

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Tentang Tanaman Obat Yang Dipergunakan

Usaha manusia untuk menjaga kesehatan atau mengobati berbagai penyakit dengan bahan-bahan alami berupa ramuan tanaman tertentu sudah dikenal sejak berabad-abad lamanya. Kebiasaan ini telah diwariskan secara turun temurun oleh nenek moyang kita. Namun karena kemajuan jaman, penggunaan bagian tanaman sebagai ramuan obat tradisional menjadi semakin ditinggalkan dan dilupakan. Untuk mempopulerkan kembali penggunaan bahan-bahan nabati sebagai obat tradisional, maka perlu diadakan penelitian yang berkesinambungan agar potensi tanaman obat tersebut dapat diketahui secara spesifik. Berikut ini akan disampaikan uraian mengenai tanaman obat yang dipergunakan :

1. Tanaman Sirih.

Sirih merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan secara tradisional dan tersebar di berbagai daerah di Indonesia (Rostiana, dkk, 1991). Dalam taksonomi, tanaman sirih dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	:	Spermatophyta
Sub divisi	:	Angiospermae
Class	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Piperales

Familia : Piperaceae
Genus : Piper
Species : *P. betle*

(Steenis, 1975; Backer & Bakhuizen, 1965).

Sirih merupakan tumbuhan memanjat. Mempunyai batang dengan panjang 5 ~ 15 m, batangnya setengah berkayu, batang yang masih muda licin dan tidak berbuku. Pada bagian buku membesar dan dari sini keluar daun dengan susunan berseling atau tersebar. Mempunyai daun penumpu yang cepat rontok dan meninggalkan bekas berbentuk cincin. Helaiian daun bulat telur sampai memanjang, dengan pangkal daun berbentuk jantung, atau pangkal yang miring dengan ujung meruncing, belahan daun sering tidak sama besar, mempunyai ukuran 5 ~ 18 x 2 ~ 20 cm, helaiian daun tebal dengan permukaan mengkilap, warnanya hijau terang, biasanya berurat daun 5 ~ 7 pasang, tangkai daunnya kuat. Bunga berkelamin satu, berumah satu atau dua. Bulir berdiri sendiri, di ujung dan berhadapan dengan daun. Daun pelindung berbentuk lingkaran, bulat telur terbalik atau bulat memanjang, panjang lebih kurang 1 mm. Bulir jantan bertangkai 1,5 ~ 3 cm. Benang sari dua, sangat pendek. Bulir betina bertangkai 2,5 ~ 6 cm, kepala putik 3 ~ 5, bila sudah masak berwarna merah. Banyak ditanam penduduk pada ketinggian 5 ~ 700 m (Steenis, 1975; Darwis, 1991).

Secara tradisional, daun tanaman sirih dipergunakan untuk mengobati penyakit-penyakit seperti hidung berdarah (mimisan), batuk dan serak, sariawan, keputihan, obat kumur, sakit gigi, obat bau badan, sakit perut, wasir, obat tetes mata, trachoom, asma, encok, kepala pusing, mengurangi air susu (Hernani & Sri Yuliani, 1991; Mardisiswojo & Radjakmangunsudarso, 1965), juga sebagai bahan untuk mengobati bisul, borok dan luka (Perry, 1978; Heyne, 1978).

Daun sirih mempunyai kandungan kimia berupa minyak atsiri, yang terdiri dari cadinen, eugenol, metil eter, caryophyllen, sineol, chavibetol / chavicol, allilpyrocatechol, carvacrol, terpene, sesquiterpene dan betelfenol. Selain itu, daun sirih juga mengandung alkaloid arakene, diastase, zat penyamak, gula, pati, vitamin A, vitamin C dan lain sebagainya (Perry, 1978; Anonim, 1980; Kartasapoetra, 1988; Tampubolon, 1981; Mardisiswojo & Radjakmangunsudarso, 1965; Darwis, 1991).

2. Tanaman Cocor Bebek.

Cocor bebek merupakan tanaman yang cukup dikenal karena sering ditanam oleh penduduk sebagai tanaman hias. Tanaman ini mempunyai habitus berupa herba yang berdaging dan secara taksonomis termasuk dalam Famili Crassulaceae. Adapun klasifikasinya adalah :

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Class : Dicotyledonae
Ordo : Rosales
Famili : Crassulaceae
Genus : Kalanchoe
Species : *K. pinnata*

(Steenis, 1975; Backer & Bakhuizen, 1965)

Cocor bebek pada umumnya senang tumbuh di daerah berbatu yang cukup mendapat sinar matahari atau dengan sedikit naungan. Biasanya tumbuh berkelompok. Merupakan herba berdaging, pada pangkalnya agak berkayu, tumbuh tegak dengan tinggi 0,3 ~ 2 m. Batang berbentuk segi empat tumpul atau hampir membulat. Daun tunggal atau berbilang tiga atau menyirip berdaun lima, berdaging. Daun memanjang atau oval dengan ujung yang tumpul, beringgit atau beringgit rangkap, 5 ~ 20 x 2,5 ~ 15 cm. Bunga berkelipatan empat, menggantung pada malai yang tidak rapat. Kelopak daun lekat, bulat silindris, melembung, panjang 1,5 ~ 4 cm. Mahkota bentuk periuk atau lonceng, jelas menyempit di atas pangkal yang melebar, panjang 3,5 ~ 5,5 cm, bagian yang muncul di atas kelopak merah, pangkal tabung dengan delapan lipatan yang dalam. Benang sari delapan dan tersusun dalam dua lingkaran. Tangkai putik panjang. Helaiian sisik segi empat. Tumbuh pada ketinggian 1 ~ 1000 m.

Diperkirakan berasal dari Afrika. Jika daun dipetik, di tempat lekukan tepi daun dan pada ibu tulang daun terjadi tanaman muda. Nama lainnya adalah *Bryophyllum calycinum* (Steenis, 1975; Backer & Bakhuizen, 1965)

Perry (1978), menyatakan bahwa daun cocor bebek ini dapat dipergunakan untuk mengobati luka bakar, reumatik, neuralgia, scabies, batuk dan gangguan perut. Sedangkan Heyne (1978) dan de Padua (1979), menyebutkan juga kegunaan cocor bebek sebagai obat pendingin demam, obat luka, bisul, sakit kepala, keseleo, eksim, infeksi kulit lain dan akibat gigitan serangga. Juga dapat digunakan untuk mengobati diarrhe, disentri, cholera dan sakit telinga.

Daun cocor bebek diketahui mempunyai kandungan glikosida yang berikatan dengan kaemferol (kaemferol-3-glikosida), appelzuur, damar, asam damar, zat lendir, Mg-maleat, Ca-oksalat, asam formiat, tannin, sulfur, bryophylline, zat asam lemon dan quercetin-3-diarabinosida (Tampubolon, 1981; Perry, 1978; Mardisiswojo & Radjakmangunsudarso, 1965; Wijayakusuma, 1992).

3. Tanaman Ubi Jalar.

Ubi jalar merupakan tanaman yang juga banyak dikenal karena sering dibudidayakan untuk memperoleh umbinya. Selain sebagai sumber karbohidrat yang cukup penting, zat patinya dipergunakan sebagai bahan dalam

pembuatan tekstil atau kertas. Daunnya sering dipergunakan sebagai sayuran dan makanan ternak. Dalam taksonomi, ubi jalar mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Class : Dicotyledonae
Sub class : Sympetalae
Ordo : Solanales
Famili : Convolvulaceae
Genus : Ipomoea
Species : *I. batatas*

(Steenis, 1975; Backer & Bakhuizen, 1965).

Ubi jalar merupakan semak yang bercabang. Batang gundul atau berambut, kadang-kadang membelit, bergetah, sering keunguan, panjang sampai 5 m. Tangkai daun mempunyai panjang 4 ~ 20 cm, helaian daun lebar, bentuk telur sampai membulat dengan pangkal yang berbentuk jantung atau terpancung, rata atau bersudut sampai berlekuk, kadang-kadang berbagi menjari 3 ~ 5 dalam, berukuran 4 ~ 14 x 4 ~ 11 cm. Karangan bunga di ketiak, bentuk payung, berbunga banyak. Daun pelindung kecil, rontok. Daun kelopak memanjang bulat telur, runcing, panjang lebih kurang 1 cm, yang terluar paling kecil. Mahkota berbentuk lonceng sampai bentuk terompet, ungu muda, panjang 3 ~ 4,5 cm. Benang sari tertanam dalam, tidak sama

panjangnya. Tangkai putik berbentuk benang. Kepala putik berbentuk bola rangkap. Tonjolan dasar bunga berbentuk cawan, berwarna kuning. Di Jawa ditanam sampai ketinggian 2200 m. Ditanam untuk dimakan umbinya (di dalam tanah) dan daunnya seringkali digunakan sebagai sayuran. Kadang-kadang tumbuh menjadi liar (Steenis, 1975).

Pringgohusodo (1980) dan Mardisiswojo (1965), mengemukakan bahwa daun ubi jalar umumnya dipergunakan untuk mengobati bisul. Kegunaannya sebagai ramuan untuk mengobati penyakit lain belum diketahui.

Daun ubi jalar mempunyai kandungan kimia berupa alkaloid ergot dan asam klorogenik (Anonim, 1989).

B. Tinjauan Tentang Mikrobia Penguji

Bakteri dapat ditemukan di berbagai tempat di alam, seperti air, tanah dan udara. Kehadiran bakteri di alam bergantung pada adanya material yang dapat dipergunakan sebagai sumber nutrisi. Kebanyakan dari bakteri-bakteri tersebut hidup bebas di alam dan hanya sebagian kecil yang dapat menyebabkan penyakit atau bersifat pathogen bagi manusia. Sifat pathogen biasanya muncul jika kondisi lingkungan menguntungkan bagi bakteri dan immunitas inang rendah (Ross, 1962).

Bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri Gram positif dan Gram negatif berdasarkan atas perbedaan

susunan makromolekul pada struktur dinding selnya. Dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai susunan kimia yang lebih kompleks daripada dinding sel bakteri Gram positif. Struktur dinding sel bakteri Gram positif relatif tebal, yaitu antara 15 ~ 80 nm, mempunyai lapisan peptidoglikan sebagai komponen utama dan asam teikhoat. Pada beberapa sel bakteri, lapisan peptidoglikan dapat mencapai berat lebih dari 50% dari berat kering sel bakteri tersebut. Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel yang relatif lebih tipis dengan ketebalan 10 ~ 15 nm, namun terdiri atas lapisan yang lebih kompleks, yaitu lapisan peptidoglikan, lipoprotein dan kompleks lipopolisakarida. Lapisan peptidoglikan terletak pada bagian dalam dengan jumlah sedikit, sekitar 10% dari berat kering sel bakteri tersebut. Secara umum, dinding sel bakteri Gram negatif lebih banyak mengandung lipida daripada bakteri Gram positif (Pelczar, 1986; Kingsbury, Segal, dan Wagner, 1985)

Bakteri Gram positif umumnya berflagella dengan susunan peritrik. Sedangkan bakteri Gram negatif bergerak dengan flagella yang tersusun secara peritrik atau polar (monotrik). Beberapa mempunyai alat tambahan seluler berupa pilli (Stanier, 1984).

Adapun bakteri-bakteri yang dipergunakan dalam pengujian ini adalah :

1. *Staphylococcus aureus*

Secara taksonomi, *St. aureus* mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Divisi : Bacteria
Class : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : Micrococcaceae
Genus : *Staphylococcus*
Species : *St. aureus*

(Smith, et al., 1960; Buchanan, 1923; Deb, 1982)

St. aureus merupakan salah satu jenis *Staphylococcus* yang bersifat pathogen dan umumnya dapat ditemukan pada tubuh manusia, terutama pada bagian kulit dan hidung. *St. aureus* merupakan penyebab dari banyak infeksi pada manusia, seperti furunculosis, infeksi luka pyogenik dan osteomyelitis. Infeksi oleh *St. aureus* seringkali terjadi pada luka-luka bekas tusukan, lecet atau goresan, infeksi jamur, luka bedah dan trauma lainnya pada kulit. Selain itu, *St. aureus* juga merupakan penyebab gastroenteritis pada orang yang sering mendapat terapi antibiotik. Keracunan makanan akibat enterotoksin yang dihasilkan dapat mengakibatkan muntah-muntah dan diarrhe hanya dalam waktu beberapa jam saja (Duguid, et al., 1978; Tachibana, 1976; Laskin, et al., 1973).

Adapun ciri-ciri dari *St. aureus* antara lain adalah merupakan bakteri Gram positif, berbentuk sphaeris atau bulat dengan diameter 0,5 ~ 1 μm . Umumnya terdapat dalam bentuk tidak teratur atau bergerombol seperti buah anggur, *St. aureus* merupakan bakteri yang tidak motil, tidak membentuk kapsula dan tidak membentuk spora. Umumnya hidup aerob atau fakultatif anaerob. Hidup pada kisaran temperatur 10 ~ 45°C, dengan temperatur optimum 37°C. Koloninya pada agar berwarna putih, krem, yang dapat berkembang menjadi keemasan setelah 2 ~ 3 hari inkubasi. Menghasilkan coagulase, empat antigen berupa α , β , γ dan δ hemolysin, yang dipercaya mengambil bagian dalam pathogenitas dari penyakit-penyakit yang disebabkan oleh *St. aureus*, walaupun peran yang sebenarnya belum diketahui secara pasti. Beberapa strain menghasilkan PV (Panton Valentine) Leucocidin, yaitu substansi yang mengandung protein dan bersifat antigenik. Juga menghasilkan lima macam enterotoksin (A, B, C, D, dan E). Selain itu *St. aureus* juga memproduksi enzim-enzim seperti hyaluronidase (faktor penyebar), staphylokinase, proteinase, lipase dan penicilinase (Duguid, *et al.*, 1978; Laskin, *et al.*, 1973; Ivler, 1970; Jawets, *et al.*, 1982).

2. *Escherichia coli*

Dalam taksonomi, *E. coli* mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Divisi : Bacteria
Class : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Species : *E. coli*

(Smith, et al., 1960; Deb, 1982).

E. coli merupakan penghuni normal yang bersifat sebagai komensal dalam intestinum manusia dan banyak hewan berdarah panas lainnya. *E. coli* yang bersifat sebagai pathogen mempunyai banyak kesempatan untuk menimbulkan bermacam-macam penyakit ekstra intestinal jika immunitas setempat atau secara umum, ada dalam keadaan rendah. Infeksi saluran urine, kantung empedu, peritonium dan appendiks juga sering diakibatkan oleh bakteri ini. Selain itu, *E. coli* juga dapat menginfeksi luka yang dihasilkan setelah operasi. Umumnya *E. coli* bersifat pathogen bila berada di luar saluran pencernaan, tapi dapat pula menimbulkan penyakit pada saluran pencernaan, yaitu diarrhe pada orang dewasa dan kebanyakan bayi. Beberapa strain dapat menghasilkan enterotoksin yang dalam beberapa hal tertentu mempunyai kesamaan dengan toksin penyebab disentri. Adanya enterotoksin yang

dihasilkan oleh *E. coli* menyebabkan gastroenteritis, terutama pada bayi. Adapun penyakit-penyakit lain yang dapat disebabkan oleh *E. coli* antara lain adalah bacteraemia, pneumonia, meningitis, peritonitis, cholecystitis, abses (bengkak bernanah) dan bakteriuria pada wanita hamil. Kehadiran bakteri ini pada tanah atau air dianggap menandakan bahwa tanah atau air tersebut telah terkontaminasi oleh kotoran manusia atau hewan (Cowan & Steel, 1974; Jawets, *et al.*, 1982; Starr, 1986; Deb, 1982; Duguid, *et al.*, 1978).

Bakteri *E. coli* ini mempunyai ciri-ciri antara lain berupa bakteri Gram negatif, bersifat motil dengan bantuan flagella yang tersusun peritrik, tidak membentuk spora, berbentuk batang pendek sampai panjang dengan ukuran yang bervariasi $0,5 \times 1 \sim 4 \mu\text{m}$ dapat ditemukan sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek. Bersifat aerob atau fakultatif anaerob. Pada keadaan aerob menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi, sedangkan pada kondisi anaerob, energi diperoleh dari fermentasi karbohidrat. Kebanyakan strain dapat tumbuh pada media minim yang hanya mengandung garam ammonium dan sumber karbohidrat (Cowan & Steel, 1974; Kelly & Hite, 1955; Starr, 1986).

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Ps. aeruginosa* mempunyai sistematika sebagai berikut :

Divisi : Bacteria
Class : Schizomycetes
Ordo : Pseudomonadales
Famili : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Species : *Ps. aeruginosa*

(Smith, et al., 1960; Deb, 1982).

Ps. aeruginosa merupakan saprofit yang dapat ditemukan pada air, tanah dan kotoran. Dalam genus *Pseudomonas*, *Ps. aeruginosa* merupakan species yang bersifat paling pathogen bagi manusia. *Ps. aeruginosa* dapat hidup sebagai komensal dalam intestinum manusia dan dapat diisolasi dari kulit manusia yang sehat. Sifat pathogen timbul jika *Ps. aeruginosa* berada pada organisme yang tumbuh pada kondisi lingkungan yang menguntungkan bagi *Pseudomonas* tersebut. Walaupun tidak terlalu menyerang, jika telah menginfeksi, *Ps. aeruginosa* sangat sulit untuk dibasmi. Hal ini disebabkan karena *Ps. aeruginosa* merupakan organisme yang dapat beradaptasi dan menjadi resisten terhadap beberapa antibiotika dan desinfektan, sehingga kemoterapi yang harus dilakukan dipandang sulit. *Ps. aeruginosa* menginfeksi hampir semua bagian luar atau organ dalam tubuh. Pada umumnya menginfeksi luka,

luka bakar, bisul, luka baring dan menghasilkan warna kebiruan pada daerah yang terinfeksi yang disebabkan oleh pigmen yang dihasilkan oleh bakteri ini. Penyakit lainnya antara lain adalah septicaemia, infeksi saluran urine, infeksi mata setelah penghilangan katarak yang dapat menyebabkan kebutaan. Beberapa strain dapat menghasilkan enterotoksin yang dapat mengakibatkan diarrhe. Strain-strain lainnya ada yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan eksotoksin yang tidak tahan terhadap panas, dapat menghambat sintesa protein dan menyebabkan nekrosis jaringan. Walaupun toksin tersebut mempunyai sifat dermonekrotik, peranannya terhadap infeksi pada manusia belum diketahui dengan pasti. Selain itu *Ps. aeruginosa* juga menghasilkan substansi ekstra seluler yang bersifat merusak bagi sel seperti haemolysin, proteinase, lecithinase dan pyocyanin (Laskin & Lechevalier, 1973; Jawets, *et al.*, 1982; Duguid, *et al.*, 1978).

Ps. aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk basil, tidak membentuk spora, tidak berkapsula, motil dengan bantuan flagellum pada satu kutub, mempunyai kisaran temperatur antara 5 ~ 43°C dengan temperatur optimum 37°C. Bersifat aerob, tapi dapat tumbuh pada kondisi anaerob dengan adanya nitrat. Dapat tumbuh pada medium biasa. Koloni bulat halus, berukuran kecil sampai besar dan ada yang

bersifat mucoid. Mempunyai bau aromatis yang enak. Umumnya koloni besar, agak cembung dengan permukaan tidak teratur, bagian pinggirnya tembus cahaya dibandingkan bagian tengah yang mengandung pigmen. *Ps. aeruginosa* dapat menghasilkan dua macam pigmen, yaitu pyocyanin yang berwarna hijau kebiruan dan mempunyai aktifitas anti jasad renik, tapi terlalu toksik untuk terapi antimikrobia. Pigmen lainnya adalah fluorescin yang berwarna kuning kehijauan dan bersifat fluorescent. Pigmen tersebut menyebar pada medium. *Ps. aeruginosa* bersifat catalase positif, oksidase positif, seringkali lysogenik. Beberapa strain dapat menghemolisis darah. *Ps. aeruginosa* dapat ditemukan pada air, tanah, udara dan sampah (Duguid, *et al.*, 1978; Laskin & Lechevalier, 1973).

4. *Bacillus subtilis*

Dalam sistematika, *B. subtilis* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi : Bacteria
Class : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : Bacillaceae
Genus : Bacillus
Species : *B. subtilis*

(Smith, *et al.*, 1960; Deb, 1982).

B. subtilis merupakan bakteri saprofit yang tersebar luas pada debu, tanah, air dan pada susu. Karena sifat hidupnya tersebut, maka bakteri ini dianggap merugikan karena seringkali menimbulkan pembusukkan. Beberapa strain dapat menyebabkan pembusukkan pada umbi batang kentang, selain itu juga mendekomposisi pektin dan polisakarida dari jaringan tumbuhan. *B. subtilis* dapat ditemukan pada barang yang telah dipanaskan, seperti pembalut untuk operasi dan makanan kaleng (Kelly & Hite, 1955; Buchanan & Gibbons, 1923).

Adapun ciri-ciri umum dari bakteri *B. subtilis* adalah merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang ramping dengan ujung membulat, seringkali tersusun dalam rantai, berukuran $0,8 \sim 0,9 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$, bersifat motil dengan flagella di lateral. Membentuk endospora yang berukuran $0,6 \sim 0,7 \times 1 \sim 1,5 \mu\text{m}$. Spora tersebut berbentuk oval dan terletak sentral, resisten terhadap panas. Umumnya bersifat aerob, tapi dapat tumbuh anaerob pada medium kompleks yang mengandung glukosa. Koloni berbentuk irreguler, permukaan halus atau berkerut, buram. Ciri koloni sangat bergantung pada komposisi medium. Penyebaran aktif dapat terjadi pada agar yang permukaannya lembab. Bersifat katalase positif, dapat menghidrolisa pati. Kisaran temperatur $5 \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dapat tumbuh aktif pada pH 5,5 ~ 8,5 (Kelly & Hite, 1955; Buchanan & Gibbons, 1923; Cowan & Steel, 1974).

C. Metode Pengujian Agenia Kemoterapi

Potensi suatu agensia kemoterapi dapat ditentukan secara kimia maupun biologi. Secara kimia kekuatan agensia tersebut ditunjukkan dengan mikrogram senyawa kimia murni dalam miligram specimen. Sedangkan secara biologi, potensi tersebut dapat ditunjukkan dengan membandingkan mikrogram substansi tersebut dengan jumlah mikroorganisme yang mati atau terhambat pertumbuhannya dalam suatu percobaan (Pelczar, 1958).

Untuk pengujian potensi suatu agen kemoterapi secara biologi, dapat digunakan beberapa metode atau teknik yang umum dipergunakan untuk pengujian suatu antibiotik. Adapun beberapa metode yang umum dipergunakan antara lain adalah metode difusi dan metode turbidimetri/dilusi.

Dalam metode difusi dikenal beberapa cara, antara lain adalah 'cylinder-disk-methode' dan 'paper disk methode'. Pada prinsipnya, test ini didasarkan pada kemampuan suatu larutan yang diuji untuk berdifusi ke medium disekelilingnya. Perbedaan antara keduanya tergantung pada alat yang dipergunakan. Untuk 'cylinder disk methode' digunakan silinder yang umumnya terbuat dari bahan stainless steel, porcelain atau gelas dengan diameter luar 1 cm dan ketebalan sekitar 1 mm.

Sedangkan untuk 'paper disk methode' dipergunakan kertas saring yang berbentuk lingkaran dengan diameter 1 cm. Dalam metode difusi ini dipergunakan petridish yang berukuran sama dan penanaman bakteri secara taburan/pour plate. Pada waktu agar mulai mengeras, silinder diletakkan pada permukaan agar dengan kedalaman yang sama dan jarak yang tidak terlalu dekat. Kemudian silinder diisi dengan agensia kemoterapi yang akan diuji. Untuk 'paper disk methode' dapat dilakukan dua cara, yaitu kertas saring tersebut terlebih dahulu dicelupkan ke dalam agensia kemoterapi yang akan diuji lalu diletakkan pada permukaan medium agar yang telah diinokulasi bakteri uji secara taburan atau kertas saring diletakkan di permukaan medium agar, lalu ditetesi dengan agensia kemoterapi yang akan diuji. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 jam untuk mengetahui zona hambatan yang dihasilkan agensia kemoterapi tersebut terhadap bakteri uji (Pelczar, 1958).

Metode lain yang juga sering dipergunakan adalah metode turbidimetri/dilusi. Metode ini didasarkan pada kenyataan bahwa sebagian atau seluruh mikroorganisme yang diuji akan terhambat pertumbuhannya dalam kultur cair yang mengandung sejumlah agensia kemoterapi. Turbiditas atau kekeruhan terjadi karena adanya pertumbuhan mikroorganisme dalam medium cair. Dalam metode ini dipergunakan sejumlah tabung yang diisi

dengan medium cair yang telah diinokulasi bakteri uji dan ditambah sejumlah agensia kemoterapi dalam jumlah yang bervariasi. Kemudian kekeruhan yang terjadi dalam setiap tabung dibandingkan dengan larutan standar setelah diinkubasikan dibawah kondisi yang sama. Pengamatan dilakukan dengan spektrofotometer. Keuntungan dalam menggunakan metode ini adalah hasil pengamatan dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat daripada jika menggunakan metode difusi (Pelczar, 1958)

