

## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1. Sirih Hijau

## 2.1.1. Klasifikasi Sirih Hijau

Sirih hijau merupakan tanaman yang termasuk ke dalam suku atau famili *Piperaceae*. Sirih hijau di Indonesia banyak digunakan sebagai obat karena kandungan minyak atsirinya yang tinggi. Tempat yang terbuka atau sedikit terlindung merupakan tempat yang disukai sirih hijau untuk tumbuh (Muhlisah, 2007). Tanaman sirih hijau dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Muhlisah, 2007):

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Magnoliophyta/Angiospermae
- Klas : Magnoliopsida/Dicotyledonae
- Ordo : Piperales
- Famili : Piperaceae
- Genus : *Piper*
- Spesies : *Piper betle* Linn



Gambar 2.1 Daun Sirih Hijau (Muhlisah, 2007)

### 2.1.2. Morfologi Sirih Hijau

Sirih hijau merupakan tanaman yang tumbuh merambat dengan ketinggian dapat mencapai 5-15 meter. Batangnya berwarna hijau kecoklatan. Daun sirih hijau berbentuk jantung dan berwarna hijau tua. Permukaan daun agak kasar jika diraba. Bunganya tersusun dalam bulir, merunduk dan panjangnya 5-15 cm. Buahnya merupakan buni (memiliki dinding dengan dua lapisan), berbentuk bulat dan berwarna kuning kehijauan. Akar sirih termasuk akar tunggang dengan bentuk bulat serta warna coklat kekuningan (Muhlisah, 2007).

### 2.1.3. Kandungan Sirih Hijau

Daun sirih hijau mengandung minyak atsiri dengan 30% fenol dan beberapa derivatnya yang terdiri dari *hidroksikavicol*; 7,2-16,7% *kavicol*; 2,7-6,2% *kavibetol*; 0-9,6% *allylyrokatel*; 2,2-5,6% *karvakrol*; 26,8-42,5% *eugenol*; 4,2- 15,8% *eugenol metal eter*, 1,2-2,5% *p-cymene*; 2,4-4,8% *cineole*; 3-9,8% *caryophyllene*, 2,4-15,8% *cadinen*, *setragenol*, *terpennena*, *seskuiterpena*, *fenil propane*, *flavonoid*, *tannin*, *diastase*, *gula* dan *pati* (Hariana, 2006). Selain itu

menurut Materia Medica (2015), sirih hijau juga mengandung katekol, 1,8-sineol, pirokatekin, terpinil asetat, alkaloid dan piperin (Materia Medica, 2015).

## 2.2. Sirih Merah

### 2.2.1. Klasifikasi Sirih Merah

Sirih merah merupakan tanaman yang termasuk ke dalam suku atau famili *Piperaceae*. Pada tahun 1990-an sirih merah berfungsi sebagai tanaman hias karena penampilannya yang menarik. Tetapi pada tahun-tahun terakhir, sirih merah mulai dimanfaatkan sebagai tanaman obat (Juliantina, 2009). Tanaman sirih merah dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Hidayat, 2013):

- Divisi : Angiospermae/ Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida/ Dicotyledonae
- Ordo : Piperales
- Famili : Piperaceae
- Genus : *Piper*
- Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.



Gambar 2.2 Daun Sirih Merah (Hidayat, 2013)

### 2.2.2. Morfologi Sirih Merah

Tanaman sirih merah tumbuh menjalar seperti halnya sirih hijau. Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daun bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata dan permukaannya mengilap. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm (Andareto, 2015).

### 2.2.3. Kandungan Sirih Merah

Daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, polifenol dan tanin (Ngaisah, 2007). Selain itu menurut Matera Medica (2015), sirih merah juga mengandung terpenoid, isprenoid, saponin, cyanogenik, glukosida, glucosonilate, senyawa polivenol dan non protein amino acid (Materia Medica, 2015). Terdapat kesamaan kandungan pada daun sirih hijau dan daun sirih merah, keduanya memiliki kandungan fenol, flavonoid dan tanin. Sedangkan perbedaannya yaitu terdapat kandungan pada daun sirih hijau yang tidak terdapat pada daun sirih merah. Selain itu juga disebabkan karena perbedaan besar kandungan minyak atsiri yang terkandung dalam ekstrak daun sirih hijau dan ekstrak daun sirih merah (Hafida dkk., 2012).

### 2.3. Peran Sirih Hijau dan Sirih Merah sebagai Antibakteri

Dalam daun sirih hijau terdapat senyawa fenol dan derivatnya yang memiliki sifat antibakteri lima kali lipat dari senyawa fenol biasa jika dibandingkan dengan daun sirih merah (Hafida dkk., 2012). Mekanisme fenol sebagai agen anti bakteri menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat proses

pembentukan dinding sel atau dengan melisis dinding sel yang sudah terbentuk (Syahrinastiti dkk., 2015). Selain itu dalam daun sirih terdapat flavonoid yang berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Juliantinana dkk., 2009).

Alkaloid juga memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Tanin memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme reaksi dengan membran sel yang diduga dapat mengkerutkan dinding atau membran sel bakteri, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Sendy dkk., 2014).

#### **2.4. Metode Ekstraksi Daun Sirih Hijau dan Daun Sirih Merah**

Ekstraksi adalah istilah dalam bidang farmasi yang artinya pemisahan bahan aktif baik pada tanaman maupun hewan dengan menggunakan pelarut selektif sesuai standar prosedur ekstraksi. Standarisasi proses ekstraksi bertujuan untuk memurnikan zat aktif dari zat lain dengan menggunakan pelarut tertentu (Cahyono dan Meiny, 2011). Pelarut akan berpenetrasi ke dalam bahan tanaman sehingga melarutkan senyawa yang ada di dalamnya yang memiliki kepolaran yang sama (Yuliana dan Satu, 2012).

Salah satu metode ekstraksi adalah dengan cara maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi dengan cara merendam bahan baku dengan pelarut organik dengan temperatur kamar. Proses maserasi membutuhkan waktu yang relatif lebih singkat dan lebih sederhana untuk mendapatkan ekstrak (Yuliana dan Satu, 2012). Dalam proses maserasi terjadi pergantian cairan pelarut, larutan

dengan konsentrasi rendah akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel akibatnya larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar sehingga akan diperoleh keseimbangan. Selama proses perendaman larutan, dilakukan pula pengadukan dan penggantian pelarut. Terakhir endapan yang diperoleh kemudian dipisahkan dan filtratnya dipekatkan (Armando, 2009).

## **2.5. Nekrosis Pulpa**

### **2.5.1. Pengertian Nekrosis Pulpa**

Nekrosis pulpa adalah kematian pulpa. Dapat terjadi sebagian atau seluruhnya. Meskipun nekrosis merupakan suatu inflamasi, tetapi dapat juga terjadi karena trauma (Grossman, 2010). Nekrosis pulpa dapat berupa nekrosis sebagian dan nekrosis total. Nekrosis sebagian menunjukkan gejala seperti pulpitis irreversibel dengan nyeri spontan sedangkan nekrosis total tidak menunjukkan gejala dan tidak ada respon terhadap tes termal, tes listrik, tes kavitas dan tes jarum miller (Walton dan Torabinejad, 2008).

### **2.5.2. Etiologi Terjadinya Nekrosis Pulpa**

Nekrosis pulpa dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu berupa iritan mikroba, iritan mekanik dan iritan kimia (Walton dan Torabinejad, 2008).

#### **a. Iritan Mikroba**

Bakteri yang terdapat pada karies gigi merupakan sumber utama terjadinya iritasi pada jaringan pulpa. Jaringan pulpa bisa tetap terinflamasi untuk waktu yang lama sampai akhirnya menjadi nekrosis hal ini bergantung pada virulensi bakteri, kemampuan mengeluarkan cairan inflamasi guna mencegah tekanan intra pulpa, ketahanan host, jumlah sirkulasi dan drainase limfe (Walton dan Torabinejad, 2008).

b. Iritan Mekanik

Iritan mekanik yang biasa terjadi yang dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pulpa adalah trauma atau pemakaian patologik gigi. Injuri traumatik dapat disertai atau tidak disertai oleh fraktur mahkota atau akar. Selain itu, beberapa prosedur kedokteran gigi kadang-kadang juga melukai pulpa. Terbukanya pulpa secara tidak sengaja pada waktu eskavasi struktur gigi yang terkena karies, gerakan gigi yang terlalu cepat pada waktu perawatan ortodontik dan kuretase periodontal yang dalam merupakan iritan-iritan yang berperan terhadap kerusakan jaringan pulpa (Grossman, 2010).

c. Iritan Kimia

Iritan pulpa mencakup berbagai zat yang digunakan untuk desentisasi, sterilisasi, pembersih dentin, base, tambahan sementara dan permanen. Zat antibakteri seperti *silver nitrat*, *fenol* dengan atau tanpa *camphor* dan *eugenol* dapat menyebabkan perubahan inflamasi pada jaringan pulpa (Walton dan Torabinejad, 2008).

### 2.5.3. Patogenesis Nekrosis Pulpa

Derajat inflamasi pulpa sangat berhubungan dengan intensitas dan keparahan jaringan pulpa yang rusak. Pulpitis atau inflamasi pulpa dapat akut atau kronis, sebagian atau seluruhnya, dan pulpa dapat terinfeksi atau steril (Grossman, 2010).

Iritasi sedang sampai parah akan mengakibatkan inflamasi lokal dan lepasnya sel-sel inflamasi dalam konsentrasi tinggi. Iritasi ini akan mengakibatkan pengaktifan bermacam-macam sistem biologis seperti reaksi inflamasi nonspesifik seperti histamin, bradikinin, metabolit asam arakhidonat, leukosit PMN, inhibitor protease dan neuropeptid. Sel-sel inflamasi dalam

jumlah yang besar ini akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas vaskuler, statis vaskuler dan migrasi leukosit ke tempat iritasi tersebut. Akibatnya terjadi pergerakan cairan dari pembuluh ke jaringan sekitarnya. Jika pergerakan cairan oleh venul dan limfatik tidak dapat mengimbangi filtrasi cairan dari kapiler, eksudat pun terbentuk (Walton dan Torabinejad, 2008).

Eksudat inflamasi yang cukup banyak bertumpuk dan menyebabkan rasa sakit karena adanya tekanan pada ujung syaraf. Daerah nekrosis berkembang, banyak leukosit polimorfonuklear mati, dan terbentuk nanah selanjutnya mengiritasi sel syaraf. Bila prosesnya tidak parah, limfosit dan sel plasma akan menggantikan leukosit polimorfonuklear dan reaksi inflamasi dapat dibatasi pada permukaan pulpa. Tetapi proses kronis dapat berlanjut sampai hampir atau seluruh pulpa terlibat, yang pada akhirnya akan terjadi kematian pulpa. Kebanyakan kasus mikroorganisme tetap hidup, berkembang biak cepat dan mencapai jaringan periapikal dan menghasilkan suatu abses alveolar akut. Sementara itu, selama proses ini tubuli dentin mungkin dimasuki produk dekomposisi darah, bakteri, sisa makanan dan dentin mengalami diskolorasi atau perubahan warna yang merupakan tanda pertama terjadinya nekrosis pulpa (Grossman, 2010).

#### **2.5.4. Nekrosis Pulpa pada Anak**

Masalah kesehatan gigi dan mulut sering terjadi pada anak-anak terutama pada anak usia sekolah adalah karies gigi, karena pada anak-anak enamel masih mengalami maturasi setelah erupsi, sehingga kemungkinan terjadi karies besar (Wong *et al.*, 2008). Karies gigi pada anak yang tidak segera dirawat, lambat laun akan mencapai pulpa dan dapat menyebabkan kematian pulpa (Walton dan Torabinejad, 2008).

Anak kelompok umur 6-12 tahun merupakan kelompok yang rentan terhadap karies gigi dan terjadinya nekrosis pulpa karena morfologi gigi sulung yang mempunyai rongga pulpa yang relatif lebih besar, tanduk pulpa yang lebih menonjol dan enamel yang lebih tipis memungkinkan invasi bakteri lebih cepat sehingga proses kerusakan pada gigi sulung juga lebih cepat menyebar (Kidd dan Bechal, 2012).

## **2.6. Bakteri *Mix* Saluran Akar Gigi Nekrosis**

### **2.6.1. Macam-macam Bakteri *Mix* Saluran Akar Gigi Nekrosis**

Dari sekitar 500 spesies bakteri yang dikenal sebagai flora normal rongga mulut, hanya sedikit kelompok yang dapat diisolasi dari ruang pulpa yang terinfeksi. 90% dari bakteri penyebab infeksi saluran akar adalah jenis bakteri anaerob. Jenis bakteri yang dominan adalah bakteri anaerob obligat dan bakteri anaerob fakultatif jenis Gram negatif dan Gram positif (Walton dan Torabinejad, 2008).

Bakteri anaerob ditemukan di semua bagian tubuh manusia baik di kulit, di permukaan mukosa, dan di mulut serta saluran cerna dengan konsentrasi tinggi sebagai bagian dari flora normal. Infeksi terjadi ketika bakteri anaerob dan bakteri flora normal lainnya mengontaminasi bagian tubuh yang secara normal steril (Jawetz dkk, 2008). Baik mikroorganisme aerob dan anaerob, dan juga mikroorganisme fakultatif dapat ditemukan di dalam saluran akar. Menurut Jawetz (2008) bakteri anaerob terbagi menjadi dua yaitu bakteri anaerob Gram negatif dan bakteri anaerob Gram positif. Berikut beberapa spesies bakteri anaerob yang paling sering ditemukan pada saluran akar.

## 1. Bakteri Anaerob Gram Negatif

### A. Bacteroides

Spesies *Bacteroides* adalah anaerob yang sangat penting yang menyebabkan infeksi pada manusia. Spesies ini adalah kelompok besar basillus Gram negatif dan dapat tampak seperti batang yang tipis atau kokobasillus (Jawetz dkk., 2008).

### B. Prevotella

Spesies *Prevotella* adalah bakteri basillus Gram negatif dan dapat tampak seperti batang yang tipis atau kokobasillus. *Prevotella* meliputi spesies yang baru diberi nama dan spesies yang dulu diklasifikasikan ke dalam spesies bakteroides (Jawetz dkk., 2008). Spesies yang diisolasi di saluran akar adalah *Prevotella intermedia* dan *Prevotella nigrecens*. *Prevotella nigrecens* paling banyak ditemukan dalam infeksi saluran akar (Walton dan Torabinejad, 2008).

### C. Porphyromonas

Spesies *Porphyromonas* merupakan basillus Gram negatif yang merupakan bagian dari flora normal mulut dan juga terdapat pada bagian tubuh yang lain. Genus *porphyromonas* meliputi spesies yang baru diberi nama dan dahulu dimasukkan ke dalam genus bakteroides (Jawetz dkk., 2008). Bakteri *porphyromonas* yang diisolasi di dalam saluran akar adalah *Porphyromonas gingivalis* dan *Porphyromonas endodontalis* yang biasanya terdapat pada infeksi akut (Walton dan Torabinejad, 2008).

### D. Fusobacterium

Spesies *Fusobacterium* adalah bakteri batang pleomorfik Gram negatif. Kelompok *Fusobacterium* meliputi beberapa spesies yang sering

diisolasi dari infeksi bakteri campuran yang disebabkan oleh flora normal mukosa (Jawetz dkk., 2008).

## 2. Bakteri Anaerob Gram Positif

### A. Actinomyces

Kelompok *actinomyces* merupakan jenis bakteri yang paling banyak menyebabkan aktinomikosis. Pada pewarnaan gram, kelompok ini sangat bervariasi panjangnya, dapat berukuran pendek dan panjang, tipis, filament bermanik-manik, dapat bercabang atau tidak bercabang (Jawetz dkk., 2008).

### B. Propionibacterium

Pada pewarnaan gram, spesies ini sangat pleomorfik, menunjukkan ujung yang berbentuk lengkung, seperti gada atau titik, bentuk panjang dengan pewarnaan seperti manik-manik dan tidak rata, serta kadang-kadang berbentuk kokus (Jawetz dkk., 2008).

### C. Eubacterium

Spesies *Eubacterium* adalah jenis bakteri anaerob, pleomorfik, batang Gram positif. Bakteri ini kerap diasosiasikan dengan gejala dan tanda klinis pada penyakit periradikuler (Walton dan Torabinejad, 2008).

### E. Peptostreptococcus

Spesies *Peptostreptococcus* adalah spesies kokus Gram positif dengan ukuran dan bentuk yang bervariasi yang ditemukan pada kulit dan merupakan bagian dari flora normal membrane mukosa. Spesies ini sering ditemukan pada infeksi campuran akibat flora normal (Jawetz dkk., 2008).

### F. Entrococcus

Kelompok *Entrococcus* merupakan bakteri kokus Gram positif. Bakteri ini bersifat nonhemolitik, katalase negatif, dan merupakan salah satu

penyebab infeksi nosokomial yang paling sering dan resisten terhadap antibiotik tertentu (Jawetz dkk., 2008)

### 2.6.2. Struktur Bakteri *Mix* Saluran Akar Gigi Nekrosis

Bakteri adalah mikroorganisme bersel satu dan berkembang biak dengan membelah diri. Ukuran bakteri bervariasi baik penampang maupun panjangnya, tetapi pada umumnya penampang bakteri adalah sekitar 0,7-1,5  $\mu\text{m}$  dan panjangnya sekitar 1-6  $\mu\text{m}$ . Sebagian besar sel bakteri memiliki lapisan pembungkus sel berupa membran plasma, dinding sel. Sejumlah bakteri dapat membentuk kapsul dan lendir, juga flagela dan pili. Berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi 3 yaitu bakteri sferis yang memiliki bentuk kokus atau bulat, bakteri basil yang memiliki bentuk batang dan bakteri spiral (Walton dan Torabinejad, 2008).

Berdasarkan pewarnaan Gram, jenis bakteri juga dibedakan menjadi bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif dan Gram negatif diperlihatkan berdasarkan perbedaan dinding selnya. Bakteri Gram positif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang membentuk suatu struktur yang tebal dan kaku. Kekakuan pada dinding sel bakteri yang disebabkan oleh lapisan peptidoglikan dan ketebalan peptidoglikan (Jawetz dkk., 2008).

Bakteri Gram negatif mempunyai dua lapisan dinding sel yaitu lapisan luar yang tersusun dari lipopolisakarida dan protein dan lapisan dalam yang tersusun dari peptidoglikan tetapi lebih tipis daripada lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap kerusakan mekanik dan kimia (Jawetz dkk., 2008).

## 2.7. Uji Antibakteri

### 2.7.1. Mekanisme Kerja Bahan Antibakteri

Antibakteri adalah obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksisitas selektif mungkin. Artinya obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Sifat toksisitas yang absolut belum atau mungkin tidak akan diperoleh (Gunawan, 2007).

Jawetz (2008) membagi antibakteri menjadi 5 kelompok berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu:

1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri.

Bakteri mempunyai lapisan luar yang rigid, yakni dinding sel. Dinding sel mempertahankan bentuk bakteri dan pelindung sel bakteri yang mempunyai tekanan osmotik internal tinggi. Tekanan internal pada bakteri Gram positif tiga hingga lima kali lebih besar daripada bakteri Gram negatif. Trauma pada dinding sel atau penghambatan pembentukannya menimbulkan lisis pada sel. Pada lingkungan yang hipertonik, dinding sel yang rusak menimbulkan bentuk protoplast bakteri sferik dari bakteri Gram positif atau asferoplast dari bakteri Gram negatif. Bentuk-bentuk ini dibatasi oleh membran sitoplasma yang fragil.

2. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri.

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma yang berperan sebagai barier permeabilitas selektif yang berfungsi sebagai transpor aktif dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi integritas membran sitoplasma dirusak, makromolekul dan ion keluar dari sel kemudian sel rusak atau terjadi kematian.

### 3. Menghambat sintesis protein sel bakteri.

Bakteri mempunyai 70S ribosom, sedangkan sel mamalia mempunyai 80S ribosom. Subunit masing-masing tipe ribosom, komposisi kimianya dan spesifikasi fungsinya berbeda, itulah sebabnya antibakteri dapat menghambat sintesis protein dalam ribosom bakteri tanpa mempengaruhi ribosom pada sel mamalia.

### 4. Menghambat sintesis atau merusak asam nukleat bakteri.

Bahan antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan ikatan yang sangat kuat pada enzim *DNA Dependent RNA Polymerase* bakteri sehingga menghambat sintesis RNA bakteri.

#### 2.7.2. Metode Uji Antibakteri

Pada uji antibakteri diukur respon pertumbuhan populasi bakteri terhadap agen antibakteri. Kegunaan uji antibakteri adalah diperolehnya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Macam-macam metode uji antibakteri yaitu :

##### 1. Metode *Disc Diffusion* (Tes Kirby & Bauer)

Metode *Disc Diffusion* digunakan untuk menentukan aktivitas agen antibakteri. Kertas cakram yang berisi agen antibakteri diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri, kertas cakram tersebut akan berdifusi pada media yang telah ditanami bakteri. Media agar yang digunakan telah mengandung biakan dari suatu pengenceran yang sebelumnya kira-kira mengandung  $10^5$ - $10^6$  bakteri tiap ml. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh agen antibakteri pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008).

##### 2. *Cup Plate Tehnique*

Metode ini serupa dengan metode *Disc Diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan bakteri dan pada sumuran tersebut

diberi agen antibakteri yang akan diuji. Lubang sumuran dibuat dengan menggunakan perforator steril berdiameter 6 mm dengan kedalaman lubang sumuran 4 mm. Setiap satu lubang sumuran diberi larutan uji  $\pm 50 \mu\text{l}$ . Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh agen antibakteri pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008).

### 3. Metode Dilusi Cair / *Broth Dilution Test*

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM dan KBM antimikroba. Prinsipnya dengan membuat seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media agar padat diinkubasi selama 18-24 jam. Konsentrasi terendah antibakteri pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari antimikroba terhadap bakteri uji (Jawetz dkk., 2008).

### 4. Metode Dilusi Padat / *Solid Dilution Test*

Metode ini serupa dengan metode difusi cair namun menggunakan media padat (*solid*). Pengujian dilakukan dengan menggunakan agar padat. Larutan antibakteri dicampur dengan agar yang masih cair dan sudah tidak terlalu panas. Kemudian agar dibiarkan hingga memadat. Setelah agar padat, diinokulasi dengan kuman, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, setelah itu dilakukan pengamatan. Konsentrasi antimikroba terendah yang menghambat pertumbuhan yang terlihat dari pengamatan dengan mata telanjang disebut KHM (Jawetz dkk., 2008).