

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian yang dilakukan oleh Wiart *et al* (2004) menunjukkan bahwa ekstrak daun teh-tehan mengandung senyawa steroid, terpenoid dan tanin. Ekstrak metanol dan etil asetat daun teh-tehan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Shigella sonnei* dengan konsentrasi 5 mg/ cakram (50%) (Wiart *et al.*, 2004).

Tabel 2.1 Aktivitas Antimikroba Ekstrak DaunTeh-Tehan (Wiart *et al*, 2004)

Bakteri	Diameter Zona Hambat (mm)		
	Etil asetat	Metanol	Streptomisin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	19	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	11	13	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	12	17
<i>Shigella sonnei</i>	19	13	14

Penelitian Trisharyanti (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun teh-tehan dengan metode ekstraksi masersasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 11,1343% dan ekstrak etanol daun teh-tehan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* dengan konsentrasi 10% (1 mg/cakram). Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan diameter zona hambat sebesar 13,50 mm (Trisharyanti, 2017).

Penelitian Maya Syari *et al* (2022) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% dengan metode maserasi daun teh-tehan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi 20%; 30%; 50%; 80 % (Maya Syari dan Aprilla, 2022; Syari dan Sukma Patriza, 2022).

Tabel 2. 2 Aktivitas Antimikroba Ekstrak DaunTeh-Tehan (Maya Sari *et al*, 2022)

Konsentrasi (%)	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
20	7,4	5,1
30	8,7	9,7
50	9,3	11,4
80	12,1	12,8

Penelitian yang akan dilakukan memiliki beberapa persamaan dengan penelitian-penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya. Penelitian yang akan dilakukan menggunakan pelarut metanol yang sama dengan penelitian yang dilakukan Wiart *et al* (2004). Metode uji aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi yang sama dengan semua penelitian sebelumnya.

Suatu penelitian harus memiliki perbedaan dengan penelitian yang sudah dilakukan untuk keterbaruan atau perkembangan pengetahuan. Penelitian yang akan dilakukan memiliki perbedaan dengan penelitian sebelumnya pada sampel yang akan diuji. Pada penelitian ini sampel yang diuji tidak hanya ekstrak dari daun teh-tehan, namun fraksi-fraksi dari ekstrak tersebut juga akan diuji aktivitasnya. Pada penelitian sebelumnya uji aktivitas yang dilakukan hanya pada bakteri, baik Gram positif maupun Gram negatif, sedangkan pada penelitian ini uji aktivitas akan dilakukan terhadap bakteri dan jamur.

B. Landasan Teori

1. Teh-tehan (*Acalypha siamensis* Olive. ex Gage)

Teh-tehan merupakan tanaman dari famili Euphorbiaceae. Tanaman teh-tehan memiliki cabang dan daun yang banyak dan rapat sehingga tumbuh membentuk rumpun. Tanaman teh-tehan dapat tumbuh membentuk rumpun hingga mencapai 4 meter. Tanaman teh-tehan dapat tumbuh di hutan kering, tanah berpasir dan ditemukan juga di batu kapur dengan ketinggian hingga 400 meter (Karyati dan Adi, 2018; Ken Fern, 2022).



Gambar 2. 1 Tanaman Teh-Tehan

Klasifikasi

Kingdom : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Ordor : Malpighiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : Acalypha L

Species : *Acalypha siamensis* Olive. ex Gage

Tanaman teh-tehan oleh masyarakat Thailand, Semenanjung Malaysia dan Indonesia dimanfaatkan sebagai tanaman hias di halaman rumah sebagai pagar. Tanaman teh-tehan juga banyak ditemukan di taman-taman karena dapat dibentuk menyerupai objek-objek tertentu yang menarik perhatian. Selain sebagai tanaman hias dan tanaman pagar, teh-tehan dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat untuk mengobati demam, penyakit renosis, dan menyembuhkan luka. Di Malaysia daun teh-tehan dibuat teh dan pengobatan tradisional untuk mengatasi demam, masalah pencernaan, ginjal dan sebagai antipiretik (Karyati dan Adi, 2018; Ken Fern, 2022). Metabolit sekunder yang terdapat pada daun teh-tehan meliputi steroid, terpenoid dan tanin (Maya Syari dan Aprilla, 2022; Wiart *et al.*, 2004).

Metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme tanaman yang tidak digunakan untuk proses pertumbuhan tanaman penghasilnya, metabolit sekunder dihasilkan ketika tanaman

mendapatkan intervensi lingkungan seperti kekurangan nutrisi atau serangan predator. Tanaman memproduksi metabolit sekunder karena digunakan untuk perlindungan terhadap mikroorganisme atau predator, sehingga besar kemungkinan metabolit sekunder dari tumbuhan memiliki aktivitas antimikroba. Aktivitas antimikroba suatu metabolit sekunder dipengaruhi oleh banyak faktor yang meliputi morfologi mikroorganisme, konsentrasi, suhu dan pH. Sitoplasma merupakan target utama aksi dari metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antimikroba. Banyak cara yang dapat dilakukan metabolit sekunder dalam mempengaruhi struktur, permeabilitas dan fungsi dari mikroorganisme sehingga pertumbuhan mikroorganisme akan terganggu (Radulovic *et al.*, 2013).

Tabel 2.3 Mekanisme Kerja Antimikroba Metabolit Sekunder

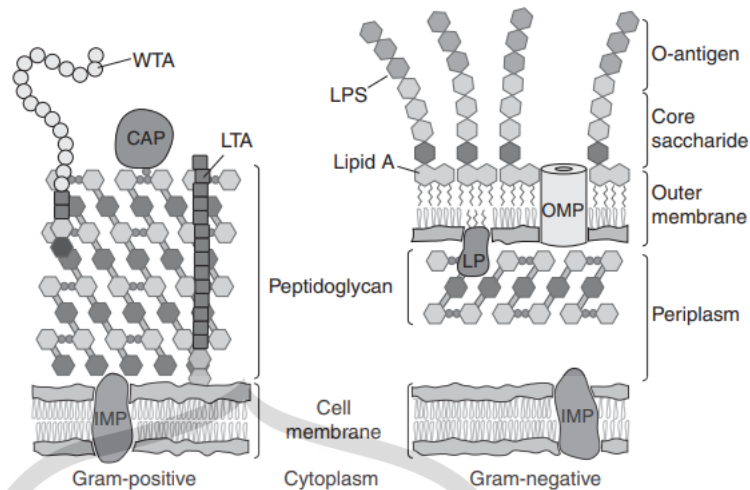
Senyawa	Mekanisme
Flavonoid	Menghambat sintesis DNA (<i>deoxyribonucleic acid</i>) Menggangu fungsi membran sitoplasma Menghambat metabolisme energi
Tanin	Berikatan dengan protein Berikatan dengan adhesin Menghambat produksi enzim Membentuk kompleks dengan dinding sel Menggangu membran sel
Alkaloid	Interkalasi ke dalam dinding sel atau DNA
Terpenoid	Menggangu membran sel

Sumber: (Cushnie dan Lamb, 2005; Silva dan Fernandes Júnior, 2010)

2. Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif

Secara umum bakteri dapat dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu bakteri Gram negatif dan Gram positif. Perbedaan dari dua jenis bakteri ini terletak pada struktur dinding selnya. Secara umum, dinding sel bakteri merupakan struktur kompleks yang berfungsi dalam penentuan bentuk sel dan melindungi sel dari pengaruh luar maupun dalam sel, namun perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram negatif dan Gram positif menyebabkan perbedaan respon bakteri terhadap

pengaruh luar (Pratiwi, 2008). Dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas tiga lapisan. Lipopolisakarida merupakan lapisan terluar dari dinding sel bakteri Gram negatif, lapisan tengah berupa peptidoglikan dan membran sitoplasma sebagai lapisan dalamnya (Kumayas *et al.*, 2015). Lipopolisakarida yang merupakan penyusun membran luar bakteri Gram negatif menjadi penghalang yang efektif dari pengaruh luar pada bakteri Gram negatif. Lipopolisakarida menjadi penghalang yang efektif untuk molekul-molekul hidrofobik. Dalam membran luar sel bakteri Gram negatif juga terdapat protein yang dapat menghambat difusi molekul hidrofilik. Hal ini menjadikan secara umum bakteri Gram negatif lebih resisten terhadap antibiotik dari pada bakteri Gram positif (Silhavy *et al.*, 2010). Antara bakteri Gram negatif dan Gram positif sama-sama memiliki lapisan peptidoglikan, namun pada bakteri Gram negatif lapisan ini tidak begitu tebal yang menyebabkan dinding sel bakteri Gram negatif lebih tahan terhadap kerusakan mekanis (Pratiwi, 2008). Bakteri Gram negatif memiliki ruang periplasma, dimana di dalam ruang periplasma tersebut terdapat enzim yang dapat memecah molekul yang masuk dari luar (Saleh-e-In *et al.*, 2016) (Rezk *et al.*, 2015) (Singh dan Kumar, 2011). Berbeda dengan bakteri Gram negatif, bakteri Gram positif tidak memiliki membran luar yang menjadi penghalang yang efektif dari pengaruh luar. Secara tidak langsung membran luar juga membantu menstabilkan membran dalam, sehingga stabilitas dinding sel bakteri Gram positif lebih lemah dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif tidak memiliki ruang periplasma yang terdapat enzim yang dapat memecah molekul yang akan masuk dari luar. Perbedaan struktur dinding sel tersebut secara umum menyebabkan bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap antibiotik (Silhavy *et al.*, 2010).

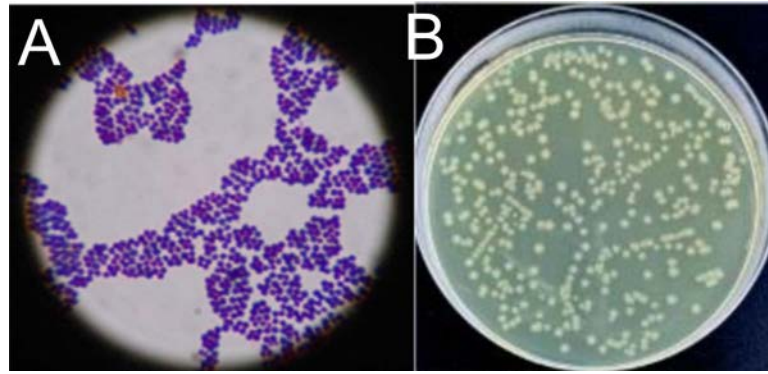


Gambar 2. 2 Perbedaan Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. CAP, covalently attached protein; IMP, integral membrane protein; LP, lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; OMP, outer membrane protein; WTA, wall teichoic acid (Silhavy *et al.*, 2010)

3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri berbentuk kokus yang termasuk ke dalam jenis bakteri Gram positif. *Staphylococcus aureus* merupakan famili dari Micrococaceae. Berdasarkan beratnya, 50% dinding sel bakteri *S. aureus* terdiri dari peptidoglikan yang tersusun dari subunit polisakarida. *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan berbagai produk yang dapat menyebabkan infeksi, dimana produk-produk tersebut dapat bekerja secara tunggal atau bersama-sama (Lowy, 1998).

Staphylococcus aureus dapat ditemukan pada rongga hidung, aksila, vagina, faring dan permukaan kulit. Infeksi akan terjadi apabila *S. aureus* dapat menembus jaringan kulit atau mukosa sehingga dapat masuk ke pembuluh darah. Infeksi kulit, jaringan lunak, pernapasan, tulang, sendi, dan endovaskuler merupakan kemungkinan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus* (Lowy, 1998).

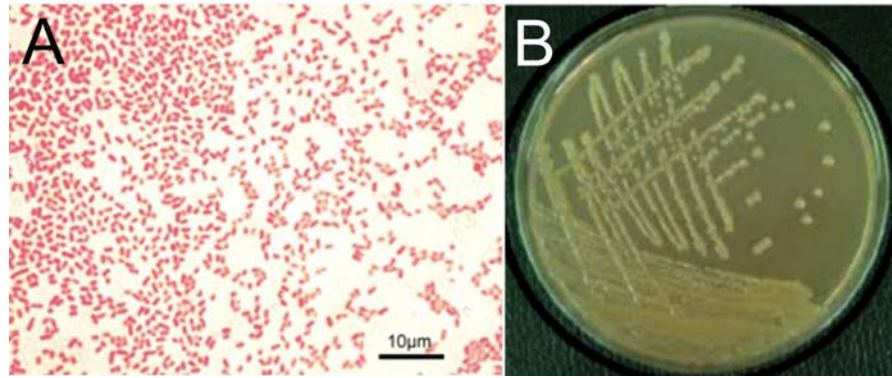


Gambar 2. 3 Morfologi A. Mikroskopis (Joshi *et al.*, 2014) B. Makroskopis bakteri *S.aureus* (Naeem *et al.*, 2020)

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang. *Pseudomonas aeruginosa* termasuk bakteri aerob dari famili *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki ukuran sekitar 0,6 x 2 mm. Bakteri ini tidak membutuhkan lingkungan yang ideal untuk dapat tumbuh, namun dengan kondisi lingkungan yang rendah oksigen, nutrisi dan dengan suhu diantara 37-42°C bakteri tersebut dapat beradaptasi dan tumbuh (Dharmayanti dan Sukrama, 2019; Jawetz *et al.*, 2004).

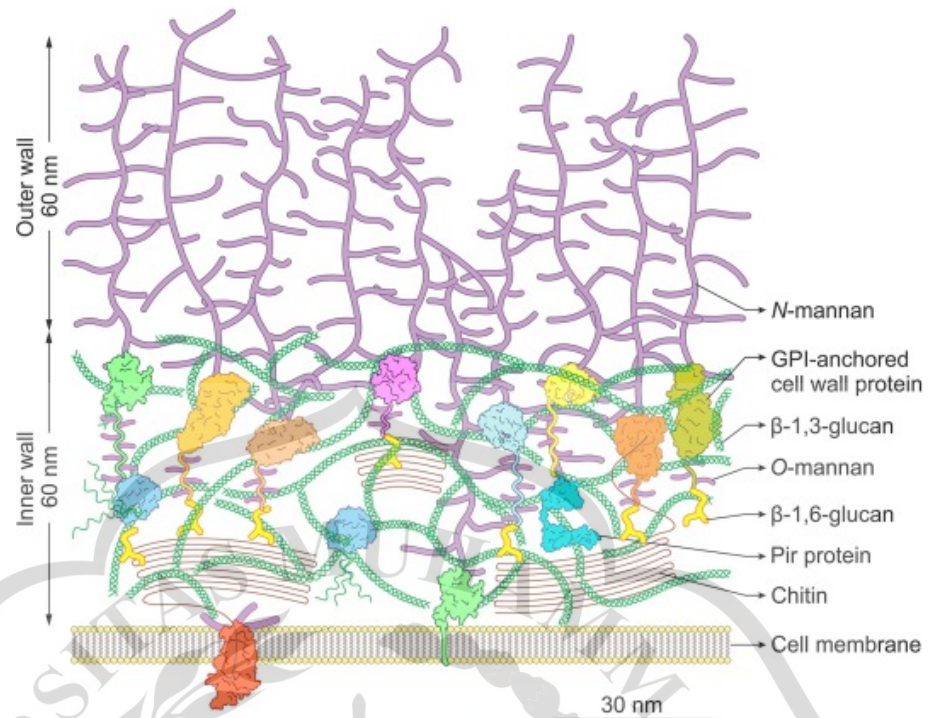
Pseudomonas aeruginosa dapat ditemukan dalam usus dan kulit manusia dalam jumlah yang kecil. Infeksi akan terjadi jika jumlahnya bertambah dan daya tahan tubuh tidak normal. *Pseudomonas aeruginosa* akan membentuk koloni pada kulit atau membran mukosa dan akan menjadi infeksi sistemik. Infeksi *P. aeruginosa* akan menyebabkan demam, syok, oliguria, leukositosis dan leukopenia (Jawetz *et al.*, 2004).



Gambar 2. 4 Morfologi A. Mikroskopis (Wilson dan Pandey, 2023) B. Makroskopis Bakteri *P.aeruginosa* (Ali *et al.*, 2020)

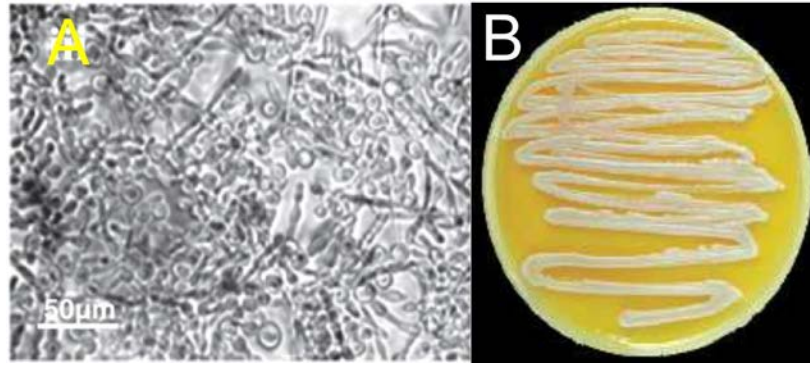
5. *Candida albicans*

Candida albicans merupakan mikroorganisme yang termasuk ke dalam kingdom fungi. *Candida albicans* memiliki sifat dimorfik, dimana *C. albicans* dapat tumbuh sebagai kapang (*mold*) dan juga sebagai sel khamir (*yeast*). Perubahan pertumbuhan *C. albicans* sebagai kapang dan khamir bersifat reversibel. Perubahan pertumbuhan tersebut dipengaruhi oleh lingkungan seperti suhu dan pH. Pada suhu 25°C dan pH <6 *C. albicans* akan tumbuh sebagai khamir, sedangkan apabila pada suhu 37°C dan pH >7 *C. albicans* akan tumbuh sebagai kapang (Kabir *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Murwani, 2015). Struktur dinding sel *C. albicans* berlapis-lapis yang terdiri dari Mannan (*polymers of mannose*) yang berpasangan dengan protein membentuk glikoprotein (mannoprotein); β -glucans yang bercabang-cabang menjadi polimer glukosa yang mengandung β -1,3 dan β -1,6 yang berikatan; Chitin; protein (6-25%) dan lemak (1-7%) (gambar 4.4) (Keumala, 2016) (Lenardon *et al.*, 2020).



Gambar 2. 5 Struktur Dinding Sel *C.albicans* (Lenardon *et al.*, 2020)

Candida albicans dapat ditemukan pada rongga mulut, saluran pencernaan, vagina dan kulit. Pada individu dengan sistem imun yang baik, tidak akan terjadi infeksi, namun pada individu dengan sistem imun yang kurang baik akan terjadi infeksi. Pasien *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) merupakan faktor resiko yang paling beresiko terkena infeksi *C. albicans*. Selain pasien AIDS, penggunaan gigi palsu, usia, diabetes melitus, penggunaan antibiotik, kontrasepsi oral, kehamilan dan terapi hormon juga merupakan faktor resiko terjadinya infeksi *C. albicans*. Infeksi *C. albicans* akan menyebabkan sariawan, kandidiasis vulvo vagina dan kandidiasis sistemik yang dapat mengancam jiwa (Kabir *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Talapko *et al.*, 2021).



Gambar 2. 6 Morfologi A. Mikroskopis (Khodavandi *et al.*, 2011) B. Makroskopis Jamur *C.albicans* (Keumala, 2016)

6. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan aktif dari bahan yang tidak aktif dengan pelarut yang sesuai dan metode ekstraksi tertentu sehingga diperoleh ekstrak cair yang kemudian dipekatkan dengan diuapkan pada *rotary evaporator* atau penangas air. Maserasi, infundasi, perkolasi, dekokta, soxhletasi dan refluks merupakan beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk mendapatkan ekstrak dari suatu simplisia. Dalam pemilihan metode ekstraksi dipengaruhi beberapa faktor diantaranya stabilitas kandungan terhadap panas, sifat pelarut dan harga dari pelarut yang digunakan. Kandungan senyawa simplisia yang tidak stabil terhadap pemanasan dapat dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi, perkolasi, sedangkan untuk kandungan senyawa simplisia yang stabil terhadap pemanasan dapat dilakukan dengan metode infundasi, dekokta, soxhletasi dan refluks. Pelarut yang mudah menguap lebih sesuai apabila metode ekstraksi yang digunakan adalah soxhletasi. Metode maserasi membutuhkan pelarut yang banyak sehingga harga pelarut yang digunakan juga menjadi salah satu faktor yang berpengaruh dalam pemilihan metode ekstraksi (Abubakar dan Haque, 2020) (Jones dan Kinghorn, 2012).

7. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses untuk memisahkan kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak sehingga diperoleh fraksi-fraksi yang kandungan senyawanya lebih sederhana dari pada ekstrak.

Teknik dasar fraksinasi dibagi menjadi dua yaitu teknik kimia dan teknik fisika. Fraksinasi dengan teknik kimia didasarkan pada perbedaan gugus fungsi yang dimiliki oleh masing-masing senyawa. Teknik fisika dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya kromatografi, destilasi, kristalisasi dan sublimasi (Abubakar dan Haque, 2020).

Kromatografi merupakan suatu prosedur pemisahan kandungan senyawa dalam ekstrak berdasarkan perbedaan adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan ukuran ion suatu senyawa dengan senyawa lainnya sehingga menyebabkan perbedaan mobilitas dari masing-masing senyawa (Kemenkes, 2017). Teknik pemisahan dengan kromatografi dapat dilakukan dengan kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom, kromatografi cair dan kromatografi gas. Pemilihan teknik kromatografi dapat didasarkan pada sifat senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa yang mudah menguap akan sesuai apabila dilakukan dengan teknik kromatografi gas. Untuk senyawa yang tidak mudah menguap akan sesuai apabila dilakukan dengan teknik selain kromatografi gas seperti kromatografi kertas, klt dan kromatografi kolom (Abubakar dan Haque, 2020).

Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan dengan mekanisme adsorpsi. Fase gerak yang dapat melarutkan sampel dialirkan melawati kolom yang sudah *dipacked* dengan fase diam. Perbedaan afinitas komponen senyawa dalam sampel terhadap fase diam akan menyebabkan pemisahan sehingga diperoleh fraksi-fraksi dengan komponen senyawa yang lebih sederhana dibandingkan dengan ekstrak yang belum dipisahkan (Nurdiani, 2018).

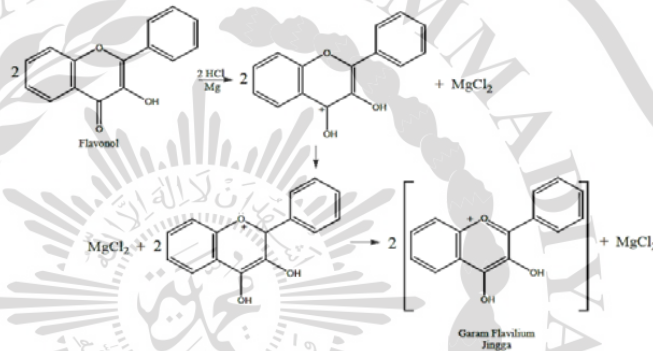
8. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dari suatu sampel berupa ekstrak atau fraksi. Skrining fitokimia dilakukan dengan mereaksikan

sampel dengan reagen tertentu yang dapat bereaksi dengan golongan senyawa tertentu yang terdapat dalam sampel (Putri *et al.*, 2013).

a. Flavonoid

Skrining fitokimia senyawa golongan flavonoid dapat dilakukan dengan menambahkan logam mg dan HCl. Inti benzopiron dalam golongan senyawa flavonoid akan tereduksi dengan penambahan logam Mg dan HCl sehingga terbentuk garam flavilium berwarna jingga. Sehingga apabila ekstrak direaksikan dengan logam Mg dan HCl dan terjadi perubahan warna menjadi jingga menandakan ekstrak tersebut mengandung senyawa golongan flavonoid (Tandi *et al.*, 2020)

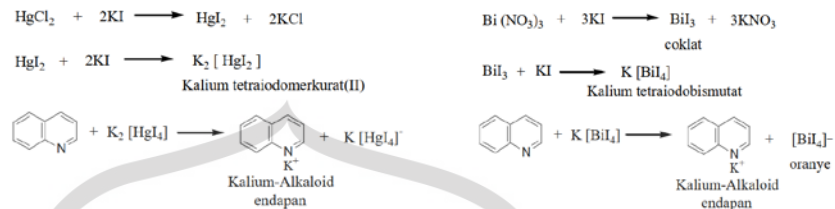


Gambar 2. 7 Reaksi Flavonoid dengan Logam mg dan HCl (Tandi *et al.*, 2020)

b. Alkaloid

Pereaksi dragendorff dan pereaksi mayer merupakan pereaksi yang dapat mengidentifikasi senyawa golongan alkaloid. Bismut nitrat dan kalium iodida merupakan komponen utama dalam pereaksi dragendorff. Ion Bi³⁺ dalam bismut nitrat akan bereaksi dengan kalium iodida sehingga terbentuk endapan hitam bismut (III) iodida dan melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Nitrogen pada alkaoid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K⁺ yang ada pada kalium tetraiodobismutat sehingga terbentuk endapan kuning kalium alkaloid, sedangkan pada pereaksi mayer kalium iodida akan bereaksi dengan merkuri(II) klorida sehingga terbentuk endapan merah merkuri(II) iodida. Kalium iodida yang berlebih

akan membentuk kalium tetraiodomerkurat(II). Sama dengan pereaksi dragendorff, nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang ada pada kalium tetraiodomerkurat (II) sehingga terbentuk endapan putih kalium alkaloid (Marliana *et al.*, 2005)

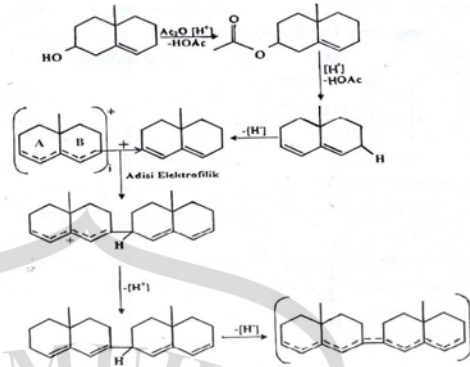


Gambar 2. 8 Reaksi Pereaksi Mayer dan Dragendorff dengan Golongan Senyawa Alkaloid (Marliana *et al.*, 2005)

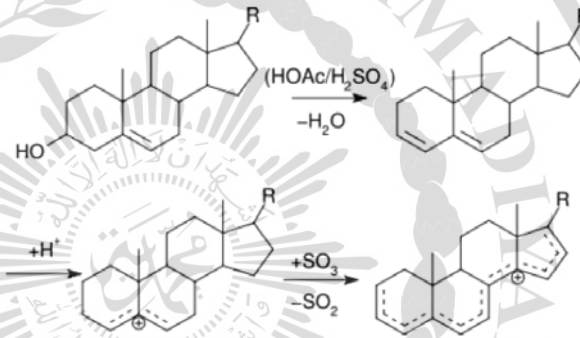
c. Terpenoid dan Steroid

Skrining fitokimia senyawa golongan terpenoid dan steroid dapat dilakukan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang terdiri dari asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Reaksi terpenoid dengan pereaksi Liebermann Burchard diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna merah sampai ungu (K.Siadi, 2012). Senyawa golongan steroid akan bereaksi dengan asam asetat anhidrat sehingga menyebabkan asetilasi gugus -OH pada steroid dan terbentuk turunan asetil. Asam sulfat akan menghidrolisis air yang bereaksi dengan turunan asetil membentuk larutan warna. Oksidasi pada senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi menyebabkan terjadinya

perubahan warna (gambar 4.1). Perubahan warna menjadi biru menandakan adanya senyawa golongan steroid (Nurjannah *et al.*, 2022) (Sulistyarini *et al.*, 2020) (Ilyas *et al.*, 2015).



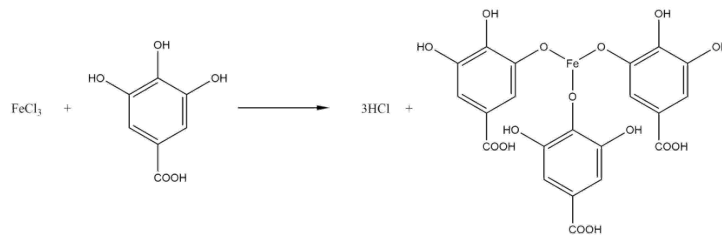
Gambar 2. 9 Reaksi Golongan Senyawa Terpenoid dengan Pereaksi Liebermann Burchard (K.Siadi, 2012)



Gambar 2. 10 Reaksi Golongan Senyawa Steroid dengan Pereaksi Liebermann Burchard (Nurjannah *et al.*, 2022)

d. Polifenol

Senyawa golongan polifenol diidentifikasi dengan FeCl_3 . Terjadinya perubahan warna coklat kehitaman yang merupakan senyawa kompleks menandakan adanya golongan senyawa polifenol. Senyawa kompleks tersebut terbentuk karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion Fe yang terdapat dalam FeCl_3 dengan gugus hidroksil yang ada pada golongan senyawa polifenol (Nurjannah *et al.*, 2022)



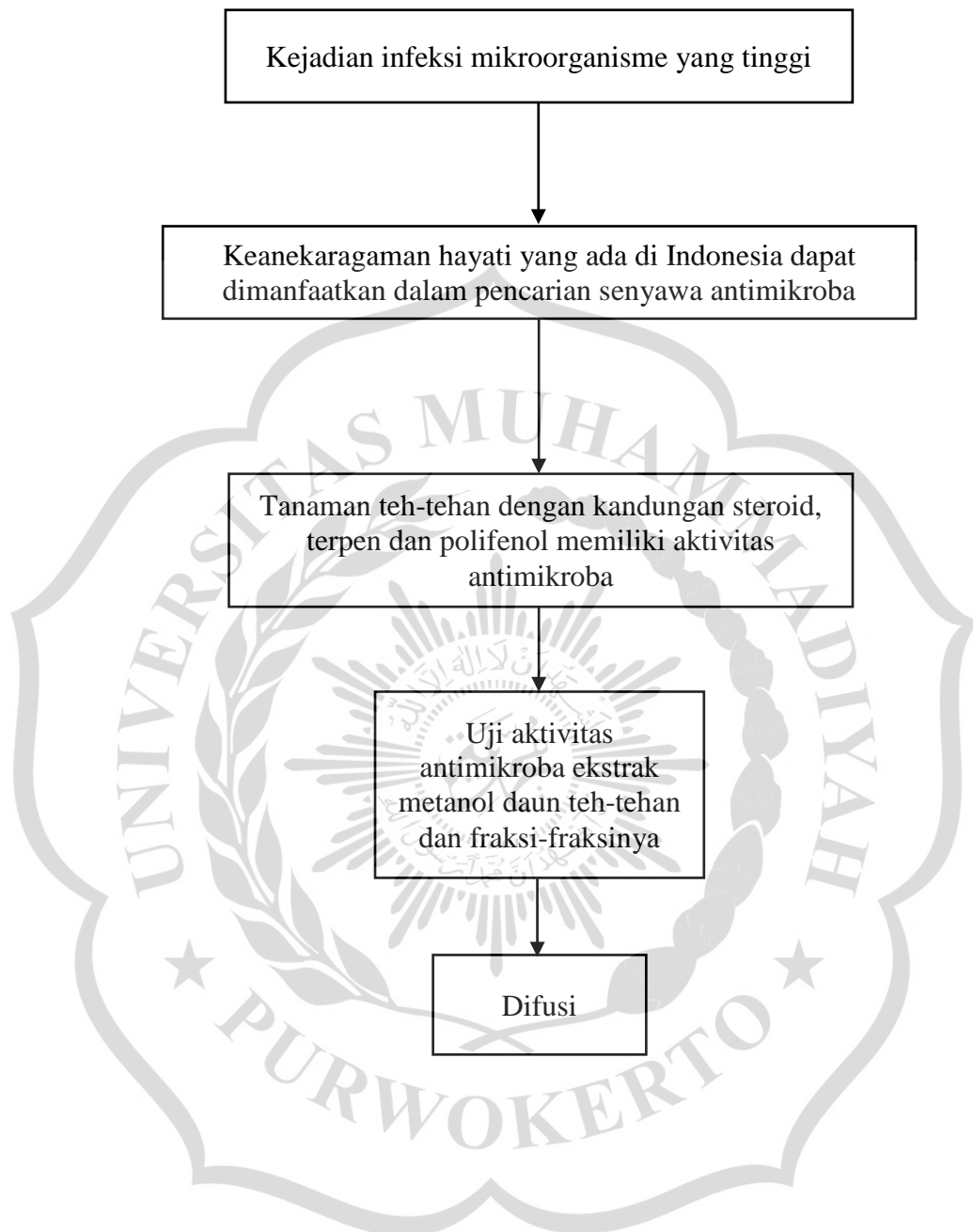
Gambar 2. 11 Reaksi FeCl_3 dengan Golongan Senyawa Polifenol (Sangi *et al.*, 2012)

9. Metode Difusi Cakram

Metode uji aktivitas antimikroba difusi cakram memanfaatkan mekanisme difusi atau perpindahan agen antimikroba dari cakram ke media kultur bakteri. Metode uji aktivitas antimikroba difusi cakram sangat sederhana sehingga hanya membutuhkan sedikit biaya, namun dengan metode ini tidak dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas agen antimikroba yang diuji bersifat bakteriostatik atau bakterisidal. Interpretasi hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode ini hanya dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk sehingga metode ini juga tidak dapat digunakan untuk menganalisis *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Balouiri *et al.*, 2015).

Prosedur uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar dengan menyiapkan cakram kertas berdiameter sekitar 6 mm dan sampel yang akan diuji ditambahkan ke dalam kertas cakram tersebut dengan konsentrasi yang diinginkan. Letakan cakram di atas media agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme tertentu dan diinkubasi dengan kondisi lingkungan yang sesuai dengan mikroorganisme yang digunakan. Hasil uji dapat dilihat setelah diinkubasi dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar zona hambat yang terbentuk maka efektivitas antimikroba sampel semakin baik, namun diameter zona hambat juga dipengaruhi oleh konsentrasi sampel yang digunakan, sehingga apabila dengan metode ini saja tidak bisa untuk membuktikan bahwa suatu sampel memiliki aktivitas antimikroba yang potensial (Balouiri *et al.*, 2015).

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

1. Ekstrak metanol daun teh-tehan dan fraksi-fraksinya memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *C. albicans*.
2. Ekstrak metanol daun teh-tehan dan fraksi-fraksinya mengandung senyawa golongan steroid, terpenoid dan polifenol.

