasi rumput laut *Gracilaria* sp. adalah sebagai berikut:

Superkingdom : Eukaryota

Kingdom : Plantae

Phylum : Rhodophyta

Class : Florideophycidae

Subclass : Rhodymeniophycidae

Order : Gracilariales

Family : Gracilariaceae

Genus : *Gracilaria* (Wirawan *et al.*, 2021)

Gracilaria sp. adalah jenis rumput laut merah dengan akar, batang, dan daun yang tidak memiliki perbedaan. *Gracilaria* sp. memiliki talus dengan diameter 0,5-2 milimeter dan panjang hingga 30 sentimeter. Talusnya berbentuk silindris atau gepeng dengan permukaan halus atau berbintil. Rumput laut *Gracilaria* sp. biasanya hidup di kedalaman 10 sampai 15 meter di bawah permukaan laut (Setiawati & Sari, 2017).

2.1.2 Kandungan metabolit rumput laut merah (*Gracilaria* sp.)

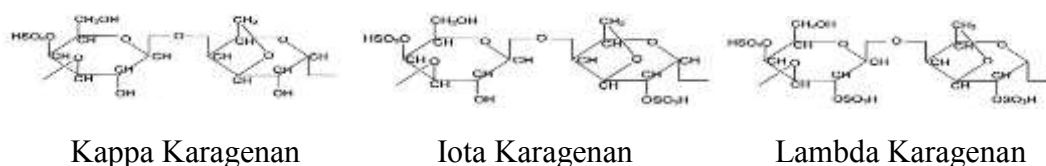
Rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) pada umumnya mengandung agar sebagai hasil dari metabolisme primer. Metabolit primer *Gracilaria* sp. meliputi agar, alginat, dan karagenan yang dibagi menjadi jenis iota, kappa, dan lambda. Kandungan metabolit primer agar adalah campuran polisakarida yang diekstraksi

dari dinding sel rumput laut merah (*Rhodophyta*), terutama genus *Gracilaria* dan *Gelidium* (Darmayanti *et al.*, 2023).

Agar terdiri dari agarosa dan agaropektin, yang digunakan untuk membuat media pertumbuhan mikroba. Kandungan agarosa dapat digunakan dalam industri pangan, farmasi, dan kosmetik sebagai sumber biomasa, oligosakarida, antibakteri, antikanker, dan antioksidan (Martinah *et al.*, 2014). Rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) juga memiliki kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan fenol yang memiliki sifat antibakteri, antivirus, dan antijamur. Kandungan flavonoid dalam rumput laut *Gracilaria* sp. berfungsi menghentikan DNA girase yang menghambat fungsi pembentukan protein dan lemak. Rumput laut *Gracilaria* sp. memiliki kandungan air 19,01%, abu 14,18%, protein 4,17%, lemak 9,54%, serat kasar 10,51% dan karbohidrat 42,59% dalam persentase berat kering (Sasadara *et al.*, 2022). Rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) juga memiliki kandungan serat yang tinggi (Hangga & Meiyasa, 2023). *Gracilaria* sp. adalah salah satu jenis rumput laut yang dikenal menghasilkan senyawa fitokimia aktif secara biologi seperti tokoferol, fikosianin, karotenoid, terpenoid, xantofil, fikobilin, asam lemak jenuh, polisakarida, vitamin, dan sterol (Andriani *et al.*, 2021).

2.2 Karagenan

Karagenan adalah hasil ekstraksi dari rumput laut dan merupakan kelompok polisakarida galaktosa. Rumput laut dari kelas *Rhodophyceae* dapat menghasilkan karagenan. Rumput laut menghasilkan senyawa karagenan dengan tiga jenis yaitu kappa, iota, dan lambda. Tiga jenis senyawa ini dibedakan berdasarkan perbedaan ikatan sel dan sifat gel. Kappa karagenan menghasilkan sifat gel terkuat dengan ion kalium, lambda karagenan tidak membentuk gel dalam air tetapi dapat berinteraksi baik dengan protein sehingga cocok untuk produksi makanan dan iota karagenan menghasilkan sifat gel dengan ion kalsium. Gugus ester sulfat galaktosa dan kopolimer 3,6-anhydro-galaktosa dapat terikat pada karagenan yang mengandung natrium, magnesium, dan kalsium (Fajarini *et al.*, 2018).



Sumber : Nafiah (2011, Gambar 2.3)

Gambar 2.3 Struktur Kappa, Iota dan Lambda Karagenan

2.2.1 Ekstraksi karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.)

Karagenan adalah hasil ekstraksi dari rumput laut. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dalam pelarut. Pelarut yang digunakan adalah air suling (akuadest) atau basa seperti natrium hidroksida dan kalium hidroksida. Ekstraksi karagenan dilakukan dengan cara rumput laut direndam (maserasi) dengan pelarut yang sesuai kemudian dilakukan ekstraksi *waterbath* dengan memanaskan pelarut pada suhu 80⁰ C-90⁰ C selama 2 jam. Untuk mendapatkan karagenan dilakukan dengan cara menuangkan hasil filtrat ekstraksi kedalam etanol 96% dengan suhu 5⁰ C. Volume etanol digunakan 3 kali volume filtrat. Serat karagenan yang dihasilkan kemudian dioven selama 30 menit dengan suhu 60⁰ C sampai berat konstan sehingga diperoleh karagenan kering (Orilda *et al.*, 2021).

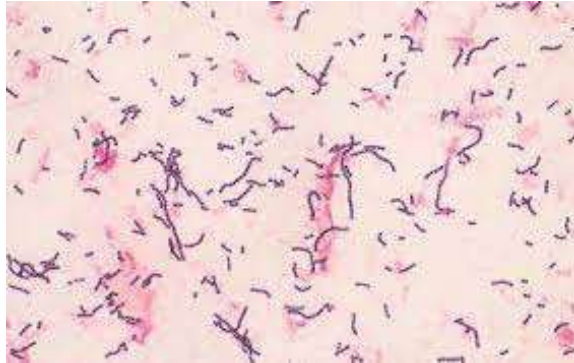
Pada penelitian lain, proses ekstraksi karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dapat direbus dengan akuadest pada suhu 90⁰C selama 15 menit. Proses perebusan dapat meningkatkan kadar glukosa pada rumput laut. Kadar glukosa akan mengalami kenaikan pada proses pemanasan karena pada proses pemanasan polisakarida dipecah menjadi senyawa glukosa melalui proses hidrolisis. Hidrolisis merupakan reaksi endotermis yang dipengaruhi oleh panas untuk dapat bereaksi. Peningkatan suhu dan waktu pemanasan menyebabkan meningkatnya proses penguapan air yang dapat menurunkan kadar air kemudian meningkatkan persentase glukosa (Sasara *et al.*, 2022).

2.2.2 Aktivitas antibakteri karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.)

Antibakteri adalah obat yang digunakan untuk menghancurkan jasad renik yang berasal dari senyawa non organik atau yang dihasilkan melalui sintesis. Senyawa metabolit primer terkandung dalam pengujian aktivitas antibakteri. Karagenan yang berasal dari ekstraksi rumput laut merah merupakan salah satu senyawa metabolit primer yang terbentuk. Berdasarkan beberapa penelitian, karagenan rumput laut dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Briones *et al.*, 2014). Pada pengujian yang telah dilakukan sebelumnya, karagenan rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa mikroorganisme seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Klebsiella pneumonia* (Darmawan, 2023 ; Sari, 2023 ; Yanti, 2023 ; Sari, 2023).

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, menunjukkan hasil bahwa karagenan dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dengan konsentrasi karagenan 1 mg/mL dan 5 mg/mL pada bakteri *Escherichia coli*, memiliki zona hambat kuat (18,00 mm) dan sangat kuat (33,00 mm). Pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan konsentrasi karagenan 1 mg/mL dan 5 mg/mL memiliki zona hambat kuat (17,5 mm) dan sangat kuat (30,3 mm). Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi karagenan 50 mg/mL, 75 mg/mL, dan 100 mg/mL memiliki zona hambat kuat (18,33 mm) serta sangat kuat (23,66 mm) dan (24,00 mm). Pada bakteri *Klebsiella pneumonia* dengan konsentrasi karagenan 50 mg/mL, 75 mg/mL, dan 100 mg/mL memiliki zona hambat sangat kuat (28,33 mm), (33,33 mm) dan (32,67 mm) (Darmawan, 2023 ; Sari, 2023 ; Yanti, 2023 ; Sari, 2023). Pada penelitian lainnya, menunjukkan aktivitas antibakteri dari rumput laut merah (*Gracilaria* sp.) dengan konsentrasi 1% dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 8 mm sedangkan pada bakteri *Vibrio* sp. sebesar 7,6 mm dengan kategori zona hambat sedang (Pratiwy *et al.*, 2022).

2.3 Bakteri *Streptococcus pyogenes*



Sumber : Agustin (2018, Gambar 2.4)

Gambar 2.4 Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah salah satu bakteri yang paling sering menginfeksi manusia dan merupakan bakteri gram positif dalam kelompok *Streptococcus* grup A dengan ciri-ciri katalase dan oksidase negatif (Savitri *et al.*, 2019). Infeksi yang disebut *faringitis* dan *necrotizing fasciitis* disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes* (Agustin *et al.*, 2019; Kesuma & Nurdian, 2018).

Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah spesies *Streptococcus* yang paling patogen pada manusia. Menurunnya sistem imun dalam tubuh dan terjadi ketidakseimbangan flora normal yang menimbulkan suatu infeksi disebabkan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi invasif parah karena memiliki protein eksotoksin, super antigen, dan protein yang terdapat pada dinding sel (Sari, 2020). *Streptococcus pyogenes* memiliki bentuk kokus seperti rantai dan bersifat anaerob fakultatif yang dapat tumbuh dengan pada suhu 37°C (Savitri *et al.*, 2019). Bakteri anaerob fakultatif merupakan jenis bakteri untuk kelangsungan hidupnya tidak membutuhkan oksigen (Oktavia *et al.*, 2022).

Klasifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
Filum : *Firmicutes*
Class : *Bacilli*

Ordo : *Lactobacillales*
Famili : *Streptococcaceae*
Genus : *Streptococcus*
Spesies : *Streptococcus pyogenes* (Agustin, 2018)

2.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Difusi Sumuran

1. Metode sumuran

Metode difusi merupakan metode yang sering digunakan dalam analisis aktivitas antibakteri. Metode difusi terdiri atas metode sumuran, metode cakram, dan metode parit. Prinsip kerja metode difusi yaitu terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan (Nurhayati *et al.*, 2020). Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan penelitian, kemudian lubang diisi dengan sampel yang akan diuji. Proses inkubasi berlangsung selama 18 hingga 24 jam pada suhu 37⁰ C. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang. Daerah bening di sekitar lubang menunjukkan bahwa agen antibakteri menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan milimeter. Kelebihan metode ini adalah lebih mudah untuk mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri beraktivitas di permukaan atas dan bawah *nutrient agar* (Pratiwi, 2019).

2.5 Analisis Statistik

2.5.1 Uji normalitas

Uji normalitas merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui nilai sebaran data pada sebuah kelompok data atau variabel, apakah sebaran data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas diperlukan untuk menjawab pertanyaan apakah syarat sampel telah terpenuhi atau tidak, sehingga hasil penelitian dapat digeneralisasi pada populasi atau dapat mewakili populasi.

Ketika data yang dihasilkan tidak terdistribusi secara normal, hasil yang diberikan akan meleset dari yang sebenarnya. Hal ini dapat disebabkan oleh data ekstrim, data yang diurutkan, dan data yang mengikuti distribusi lain (Fahmeyzan *et al.*, 2018).

Pengambilan kesimpulan hasil uji normalitas dapat dilihat sebagai berikut:

1. Jika nilai signifikansi $> 0,05$, maka dinyatakan data berdistribusi normal.
2. Jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka dinyatakan data berdistribusi tidak normal (Pratama & Permatasari, 2021).

2.5.2 Uji homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji yang digunakan sebagai bahan acuan untuk menentukan uji statistik. Dasar atau pedoman pengambilan keputusan dalam uji homogenitas adalah sebagai berikut:

1. Jika nilai signifikan atau Sig. $< 0,05$, maka dikatakan bahwa varians dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama (tidak homogen).
2. Jika nilai signifikan atau Sig. $> 0,05$, maka dikatakan bahwa varians dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama (homogen) (Pratama & Permatasari, 2021).

2.5.3 Uji *one way anova*

Uji *one way anova* atau dikenal dengan anova satu arah digunakan untuk membandingkan lebih dari dua kelompok data dan merupakan pengembangan lebih lanjut dari uji-T. Anova satu arah menguji kemampuan dari signifikan hasil penelitian. Artinya jika terbentuk berbeda dua atau lebih sampel maka dianggap dapat mewakili populasi. Untuk memenuhi uji anova maka harus memenuhi beberapa syarat sebagai berikut:

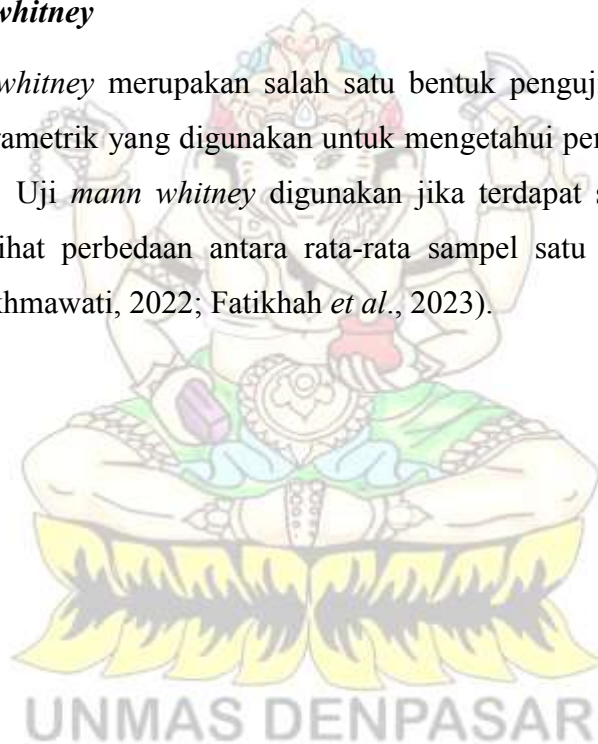
1. Sampel terdiri dari kelompok yang independen.
2. Varian antar kelompok harus homogen.
3. Data masing-masing kelompok berdistribusi normal (Palupi & Prasetya, 2022).

2.5.4 Uji *kruskal wallis*

Uji *kruskal wallis* merupakan salah satu uji statistik non parametrik yang dapat digunakan untuk menguji perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dengan variabel dependen. Uji *kruskal wallis* dilakukan untuk kelompok data yang tidak memenuhi persyaratan uji parametrik seperti uji normalitas dan uji varians (Jamco & Balami, 2022).

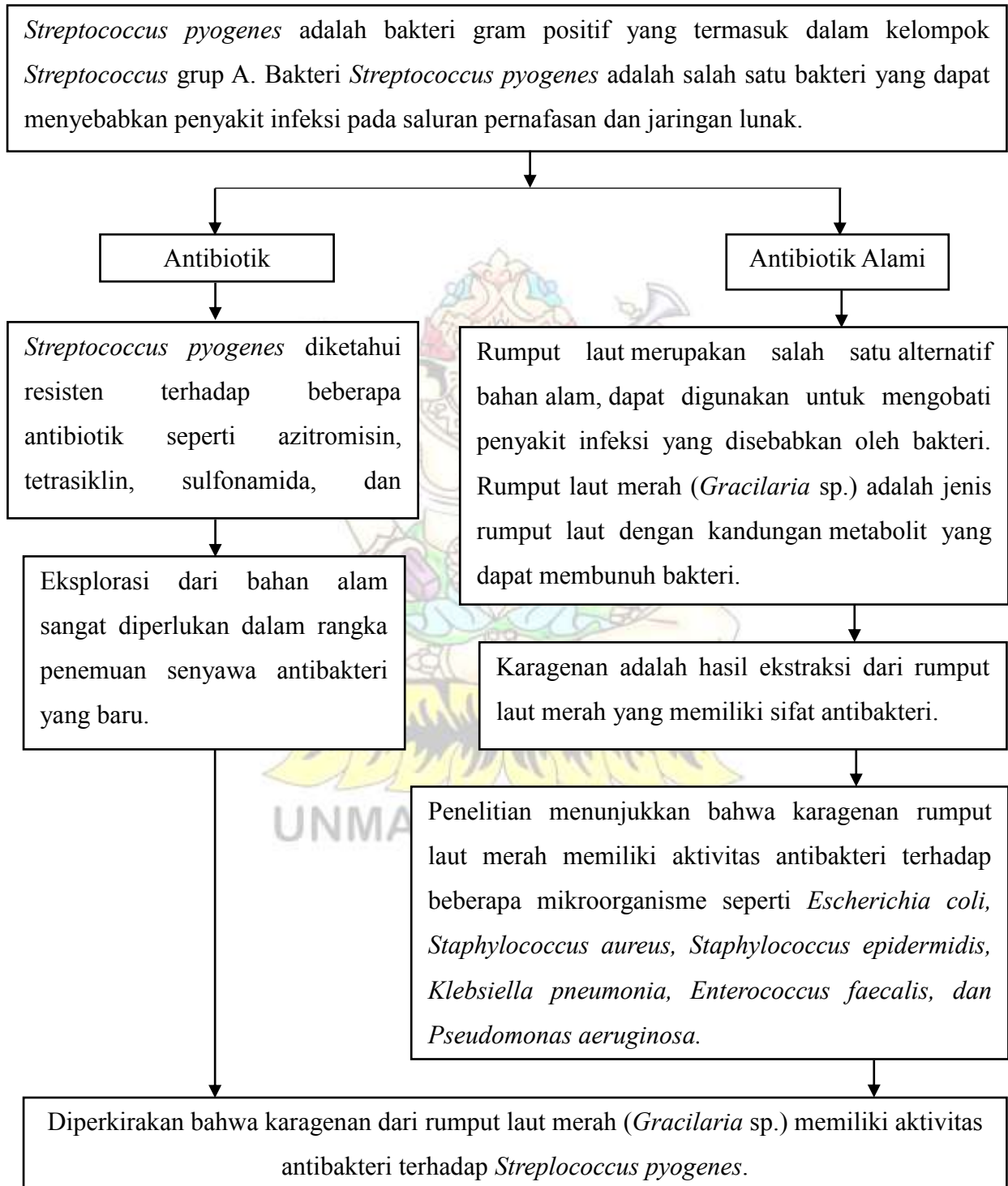
2.5.4 Uji *mann whitney*

Uji *mann whitney* merupakan salah satu bentuk pengujian dalam analisis statistika non parametrik yang digunakan untuk mengetahui perbedaan antara dua kelompok bebas. Uji *mann whitney* digunakan jika terdapat sebaran data tidak normal dan melihat perbedaan antara rata-rata sampel satu dengan yang lain (Fajarwati & Rakhmawati, 2022; Fatikhah *et al.*, 2023).



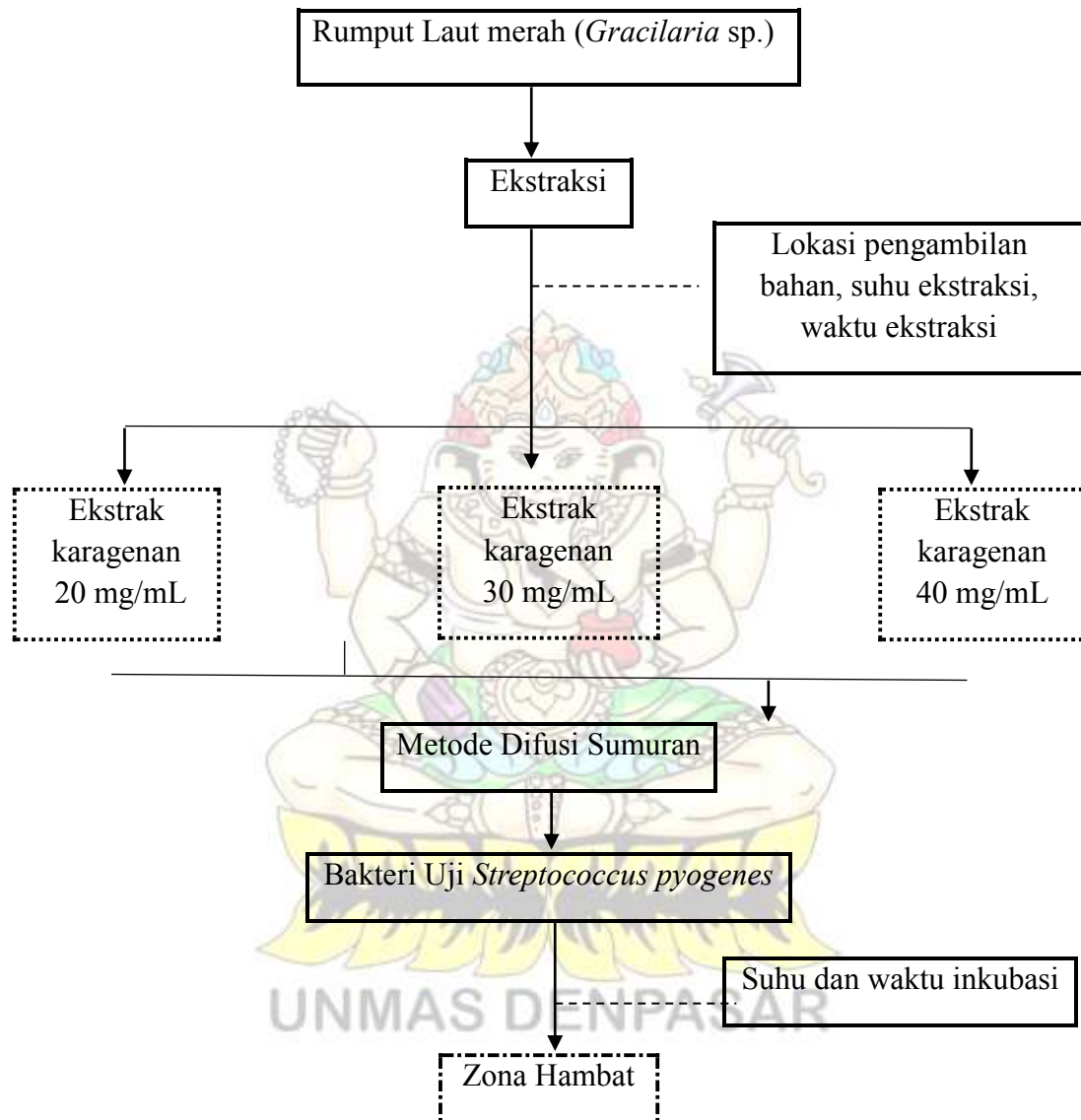
2.6 Kerangka Konsep

2.6.1 Kerangka teori



Gambar 2.5 Kerangka Teori

2.6.2 Kerangka konseptual



Gambar 2.6 Kerangka Konseptual

Keterangan :

Variabel	Bebas		:
Variabel	Terikat		:

Variabel Kontrol :

