

RESEARCH ARTICLE

Comparison of Types of Etanol Solvents, Antibacterial Test Methods, and Bacterial Inoculation Techniques used to Determine The Antibacterial Activity of Turmeric Rhizome Ethanol Extract Against *Escherichia coli*

(Perbandingan Jenis Pelarut Etanol, Metode Uji Antibakteri, dan Teknik Inokulasi Bakteri yang digunakan untuk Menentukan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit terhadap *Escherichia coli*)

Endang Soesetyaningsih, Azizah^{*)}

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia

ABSTRACT

Turmeric is a plant with antibacterial properties due to the curcumin content found in its rhizomes. Antibacterial testing of plant extracts is influenced by several factors. This study aims to determine the effect of the type of ethanol solvents, antibacterial test methods, and inoculation techniques used on the antibacterial activity of turmeric rhizome ethanol extract. Turmeric rhizome ethanol extract was prepared using two types of ethanol solvent, namely 99% ethanol (absolute) and 96% ethanol, with the final concentration of the extract used being 80%. The antibacterial test methods used were the disc diffusion method and agar well diffusion. Additionally, two inoculation techniques were employed for the test bacteria, *E. coli*: the spread plate and pour plate methods. The research results showed that the ethanol extract of turmeric rhizomes was capable of inhibiting *E. coli* growth under various treatment conditions. The highest average inhibition zone was in the PA_C_SP treatment, which was 29.82 mm, while the lowest average inhibition zone was in the T_S_PP treatment, namely 2.12 mm. The type of ethanol solvent that produced a larger average inhibition zone was 99% ethanol. The disk diffusion antibacterial test method produces a larger average zone of inhibition than the well diffusion method. The average inhibition zone results for the spread plate inoculation technique were greater than for the pour plate inoculation technique. These findings indicate that the type of ethanol solvent, antibacterial test method, and bacterial inoculation technique significantly influence the antibacterial activity of turmeric rhizome ethanol extract. However, further research needs to be carried out regarding the effect of the type of ethanol solvent, antibacterial test methods, and bacterial inoculation techniques in turmeric rhizome extract on other types of pathogenic bacteria.

Kunyit merupakan salah satu tanaman yang memiliki sifat sebagai antibakteri dikarenakan kandungan kurkumin pada bagian tanamannya seperti rimpang. Pengujian antibakteri ekstrak tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri, dan teknik inokulasi yang digunakan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit. Ekstrak etanol rimpang kunyit dibuat dengan dua jenis pelarut etanol yaitu etanol 99% (absolut) dan etanol 96% dengan konsentrasi akhir ekstrak yang digunakan yaitu 80%. Metode uji antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi cakram dan difusi sumuran agar. Teknik inokulasi bakteri uji, *E. coli*, yang digunakan pada penelitian ini adalah *spread plate* dan *pour plate*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* walaupun dengan beberapa perlakuan yang berbeda. Rata-rata zona hambat tertinggi yaitu pada perlakuan PA_C_SP sebesar 29.82 mm sedangkan rata-rata zona hambat terendah pada perlakuan T_S_PP yaitu 2.12 mm. Jenis pelarut etanol yang menunjukkan rata-rata zona hambat lebih besar adalah pelarut etanol 99%. Metode uji antibakteri difusi cakram menghasilkan rata-rata zona hambat lebih besar dibandingkan metode difusi sumuran. Hasil rata-rata zona hambat pada teknik inokulasi *spread plate* lebih besar dibandingkan teknik inokulasi *pour plate*. Hasil ini menunjukkan bahwa jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri, dan teknik inokulasi bakteri yang berbeda yang digunakan pada penelitian ini memengaruhi aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri, dan teknik inokulasi bakteri pada ekstrak rimpang kunyit terhadap jenis bakteri patogen yang lain.

Keywords: Turmeric rhizome ethanol extract, Antibacterial activity, *Escherichia coli*.

^{*)}Corresponding author:
Azizah
E-mail: azizah.bafared@gmail.com

PENDAHULUAN

Senyawa antibakteri adalah senyawa kimiawi atau biologis baik alami maupun sintetik yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri [1]. Penggunaan antibiotik sebagai antibakteri memiliki efek samping seperti munculnya resistensi pada beberapa jenis bakteri [2]. Oleh karena itu, banyak dilakukan penelitian mengenai penggunaan tanaman herbal sebagai antibakteri. Salah satu tanaman herbal yang banyak digunakan oleh peneliti yaitu kunyit.

Kunyit merupakan tanaman dari famili Zingiberaceae. Kunyit secara tradisional digunakan sebagai bumbu dan obat-obatan. Potensi lain dari kunyit telah dimanfaatkan dalam beberapa tahun terakhir di berbagai bidang lain seperti penelitian, kosmetik, dan industri. Komponen fitokimia dari kunyit meliputi gula, protein, resin, minyak atsiri, dan senyawa yang disebut kurkuminoid. Kurkuminoid terdiri dari beberapa senyawa yaitu kurkumin, *demethoxycurcumin*, dan *bisdemethoxycurcumin*. Beberapa manfaat kunyit yang telah dilaporkan diantaranya sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, antitumor, dan antikanker. Manfaat ini disebabkan oleh adanya senyawa kurkumin yang termasuk komponen bioaktif utama di dalamnya [3]-[4]. Penelitian yang banyak dilakukan beberapa tahun terakhir ini yaitu mengenai potensi kunyit sebagai antibakteri pada beberapa jenis bakteri patogen.

Uji antibakteri suatu ekstrak terhadap bakteri patogen perlu dilakukan. Metode uji aktivitas antibakteri yang umum digunakan adalah metode difusi cakram dan metode pengenceran media cair atau padat. Selain kedua metode tersebut, metode difusi sumuran agar juga salah satu metode yang dapat digunakan dalam menguji aktivitas antibakteri suatu ekstrak [5]. Metode yang umum dilakukan oleh beberapa peneliti di Laboratorium Mikrobiologi adalah metode difusi cakram dan sumuran agar.

Metode difusi cakram merupakan metode yang dikembangkan pada tahun 1940. Metode ini merupakan salah satu metode tertua untuk pengujian kerentanan antimikroba atau *antimicrobial susceptibility testing* (AST). Selain itu metode ini menjadi salah satu teknik yang paling populer untuk AST di laboratorium mikrobiologi klinis [6]. Keuntungan utama metode ini adalah metode sederhana, murah, dapat digunakan untuk menguji sebagian besar mikroorganisme dan

agen antimikroba, serta mudah menafsirkan hasil yang tampak [5], [7]. Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah kurangnya mekanisasi atau otomatisasi pengujian dan beberapa jenis yang susah ditumbuhkan tidak dapat diuji dengan menggunakan metode ini [8].

Metode uji antimikroba lainnya ada metode difusi sumuran agar. Metode difusi sumuran agar merupakan metode yang banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba tanaman atau ekstrak mikroba [9]. Keuntungan dari metode difusi sumuran agar yaitu lebih mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk. Namun, pembuatan sumuran pada media agar memiliki beberapa kesulitan seperti retaknya media agar di sekitar lokasi sumuran sehingga akan memengaruhi hasil zona hambat suatu ekstrak [1]. Penentuan aktivitas antibakteri suatu ekstrak dapat dilihat dengan mengukur zona bening yang tampak disekitar ekstrak yang diujikan.

Beberapa faktor yang memengaruhi hasil uji antibakteri diantaranya adalah metode uji yang digunakan, jenis dan jumlah inokulum bakteri, komposisi dan kedalaman media, waktu penundaan antara aplikasi cakram dan inkubasi, suhu dan waktu inkubasi, konsentrasi antibiotik dan metode pembacaan ukuran zona [10]-[12]. Selain itu, teknik inokulasi isolat bakteri serta jenis pelarut pada ekstrak agen antimikroba juga dapat memengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri suatu ekstrak. Pelarut yang umum digunakan dalam pembuatan ekstrak rimpang kunyit diantaranya yaitu etanol, metanol, heksan, etil asetat, dan lain sebagainya. Menurut penelitian Wahyuningtyas *et al.* [13], etanol merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa kurkumin pada kunyit paling tinggi (1,89%) dibandingkan pelarut lain. Oleh karena itu, pada penelitian ini pembuatan ekstrak rimpang kunyit menggunakan pelarut etanol. Namun penggunaan pelarut etanol pada laboratorium sendiri ada yang murah (teknis) dan mahal (Pro Analisis).

Selain penggunaan pelarut, teknik inokulasi isolat bakteri pada media uji juga menjadi salah satu faktor yang memengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri suatu senyawa. Teknik inokulasi yang banyak digunakan pada beberapa penelitian adalah metode *spread plate*. Namun, teknik ini terdapat beberapa kekurangan diantaranya pertumbuhan isolat yang tidak merata pada media uji sehingga akan menyebabkan hasil uji antibakteri tidak seragam. Oleh karena itu, salah satu teknik lain yang juga digunakan yaitu metode *pour plate*.

Hasil pertumbuhan isolat bakteri yang tumbuh dengan menggunakan teknik ini lebih rata dibandingkan dengan metode *spread plate*.

Namun, selama ini belum terdapat penelitian yang membandingkan pengaruh kedua teknik inokulasi bakteri tersebut terhadap hasil uji antibakteri. Jenis isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *E. coli* merupakan salah satu bakteri yang normal ada di saluran pencernaan manusia. Namun, beberapa strain dari bakteri ini dapat bersifat patogen pada manusia yang menyebabkan penyakit pada pencernaan seperti diare, infeksi saluran kemih, dan meningitis [14]-[16]. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh penggunaan jenis pelarut, metode uji antibakteri, serta teknik inokulasi bakteri yang berbeda terhadap aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit terhadap bakteri *E. coli*.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit

Satu kilogram rimpang kunyit yang dibeli di Pasar Tanjung dicuci bersih kemudian dipotong tipis-tipis. Rimpang kunyit yang telah dipotong selanjutnya dikeringkan kurang lebih selama lima hari. Setelah rimpang kering, kemudian serbuk kunyit dihaluskan dan disaring menggunakan *mesh* no 60. Sebanyak 40 gram serbuk dimaserasi dengan menambahkan 400 mL pelarut etanol 96% untuk jenis pelarut etanol teknis dan 99% untuk jenis pelarut etanol Pro Analisis (PA) / absolut selama 2 x 24 jam. Hasil maserasi kemudian disaring dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan sisa etanol yang ada sehingga didapatkan ekstrak etanol rimpang kunyit [17], [18]. Penggunaan pelarut etanol dalam pembuatan ekstrak rimpang kunyit dikarenakan berdasarkan pada penelitian Wahyuningtyas *et al.* [13] pelarut etanol merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa kurkumin tertinggi dibandingkan pelarut lain yaitu sebesar 1,89%. Ekstrak yang didapatkan dibuat konsentrasi 80% untuk masing-masing jenis pelarut etanol. Penentuan konsentrasi ini berdasarkan pada penelitian Rahmawati *et al.* [19], menyatakan bahwa ekstrak kunyit dapat menghambat aktivitas bakteri *E. coli* dengan konsentrasi terendah 50% dan konsentrasi tertinggi 100%.

Peremajaan isolat *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* dari stok koleksi diremajakan dengan cara menginokulasikan secara goresan pada media Nutrient Agar (NA) miring dan dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari peremajaan isolat bakteri ini yaitu untuk meregenerasi atau memperbaiki sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam [20].

Pembuatan Inokulum

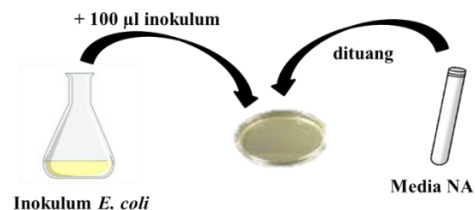
Pembuatan inokulum *E. coli* disesuaikan dengan jumlah kebutuhan yang akan digunakan untuk penelitian. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan 1 ose isolat *E. coli* berumur 24 jam dari media NA ke dalam media *Nutrient Broth* (NB). Setelah itu diinkubasi *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

Penanaman isolat bakteri *E. coli*

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, pada penelitian ini akan digunakan dua teknik penanaman isolat bakteri *E. coli* yaitu metode tuang (*pour plate*) dan metode tabur (*spread plate*).

a. Teknik Inokulasi *Pour Plate*

Media NA 10 ml dipanaskan hingga mencair, kemudian disimpan pada inkubator suhu 50°C. Inokulum bakteri yang ada diambil sebanyak 100 µl menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Setelah itu, tuangkan media NA yang sudah dicairkan, kemudian cawan yang berisi inokulum dan media NA digeser membentuk angka delapan sebanyak 20x untuk meratakan media dengan inokulum. Media ditunggu hingga memadat. Media yang sudah memadat selanjutnya digunakan sebagai media uji. Tahapan metode *pour plate* ini dapat dilihat pada Gambar 1.

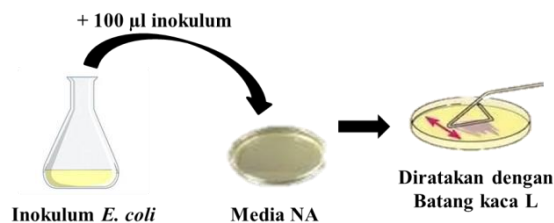


Gambar 1. Tahapan metode *pour plate*

b. Teknik Inokulasi *Spread Plate*

Media NA 10 ml dipanaskan hingga mencair, kemudian simpan pada inkubator suhu 50°C. Ketika

media sudah hangat, media dituang ke dalam cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat. Setelah media memadat, simpan media pada suhu kamar (25°C) selama 24 jam. Inokulum bakteri uji diambil sebanyak 100 µl menggunakan mikropipet, kemudian masukkan ke dalam media NA pada cawan petri sebelumnya. Kemudian *dispread* dengan menggunakan batang kaca L secara merata. Setelah rata dan kering, media siap untuk digunakan sebagai media uji. Tahapan metode *spread plate* ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tahapan metode *spread plate*

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 2 metode yaitu metode difusi cakram dan metode difusi sumuran agar.

a. Metode Difusi Cakram

Pada metode ini, pemberian ekstrak etanol rimpang kunyit di kertas cakram dilakukan dengan cara meneteskan ekstrak etanol rimpang kunyit di kertas cakram. Masing-masing cara diulang sebanyak 5 kali pada masing-masing media uji (*spread plate* dan *pour plate*). Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm ditetaskan 20 µl ekstrak etanol rimpang kunyit [21]. Setelah itu kertas cakram diletakkan secara steril pada media uji baik yang *spread plate* ataupun yang *pour plate*. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, zona hambat yang terbentuk disekitar cakram dihitung dengan menggunakan jangka sorong dan hasil yang didapatkan dicatat serta dihitung rata-ratanya [22], [23].

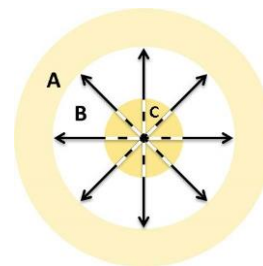
b. Metode Difusi Sumuran Agar

Media uji yang telah siap digunakan baik *spread plate* ataupun *pour plate* dilubangi dengan pelubang media berdiameter 5 mm secara steril. Kemudian lubang diisi dengan ekstrak etanol rimpang kunyit sebanyak 20 µl.

Media uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur dengan menggunakan jangka sorong sebagai hasil aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit [23], [24].

Zona hambat yang muncul di sekitar cakram atau sumuran merupakan aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit terhadap bakteri *E. coli*. Diameter total (diameter zona hambat dan diameter cakram / sumuran) dan diameter cakram / sumuran diukur menggunakan jangka sorong sebanyak 4 kali (Gambar 3.) untuk mendapatkan nilai zona hambat pada posisi yang berbeda. Hasil hitung dirata-rata untuk masing-masing pengulangan uji. Zona hambat ekstrak rimpang kunyit ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Diameter Zona hambat (mm)} = \text{diameter total} - \text{diameter cakram atau sumuran} \dots (1)$$



Keterangan : A : Media uji; B : Zona hambat; C : Kertas cakram atau sumuran; ↔ : diameter total; --- : diameter cakram / sumuran

Gambar 3. Sketsa Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak rimpang kunyit

Analisis Data

Hasil pengukuran zona hambat ekstrak rimpang kunyit dianalisis menggunakan Kruskal Wallis dengan nilai α yaitu 0,05. Apabila hasil signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Dunn. Analisis data menggunakan Aplikasi R Studio. Analisis data digunakan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri, dan teknik inokulasi bakteri yang digunakan terhadap hasil aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kunyit merupakan tanaman yang telah banyak diketahui manfaatnya seperti sebagai antioksidan, anti

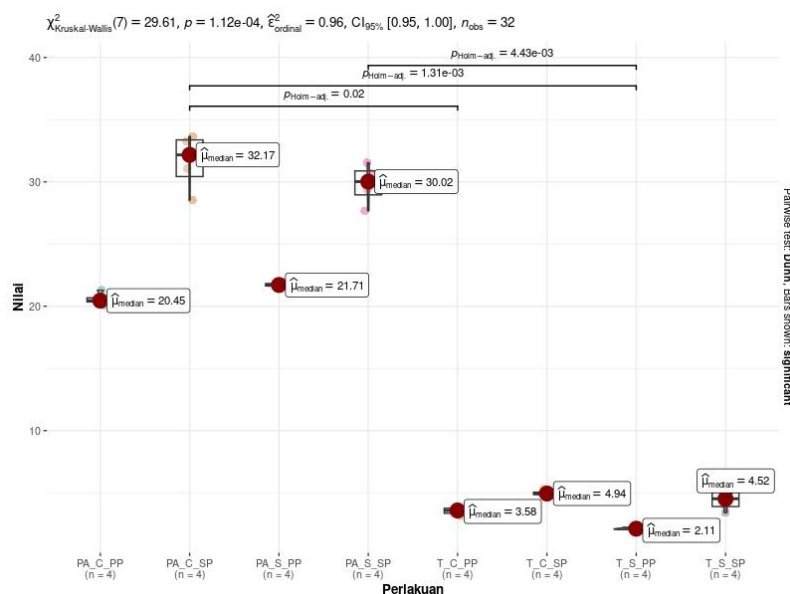
inflamasi, anti tumor, anti kanker, dan antibakteri [3]. Hasil uji antibakteri ekstrak rimpang kunyit yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang kunyit mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* (Tabel 1). Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian yaitu pada penelitian Rahmawati *et al.* [19], yang menyebutkan bahwa ekstrak kunyit memiliki diameter zona hambat yang sangat signifikan terhadap *E. coli* dengan konsentrasi terendah 50% dan konsentrasi tertinggi 100%. Pada penelitian Mukhtar dan Ghorri [22], juga menyebutkan bahwa ekstrak etanol kunyit mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan zona hambat yang dihasilkan pada konsentrasi 80% sebesar $10,6 \pm 0,52$ mm, sedangkan pada penelitian Septiana dan Simanjuntak [17], menyatakan bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* pada konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm dengan masing-masing diameter penghambatan secara berurutan sebesar 7 mm, 8 mm, dan 9 mm.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa rata-rata zona hambat tertinggi yaitu pada perlakuan pelarut etanol PA, metode uji cakram, dan teknik inokulasi *spread plate* (PA_C_SP) sedangkan rata-rata zona hambat terendah pada perlakuan pelarut etanol teknis, metode uji sumuran, dan teknik inokulasi *pour plate* (T_S_PP) dengan nilai zona hambat secara

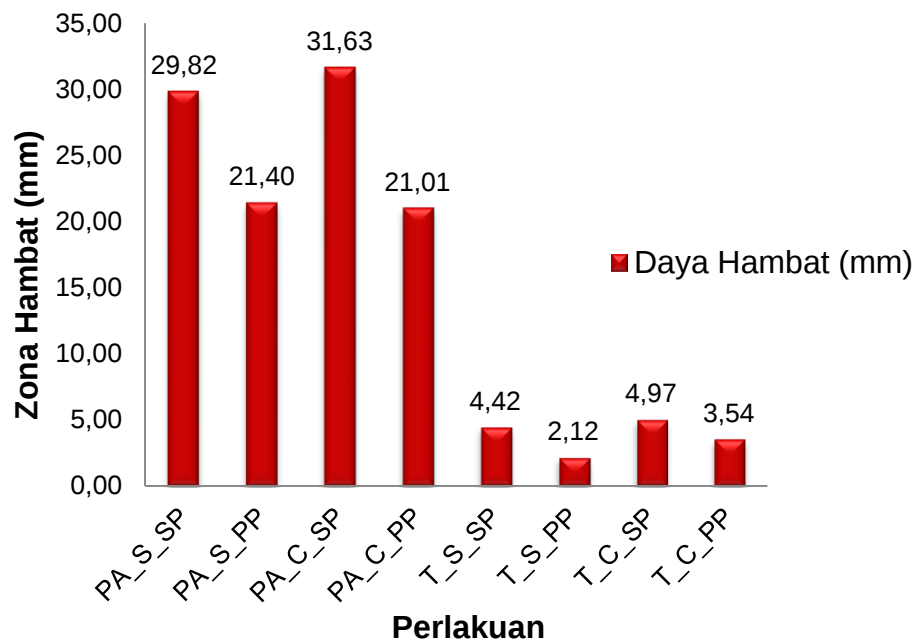
berutuan adalah 29.82 mm dan 2.12 mm. Hasil analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang digunakan pada hasil rata-rata zona hambat ekstrak etanol rimpang kunyit terhadap bakteri *E. coli* ($P = 0,000$). Hasil uji lanjut Dunn test dilakukan pada penelitian ini untuk mengetahui signifikansi antar perlakuan. Hasil uji lanjut masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 1. Rata-Rata Zona Hambat Ekstrak Rimpang Kunyit Terhadap Bakteri *E. coli* dengan beberapa perlakuan

Perlakuan	Rata – Rata Zona Hambat (mm) $\pm$ SD
Pro Analisis_Sumuran_SpreadPlate (PA_S_SP)	29,82 $\pm$ 1,68
Pro Analisis_Sumuran_PourPlate (PA_S_PP)	21,40 $\pm$ 0,39
Pro Analisis_Cakram_SpreadPlate (PA_C_SP)	31,63 $\pm$ 2,36
Pro Analisis_Cakram_PourPlate (PA_C_PP)	21,01 $\pm$ 0,68
Teknis_Sumuran_SpreadPlate (PA_S_SP)	4,42 $\pm$ 0,84
Teknis_Sumuran_PourPlate (PA_S_PP)	2,12 $\pm$ 0,08
Teknis_Cakram_SpreadPlate (PA_C_SP)	4,97 $\pm$ 0,26
Teknis_Cakram_PourPlate (PA_C_PP)	3,54 $\pm$ 0,33



Gambar 4. Hasil Uji Lanjut Dunn antar perlakuan menggunakan aplikasi R studio



Gambar 5. Grafik Rata-Rata Zona Hambat Ekstrak Rimpang Kunyit Terhadap Bakteri *E. coli* dengan beberapa perlakuan

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa hanya perlakuan PA_C_SP berbeda nyata dengan T_C_PP ($P 0,02 < 0,05$), perlakuan PA_C_SP berbeda nyata dengan T_S_PP ($P 0,00 < 0,05$) dan perlakuan PA_S_SP berbeda nyata dengan T_S_PP ($P 0,00 < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa tidak semua perlakuan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Pengaruh masing-masing perlakuan jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri, dan teknik inokulasi bakteri yang digunakan pada penelitian ini terhadap zona hambat ekstrak etanol rimpang kunyit yang dihasilkan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan Gambar 5 dapat diketahui bahwa perbedaan pelarut etanol yang digunakan dalam proses maserasi rimpang kunyit sangat memengaruhi nilai zona hambat. Penggunaan pelarut etanol PA / Absolut 99% menghasilkan zona hambat lebih besar dibandingkan dengan pelarut etanol teknis 96%. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi maka akan semakin tinggi senyawa bioaktif dalam kunyit yang terlarut yaitu kurkumin. Pernyataan ini sesuai dengan penelitian Ihsan *et al.* [25], yang menyatakan bahwa kurkumin sangat mudah larut dalam etanol dengan

semakin besar kandungan etanol akan semakin tinggi kadar kurkumin yang terlarut. Hal ini ditunjukkan dari hasil penelitiannya yaitu kandungan kurkumin yang ada dalam ekstrak etanol 96% lebih besar dari pada kandungan kurkumin dalam ekstrak etanol 80% dan 70%.

Perbedaan metode uji antibakteri yang digunakan pada penelitian ini juga memengaruhi hasil zona hambat yang didapatkan. Berdasarkan Gambar 5 dapat diketahui bahwa secara keseluruhan rata-rata zona hambat pada perlakuan metode uji difusi sumuran baik dengan pelarut etanol PA maupun pelarut etanol teknis lebih kecil dibandingkan dengan rata-rata zona hambat pada perlakuan metode uji difusi cakram yang menggunakan pelarut etanol PA ataupun pelarut etanol teknis. Hasil ini berbeda dengan penelitian Valgas *et al.* [9], yang menyatakan bahwa penggunaan metode uji difusi sumuran lebih sensitif dari pada metode uji cakram pada ekstrak tanaman yang digunakan terhadap bakteri *E. coli*. Hasil yang berbeda ini dikarenakan perbedaan ekstrak tanaman yang digunakan. Menurut Izah [26], beberapa faktor yang menentukan aktivitas antibakteri ekstrak tanaman yaitu jenis pelarut, jenis mikroorganisme, biokimia dan fisiologi mikroorganisme, metabolisme dan strategi adaptasi mikrob uji, jenis tanaman,

biokimia tanaman yang digunakan, umur dan bagian tanaman, konsentrasi ekstrak tanaman dan periode ekstraksi. Metode uji sumuran dan metode uji cakram masing-masing memiliki kelebihan dan keuntungan.

Beberapa keuntungan metode cakram yaitu metode yang digunakan sederhana, murah, dapat digunakan untuk menguji sebagian besar mikroorganisme dan agen antimikroba, serta mudah menafsirkan hasil yang tampak [5], [7]. Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah kurangnya mekanisasi atau otomatisasi pengujian dan beberapa jenis mikroorganisme yang susah ditumbuhkan tidak dapat diuji dengan menggunakan metode ini [8]. Kelemahan utama dari metode uji cakram adalah bersifat kualitatif sehingga tidak membedakan antara efek bakterisidal dan bakteriostatik senyawa yang digunakan. Penggunaan metode uji cakram lebih baik digunakan untuk senyawa dengan berat molekul kecil sedangkan senyawa yang memiliki berat molekul lebih besar disarankan menggunakan metode uji difusi sumuran agar [9]. Metode difusi sumuran agar juga memiliki keuntungan dan kelemahan. Keuntungan dari metode difusi sumuran agar ini yaitu lebih mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk. Namun, pembuatan sumuran pada media agar memiliki beberapa kesulitan seperti retaknya media agar di sekitar lokasi sumuran sehingga akan memengaruhi hasil zona hambat suatu ekstrak[1].

Penggunaan metode uji cakram perlu memperhatikan beberapa hal penting seperti pemilihan media yang digunakan, pH media, kedalaman agar dan kadar air, kondisi inkubasi dan kepadatan inokulum yang digunakan. Diameter zona hambat dapat dipengaruhi oleh kelarutan zat yang diuji, rentang difusi, dan penguapan. Pengendapan zat yang tidak larut dalam air dalam cakram akan mencegah difusi zat antimikroba ke dalam agar. Adanya campuran konstituen dengan laju difusi yang berbeda, hal ini mungkin memberikan hasil yang tidak dapat dipercaya. Namun, tidak adanya zona hambat tidak berarti bahwa senyawa yang diuji tidak efektif, terutama jika senyawa yang digunakan kurang polar, yang berdifusi lebih lambat dalam media agar yang berair. Oleh karena itu, tidak mengherankan jika senyawa fenolik hasil uji antibakteri mendapatkan hasil yang tidak konsisten [27]-[29]. Metode uji cakram dan difusi sumuran agar merupakan metode uji yang

bersifat kualitatif. Uji tersebut tidak mengukur jumlah senyawa uji yang terdifusi ke dalam media agar [29]. Metode difusi sumuran agar lebih sensitif dan sesuai untuk uji produk alami kationik dari pada metode cakram. Hal ini dikarenakan produk alami kationik teradsorpsi pada permukaan cakram dan tidak berdifusi ke dalam media [9], [30].

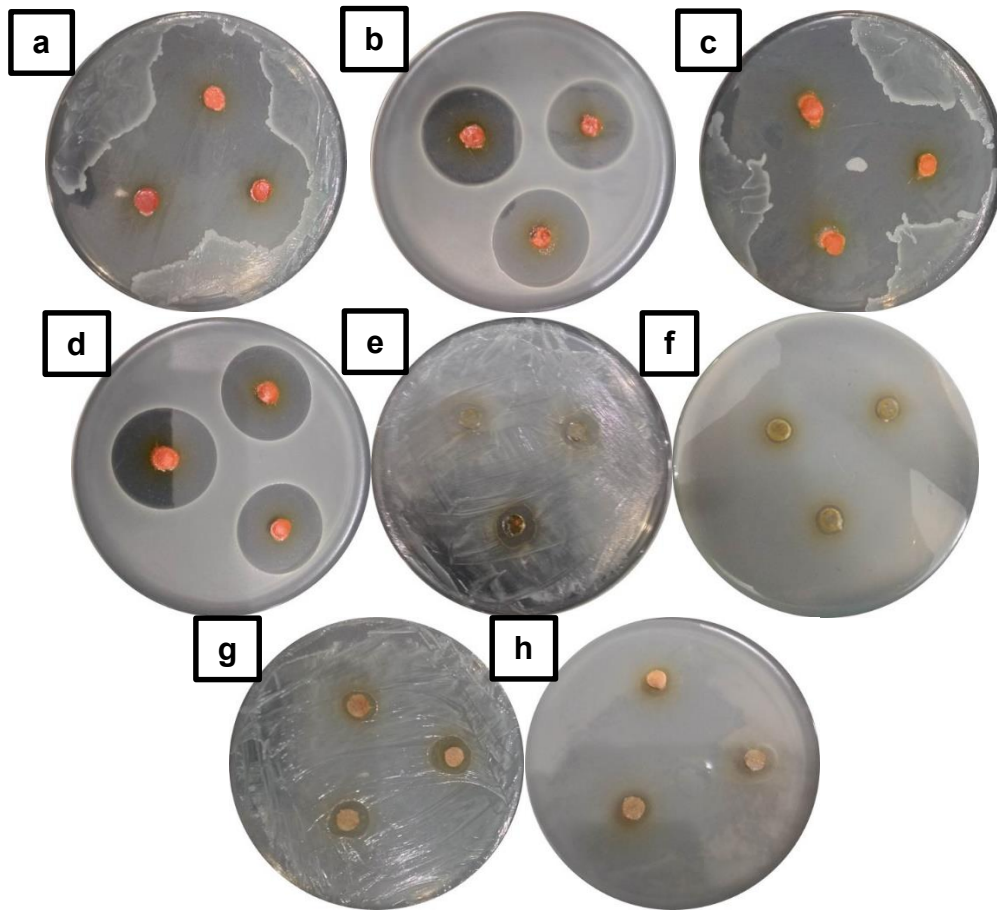
Teknik inokulasi bakteri yang digunakan pada penelitian ini menjadi salah satu variabel yang diujikan terhadap zona hambat ekstrak etanol rimpang kunyit. Teknik inokulasi bakteri *E. coli* yang digunakan yaitu *spread plate* dan *pour plate*. Berdasarkan Gambar 5. dapat diketahui bahwa perbedaan metode inokulasi bakteri yang digunakan memengaruhi zona hambat yang dihasilkan. Pada perlakuan pelarut etanol PA baik metode uji difusi sumuran agar maupun cakram, memiliki hasil rata-rata zona hambat lebih tinggi ketika menggunakan teknik inokulasi *spread plate* dibandingkan *pour plate*. Hasil ini juga sama dengan perlakuan pelarut etanol teknis baik metode uji difusi sumuran agar maupun cakram, memiliki hasil rata-rata zona hambat lebih tinggi ketika menggunakan teknik inokulasi *spread plate* dibandingkan *pour plate*.

Metode *pour plate* merupakan metode yang sering digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme dari suatu sampel dengan menambahkan inokulum pada medium agar yang cair sebelum dipadatkan. Metode ini akan menghasilkan koloni yang terdistribusi secara merata keseluruh media pada pengenceran sampel yang sesuai digunakan. Metode *spread plate* juga merupakan metode yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme dari suatu sampel. Selain itu, teknik ini biasa digunakan untuk memisahkan mikroorganisme yang terdapat dalam sampel dengan volume sedikit, yang disebarkan pada permukaan media agar di dalam cawan [31]. Teknik inokulasi yang sering digunakan dalam uji antibakteri terutama dengan metode cakram adalah teknik inokulasi *spread plate*. Hal ini dikarenakan pertumbuhan bakteri yang diinokulasikan tumbuh di permukaan media agar saja sehingga efek dari zat antibakteri yang diujikan akan langsung mengenai bakterinya. Menurut Hudzicki [32], teknik inokulasi bakteri yang digunakan pada uji antibakteri difusi cakram Kirby-Bauer adalah teknik *swab*. Prinsip teknik *swab* adalah dengan menggoreskan *swab* yang sudah direndam pada

inokulum ke seluruh permukaan media agar. Teknik *swab* ini sama prinsipnya dengan teknik *spread plate*.

Penggunaan teknik inokulasi *spread plate* untuk uji antibakteri memiliki kekurangan yaitu pertumbuhan isolat yang tidak merata pada media uji sehingga akan menyebabkan hasil uji antibakteri tidak seragam. Kekurangan ini juga terjadi pada penelitian ini yaitu hasil inokulasi bakteri *E. coli* pada media agar untuk uji

antibakteri baik menggunakan pelarut etanol PA atau etanol teknis maupun metode uji cakram atau difusi sumuran agar menghasilkan pertumbuhan isolat yang tidak merata pada media uji serta hasil zona hambat yang tidak seragam (Gambar 6a, 6c, 6e, 6g), berbeda dengan hasil teknik inokulasi *pour plate* (Gambar 6b, 6d, 6f, 6h).



Gambar 6. Hasil Uji Antibakteri dengan berbagai perlakuan, a. PA_S_SP, b. PA_S_PP, c. PA_C_SP, d. PA_C_PP, e. T_S_SP, f. T_S_PP, g. T_C_SP, dan h. T_C_PP

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit baik menggunakan pelarut etanol PA ataupun pelarut etanol teknis ketika proses maserasi, mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Hal ini dikarenakan adanya senyawa kurkumin pada rimpang kunyit yang memiliki sifat antibakteri. Menurut Priyadarsini [33], senyawa bioaktif utama dari rimpang kunyit adalah minyak atsiri dan kurkuminoid. Senyawa kurkuminoid pada ekstrak rimpang kunyit terdiri atas curcumin (60-70%), demethoxycurcumin (20-27%)

dan bisdemethoxycurcumin (10-15%). Mekanisme kerja kurkumin sebagai antibakteri mirip senyawa fenol lainnya yaitu menghambat metabolisme bakteri dengan cara merusak membran sitoplasma dan merusak protein di dalam sel sehingga menyebabkan metabolisme terganggu dan pertumbuhannya terhambat bahkan sel bakteri mati [19], [34]. Selain itu, menurut Rahmawati *et al.* [19], senyawa kurkumin mampu menghambat aktivitas bakteri *E. coli* dengan cara menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (cox-2) yang dapat mengubah asam arakhidonat

menjadi prostaglandin. Senyawa aktif pada rimpang kunyit menyebabkan terjadinya plasmolisis, kerusakan dinding sel dan kematian sel dari bakteri *Staphylococcus aureus* [35]. Berdasarkan penelitian Gupta *et al.* [36], sel bakteri *S. aureus* setelah dipapar dengan ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 0,5 g/ml selama 24 jam mengalami kelainan morfologi, dengan hilangnya sebagian membran sitoplasma, yang menyebabkan kerusakan sel bakteri hingga mengalami kematian selnya.

KESIMPULAN

Hasil uji antibakteri ekstrak etanol rimpang kunyit pada penelitian ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* walaupun dengan beberapa perlakuan yang berbeda. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang digunakan terhadap hasil rata-rata zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan hasil rata-rata zona hambat yang terbentuk, penggunaan pelarut etanol Pro Analisis / Absolut dengan konsentrasi 99% lebih baik dibandingkan dengan penggunaan pelarut etanol teknis 97%. Metode uji antibakteri yang digunakan pada penelitian ini yang menghasilkan rata-rata zona hambat dari ekstrak etanol rimpang kunyit lebih tinggi adalah metode difusi cakram dibandingkan dengan difusi sumuran agar. Teknik inokulasi bakteri juga berpengaruh terhadap hasil zona hambat dari ekstrak etanol rimpang kunyit yang terbentuk. Teknik inokulasi *spread plate* memiliki rata-rata zona hambat lebih tinggi dari pada *pour plate* pada perlakuan pelarut etanol PA dan teknis serta metode uji difusi sumuran dan cakram. Saran untuk penelitian lebih lanjut yaitu perlu dilakukannya penelitian terkait pengaruh jenis pelarut etanol, metode uji antibakteri dan teknik inokulasi pada ekstrak rimpang kunyit terhadap jenis bakteri patogen yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] L. S. Nurhayati, N. Yahdiyani, and A. Hidayatulloh, "Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram," *J. Teknol. Has. Peternak.*, vol. 1, no. 2, p. 41, 2020, doi: 10.24198/jthp.v1i2.27537.
- [2] R. Humaida, "Strategy to handle resistance of antibiotics," *J Major.*, vol. 3, no. 7, p. 113, 2014.
- [3] D. P. Basak, T. Adhikary, P. Das, and S. Biswas, "Phytochemical analysis and comparative study of antibacterial effect of turmeric extracts using different solvent.," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 410, no. 1, 2018, doi: 10.1088/1757-899X/410/1/012018.
- [4] K. M. Nelson, J. L. Dahlin, J. Bisson, J. Graham, G. F. Pauli, and M. A. Walters, "The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 5, pp. 1620-1637, 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- [5] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71-79, 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [6] E. Matuschek, D. F. J. Brown, and G. Kahlmeter, "Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 4, pp. O255-O266, Apr. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- [7] S. Le Page, A. van Belkum, C. Fulchiron, R. Huguet, D. Raoult, and J. M. Rolain, "Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 9, pp. 1859-1869, 2015, doi: 10.1007/s10096-015-2424-8.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute, "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - Eleventh edition," vol. 32, no. 1. 2012. doi: M02-A11.
- [9] C. Valgas, S. M. De Souza, E. F. A. Smânia, and A. Smânia, "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, no. 2, pp. 369-380, 2007, doi: 10.1590/S1517-83822007000200034.
- [10] I. M. Gould, "Towards a common susceptibility testing method?," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, no. 6, pp. 919-920, 2000, doi: 10.1093/jac/45.6.919.
- [11] J. Li *et al.*, "Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. JUN, pp. 1-11, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00364.
- [12] L. Jiang, F. Wang, F. Han, W. Prinyawiwatkul, H. K. No, and B. Ge, "Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 114, no. 4, pp. 956-963, 2012, doi: 10.1111/jam.12111.
- [13] E. P. Wahyuningtyas, I. G. Permana, and S. Wiadnyani, "Pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan senyawa kurkumin dan aktivitas antioksidan ekstrak kunyit

- (*Curcuma domestica* Val.),” *J. Ilmu dan Teknol. Pangan*, vol. 6, no. 2, pp. 61-70, 2017, [Online]. Available: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/itepa/article/view/36950>
- [14] J. W. Sahl, C. R. Morris, and D. A. Rasko, *Comparative genomics of pathogenic Escherichia coli*, Second Edi. Elsevier, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-397048-0.00002-4.
- [15] J. T. Poolman, *Escherichia coli*, Second Edi., vol. 2. Elsevier, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X.
- [16] S. L. Percival and D. W. Williams, *Escherichia coli*, Second Edi. Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8.
- [17] E. Septiana and P. Simanjuntak, “Aktivitas antimikroba dan antioksidan ekstrak beberapa bagian tanaman kunyit (*Curcuma longa*),” *FTTOFARMAKA J. Ilm. Farm.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-10, Jun. 2015, doi: 10.33751/jf.v5i1.193.
- [18] A. Muadifah, A. E. Putri, and N. Latifah, “Aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*,” *J. SainHealth*, vol. 3, no. 1, p. 45, 2019, doi: 10.51804/jsh.v3i1.313.45-54.
- [19] N. Rahmawati, E. Sudjarwo, and E. Widodo, “Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*,” *J. Ilmu-Ilmu Peternak. (Indonesian J. Anim. Sci.)*, vol. Vol. 24, no. 3, pp. 24–31, 2014.
- [20] M. Baharuddin, A. R. Patong, A. Ahmad, and N. La Nafie, “Isolasi dan karakterisasi bakteri simbiosis larva kupu-kupu *cossus cossus* penghasil enzim selulase,” *Al-Kimia*, vol. 2, no. 2, pp. 58-68, 2014.
- [21] N. Singh, S. Gupta, and V. Rathore, “Comparative antimicrobial study of ethanolic extract of leaf and rhizome of *curcuma longa* linn,” *Pharmacogn. J.*, vol. 9, no. 2, pp. 208–212, 2017, doi: 10.5530/pj.2017.2.35.
- [22] S. and Mukhtar and Ghori ifra, “Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamin and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256,” *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 131-136, 2012.
- [23] P. A. R. El Feghali, R. Ibrahim, and T. Nawas, “Antibacterial activity of curcumin against Lebanese clinical isolates of *Staphylococcus aureus*,” *MOJ Toxicol.*, vol. 4, no. 2, pp. 81-83, 2018, doi: 10.15406/mojt.2018.04.00094.
- [24] R. Arutselvi, T. Balasaravanan, P. Ponmurugan, N. M. Saranji, and P. Suresh, “Phytochemical screening and comparative study of anti microbial activity of leaves and rhizomes of turmeric varieties,” *Asian J. plant Sci. reserach*, vol. 2, no. 2, pp. 212-219, 2012.
- [25] B. R. P. Ihsan, I. P. Nurhayati, and I. Maysaroh, “Validasi metode Ultra High Performance Chromatography Double Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) untuk analisis kurkumin pada ekstrak etanol kunyit (*Curcuma longa*) dengan berbagai perbandingan method validation of ultra hig,” *Pharm. J. Indones.*, vol. 2018, no. 1, pp. 29-34, 2018.
- [26] S. C. Izah, “Some determinant factors of antimicrobial susceptibility pattern of plant extracts,” *Res. Rev. Insights*, vol. 2, no. 3, pp. 1-4, 2018, doi: 10.15761/rri.1000139.
- [27] T. King, G. Dykes, and R. Kristianti, “Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds,” *J. AOAC Int.*, vol. 91, no. 6, pp. 1423-1429, 2008, doi: 10.1093/jaoac/91.6.1423.
- [28] A. Klančnik, S. Piskernik, B. Jeršek, and S. S. Možina, “Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 81, no. 2, pp. 121-126, 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004.
- [29] M. Bubonja-Šonje, S. Knezević, and M. Abram, “Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds,” *Arb. Hig. Rada Toksikol.*, vol. 71, no. 4, pp. 300-311, 2020, doi: 10.2478/aiht-2020-71-3396.
- [30] T. Essawi and M. Srouf, “Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 70, no. 3, pp. 343-349, 2000, doi: 10.1016/S0378-8741(99)00187-7.
- [31] E. R. Sanders, “Aseptic laboratory techniques: Plating methods,” *J. Vis. Exp.*, no. 63, pp. 1-18, 2012, doi: 10.3791/3064.
- [32] J. Hudzicki, “Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol author information,” *Am. Soc. Microbiol.*, no. December 2009, pp. 1-13, 2016, [Online]. Available: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- [33] K. I. Priyadarsini, “The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent,” *Molecules*, vol. 19, no. 12. MDPI AG, pp. 20091-20112, Dec. 01, 2014. doi: 10.3390/molecules191220091.
- [34] M. U. Ulfah, “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Aseton Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*,” *J. FARMAMAKU (Farmasi Muhammadiyah Kuningan)*, vol. 5, no. 1, pp. 25-31, 2020, [Online]. Available: <https://stikes-muhammadiyahku.ac.id/ojs.stikes-muhammadiyahku.ac.id/index.php/jurnalfarmaku/article/view/82>

- [35] G. A. Cordell, M. Lou Quinn-Beattie, and N. R. Farnsworth, "The potential of alkaloids in drug discovery," *Phyther. Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 183-205, 2001, doi: 10.1002/ptr.890.
- [36] A. Gupta, S. Mahajan, and R. Sharma, "Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa rhizome* extract against *Staphylococcus aureus*," *Biotechnol. Reports*, vol. 6, pp. 51-55, 2015, doi: 10.1016/j.btre.2015.02.001.