

Antibacterial Activity Assay of Crude Extracts from the Roots and Leaves of Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

[Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Akar dan Daun Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*]

Lusia Cherlyana Moi¹⁾, Chylen Setiyo Rini^{*,2)}

¹⁾Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

²⁾ Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

*Email Penulis Korespondensi: chylensetiyorini@umsida.ac.id

Abstract. The increasing resistance of bacteria to antibiotics has spurred the search for natural antibacterial sources, one of which is Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray). This study aims to determine the antibacterial activity of Kipait root and leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, as well as to compare their effectiveness. This laboratory experimental study used Kipait roots and leaves macerated in 70% ethanol (1:4 w/v) for 3×24 hours. Secondary metabolites were identified through phytochemical testing, while antibacterial activity was assessed using the Kirby–Bauer disk diffusion method at concentrations of 25%, 50%, 75%, and 100%, with 250 mg of chloramphenicol as the positive control and sterile distilled water as the negative control. The results showed that all extracts were able to inhibit the growth of *S. aureus* and *E. coli*. The leaf extract exhibited higher activity than the root extract, with the largest inhibition zone diameters at a 100% concentration, namely 22.13 mm against *S. aureus* and 20.74 mm against *E. coli*. The conclusion of this study is that Kipait leaf extract has potential as a source of natural antibacterial agents.

Keywords – Kipait; crude extract; antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

Abstrak. Meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik mendorong pencarian sumber antibakteri alami, salah satunya Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak akar dan daun Kipait terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, serta membandingkan efektivitas keduanya. Penelitian eksperimental laboratorium ini menggunakan akar dan daun Kipait yang dimaserasi dengan etanol 70% (1:4 b/v) selama 3×24 jam. Kandungan metabolit sekunder diidentifikasi melalui uji fitokimia, sedangkan aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode difusi cakram Kirby–Bauer pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, dengan kloramfenikol 250 mg sebagai kontrol positif dan akuades steril sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian menunjukkan seluruh ekstrak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Ekstrak daun memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar, dengan diameter zona hambat terbesar pada konsentrasi 100%, yaitu 22,13 mm terhadap *S. aureus* dan 20,74 mm terhadap *E. coli*. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun Kipait berpotensi sebagai sumber antibakteri alami.

Kata Kunci – Kipait; ekstrak kasar; aktivitas antibakteri; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan dan keanekaragaman hayati melimpah, khususnya tanaman obat yang telah dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat dalam mengatasi berbagai masalah kesehatan. Penggunaan tanaman obat meliputi berbagai bagian tanaman seperti daun, akar, batang, dan rimpang. Keberadaan tanaman herbal sebagai sumber alternatif pengobatan alami semakin mendapat perhatian luas seiring dengan meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik konvensional dan tingginya infeksi bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, yang menjadi penyebab utama berbagai infeksi kulit terutama pada luka yang tidak sembuh dengan baik dan menjadi tempat berkembangnya bakteri sehingga memperburuk penyembuhan dan meningkatkan risiko infeksi sulit diatasi [1].

Luka merupakan kerusakan jaringan yang dapat menjadi pintu masuk berbagai mikroorganisme patogen. Infeksi pada luka dapat menghambat proses penyembuhan, memperluas kerusakan jaringan, bahkan berkembang menjadi infeksi sistemik apabila tidak ditangani dengan baik [2]. Di antara bakteri penyebab infeksi luka, *S. aureus* dan *E. coli* merupakan mikroorganisme yang paling sering ditemukan. *S. aureus* merupakan flora normal pada kulit yang bersifat oportunistik, artinya jika kulit terluka, bakteri ini akan langsung masuk ke jaringan dalam dan menyebabkan infeksi. Keadaan ini semakin sulit diobati karena kemampuannya membentuk biofilm dan sifatnya yang resisten terhadap

banyak antibiotik seperti metisilin (MRSA) [3]. Sedangkan *E. coli* sering menyebabkan infeksi sekunder akibat kontaminasi pada luka terbuka [4]. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa kedua bakteri tersebut merupakan bakteri dominan yang diisolasi dari luka infeksi kulit, luka bakar, maupun luka operasi. Berdasarkan isolasi dan identifikasi pus (nanah) dari luka infeksi kulit, jenis bakteri yang dominan adalah *E. coli* dengan persentase 24,6%, *S. aureus* sebanyak 20,5 %) dan *K. pneumoniae* 16,4 % [5]. Adapun ditemukan bakteri pada infeksi luka operasi dengan persentase *E. coli* 33,33%, *S. aureus* 50% dan *Achromobacter sp* 16,66% [6].

Peningkatan kasus resistensi antibiotik menjadi tantangan utama dalam pengobatan infeksi luka. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan berlebihan menyebabkan banyak bakteri patogen menjadi resisten sehingga efektivitas terapi menurun. Menurut laporan WHO tahun 2023, resistensi *S. aureus* terhadap metisilin (MRSA) mencapai 50% secara global [7]. Sementara *E. coli* resisten terhadap sefalosporin generasi ketiga hingga 65% di Asia Tenggara [8]. Di Indonesia, data Kementerian Kesehatan (Kemenkes RI) 2024 menunjukkan bahwa 40-60% isolat bakteri dari luka pasien rawat inap resisten terhadap antibiotik standar, menyebabkan peningkatan mortalitas hingga 15% dan biaya pengobatan yang melonjak [9]. Kondisi ini mendorong pengembangan sumber antibakteri alternatif yang lebih aman dan mudah diperoleh, salah satunya berasal dari tanaman obat. Indonesia memiliki ribuan spesies tanaman yang berpotensi sebagai bahan obat tradisional, namun sebagian besar belum dimanfaatkan dan dikembangkan secara optimal [10].

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri adalah Kipait. Tanaman ini diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, glikosida, serta laktone seskuiterpen, termasuk Tagitinin F, yang memiliki aktivitas antimikroba dan antiinflamasi [11]; [12]. Tagitinin F merupakan senyawa utama yang khas pada Kipait dan berkontribusi signifikan terhadap potensi terapeutik, khususnya sebagai agen antibakteri, antiinflamasi, dan sitotoksik. Aktivitas antibakteri dari senyawa turunan *sesquiterpene lactone* ini diduga berkaitan erat dengan keberadaan gugus α -methylene- γ -lactone yang bersifat elektrofilik. Gugus fungsional ini bertindak sebagai akseptor Michael (gugus penerima elektron) yang mampu berikatan secara kovalen dengan gugus sulfhidril (-SH) pada enzim dan protein esensial bakteri. Ikatan tersebut menyebabkan terganggunya berbagai proses metabolisme sel dan menghambat replikasi bakteri. Senyawa ini mampu meningkatkan permeabilitas membran sel, yang memicu kebocoran komponen intraseluler dan menyebabkan kematian sel bakteri [13].

Pemilihan bagian daun dan akar Kipait didasarkan pada perbedaan distribusi metabolit sekunder antar organ tanaman. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa daun memiliki kandungan alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, dan terpenoid yang lebih tinggi dibandingkan batang maupun akar. Sementara itu, akar juga mengandung alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, dan fenol total yang lebih tinggi dibandingkan batang. Perbedaan kandungan metabolit sekunder tersebut menunjukkan bahwa daun dan akar Kipait merupakan organ yang berpotensi memiliki aktivitas biologis lebih tinggi dibandingkan batang [14]. Selain itu, secara tradisional daun dan akar Kipait telah banyak dimanfaatkan untuk pengobatan luka dan berbagai penyakit kulit [15]. Kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid, fenolik, dan tanin diketahui mampu merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis protein, dan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif [16].

Berdasarkan penelitian terdahulu tanaman Kipait mengandung senyawa antibakteri. Ekstrak daun Kipait mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* dengan kategori daya hambat sangat kuat pada konsentrasi 60% dan 80% [17]. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Kipait konsentrasi 5%, 10% dan 15% metode maserasi dan digesti mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan rata-rata diameter zona hambat paling tinggi pada metode maserasi konsentrasi 15% yaitu 26,50 mm [18]. Selain itu, ekstrak air daun, batang, dan akar *T. diversifolia* dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Proteus mirabilis*, dengan ekstrak daun menunjukkan aktivitas paling tinggi [19].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak akar dan daun Kipait terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, serta membandingkan efektivitas kedua bagian tanaman tersebut.

II. METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium dengan teknik disk diffusion Kirby-Bauer untuk melihat pengaruh ekstrak akar dan daun Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dengan mengamati terjadinya zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang telah diberi konsentrasi ekstrak. Populasi dalam penelitian ini adalah akar dan daun Kipait yang diperoleh dari Kecamatan Prigen, Jawa Timur. Sampel yang digunakan adalah akar dan daun Kipait dengan kriteria akar tunggang dan daun segar, tidak busuk, dan berwarna hijau. Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diperoleh dari e-commerce Vie Laboratorium Jember.

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2026 dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Ilmu Kesehatan dan Psikologi, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Uji Fitokimia di Laboratorium Kimia Organik FMIPA, Uji Determinasi Tanaman dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu. Penelitian ini telah lulus uji etik di FKG, Universitas Airlangga Surabaya dengan Nomor: 0498/HRECC.FODM/V/2026.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi bejana maserasi, *rotary vacuum evaporator* merk BUCHI R-215, grinder, timbangan analitik, rak tabung, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, gelas beaker, gelas ukur, ose loop, kassa, kaki tiga, kapas steril, kaca arloji, bunsen, sendok zat, batang pengaduk, pipet ukur, bulb, inkubator, jembatan pewarnaan, autoklave, mortar, stamper, spektrofotometer UV-Vis 1600PC. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak akar dan daun Kipait, biakan murni *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), biakan murni *Escherichia coli* (ATCC 25923), media Nutrien agar, *Mueler Hinton Agar* (MHA), *Manitol Salt Agar* (MSA), *Eosin Metylen Blue* (EMB), *McFarland 0,5*, NaCl 0,9%, zat warna kristal violet, lugol, alcohol, safranin dan aquades.

Penelitian ini diawali dengan proses ekstraksi sampel. Simplisia akar dan daun Kipait masing-masing diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, yaitu sebanyak 250 g serbuk simplisia direndam dalam 1000 mL etanol 70% (perbandingan 1:4 b/v) selama 3x24 jam pada suhu ruang, kemudian disaring dan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak selanjutnya dibuat dalam konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Pembuatan variasi konsentrasi sampel menggunakan metode pengenceran induk dengan aquades steril sebagai pelarut. Larutan uji ekstrak akar dan daun kipait dibuat dengan menyiapkan larutan stok konsentrasi 100%, yaitu 25 g ekstrak kental dilarutkan menggunakan aquades steril hingga volume akhir 25 mL. Larutan stok tersebut kemudian diencerkan menggunakan aquades steril untuk memperoleh konsentrasi 75%, 50%, dan 25%. Konsentrasi 75% dibuat dengan mencampurkan 7,5 mL larutan stok dengan 2,5 mL aquades steril, konsentrasi 50% dibuat dengan mencampurkan 5 mL larutan stok dengan 5 mL aquades steril, sedangkan konsentrasi 25% dibuat dengan mencampurkan 2,5 mL larutan stok dengan 7,5 mL aquades steril. Kontrol positif dalam pengujian ini menggunakan antibiotik kloramfenikol 250 mg dan kontrol negatif aquades steril. Pengulangan sampel dihitung dengan rumus *Federer* yaitu dengan hasil tiga kali pengulangan untuk setiap konsentrasinya.

Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* yang akan digunakan sebelumnya diremajakan terlebih dahulu pada media NA. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan pengambilan koloni bakteri dari media selektif *S. aureus* dan *E. coli* yaitu MSA dan EMB menggunakan ose dan disuspensikan di dalam tabung yang berisi 7 ml larutan NaCl 0,9% steril. Kekeruhan suspensi bakteri uji dibandingkan dengan kekeruhan *Mac Farland 0,5* dan diukur pada spektrofotometer Uv-Vis 1600PC dengan panjang gelombang (λ) 600 nm. Nilai absorbansi 0,08-0,1 setara dengan standar *Mac Farland 0,5* (1.5×10^8 CFU/mL) [20]. Suspensi bakteri kemudian diinokulasikan secara merata pada media uji *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan kapas swab steril. Kemudian kertas cakram yang mengandung tiap konsentrasi akar dan daun Kipait serta kontrol positif (kloramfenikol 250 mg) dan kontrol negatif (aquades steril) diletakkan pada media uji. Kertas cakram ditekan secara perlahan hingga melekat sempurna pada permukaan media MHA. Cawan kemudian ditutup menggunakan *cling wrap*, selanjutnya media uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setelah selesai proses inkubasi 1x24 jam dengan mengukur zona bening yang terbentuk di sekitar cakram menggunakan jangka sorong. Interpretasi zona hambat dilakukan berdasarkan acuan zona hambat yang dikategorikan lemah dengan diameter ≤ 5 mm, kategori sedang dengan diameter zona hambat 6-10 mm, kategori kuat dengan diameter 11-20 mm dan kategori sangat kuat dengan diameter ≥ 21 mm [21].

Data hasil uji daya hambat bakteri yang diperoleh dianalisis secara parametrik menggunakan uji statistik *Anova TWO-WAY* dengan software IBM SPSS Statistik 25.0 dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$. Uji statistik *Anova TWO-WAY* digunakan untuk menentukan pengaruh signifikan terhadap kelompok perlakuan. Apabila nilai $p < 0,05$, maka dilakukan uji lanjut *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan nyata antar kelompok perlakuan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Uji Determinasi Tanaman

Penelitian ini diawali dengan uji determinasi untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar merupakan spesies *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. Sampel tanaman diperoleh dari Kecamatan Prigen, Jawa Timur, kemudian dideterminasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu dengan nomor determinasi 000.9.3/1217/102.20/2026. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah benar merupakan Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) dari famili Asteraceae. Penentuan spesies dilakukan berdasarkan pengamatan terhadap karakter morfologi tanaman, meliputi akar, batang, daun, bunga dan biji. Tanaman ini memiliki habitus berupa semak dengan tinggi sekitar 2–3 m, batang berkayu pada bagian pangkal, daun tunggal bertoreh menjari dengan tepi bergerigi dan permukaan kasar, bunga majemuk berwarna kuning, biji dengan tipe achenes, serta akar tunggang. Hasil tersebut memastikan bahwa bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini memiliki identitas botani yang benar sehingga dapat mendukung keabsahan dan keandalan hasil penelitian.

B. Pembuatan Ekstrak Akar dan Daun Kipait

Proses ekstraksi serbuk akar dan daun dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% dipilih sebagai pelarut ekstraksi karena memiliki kemampuan yang baik dalam melarutkan metabolit sekunder yang bersifat polar hingga semipolar, seperti alkaloid, saponin, fenolik, tanin, steroid, dan triterpenoid yang terdapat pada tanaman. Kandungan air dalam etanol 70% meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman sehingga pelepasan senyawa bioaktif menjadi lebih optimal. Selain itu, etanol bersifat relatif aman, mudah diuapkan,

dan tidak meninggalkan residu toksik, sehingga banyak digunakan sebagai pelarut ekstraksi bahan alam [22]. Metode maserasi dipilih karena kelebihan metode ini yaitu mudah untuk dilakukan dan tanpa pemanasan sehingga dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat (termolabil). Pemekatan cairan hasil maserat dilakukan dengan *rotary vaccum evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Hasil pembuatan ekstrak akar dan daun kipait dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak Akar dan Daun Kipait

Sampel	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Akar	250 gram	27 gram	10,8%
Daun	250 gram	60 gram	24%

Berdasarkan hasil pada Tabel 1, ekstraksi simplisia menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% menghasilkan rendemen ekstrak akar sebesar 10% dan ekstrak daun sebesar 24%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa dari 250 g simplisia kering diperoleh sekitar 25 g ekstrak akar dan 60 g ekstrak daun. Rendemen ekstrak daun yang lebih tinggi mengindikasikan bahwa senyawa yang larut dalam etanol 70% lebih banyak terdapat pada daun dibandingkan akar. Perbedaan ini diduga dipengaruhi oleh distribusi metabolit sekunder pada masing-masing bagian tanaman yang berbeda [14]. Hasil rendemen tersebut juga telah memenuhi standar, sebagaimana dinyatakan oleh Kemenkes RI pada buku Farmakope Herbal Indonesia (FHI) bahwa rendemen ekstrak dikatakan baik apabila nilai rendemen yang diperoleh tidak kurang dari 10% [23].

C. Uji Skrining Fitokimia

Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan sebagai langkah awal untuk mengidentifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak akar dan daun Kipait yang diduga berperan dalam aktivitas antibakteri. Pengujian dilakukan dengan mereaksikan masing-masing ekstrak akar dan daun Kipait dengan pereaksi tertentu di dalam tabung reaksi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna yang sesuai dengan standar warna untuk masing-masing golongan senyawa yang diuji. Sebaliknya, apabila tidak terjadi perubahan warna sesuai standar, maka hasil uji dinyatakan negatif atau menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak terdeteksi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil uji fitokimia ekstrak akar dan daun Kipait disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak akar dan daun Kipait mengandung senyawa alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid, fenolik, dan tanin. Ekstrak daun menunjukkan intensitas kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar, terutama pada golongan alkaloid, triterpenoid, fenolik, dan tanin. Perbedaan intensitas tersebut mengindikasikan adanya variasi distribusi metabolit sekunder pada masing-masing bagian tanaman yang dipengaruhi oleh fungsi fisiologisnya. Penelitian [24] menyatakan bahwa daun Kipait memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, steroid, flavonoid, triterpenoid, fenolik dan tannin. Sedangkan pada akar Kipait penelitian [25] menyatakan bahwa akar Kipait mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid dan fenolik. Daun merupakan organ utama tempat berlangsungnya fotosintesis dan biosintesis berbagai metabolit sekunder yang berperan sebagai mekanisme pertahanan alami tanaman terhadap gangguan lingkungan maupun serangan mikroorganisme, sehingga berpotensi menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan akar [24].

Tabel 2. Hasil Fitokimia Akar dan Daun Kipait

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil yang terbentuk	Kesimpulan	
			Akar	Daun
Alkaloid	Mayer	Endapan putih	++	+++
	Wagner	Endapan coklat	+++	+++
	Dragendorff	Endapan jingga	++	+++
Flavonoid	Mg + HCl pekat + etanol	Warna merah	-	-
Saponin	-	Adanya busa stabil	+++	+++
Steroid	Libermann-Burchard	Ungu ke biru/hijau	++	++
Triterpenoid	Kloroform + H ₂ SO ₄ pekat	Merah kecoklatan	++	+++
Fenolik	NaCl 10% + Gelatin 1%	Endapan putih	++	+++
Tanin	FeCl ₃ 1%	Coklat kehijauan	++	+++

Keterangan: (+) = Teridentifikasi dengan intensitas lemah, (++) = Teridentifikasi dengan intensitas sedang, (+++) = Teridentifikasi dengan intensitas kuat, (-) = Tidak teridentifikasi.

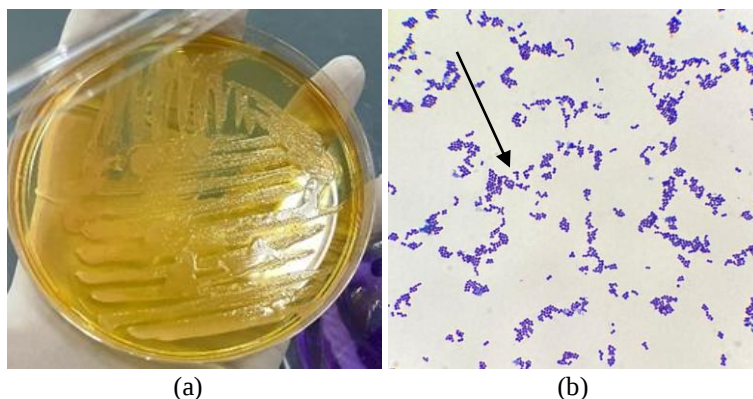
Senyawa metabolit sekunder pada tanaman diketahui mampu menghambat pertumbuhan mikroba melalui berbagai mekanisme, seperti merusak membran sel, mengganggu sintesis protein, dan menghambat aktivitas enzim bakteri [26]. Uji alkaloid menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Wagner, dan endapan jingga pada pereaksi Dragendorff. Endapan tersebut terbentuk akibat reaksi

alkaloid yang bersifat basa dengan ion logam dari pereaksi sehingga menghasilkan kompleks yang tidak larut [27];[28]. Alkaloid diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui penghambatan pembentukan peptidoglikan, gangguan metabolisme, serta interaksi dengan DNA dan protein sel bakteri [29]. Uji saponin menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya busa stabil yang bertahan selama kurang lebih 5 menit. Saponin bersifat seperti surfaktan sehingga mampu menurunkan tegangan permukaan dan membentuk busa. Sebagai antibakteri, saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri hingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler [30]. Uji steroid dan triterpenoid juga menunjukkan hasil positif. Keberadaan steroid ditandai dengan perubahan warna ungu kehijauan pada uji Liebermann-Burchard, sedangkan triterpenoid menunjukkan warna merah kecoklatan setelah penambahan kloroform dan H_2SO_4 pekat. Kedua senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui gangguan terhadap permeabilitas membran sel mikroba [31]. Uji fenolik dan tanin memberikan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada uji fenolik dan perubahan warna coklat kehijauan pada uji tanin. Fenolik dan tanin diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui pengendapan protein, kerusakan dinding sel, penghambatan aktivitas enzim, serta gangguan proses metabolisme bakteri [32]. Uji flavonoid, ekstrak akar Kipait tidak menunjukkan perubahan warna merah sehingga flavonoid tidak terdeteksi secara kualitatif. Kondisi ini diduga karena kadar flavonoid yang rendah atau berada di bawah batas deteksi metode yang digunakan. Meskipun demikian, flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui kerusakan membran sel dan penghambatan enzim bakteri [33];[34]. Kandungan senyawa fitokimia pada ekstrak akar dan daun Kipait dipengaruhi oleh bagian tanaman yang digunakan, kondisi lingkungan tumbuh, serta lokasi geografis asal tanaman. Perbedaan faktor-faktor tersebut dapat menyebabkan variasi kandungan metabolit sekunder, termasuk tidak terdeteksinya flavonoid pada ekstrak akar dalam penelitian ini [35].

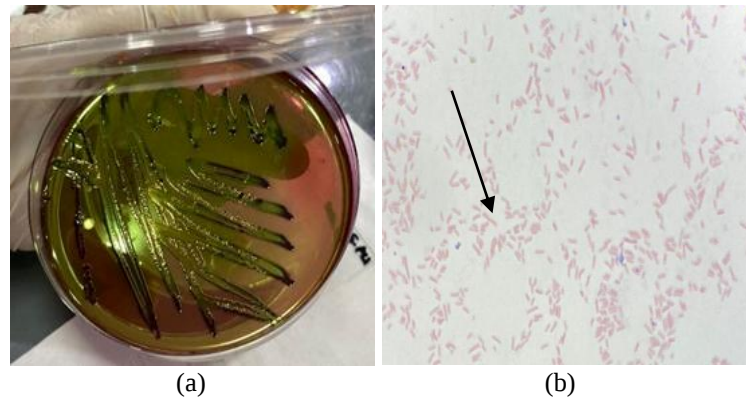
D. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Identifikasi *S. aureus* dilakukan dengan pengamatan karakteristik koloni pada media *Mannitol Salt Agar (MSA)* serta pewarnaan gram, dilihat pada Gambar 1 Hasil kultur pada media *MSA* menunjukkan adanya pertumbuhan koloni berwarna kuning disertai perubahan warna media dari merah menjadi kuning (Gambar 1 a). Perubahan warna tersebut menunjukkan kemampuan bakteri dalam memfermentasi manitol sehingga menghasilkan asam yang menyebabkan indikator fenol merah pada media berubah menjadi kuning [36]. Pengamatan mikroskopis setelah pewarnaan gram dengan perbesaran 100x, isolat menunjukkan bakteri gram positif berbentuk kokus yang tampak berkelompok menyerupai buah anggur dan berwarna ungu (Gambar 1 b). Hasil identifikasi ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri gram positif berbentuk kokus yang mampu memfermentasi manitol pada media *MSA* sehingga menghasilkan koloni dan media berwarna kuning. Warna ungu pada hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga mampu mempertahankan pewarna kristal violet selama proses dekolonisasi [37].

Sedangkan pada bakteri *E. coli* dilakukan melalui pengamatan karakteristik koloni pada media *Eosin Methylene Blue (EMB)* serta pewarnaan gram. Pada Gambar 2 Hasil kultur pada media *EMB* menunjukkan pertumbuhan koloni dengan warna hijau metalik (Gambar 2 a). Karakteristik tersebut menunjukkan kemampuan isolat dalam memfermentasi laktosa secara kuat sehingga menghasilkan asam dalam jumlah tinggi yang bereaksi dengan zat warna eosin dan *methylene blue* pada media *EMB* [38]. Koloni dengan warna hijau metalik merupakan ciri khas pertumbuhan *E. coli* pada media *EMB*. Pada pengamatan mikroskopis setelah pewarnaan gram dengan perbesaran 100x, terlihat bakteri gram negatif berbentuk batang (basil) berwarna merah muda (Gambar 2 b). Warna merah muda pada bakteri menunjukkan bahwa sel tidak mampu mempertahankan pewarna kristal violet akibat lapisan peptidoglikan yang tipis dan kandungan lipid yang lebih tinggi pada dinding sel bakteri gram negatif. Hasil identifikasi ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa *E. coli* menunjukkan pertumbuhan khas berupa koloni hijau metalik pada media *EMB* dan memiliki morfologi gram negatif berbentuk basil [39].



Gambar 1. Hasil Karakteristik Bakteri *S.aureus* (a) Hasil penanaman bakteri *S.aureus* pada media selektif *MSA* (b) Hasil pewarnaan gram bakteri *S.aureus* dan pengamatan pada perbesaran 1000x. (Dokumentasi Pribadi)



Gambar 2. Hasil Karakteristik Bakteri *E. coli* (a) Hasil pengamatan bakteri *E. coli* pada media selektif (b) Hasil pewarnaan gram bakteri *E. coli* dan pengamatan mikroskop pada perbesaran 1000x.
(Dokumentasi Pribadi)

E. Uji Antibakteri

Uji daya hambat dilakukan pada bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram (*Kirby-Bauer*) dan pengamatan diameter zona bening sebagai indikator penghambat pertumbuhan bakteri. Metode ini merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan dalam penelitian aktivitas antimikroba karena prosedurnya sederhana, ekonomis, dan mampu memberikan gambaran mengenai sensitivitas suatu bakteri terhadap senyawa antibakteri. Pada metode ini, senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak akan berdifusi dari kertas cakram menuju media agar dan membentuk zona bening apabila mampu menghambat pertumbuhan bakteri [40]. Media yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), karena memiliki sifat netral atau nonselektif sehingga tidak memengaruhi hasil pengujian. Media ini juga mengandung nutrisi yang sesuai untuk mendukung pertumbuhan bakteri uji [41]. Interpretasi zona hambat dilakukan berdasarkan acuan zona hambat yang dikategorikan lemah dengan diameter ≤ 5 mm, kategori sedang dengan diameter zona hambat 6-10 mm, kategori kuat dengan diameter 11-20 mm dan kategori sangat kuat dengan diameter ≥ 21 mm [21].

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak akar dan daun Kipait terhadap *S. aureus* (Tabel 4 dan Gambar 3), seluruh perlakuan ekstrak membentuk zona hambat, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak akar maupun daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Ekstrak akar pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% menghasilkan rata-rata diameter zona hambat berturut-turut sebesar 8,89 mm (kategori sedang), 9,72 mm (sedang), 10,73 mm (kuat), dan 12,91 mm (kuat). Sementara itu, ekstrak daun menghasilkan diameter zona hambat sebesar 14,99 mm, 16,84 mm, 20,12 mm, dan 22,13 mm pada konsentrasi yang sama, dengan kategori kuat hingga sangat kuat. Peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan diameter zona hambat, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil ini didukung dengan penelitian [42] yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak meningkatkan diameter zona hambat karena semakin banyak senyawa bioaktif yang berdifusi ke dalam media.

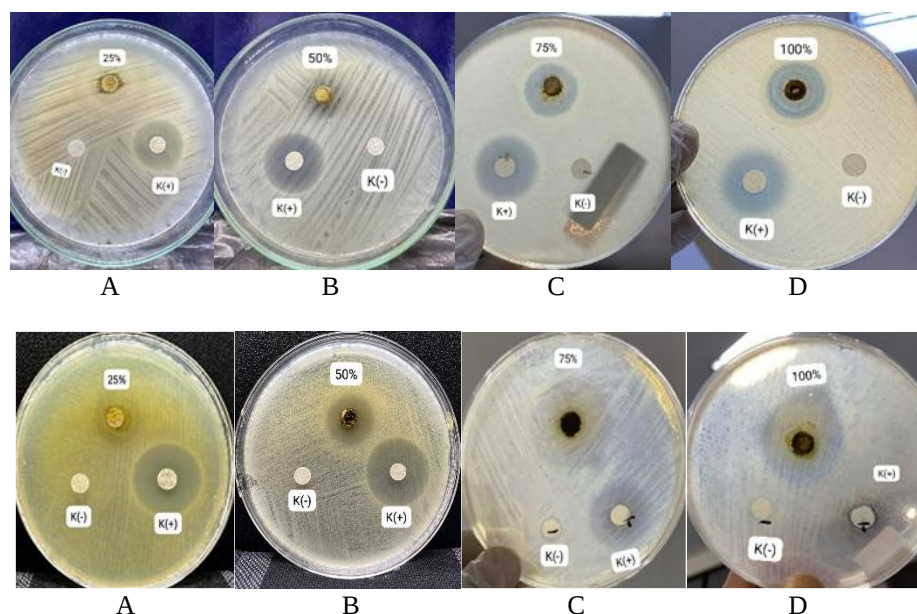
Data diameter zona hambat selanjutnya dianalisis secara statistik. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, sedangkan uji *Levene* menunjukkan varians antar kelompok homogen, sehingga data memenuhi asumsi untuk dianalisis menggunakan *Two-Way ANOVA*. Hasil analisis menunjukkan bahwa jenis ekstrak, konsentrasi ekstrak, serta interaksi keduanya berpengaruh signifikan terhadap diameter zona hambat *S. aureus* ($p=0,000$; $p<0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dipengaruhi tidak hanya oleh variasi konsentrasi ekstrak, tetapi juga oleh bagian tanaman yang digunakan. Adanya interaksi yang signifikan menunjukkan bahwa respons peningkatan daya hambat pada setiap konsentrasi berbeda antara ekstrak akar dan ekstrak daun. Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan variasi kandungan metabolit sekunder pada kedua bagian tanaman. Penelitian sebelumnya [43] melaporkan bahwa akar dan daun Kipait memiliki komposisi metabolit sekunder yang berbeda, dengan kandungan senyawa lebih tinggi pada daun, dengan hasil analisis kuantitatif memperlihatkan bahwa daun mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan akar maupun batang, sedangkan kandungan fenolik tertinggi ditemukan pada akar. Secara keseluruhan, daun merupakan bagian tanaman dengan kandungan fitokimia paling tinggi. Hasil uji fitokimia pada penelitian ini mendukung temuan tersebut, yaitu ekstrak daun menunjukkan intensitas metabolit sekunder yang lebih tinggi, terutama pada golongan alkaloid, triterpenoid, fenolik, dan tanin. Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan fungsi fisiologis daun sebagai organ utama fotosintesis dan biosintesis metabolit sekunder yang berperan dalam sistem pertahanan tanaman, sehingga ekstrak daun berpotensi memiliki aktivitas biologis yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar [44]. Selain metabolit sekunder yang teridentifikasi melalui uji fitokimia, penelitian [13] juga melaporkan bahwa Kipait mengandung seskuiterpen laktone, terutama Tagitinin F, yang merupakan senyawa utama tanaman ini. Meskipun tidak

diidentifikasi secara spesifik pada penelitian ini, keberadaan Tagitinin F diduga turut berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri ekstrak melalui mekanisme yang bekerja secara sinergis dengan metabolit sekunder lainnya.

Tabel 4. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Akar dan Daun Kipait pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Perhitungan Zona Hambat (mm)						
Zat Uji	Konsentrasi (%)	Pengulangan Ke-			Rata-rata ± SD	Kategori
		I	II	III		
Ekstrak Akar	25	8,62	9,12	8,94	8,89 ± 0,25 ^b	S
	50	9,64	9,50	10,4	9,72 ± 0,48 ^c	S
	75	10,48	10,62	11,10	10,73 ± 0,32 ^d	K
	100	12,68	13,24	12,82	12,91 ± 0,29 ^e	K
K (+)	Kloramfenikol 250 mg	22,82	23,48	23,72	23,34 ± 0,46 ^j	SK
K (-)	Aquades	0	0	0	0 ^a	L
Ekstrak Daun	25	15,10	14,56	15,32	14,99 ± 0,39 ^f	K
	50	16,64	16,72	17,16	16,84 ± 0,28 ^g	K
	75	19,86	20,32	20,18	20,12 ± 0,23 ^h	K
	100	21,98	22,24	22,18	22,13 ± 0,13 ⁱ	SK
K (+)	Kloramfenikol 250 mg	23,54	22,76	23,14	23,14 ± 0,39 ^j	SK
K (-)	Aquades	0	0	0	0 ^a	L

Keterangan: Notasi huruf di belakang angka menunjukkan hasil uji *Duncan*. Perlakuan yang memiliki huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan dengan huruf yang berbeda berarti berbeda nyata. L: Lemah, S: Sedang, K: Kuat, SK: Sangat Kuat



Gambar 3. Uji antibakteri akar dan daun pada bakteri *S. aureus* (a). Gambar A-D uji akar dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. Gambar E-H uji daun dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. (Dokumentasi pribadi)

Analisis dilanjutkan menggunakan uji *Duncan* yang menunjukkan adanya perbedaan nyata antar seluruh kelompok perlakuan. Peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan diameter zona hambat yang berbeda nyata pada setiap perlakuan, menunjukkan adanya hubungan *dosis-respons* terhadap aktivitas antibakteri. Ekstrak daun konsentrasi 100% menghasilkan diameter zona hambat tertinggi sebesar 22,13 mm, sedangkan ekstrak akar konsentrasi 25% menghasilkan diameter zona hambat terendah sebesar 8,89 mm. Pada seluruh konsentrasi yang diuji, ekstrak daun menghasilkan daya hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak akar. Hal ini didukung oleh hasil uji fitokimia yang menunjukkan intensitas metabolit sekunder ekstrak daun lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar, sehingga diduga memberikan kontribusi terhadap aktivitas antibakteri yang lebih besar. Hasil tersebut juga didukung oleh penelitian [19] yang melaporkan bahwa ekstrak daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *Klebsiella pneumoniae* dengan diameter zona hambat rata-rata 19,5 mm pada konsentrasi 0,625 g/mL dibanding batang dan akar, sehingga mengindikasikan bahwa daun merupakan bagian tanaman dengan potensi antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan akar maupun batang.

Aktivitas antibakteri ekstrak Kipait terhadap *S. aureus* juga diduga dipengaruhi oleh karakteristik bakteri Gram positif yang memiliki struktur dinding sel lebih sederhana dibandingkan bakteri Gram negatif. Dinding sel *S. aureus* tersusun terutama atas lapisan peptidoglikan tanpa membran luar yang mengandung lipopolisakarida, sehingga senyawa antibakteri lebih mudah berdifusi dan mencapai target di dalam sel. Senyawa metabolit sekunder yang teridentifikasi pada ekstrak Kipait, seperti alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid, fenolik, dan tanin, diduga bekerja secara sinergis dengan seskuiterpen lakton, terutama Tagitinin F, dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Tagitinin F dilaporkan memiliki gugus α -methylene- γ -lactone yang mampu berinteraksi dengan gugus sulfhidril (-SH) pada protein dan enzim bakteri sehingga mengganggu aktivitas enzim, meningkatkan permeabilitas membran, serta menyebabkan kebocoran komponen intraseluler [13]. Sementara itu, alkaloid, fenolik, tanin, saponin, steroid, dan triterpenoid turut berperan dalam merusak integritas dinding dan membran sel, menghambat metabolisme, serta mengganggu fungsi fisiologis bakteri [45]. Mekanisme kerja yang bersifat sinergis tersebut diduga menjadi salah satu faktor yang menyebabkan *S. aureus* menunjukkan sensitivitas tinggi terhadap ekstrak Kipait, sebagaimana ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat kategori sedang hingga sangat kuat pada seluruh perlakuan yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak.

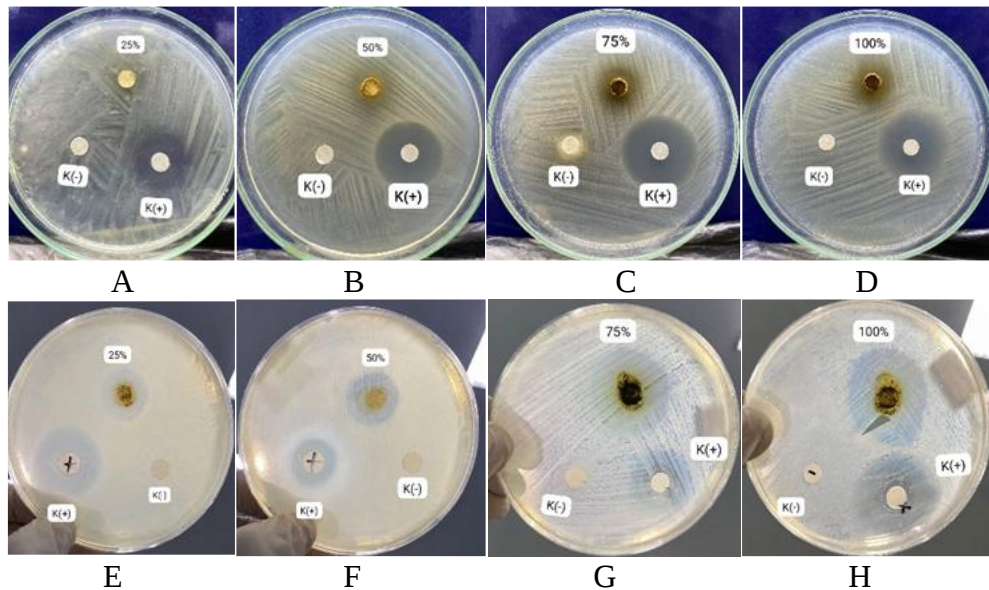
Sedangkan itu, berdasarkan Tabel 5 dan Gambar 4, hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak akar dan daun Kipait terhadap *E. coli* menunjukkan terbentuknya zona hambat pada seluruh perlakuan ekstrak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak akar maupun daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Ekstrak akar pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% menghasilkan diameter zona hambat berturut-turut sebesar 7,93 mm (kategori sedang), 8,47 mm (sedang), 9,10 mm (sedang), dan 10,10 mm (kuat). Sementara itu, ekstrak daun menghasilkan diameter zona hambat sebesar 11,90 mm (kuat), 15,55 mm (kuat), 16,84 mm (kuat), dan 20,74 mm (kuat) pada konsentrasi yang sama. Peningkatan diameter zona hambat seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Dengan demikian, perlakuan yang menghasilkan zona hambat kategori kuat dan sangat kuat menunjukkan efektivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan kategori sedang maupun lemah. Hasil ini didukung dengan penelitian [46] yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak meningkatkan diameter zona hambat karena semakin banyak senyawa antimikroba yang berdifusi ke dalam media.

Selanjutnya data diameter zona hambat dianalisis secara statistik. Data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas sehingga layak dianalisis menggunakan uji parametrik Two-Way ANOVA. Hasil analisis menunjukkan bahwa jenis ekstrak, variasi konsentrasi, serta interaksi antara keduanya berpengaruh signifikan terhadap diameter zona hambat *E. coli* ($p=0,000$; $p<0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak Kipait dipengaruhi tidak hanya oleh konsentrasi ekstrak, tetapi juga oleh bagian tanaman yang digunakan. Adanya interaksi yang signifikan menunjukkan bahwa respons peningkatan daya hambat berbeda antara ekstrak akar dan ekstrak daun pada setiap konsentrasi.

Tabel 5. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Akar dan Daun Kipait Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Zat Uji	Konsentrasi (%)	Perhitungan Zona Hambat (mm)			Rata-rata ± SD	Kategori
		Pengulangan Ke-				
		I	II	III		
Ekstrak Akar	25	7,92	8,02	7,85	7,93 ± 0,08 ^b	S
	50	8,64	7,98	8,80	8,47 ± 0,04 ^c	S
	75	9,16	9,28	8,86	9,10 ± 0,21 ^d	S
	100	10,14	9,98	10,20	10,10 ± 0,11 ^e	S
K (+)	Kloramfenikol 250 mg	22,10	21,78	22,36	22,08 ± 0,29 ^j	SK
K (-)	Aquades	0	0	0	0 ^a	L
Ekstrak Daun	25	11,86	11,64	12,21	11,90 ± 0,28 ^f	K
	50	14,86	16,16	15,64	15,55 ± 0,65 ^g	K
	75	17,02	16,68	16,84	16,84 ± 0,17 ^h	K
	100	20,18	21,26	20,80	20,74 ± 0,54 ⁱ	K
K (+)	Kloramfenikol 250 mg	21,92	22,26	21,76	21,98 ± 0,25 ^j	SK
K (-)	Aquades	0	0	0	0 ^a	L

Keterangan: Notasi huruf di belakang angka menunjukkan hasil uji *Duncan*. Perlakuan yang memiliki huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan dengan huruf yang berbeda berarti berbeda nyata. L: Lemah, S: Sedang, K: Kuat, SK: Sangat Kuat



Gambar 4. Uji antibakteri akar dan daun pada bakteri *E. coli* (a). Gambar A-D Uji akar dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. Gambar E-H uji daun dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. (Dokumentasi pribadi)

Analisis dilanjutkan menggunakan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan nyata antar kelompok perlakuan. Hasil uji menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak akar maupun ekstrak daun diikuti oleh peningkatan diameter zona hambat yang berbeda nyata pada setiap perlakuan. Pada kelompok ekstrak akar, peningkatan aktivitas antibakteri terjadi secara bertahap seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak, sedangkan pada ekstrak daun peningkatan aktivitas antibakteri lebih nyata pada setiap konsentrasi yang diuji. Hubungan tersebut menunjukkan adanya pola *dosis-respons*, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli*. Kondisi ini diduga terjadi karena peningkatan konsentrasi ekstrak menyebabkan jumlah senyawa yang tersedia untuk berdifusi ke dalam media dan berinteraksi dengan sel bakteri semakin besar. Hasil ini sesuai dengan prinsip umum aktivitas antimikroba yang menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi senyawa antibakteri meningkatkan jumlah molekul aktif yang mencapai sel bakteri sehingga efektivitas penghambatan menjadi lebih tinggi [47].

Ekstrak daun menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak akar pada seluruh konsentrasi yang diuji. Diameter zona hambat tertinggi diperoleh pada ekstrak daun konsentrasi 100% sebesar 20,74 mm, sedangkan diameter zona hambat terendah diperoleh pada ekstrak akar konsentrasi 25% sebesar 7,93 mm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun Kipait memiliki efektivitas antibakteri yang lebih tinggi terhadap *E. coli*. Perbedaan aktivitas tersebut diduga berkaitan dengan kandungan metabolit sekunder ekstrak daun yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar, sebagaimana ditunjukkan oleh hasil uji fitokimia yang mengidentifikasi intensitas alkaloid, triterpenoid, fenolik, dan tanin lebih tinggi pada ekstrak daun. Selain itu, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa (*T. diversifolia* Hemsl.) Gray mengandung seskuiterpen lakton, terutama Tagitinin F, yang dikenal sebagai senyawa utama tanaman ini. Keberadaan Tagitinin F sebagai senyawa khusus Kipait bersama metabolit sekunder lainnya diduga berkontribusi secara sinergis terhadap aktivitas antibakteri [13]. Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian [48] yang melaporkan bahwa ekstrak daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap bakteri Gram negatif dengan zona hambat terbesar diperoleh pada konsentrasi 100%, yaitu 15 mm terhadap *K. pneumoniae*. Meskipun *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki membran luar mengandung lipopolisakarida sebagai penghalang masuknya berbagai senyawa antimikroba, ekstrak daun Kipait tetap menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi. Aktivitas tersebut diduga dipengaruhi oleh kerja sinergis metabolit sekunder, seperti alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid, fenolik, tanin, serta seskuiterpen lakton seperti Tagitinin F yang mampu mengganggu integritas membran sel, meningkatkan permeabilitas membran, menghambat aktivitas enzim, dan mengganggu proses metabolisme bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat [49].

Namun demikian, diameter zona hambat terhadap *E. coli* masih lebih rendah dibandingkan terhadap *S. aureus*. Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan karakteristik *E. coli* sebagai bakteri Gram negatif yang memiliki membran luar mengandung lipopolisakarida sehingga penetrasi senyawa antibakteri menjadi lebih terbatas dibandingkan pada bakteri Gram positif. Kompleksitas struktur dinding sel tersebut menyebabkan bakteri Gram negatif umumnya lebih resisten terhadap berbagai senyawa antimikroba alami. Hasil ini didukung dengan penelitian [50] yang melaporkan bahwa senyawa antibakteri dari bahan alam umumnya menunjukkan efektivitas yang lebih tinggi terhadap bakteri Gram positif dibandingkan Gram negatif.

Berdasarkan hasil rata-rata diameter zona hambat dan analisis statistik, seluruh konsentrasi ekstrak akar dan daun Kipait mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Diameter zona hambat cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak, sedangkan ekstrak daun menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak akar pada seluruh konsentrasi yang diuji. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak akar maupun daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri, dengan efektivitas penghambatan yang dipengaruhi oleh jenis ekstrak dan konsentrasi yang digunakan. Berdasarkan hasil uji *Duncan*, ekstrak daun konsentrasi 100% menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi, yaitu menghasilkan diameter zona hambat sebesar 22,13 mm (kategori sangat kuat) terhadap *S. aureus* dan 20,74 mm (kategori kuat) terhadap *E. coli*.

Perbedaan efektivitas antibakteri antara ekstrak akar dan daun diduga berkaitan dengan perbedaan kandungan serta distribusi metabolit sekunder pada masing-masing bagian tanaman. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun memiliki intensitas kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar. Daun merupakan organ utama tempat berlangsungnya fotosintesis dan biosintesis berbagai metabolit sekunder yang berperan sebagai mekanisme pertahanan alami tanaman terhadap gangguan lingkungan maupun serangan mikroorganisme, sehingga berpotensi menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan akar [51]. Hasil ini didukung oleh penelitian [52] yang melaporkan bahwa ekstrak daun Kipait hasil maserasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio cholerae* dengan konsentrasi 50% menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak batang maupun akar. Selain itu, rendemen ekstrak daun pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan ekstrak akar, yaitu masing-masing sebesar 24% dan 10,8%. Rendemen yang lebih tinggi mengindikasikan bahwa lebih banyak senyawa yang berhasil diekstraksi oleh pelarut. Hasil ini didukung dengan penelitian [53] yang menyatakan bahwa daun menghasilkan rendemen serta kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan akar, sehingga berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri yang lebih kuat.

Kandungan metabolit sekunder yang teridentifikasi pada uji fitokimia, yaitu alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid, fenolik, dan tannin, memiliki mekanisme kerja yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Alkaloid diketahui menghambat pembentukan peptidoglikan dinding sel bakteri, saponin meningkatkan permeabilitas membran sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler, tanin dan fenolik mengendapkan protein serta menghambat aktivitas enzim, sedangkan steroid dan triterpenoid merusak integritas membran sel. Mekanisme kerja berbagai metabolit sekunder tersebut diduga berlangsung secara sinergis sehingga berkontribusi terhadap terbentuknya zona hambat pada kedua bakteri uji [54]. Selain metabolit sekunder tersebut, *T. diversifolia* (Hemsl.) Gray juga diketahui mengandung seskuiterpen lakton, terutama Tagitinin F, yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antiinflamasi, dan sitotoksik. Aktivitas antibakteri Tagitinin F diduga berkaitan dengan gugus α -methylene- γ -lactone yang bersifat elektrofilik dan mampu berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) pada protein maupun enzim esensial bakteri. Interaksi tersebut mengganggu proses metabolisme dan replikasi sel bakteri, serta meningkatkan permeabilitas membran yang menyebabkan kebocoran komponen intraseluler hingga berujung pada kematian sel [55].

Berdasarkan Tabel 4 dan Tabel 5, kontrol positif menggunakan kloramfenikol 250 mg menghasilkan rata-rata diameter zona hambat sebesar 23,34 mm dan 23,14 mm terhadap *S. aureus*, serta 22,08 mm dan 21,98 mm terhadap *E. coli*, yang seluruhnya termasuk kategori sangat kuat. Penggunaan kontrol positif berfungsi sebagai pembandingan untuk mengevaluasi efektivitas antibakteri ekstrak uji. Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang bekerja secara bakteriostatik melalui penghambatan sintesis protein bakteri sehingga menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel [56]. Penggunaan antibiotik standar juga bertujuan memastikan bahwa media, kultur bakteri, dan metode pengujian berada dalam kondisi yang sesuai sehingga hasil penelitian dapat divalidasi secara ilmiah. Selain karena spektrum luas dan mekanisme kerjanya yang telah terstandarisasi, kloramfenikol juga relatif mudah diperoleh dan banyak digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian aktivitas antibakteri [57]. Sebaliknya, kontrol negatif menggunakan akuades steril tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa akuades tidak memiliki aktivitas antibakteri dan tidak memengaruhi pertumbuhan bakteri uji. Oleh karena itu, zona hambat yang terbentuk pada seluruh perlakuan dapat dipastikan berasal dari aktivitas senyawa bioaktif dalam ekstrak Kipait, bukan akibat pengaruh pelarut maupun media yang digunakan [58].

Berdasarkan hasil pengujian, kontrol positif berupa kloramfenikol 250 mg menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan seluruh perlakuan ekstrak, baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*. Meskipun demikian, ekstrak daun Kipait konsentrasi 100% menghasilkan diameter zona hambat yang mendekati kontrol positif, yaitu sebesar 22,13 mm terhadap *S. aureus* dibandingkan 23,14 mm pada kloramfenikol, serta sebesar 20,74 mm terhadap *E. coli* dibandingkan 21,98 mm pada kontrol positif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun Kipait memiliki aktivitas antibakteri yang kuat meskipun masih berupa ekstrak kasar (*crude extract*) yang mengandung campuran berbagai metabolit sekunder. Perbedaan aktivitas antara ekstrak dan kontrol positif diduga berkaitan dengan perbedaan karakteristik senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Kloramfenikol merupakan antibiotik dengan senyawa aktif yang telah terstandarisasi dan bekerja secara bakteriostatik melalui penghambatan sintesis protein dengan berikatan pada subunit ribosom 50S bakteri [59]. Sebaliknya, ekstrak Kipait merupakan campuran berbagai metabolit sekunder, seperti alkaloid, saponin, fenolik, tanin, steroid, triterpenoid, serta seskuiterpen lakton,

yang diduga bekerja secara sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, meskipun diameter zona hambat ekstrak masih lebih rendah dibandingkan kontrol positif, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Kipait berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber antibakteri alami melalui penelitian lanjutan, seperti isolasi senyawa aktif, pengujian mekanisme kerja, dan pengembangan formulasi [60].

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa *S. aureus* cenderung lebih sensitif terhadap ekstrak Kipait dibandingkan *E. coli*, yang ditunjukkan oleh diameter zona hambat yang lebih besar pada konsentrasi ekstrak yang sama. Perbedaan sensitivitas tersebut diduga berkaitan dengan perbedaan struktur dinding sel kedua bakteri. *S. aureus* sebagai bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan tebal tanpa membran luar, sehingga senyawa antibakteri lebih mudah berdifusi dan mencapai target di dalam sel. Sebaliknya, *E. coli* sebagai bakteri Gram negatif memiliki membran luar yang mengandung lipopolisakarida sehingga menghambat penetrasi berbagai senyawa antibakteri. Karakteristik tersebut menyebabkan bakteri Gram negatif umumnya lebih resisten dibandingkan bakteri Gram positif terhadap berbagai senyawa antimikroba. Hasil ini sesuai dengan penelitian [61] yang melaporkan bahwa struktur dinding sel Gram positif yang lebih sederhana karena hanya tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tebal tanpa membran luar yang mengandung lipopolisakarida (LPS). Tidak adanya membran luar menyebabkan senyawa antibakteri lebih mudah berdifusi dan mencapai target di dalam sel bakteri. Sebaliknya, bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis, namun dilengkapi membran luar yang kaya akan LPS (lipopolisakarida) sehingga membentuk penghalang permeabilitas dan menghambat masuknya berbagai senyawa antibakteri. Oleh karena itu, bakteri Gram positif umumnya lebih rentan terhadap senyawa antibakteri dibandingkan bakteri Gram negatif [61].

IV. SIMPULAN

Ekstrak akar dan daun Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Ekstrak daun konsentrasi 100% menunjukkan efektivitas tertinggi terhadap kedua bakteri uji dan menunjukkan potensi untuk dikembangkan sebagai sumber antibakteri alami.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada petugas laboratorium dan rekan kerja serta sivitas akademik Prodi Teknologi Laboratorium Medis FIKP UMSIDA dan semua pihak yang telah memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini.

REFERENSI

- [1] O. Cemre and S. Dosler, "Prevention Of Antibiotic Resistance Created By Experimental Evolutionary Microbiology in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* With Herbal Substances," *Istanbul J Pharm*, vol. 52, no. 2, pp. 173–178, 2022, doi: 10.26650/IstanbulJPharm.2022.996448.
- [2] I. Novita, D. Usdiana, and F. Ramona, "Pola Resistensi Bakteri Penyebab Ulkus Diabetikum Terhadap Antibiotik di Salah Satu Rumah Sakit Swasta di Surakarta," *J. Pharm. Sci. Clin. Res.*, vol. 10, no. 1, p. 80, 2025, doi: 10.20961/jpscr.v10i1.85091.
- [3] E. Mayasari and E. D. Utama, "Epidemiology And Resistant Profile Of Bacterial Pathogens In a Tertiary Health Care Hospital, Medan City: a Retrospective Study," *PeerJ*, vol. 13, no. 5, pp. 1–19, 2025, doi: 10.7717/peerj.19510.
- [4] W. Saputra, P. B. Mayura, and M. A. Hendrayana, "Fecal Contamination And Antimicrobial Susceptibility Profiles Of *Escherichia coli* in Rural Water Sources Of Bali, Indonesia," *Biodiversitas*, vol. 26, no. 10, pp. 4923–4931, 2025, doi: 10.13057/biodiv/d261008.
- [5] S. Kesuma, M. J. Saputri, and P. Aleksandra, "Profil Bakteri Penginfeksi Pus Pada Luka Di Laboratorium Mikrobiologi Rsud Abdoel Wahab Sjahranie Periode Bulan Januari-Juni Tahun 2023," *J. Kesehat. Tambusai*, vol. 4, no. 4, pp. 6013–6023, 2023, doi: 10.31004/jkt.v4i4.20623.
- [6] A. Asih and M. Susanti, "Identifikasi Bakteri Pada Pasien Infeksi Luka Operasi (ILO) Pasca Bedah Orthopedi Di RS X Pekalongan," *J. Ilmu Kesehat. dan Kedokt.*, vol. 2, no. 1, 2024, doi: 10.59680/anestesi.v2i1.795.
- [7] T. Navidifar, A. Zare, M. Beig, and M. Sholeh, "Global Prevalence Of Macrolide-Resistant *Staphylococcus spp.*: A Comprehensive Systematic Review And Meta-Analysis," *Front. Microbiol.*, vol. 16, no. 4, 2025, doi: 10.3389/fmicb.2025.1524452.
- [8] WHO Antimicrobial Resistance Division, "Global Antibiotic Resistance Surveillance Report 2025: Summary," Geneva, Switzerland, 2025. doi: 10.2471/B09585.
- [9] A. Karuniawati, W. D. Gunardi, D. Anggraini, and D. Santosaningsih, *Data Resistensi Antibiotik Indonesia Tahun 2024 Pola Patogen dan Antibiotogram*. Indonesia: CV. Oke Terbitkan Indonesia, 2026.

- [10] Pusat Data dan Informasi Obat dan Makanan, “Potensi Obat Herbal Indonesia,” Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. [Diakses: 12 Desember 2025]
- [11] G. A. Silva, A. R. Silva, and E. Oliveira, “Ethnopharmacological Potential of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray Potencial etnofarmacológico da *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray,” *Res. Soc. Dev.*, vol. 2, no. 10, pp. 1–9, 2020, doi: 10.33448/rsd-v9i10.8370.
- [12] M. Novelly and B. Purba, “Efektivitas Gel Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray) Sebagai Penyembuh Luka Pada Tikus Diabetes,” *J. Kesehat. Tambusai*, vol. 5, no. 3, pp. 9889–9898, 2024, doi: 10.31004/jkt.v5i3.32092.
- [13] M. C. Andrade, R. A. S. Freitas, and H. C. S. Santos, “Tagitinin F-Rich Extract From *Tithonia diversifolia* (hemsl.) A. Gray Exerts Activity Against Pathogenic Bacteria and Biofilms,” *J. Pathol. Microbiol. Immunol.*, vol. 134, no. 3, pp. 1–11, 2026, doi: 10.1111/apm.70185.
- [14] T. Robinson and D. Justine, “Biological Activities and Phytochemical Constituents in the Stimulatory Potential of *Tithonia diversifolia* Fermented Extracts: A Review,” *European J. Med. Plants*, vol. 35, no. 6, pp. 340–352, 2024, doi: 10.9734/ejmp/2024/v35i61230.
- [15] R. Solfaine, L. Muniroh, and I. S. Hamid, “Kajian Ekstrak Etanol Daun *Tithonia diversifolia* Terhadap Histomorfologi Pankreas dan Ekspresi Interleukin 1-beta pada Induksi Alokan Tikus Wistar,” *J. Sain Vet.*, vol. 40, no. 1, p. 44, 2022, doi: 10.22146/jsv.69584.
- [16] H. Zhou, L. Chen, and K. Ouyang, “Antibacterial Activity And Mechanism Of Flavonoids From *Chimonanthus salicifolius* And Its Transcriptome Analysis Against *Staphylococcus aureus*,” *Front. Microbiol.*, vol. 13, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.1103476.
- [17] N. S. Purwaningsih, S. M. Utami, and W. Apriandini, “Uji Efektivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Kipait (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*,” *Edu Masda J.*, vol. 4, no. 1, pp. 76–87, 2020, doi: 10.52118/edumasda.v4i1.57.
- [18] C. N. Putri, M. R. R. Rahardhian, and D. Ramonah, “Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Total Fenol dan Total Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Smallanthus sonchifolius*) serta Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*,” *J. Pharm. Sci. Clin. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 15–27, 2022, doi: 10.20961/jpscr.v7i1.43465.
- [19] D. Lwanda, G. Pelusi, and M. Mphanga, “Antibacterial Activity of Crude Aqueous Extracts of *Tithonia diversifolia* from Chichiri Area in Blantyre District, Malawi,” *Biomed. Pharmacol. J.*, vol. 16, no. 4, pp. 1961–1971, 2023, doi: 10.13005/bpj/2773.
- [20] A. Putri Sarmila, “Uji Aktivitas Antibakteri Nanopartikel Perak (AgNPs) Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Jerawat,” Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, 2025.
- [21] A. F. Luthfi, S. Khotimah, and Rahmawati, “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Oncom Merah Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) Dan *Escherichia coli* (ATCC 25923) Secara In Vitro,” *Univ. Negeri Semarang*, vol. 11, pp. 587–594, 2023.
- [22] N. T. Saroya, W. Y. Solikah, and E. Emelda, “Pengaruh Variasi Jenis Pelarut Terhadap Kadar Flavonoid dan Fenolik Total Ekstrak Etanol Umbi Lobak Putih (*Raphanus sativus* L.),” *J. Ilmu Kefarmasian*, vol. 6, no. 2, pp. 124–135, 2025, doi: 10.31764/lf.v6i2.27991.
- [23] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Tahun 2022*, Edisi II (. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, 2022.
- [24] D. Wahyuni and H. U. Swandono, “Karakterisasi Dan Potensi Ekstrak Daun Paitan (*Tithonia diversifolia*) Sebagai Penolak Nyamuk *Aedes aegypti*,” *J. Ilm. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 1150–1160, 2023, doi: 10.33394/bioscientist.v11i2.8844.
- [25] D. A. Okuna, C. I. Nyamwange, and H. Nyandieka, “Qualitative Phytochemical Screening of *Tithonia diversifolia*: A Gray Aqueous Root Extract,” *Kabarak J. Res. Innov.*, vol. 14, no. 02, pp. 230–241, Sep. 2024, doi: 10.58216/KJRI.V14I02.398.
- [26] D. H. S. Jofri, R. Kartika, and M. R. Aswat, “Aktivitas Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder pada Beberapa Ekstrak Tanaman Terhadap Bakteri Gram Positif,” *Pros. Semin. Nas. Kim. FMIPA Univ. Mulawarman*, vol. 1, no. 1, pp. 313–322, 2024.
- [27] M. Febry and U. Usman, “Uji Fitokimia dan Toksisitas Ekstrak Metanol Batang Tanaman Bintaro (*Cerbera manghas* L.) Terhadap Bibit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*),” *Pros. Semin. Nas. Kim. FMIPA Univ. Mulawarman*, vol. 1, no. 1, pp. 234–240, 2024.
- [28] Tukiran, Syanto, and N. Hidayati, “Uji Awal Untuk Skrining Fitokimia Pada Tumbuhan Famili Asteraceae Indonesia,” *Pros. Semin. Nas. Kim. dan Pembelajarannya*, vol. 2, pp. 253–259, 2024.
- [29] X. Z. Zhang, M. X. Chen, R. Hou, and W. Q. Wang, “Natural Alkaloids as Antimicrobial Agents: Mechanisms, Potentials and Challenges,” *Molecules*, vol. 31, no. 7, p. 1204, 2026, doi: 10.3390/molecules31071204.

- [30] Maria F.K Hayon, Risa Supriningrum, and Nurul Fatimah, "Identifikasi Jenis Saponin Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Kulit Batang Sekilang (*Embelia borneensis* Scheff.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 DAN *Streptococcus mutans* ATCC 25175," *J. Ris. Kefarmasian Indones.*, vol. 5, no. 2, pp. 178–189, 2023, doi: 10.33759/jrki.v5i2.368.
- [31] M. N. Ramdhani, A. Firdaus, and M. Umami, "Analisis Senyawa Fitokimia Dan Tren Penelitian Pada Daun Sirih Hijau (*Piper batle* L.)," *J. Pendidik. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 108–127, 2025.
- [32] D. Asiska Permata, S. Fahma, and P. Kony, "Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Matoa (*Pometia Pinnata* J.R.Forst & G.Forst) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*," *J. Penelit. Dan Pengkaj. Ilm. Eksakta*, vol. 4, no. 2, pp. 175–184, 2025.
- [33] H. Ella, A. Ni Komang, and P. Dela, "Uji Aktivitas dari Ekstrak Etanol Daun Bilajang Bulu (*Merremia vitifolia*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*," *Al Kim.*, vol. 8, no. 1, pp. 30–36, 2020, doi: 10.24252/al-kimia.v8i1.10079.
- [34] A. Saptowo, R. Supriningrum, and Supomo, "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Sekilang (*Embeliaborneensis* Scheff) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*," *J. Ris. Kefarmasian Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 152–162, 2022, doi: 10.33759/jrki.v4i2.260.
- [35] R. Made Basma, D. Rindang, and D. Ida Ayu Putri, "Karakterisasi Morfologi Dan Analisis Fitokimia Tanaman Bunga Ratna (*Gomphrena globosa*) Fenotipe Merah Muda di Daerah Sibanggede dan Padang Galak," *J. Agrotek Trop.*, vol. 13, no. 3, pp. 359–368, 2025, doi: 10.23960/jat.v13i3.9681.
- [36] H. Zulfikar Ali, A. Windah Zufiyani, P. Rido, and Herman, "Potensi Limbah Udang Sebagai Media Alternatif Pengganti Pepton Pada Media Mannitol Salt Agar Untuk Isolasi *Staphylococcus aureus*," *J. Media Anal. Kesehat. Poltekes Makasar*, vol. 16, no. 2, pp. 151–160, 2025, doi: 10.32382/jmak.v16i2.1948.
- [37] A. Shari and A. P. Humaira, "Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Seragam Dokter di Rumah Sakit," *Indones. J. Heal. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 718–728, 2025.
- [38] M. S. Rahmaan, "Profil Resistensi Antibiotik Terhadap *Escherichia coli* pada Daging Sapi yang Dijual di Pasar Tradisional Provinsi Yogyakarta," Universitas Gadjah Mada, 2025.
- [39] I. Fajarwati, "Resistensi *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Kucing dengan Gangguan Pencernaan di Yogyakarta terhadap Lima Jenis Antibiotik," Universitas Gadjah Mada, 2025.
- [40] S. Gupta, S. Kuila, and P. Ray, "Tick-Tock, Beat The Clock: Comparative Analysis of Disc Diffusion Testing With 6-, 10-, and 24-h Growth for Accelerated Antimicrobial Susceptibility Testing and Antimicrobial Stewardship," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 42, no. 8, pp. 929–943, Aug. 2023, doi: 10.1007/S10096-023-04611-Y.
- [41] Clinical and Laboratory Standards Institute, "M23S3: Procedure for Confirming the Acceptability of *Mueller-Hinton Agar* Sources for Subsequent Use in CLSI and/or EUCAST Studies to Establish Disk Diffusion Quality Control Ranges," Wayne, Pennsylvania, Jun. 2023.
- [42] A. N. Kasim, D. Novalina, and N. E. Putri, "Potential Of *Tithonia diversifolia* Leaves As An Antibacterial Agent Against *Streptococcus mutans* A Causative Agent Of Dental Caries," *J. Anal. Farm.*, vol. 10, no. 2, pp. 1–13, 2025.
- [43] B. U. Olayinka, D. A. Raiyemo, and E. O. Etejere, "Phytochemical And Proximate Composition Of *Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A Gray," *Ann. Food Sci. Technol.*, vol. 16, no. 1, pp. 196–200, Jan. 2021.
- [44] D. V. Navarrete-Carriola, A. D. Paz-González, and V. Jiménez, "Comparative Analysis of a Secondary Metabolite Profile from Roots and Leaves of *Iostephane heterophylla* by UPLC-MS and GC-MS," *ACS Omega*, vol. 9, no. 5, pp. 5429–5439, Feb. 2024, doi: 10.1021/ACSOMEGA.3C06800.
- [45] Y. Zhao, J. Wei, C. Li, A. F. Ahmed, Z. Liu, and C. Ma, "A Comprehensive Review On Mechanism Of Natural Products Against *Staphylococcus aureus*," *J. Futur. Foods*, vol. 2, no. 1, pp. 25–33, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.JFUTFO.2022.03.014.
- [46] Q. Hafizah, L. Permatasari, and N. Rachmalia Izzatul Muchlishah, "Faktor - Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Antibakteri Daun Mangrove (*Rhizophora mucronata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*," *J. Kesehat. Tambusai*, vol. 5, no. 2, pp. 3833–3834, 2024.
- [47] T. S. Widodo and L. A. HK, "Analisis Hubungan Konsentrasi dan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Cair serta Serbuk," *AGRITEKH (Jurnal Agribisnis dan Teknol. Pangan)*, vol. 6, no. 1, pp. 13–19, 2025, doi: 10.32627/agritekh.v6i1.1471.
- [48] M. M. E. Achieng and S. O. Awuor, "Determination of Antimicrobial Activity of Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) Leaf Extract against Selected Gram-Negative Bacteria," Apr. 07, 2025, *Research Square*. doi: 10.21203/RS.3.RS-6377934/V1.
- [49] J. Mahendra, E. Kurniawaty, and S. Nareswari, "Senyawa Bioaktif dalam Ekstrak Mentimun (*Cucumis sativus* L.) dan Potensinya sebagai Alternatif Antibiotik Alami," *J. Kesehat. dan Agromedicine*, vol. 12, no. 2, pp. 126–135, 2025, doi: 10.23960/jka.v12i2.pp126-135.
- [50] A. M. Dewi, I. Priantari, and K. Munandar, "Uji Daya Hambat Antibakteri Produk Sabun Cuci Tangan Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Bakteri Patogen," *Biosci. J. Ilm. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 1256–1267, 2025, doi: 10.33394/bioscientist.v13i2.15237.

- [51] N. Afifah, “Penentuan Kandungan Flavonoid, Fenolik, dan Aktivitas Antioksidan dari Daun, Batang, serta Akar Empat Jenis Tanaman *Tradescantia*,” Universitas Andalas, 2024.
- [52] A. F. Muhammad, N. Dhiah, and S. Monika Putri, “Keunggulan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kipahit dengan Metode Maserasi terhadap Bakteri *Vibrio cholerae*,” *J. Heal. Res.*, vol. 16, no. September, pp. 806–811, 2025, doi: 10.33846/sf16325.
- [53] Supartini and D. D. N. Cahyono, “Rendemen Akar, Batang dan Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Sebagai Bahan Baku Obat Herbal,” *J. Ris. Teknol. Ind.*, vol. 14, no. 2, pp. 142–155, 2020, doi: 10.26578/jrti.v14i2.5788.
- [54] Norman Ferdinal, Miftahul Jannah, and Afrizal, “Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antijamurnya,” *J. Kim. Unand*, vol. 14, no. 1, pp. 1–10, 2025, doi: 10.25077/jku.14.1.1-10.2025.
- [55] B. S. Dlamini, C. R. Chen, and D. J. H. Shyu, “Flavonoids from *Tithonia diversifolia* and their Antioxidant and Antibacterial Activity,” *Chem. Nat. Compd.*, vol. 56, no. 5, pp. 906–908, Sep. 2020, doi: 10.1007/S10600-020-03182-0.
- [56] D. Islmiyati and F. Husen, “Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kloramfenikol Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif Secara In Silico Dan In Vitro,” *J. Bina Cipta Husada*, vol. 21, no. 2, pp. 1–8, 2025.
- [57] L. Xue and C. M. T. Spahn, “Structural Insights Into Context-Dependent Inhibitory Mechanisms of Chloramphenicol in Cells,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 32, no. 2, pp. 257–267, Feb. 2025, doi: 10.1038/S41594-024-01441-0.
- [58] T. Sangadji, A. Niwele, and D. I. S. Wally, “Antibacterial Activity Test of 70% Ethanol Extract of Mangkoka Leaves (*Nothopanax scutellarium* Merr.) Against *Propionibacterium acne* Bacteria Using the Well Diffusion Method,” *J. Ilmu Kedokt. dan Kesehat.*, vol. 2, no. 1, pp. 145–152, 2022.
- [59] S. Arifah and R. Munawaroh, “Combination Activity of Ethanolic Extract of Kersen Leaves (*Muntingia calabura* L.) and Chloramphenicol Against *Salmonella typhi*,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 212–222, 2026, doi: 10.36490/journal-jps.com.
- [60] K. Marieta Bai and R. Sumardi, *Tanaman Obat*, 1st ed. Kota Kendari: Progres Ilmiah Kesehatan, 2025.
- [61] M. N. Pasaribu, R. Pramesti, and S. Sedjati, “Pembentukan Zona Hambat Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* terhadap Pigmen Fukosantin Ekstrak *Sargassum polycystum* C. Agardh,” *J. Mar. Res.*, vol. 14, no. 1, pp. 72–78, 2025, doi: 10.14710/jmr.v14i1.47898.

Conflict of Interest Statement:

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.