

ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF GRINGSINGAN LEAF ESSENTIAL OIL (*HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT.) AGAINST *SALMONELLA TYPHI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USING THE AGAR DIFFUSION METHOD**UJI DAYA ANTIMIKROBA MINYAK ATSIRI DAUN GRINGSINGAN (*HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT.) TERHADAP BAKTERI *SALMONELLA TYPHI* DAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DENGAN METODE DIFUSI AGAR****Yulius Baki Korassa¹, Ni Nyoman Yuliani², Maria Yangsy Lenggu³**Program Studi D III Farmasi, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kupang, Indonesia^{1,2,3}

*yuliusbaki8@gmail.com

*Corresponding Author

ABSTRACT

Gringsingan leaves (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) are a medicinal plant containing essential oil with potential antibacterial properties. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of gringsingan leaf essential oil against *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. The essential oil was obtained from fresh leaves by hydrodistillation, yielding 1.5% (v/w). Antibacterial activity was evaluated using the agar cylinder diffusion method at five essential oil concentrations (0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, and 2%), with 1% amoxicillin as the positive control and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) as the negative control. The inhibition zone diameters were measured after incubation and statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Gringsingan leaf essential oil exhibited antibacterial activity against both test bacteria. Against *S. typhi*, the mean inhibition zone diameters were 10.3, 10.8, 10.9, 12.9, and 13.7 mm, respectively, whereas against *S. aureus*, the mean inhibition zone diameters were 9.9, 10.3, 11.1, 11.4, and 11.9 mm at concentrations ranging from 0.1% to 2%. Increasing the concentration of the essential oil resulted in larger inhibition zones, indicating a dose-response relationship. Statistical analysis demonstrated that gringsingan leaf essential oil exhibited significant antibacterial activity against both test bacteria ($p < 0.05$). Gringsingan leaf essential oil showed antibacterial activity against *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*, with the strongest activity observed at the 2% concentration. The essential oil produced greater inhibitory activity against *S. typhi* than against *S. aureus*, indicating its potential as a natural source of antibacterial agents.

Keywords: *Hyptis suaveolens*; essential oil; antibacterial activity; *Salmonella typhi*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRAK

Daun gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) merupakan tanaman obat yang mengandung minyak atsiri dengan potensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri daun gringsingan terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Minyak atsiri diperoleh melalui metode hidrodestilasi dari daun segar dengan rendemen sebesar 1,5% (v/b). Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode difusi silinder pada lima konsentrasi minyak atsiri (0,1%; 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2%), dengan amoksisilin 1% sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Diameter zona hambat diukur setelah inkubasi dan dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA. Minyak atsiri daun gringsingan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji. Terhadap *S. typhi*, rata-rata diameter zona hambat berturut-turut sebesar 10,3; 10,8; 10,9; 12,9; dan 13,7 mm, sedangkan terhadap *S. aureus* sebesar 9,9; 10,3; 11,1; 11,4; dan 11,9 mm pada konsentrasi 0,1% hingga 2%. Peningkatan konsentrasi minyak atsiri diikuti dengan peningkatan diameter zona hambat, menunjukkan hubungan dosis-respons. Analisis statistik menunjukkan bahwa minyak atsiri daun gringsingan memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap kedua bakteri uji ($p < 0,05$). Minyak atsiri daun gringsingan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*, dengan aktivitas terbaik pada konsentrasi 2%. Minyak atsiri menunjukkan daya hambat yang lebih besar terhadap *S. typhi* dibandingkan *S. aureus*, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai sumber antibakteri alami.

Kata Kunci: *Hyptis suaveolens*, minyak atsiri, antibakteri, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

1. PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih menjadi salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia, terutama di negara berkembang. Meningkatnya kejadian resistensi antimikroba (antimicrobial resistance/AMR) menyebabkan efektivitas antibiotik konvensional terus menurun sehingga mendorong pencarian sumber antibakteri baru yang lebih aman, efektif, dan berasal dari bahan alam. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menempatkan resistensi antibiotik sebagai salah satu ancaman kesehatan global yang memerlukan pengembangan senyawa antimikroba baru, termasuk yang berasal dari tumbuhan obat (WHO, 2023).

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tumbuhan, dimana sekitar 9.600 spesies diketahui berpotensi sebagai tanaman obat. Berbagai tanaman tersebut telah dimanfaatkan secara empiris oleh masyarakat sebagai obat tradisional untuk mengatasi penyakit infeksi, peradangan, gangguan pencernaan, maupun penyakit degeneratif. Pemanfaatan tanaman obat semakin berkembang seiring meningkatnya minat masyarakat terhadap produk herbal yang dinilai memiliki efek samping lebih rendah dibandingkan obat sintesis apabila digunakan secara tepat. Oleh karena itu, pembuktian ilmiah terhadap aktivitas biologis tanaman obat melalui penelitian fitokimia dan farmakologi menjadi sangat penting untuk mendukung pengembangan fitofarmaka berbasis bahan alam (Kementerian Kesehatan RI, 2023; WHO, 2023).

Salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber antibakteri adalah gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.), anggota famili Lamiaceae (dahulu Labiatae). Tanaman ini tumbuh melimpah di daerah tropis dan secara tradisional dimanfaatkan sebagai antiseptik luka, obat penyakit kulit, penurun demam, anti inflamasi, serta untuk mengatasi berbagai gangguan infeksi. Selain itu, masyarakat di beberapa wilayah Indonesia juga memanfaatkan daun gringsingan sebagai obat luar maupun obat tradisional untuk mempercepat penyembuhan luka. Berbagai pemanfaatan empiris tersebut menunjukkan bahwa *H. suaveolens* memiliki potensi farmakologis yang perlu dibuktikan secara ilmiah melalui penelitian eksperimental.

Berbagai penelitian fitokimia menunjukkan bahwa daun *H. suaveolens* mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, fenolik, terpenoid, serta minyak atsiri yang kaya akan senyawa monoterpen dan seskuiterpen, seperti sabinene, 1,8-cineole, β -caryophyllene, α -terpinolene, limonene, dan germacrene-D. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki mekanisme antibakteri melalui kerusakan membran sel bakteri, gangguan permeabilitas membran, denaturasi protein, hingga penghambatan sintesis asam nukleat sehingga mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri patogen (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2023; Elshamy et al., 2022).

Aktivitas antibakteri ekstrak maupun minyak atsiri daun gringsingan telah banyak dilaporkan terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *H. suaveolens* mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, serta beberapa spesies jamur patogen. Aktivitas tersebut dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi, komposisi minyak atsiri, konsentrasi ekstrak, serta asal geografis tanaman yang dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekundernya (Ramesh et al., 2022; Elshamy et al., 2022).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif oportunistik yang menjadi penyebab utama berbagai infeksi pada manusia, mulai dari infeksi kulit dan jaringan lunak, pneumonia, osteomielitis, bakteremia, hingga sepsis. Selain tingginya angka kejadian infeksi, munculnya strain Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) menyebabkan terapi infeksi semakin sulit dilakukan sehingga diperlukan alternatif agen antibakteri baru yang efektif terhadap bakteri tersebut (CDC, 2024).

Selain itu, *Salmonella enterica* serovar Typhi merupakan bakteri Gram negatif penyebab demam tifoid yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di berbagai negara berkembang, termasuk Indonesia. Penyakit ini ditularkan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi dan masih memiliki angka kejadian yang tinggi terutama pada daerah dengan sanitasi yang kurang baik. Meskipun antibiotik masih menjadi terapi utama, peningkatan resistensi *Salmonella* terhadap berbagai antibiotik lini pertama telah dilaporkan di berbagai negara sehingga diperlukan eksplorasi bahan alam yang berpotensi sebagai antibakteri alternatif (WHO, 2023; GBD Typhoid Collaborators, 2024).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri *H. suaveolens*, sebagian besar masih berfokus pada ekstrak kasar, sedangkan penelitian mengenai aktivitas minyak atsiri daun gringsingan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella* Typhi masih relatif terbatas. Selain itu, variasi komposisi minyak atsiri akibat faktor lingkungan, lokasi tumbuh, dan metode isolasi dapat mempengaruhi efektivitas antibakterinya sehingga penelitian lanjutan masih diperlukan.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri daun gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella* Typhi menggunakan metode difusi agar. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai potensi minyak atsiri daun gringsingan sebagai sumber antibakteri alami yang berpotensi dikembangkan menjadi bahan baku sediaan fitofarmaka dalam mendukung penanggulangan penyakit infeksi dan mengatasi permasalahan resistensi antibiotik.

2. METODE

2.1. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain daun gringsingan segar, air suling steril, kertas saring, tetrasiklin hidroklorida (antibiotik pembanding), bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*, silinder, media BHIB (Brain Heart Infusion Broth), Plate Count Agar (PCA), Pepton Dilution Fluid (PDF), media NA (Nutrient Agar), media BPA, etanol 96%, Amoxicillin (500 mg), Dimetil sulfoxida 10%, dan Aquadest. Mikroba uji: bakteri

2. Alat

Alat yang digunakan adalah cawan petri (10 cm dan 20 cm), Erlenmeyer 250 mL (pyrex iwake), rak tabung reaksi, gelas ukur (pyrex iwake), beaker glass (pyrex iwake), pipet volume (pyrex iwake), pipet ukur, filer, alat timbang (shimadzu), lampu Bunsen, ose, incubator (Javan), autoclave (Memert), laminary air flow (Esco), batang pengaduk, pencadangan, jangka sorong, coloni counter, labu ukur (5 mL), sendok tanduk, rotavapor, water bath, cawan porselin.

2.2. Prosedur kerja

1. Penyiapan Bahan

Daun gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) diperoleh dari beberapa pohon yang dipilih secara acak. Daun yang digunakan adalah daun segar, tidak terserang hama maupun penyakit, serta tidak mengalami kerusakan mekanis. Bagian daun yang digunakan meliputi daun muda hingga daun tua yang dipisahkan dari batang dan ranting. Selanjutnya daun segera diproses untuk memperoleh minyak atsiri menggunakan metode destilasi uap guna meminimalkan kehilangan senyawa volatil. Minyak atsiri yang diperoleh ditampung dalam botol gelap dan dibuat menjadi lima seri konsentrasi yaitu 0,1%; 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2% (v/v) sebelum dilakukan pengujian aktivitas antibakteri (WHO, 2022; Azwanida, 2021).

2. Destilasi Minyak Atsiri

Daun gringsingan segar sebanyak ± 3 kg didestilasi secara bertahap sebanyak tiga kali, masing-masing menggunakan ± 1 kg daun segar. Destilasi dilakukan dengan metode destilasi

uap menggunakan alat yang dilengkapi kondensor. Proses pemanasan dilakukan hingga campuran uap air dan minyak atsiri terkondensasi menjadi destilat. Destilat yang diperoleh berupa campuran minyak atsiri dan air kemudian dipisahkan menggunakan corong pisah. Untuk meningkatkan pemisahan minyak yang masih teremulsi ditambahkan natrium klorida (NaCl) jenuh (salting-out). Fase air kemudian diekstraksi kembali menggunakan n-heksana pro analysis (p.a.), dikocok hingga homogen dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan n-heksana dipisahkan dan diuapkan menggunakan rotary vacuum evaporator hingga diperoleh minyak atsiri murni. Minyak yang diperoleh disimpan dalam botol kaca berwarna gelap pada suhu 4°C sampai digunakan untuk pengujian (Guenther, 1972; Baser & Buchbauer, 2020).

3. Identifikasi Minyak Atsiri

Identifikasi awal minyak atsiri dilakukan secara organoleptik dan menggunakan uji noda pada kertas saring. Sebanyak satu tetes minyak atsiri diteteskan pada kertas saring dan didiamkan beberapa menit. Minyak atsiri dinyatakan memenuhi karakteristik apabila menguap sempurna tanpa meninggalkan noda transparan permanen pada kertas saring. Selain itu diamati warna, aroma khas, dan kejernihan minyak sebagai identifikasi awal mutu minyak atsiri (Guenther, 1972; European Pharmacopoeia Commission, 2023).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Penyiapan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*

Biakan bakteri yang telah diremajakan pada media Brain Heart Infusion Broth (BHIB) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 1 mL kultur dipindahkan ke dalam 9 mL Peptone Dilution Fluid (PDF) sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran bertingkat dilakukan hingga 10^{-9} . Dari setiap pengenceran diambil 1 mL kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril secara duplo dan ditambahkan 10 mL Plate Count Agar (PCA). Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam. Pengenceran yang menghasilkan jumlah koloni sekitar 10^6 CFU/mL digunakan sebagai suspensi bakteri standar untuk pengujian antibakteri. Sterilitas media dikontrol dengan menginkubasi media tanpa inokulum pada kondisi yang sama (CLSI, 2024; ISO 11133:2014).

b. Uji Daya Antibakteri Minyak Atsiri Daun Gringsingan terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi silinder (cylinder diffusion assay). Sebanyak 20 mL PCA dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebagai base layer dan dibiarkan memadat. Selanjutnya dibuat seed layer dengan mencampurkan 0,1 mL suspensi bakteri standar ($\pm 10^6$ CFU/mL) ke dalam 10 mL PCA cair, kemudian dituangkan di atas base layer.

Setelah media memadat, tujuh silinder steril ditempatkan pada permukaan media, terdiri atas lima silinder berisi minyak atsiri dengan konsentrasi 0,1%; 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2%, satu silinder berisi kontrol positif (amoksisilin), dan satu silinder berisi kontrol negatif berupa DMSO 10%. Masing-masing silinder diisi sebanyak 0,1 mL larutan uji. Media kemudian didiamkan selama 30–60 menit agar terjadi proses difusi sebelum diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong digital dalam satuan milimeter (CLSI, 2024; Balouiri et al., 2016).

c. Penentuan Zona Hambat

Aktivitas antibakteri dinilai berdasarkan terbentuknya zona bening di sekitar silinder. Diameter zona hambat diukur pada dua arah yang saling tegak lurus menggunakan jangka sorong digital, kemudian dihitung nilai rata-ratanya. Semakin besar diameter zona hambat menunjukkan semakin tinggi aktivitas antibakteri minyak atsiri terhadap bakteri uji (Balouiri et al., 2016; CLSI, 2024).

4. Analisis Data

Data penelitian berupa diameter zona hambat (mm) minyak atsiri daun gringsingan terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi dan ulangan. Seluruh data disajikan sebagai nilai rerata $\pm$ simpangan baku (mean $\pm$ SD). Uji normalitas dilakukan menggunakan uji Shapiro–Wilk dan homogenitas varians menggunakan uji Levene. Data yang memenuhi asumsi dianalisis menggunakan One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA) pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan menggunakan uji Tamhane's T2 sebagai uji lanjut untuk data dengan varians yang tidak homogen. Seluruh analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics versi terbaru (Field, 2024; IBM Corp., 2023).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil perhitungan rendemen minyak atsiri daun gringsingan

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rendemen minyak atsiri daun gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) sebesar 1,5% (v/b). Rendemen tersebut diperoleh dari hidrodestilasi 100 g daun segar yang telah dibersihkan, menghasilkan minyak atsiri sebanyak 1,5 mL. Rendemen minyak atsiri merupakan salah satu parameter yang menunjukkan potensi tanaman sebagai sumber minyak atsiri. Besarnya rendemen dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti jenis tanaman, umur, kondisi lingkungan, kadar air bahan, serta metode dan lama destilasi (Baser & Buchbauer, 2023). Rendemen sebesar 1,5% pada penelitian ini masih berada dalam kisaran rendemen *Hyptis suaveolens* yang telah dilaporkan sebelumnya, yaitu sekitar 0,5–2,5% (Sharma et al., 2021).

3.2. Hasil pembuatan seri konsentrasi

Preparasi larutan uji dilakukan dengan membuat larutan induk 10% dari masing larutan uji yaitu minyak atsiri konsentrasi 0,1%; 0,5%; 1 %; 1,5% dan 2 %, kontrol positif (Amoxicilin 1%) dan kontrol negatif (DMSO 10%) sebanyak 10 mL. Larutan induk diencerkan menjadi 5 seri konsentrasi yang digunakan untuk pengujian yang hasilnya dilihat pada tabel 1 dan data perhitungan seri konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 1. Hasil preparasi larutan uji

Konsentrasi Larutan Uji (%)	Volume Pengambilan Larutan Stok (mL)	Volume Setiap Konsentrasi (mL)
0.1	0,1	10
0.5	0,5	10
1	1	10
1.5	1,5	10
2	2	10
Kontrol +	1	10
Kontrol -	1	10

3.3. Hasil Identifikasi Fitokimia

Dalam penelitian ini, sebelum dilakukan penentuan uji daya hambat antibakteri, terlebih dahulu dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan minyak atsiri yang terkandung dalam daun gringsingan.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada tabel 2 dapat diketahui bahwa daun gringsingan mengandung minyak atsiri, Hal ini terlihat dari hasil identifikasi yang menunjukkan tidak adanya noda transparan pada kertas sarin, dengan uji kekeruhan menunjukkan tidak adanya kekeruhan pada permukaan air, hal ini dikarenakan minyak atsiri tidak bercampur dengan air, selain itu dengan menggunakan pelarut terlihat positif dengan memberikan reaksi

berwarna hijau tua. Hasil uji yang dilakukan sesuai dengan pustaka yang dirujuk. Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 2. Hasil identifikasi fitokimia

No	Identifikasi	Pustaka (Anonim, 1980)	Hasil reaksi	Kesimpulan
1.	Kertas saring	Tanpa meninggalkan noda transparan	Tanpa Meninggalkan noda transparan	+
2	Kekeruhan	Tidak keruh pada permukaan air	Tidak keruh pada permukaan air	+
3	NaCl Jenuh	Volume lapisan tidak bertambah	Volume lapisan Tidak bertambah	+
4	Larutan FeCl ₃	Hijau Tua	Hijau Tua	+

3.4. Penentuan Uji Daya Hambat Antibakteri *Salmonella typhi*

Penentuan uji daya hambat antibakteri, dilakukan dalam 3 tahap yaitu pembuatan kultur, penetapan bakteri dan uji daya antibakteri minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Media yang digunakan adalah media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), *Plate Count Agar* (PCA), *Pepton Dilution Fluit* (PDF), dan media BPA. Media BHIB berfungsi sebagai Pembuatan kultur bakteri dimaksudkan untuk mengetahui bakteri yang dibiakan tersebut adalah bakteri *Salmonella typhi* yang sebelumnya telah diremajakan.

Penetapan bakteri *Salmonella typhi* dibuat beberapa pengenceran yaitu pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-9} yang dapat dilihat pada lampiran 11, dan dari masing-masing pengenceran tersebut dibuat duplo lalu dimasukkan kedalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam agar bakteri *Salmonella typhi* dapat tumbuh dengan baik. Setelah diinkubasi selanjutnya dilakukan perhitungan terhadap koloni bakteri yang tumbuh, pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni ± 100 sel/ml adalah pengenceran 10^{-5} . Sedangkan yang digunakan sebagai standar untuk melakukan pengujian antibakteri adalah pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh $\pm 1.000.000$ sel/mL. berdasarkan hal tersebut, maka dari pengenceran 10^{-5} kemudian dikonversikan hingga mendapat koloni 1.000.000 sel/mL. Pengenceran yang digunakan sebagai standar untuk melakukan pengujian adalah pengenceran 10^{-2} . Pada pengenceran 10^{-2} tidak terbaca seperti yang terlampir pada tabel 3, namun jika dikonversikan menunjukkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh adalah 1.000.000 sel/ml yang menjadi standar pengujian antibakteri.

Tabel 3. Hasil pengenceran suspensi bakteri *Salmonella typhi*

Pengenceran	Perlakuan		Rata – rata
	1	2	
10^{-1}	TT	TT	TT
10^{-2}	TT	TT	TT
10^{-3}	TT	TT	TT
10^{-4}	TT	TT	TT
10^{-5}	220 koloni	202 koloni	211 koloni
10^{-6}	146 koloni	130 koloni	138 koloni
10^{-7}	85 koloni	79 koloni	82 koloni
10^{-8}	74 koloni	70 koloni	72 koloni
10^{-9}	48 koloni	54 koloni	51 koloni

Keterangan : TT : Tidak Terbaca

Pada pengujian daya antibakteri minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Salmonella typhi* digunakan 5 seri konsentrasi yaitu 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%, sebagai pengontrol digunakan sediaan uji kontrol negatif DMSO 10% dan kontrol positif Amoxicillin 1%. Pada tahap ini, setelah dilakukan uji daya hambat minyak atsiri daun gringsingan, terlihat adanya zona bening yang terbentuk di sekitar silinder yang menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Zona hambatan diukur dan dihitung menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada tabel 3.

Pada kontrol negatif tidak terlihat adanya zona hambatan. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif DMSO 10% tidak memberikan pengaruh terhadap daya antibakteri sediaan uji minyak atsiri daun gringsingan. Penggunaan DMSO 10% dikarenakan dalam proses pembuatan sediaan uji digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan seri konsentrasi minyak atsiri daun gringsingan, seperti yang terlihat pada tabel 3.

Kontrol positif (Amoxicillin 1%) menunjukkan adanya zona hambatan yang lebih besar dibandingkan kelima seri konsentrasi minyak atsiri, karena Amoxicillin merupakan antibakteri yang sangat efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Penggunaan Amoxicillin sebagai kontrol positif dalam pengujian ini dikarenakan Amoxicillin mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan minyak atsiri daun gringsinagn yaitu dengan menghambat pembentukan dinding sel bakteri dengan menghambat pembentukan peptidoglikan pada dinding sel bakteri, akibatnya dinding sel bakteri menjadi lisis atau hancur yang mengakibatkan bakteri tersebut mati.

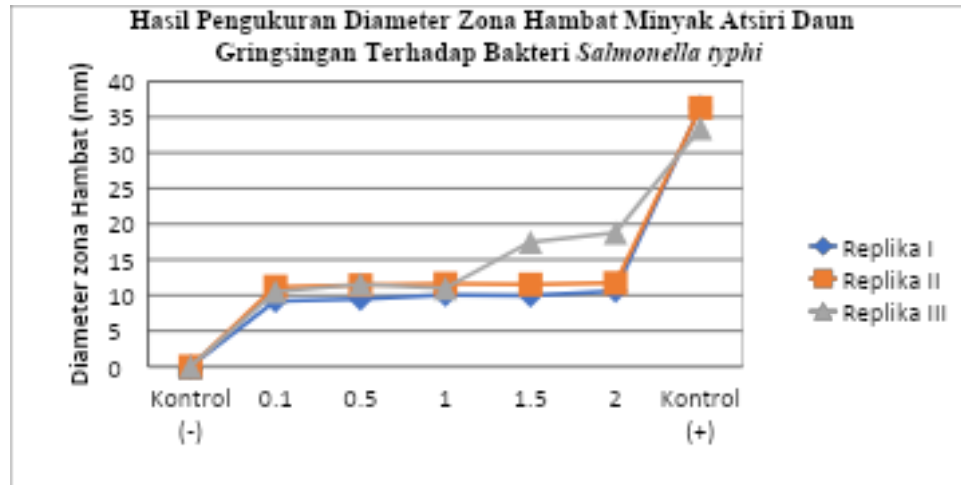
Tabel 4.
Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Perlakuan (konsentersasi)	Replikasi (mm)			Jumlah (mm)	Rata-rata (mm)
	I	II	III		
0.1	9,2	11,2	10,5	30,9	10,3
0.5	9,5	11,4	11,5	32,4	10,8
1	10,0	11,6	11,0	32,6	10,9
1.5	9,9	11,5	17,5	38,9	12,9
2	10,6	11,7	18,8	41,1	13,7
Kontrol +	36,4	36,3	33,4	106,1	35,3
Kontrol -	0	0	0	0	0

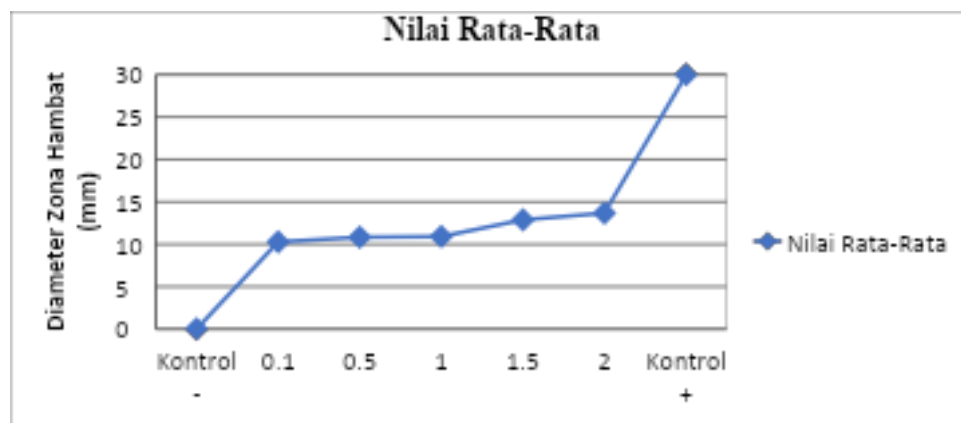
Pada tabel 4 menunjukkan adanya zona hambatan yang terbentuk dari berbagai seri konsentrasi. Zona hambatan rata-rata pada konsentrasi 0,1% membentuk zona hambatan sebesar 10,3 mm, 0,5% sebesar 10,8 mm, 1% sebesar 10,9 mm, 1,5% sebesar 12,9 mm dan rata-rata konsentrasi 2% membentuk zona hambatan sebesar 13,7 mm. Pada tabel 4 dapat dilihat bahwa zona hambatan yang paling kecil adalah konsentrasi 0,1% dengan daerah zona hambatan sebesar 10,3 mm, sedangkan zona hambatan yang paling besar adalah konsentrasi 2 % dengan membentuk daerah zona hambatan sebesar 13,7 mm. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin besar zona

hambatan yang terbentuk dan dapat dilihat pada gambar grafik zona hambat bakteri *Salmonella typhi*.

Dari grafik pada gambar 2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi terkecil 0,1 % minyak atsiri daun gringsingan masih dapat memberikan daya antibakteri terhadap *Salmonella typhi*.



Gambar 2 . Grafik Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Salmonella typhi*



Gambar 3 . Grafik Rata-rata Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Data hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan kemudian dianalisis menggunakan uji anova. Dalam uji anova, data yang digunakan harus berdistribusi normal yaitu nilai $p > 0,05$. Data yang diperoleh dari hasil test normality menunjukkan bahwa hasil pengujian terdistribusi normal, yaitu nilai p ($0,056 < 0,05$) seperti yang terlihat pada lampiran 15.

Data yang diperoleh terdistribusi secara normal, selanjutnya dilakukan uji anova menggunakan uji tamhane T2 untuk melihat homogenitas data dan perbedaan bermakna. Setelah dilakukan uji tersebut diperoleh data yang menunjukkan nilai p $0,002 < 0,05$, sehingga dapat dikatakan bahwa minyak atsiri daun gringsingan memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Namun dari hasil uji tamhane T2 diketahui bahwa nilai signifikan antara kelompok kontrol positif, konsentrasi 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5% dan konsentrasi 2% lebih

besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna dari setiap kelompok tersebut.

3.5. Penentuan Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pada penentuan uji daya hambat antibakteri, dilakukan dalam 3 tahap yaitu pembuatan kultur, penetapan bakteri dan uji daya antibakteri minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Media yang digunakan adalah media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), *Plate Count Agar* (PCA), *Pepton Dilution Fluit* (PDF), dan media BPA. Media BHIB berfungsi sebagai Pembuatan kultur bakteri dimaksudkan untuk mengetahui bakteri yang dibiakan tersebut adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang sebelumnya telah diremajakan.

Penetapan bakteri *Staphylococcus aureus* dibuat beberapa pengenceran yaitu pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-9} yang dapat dilihat pada lampiran 13, dan dari masing-masing pengenceran tersebut dibuat duplo lalu dimasukkan kedalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam agar bakteri *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh dengan baik. Setelah diinkubasi dan dilakukan perhitungan terhadap koloni bakteri yang tumbuh, pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni ± 100 sel/ml adalah pengenceran 10^{-6} . Sedangkan yang digunakan sebagai standar untuk melakukan pengujian antibakteri adalah pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh $\pm 1.000.000$ sel/mL. berdasarkan hal tersebut, maka dari pengenceran 10^{-6} kemudian dikonversikan hingga mendapat koloni 1.000.000 sel/mL. Pengenceran yang digunakan sebagai standar untuk melakukan pengujian adalah pengenceran 10^{-2} . Pada pengenceran 10^{-2} tidak terbaca seperti yang terlampir pada tabel 5, namun jika dikonversikan menunjukkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh adalah 1.000.000 sel/ml yang menjadi standar pengujian antibakteri.

Tabel 5. Hasil pengenceran suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengenceran	Perlakuan		Rata – rata
	1	2	
10^{-1}	TT	TT	TT
10^{-2}	TT	TT	TT
10^{-3}	TT	TT	TT
10^{-4}	TT	TT	TT
10^{-5}	TT	TT	TT
10^{-6}	220 koloni	230 koloni	238 koloni
10^{-7}	85 koloni	79 koloni	82 koloni
10^{-8}	74 koloni	70 koloni	72 koloni
10^{-9}	48 koloni	54 koloni	51 koloni

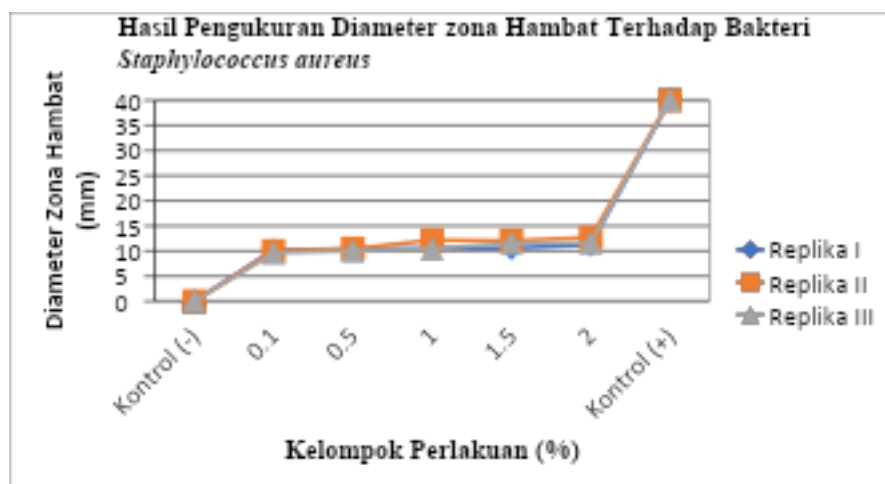
Keterangan : TT : Tidak Terbaca

Tabel 6. Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

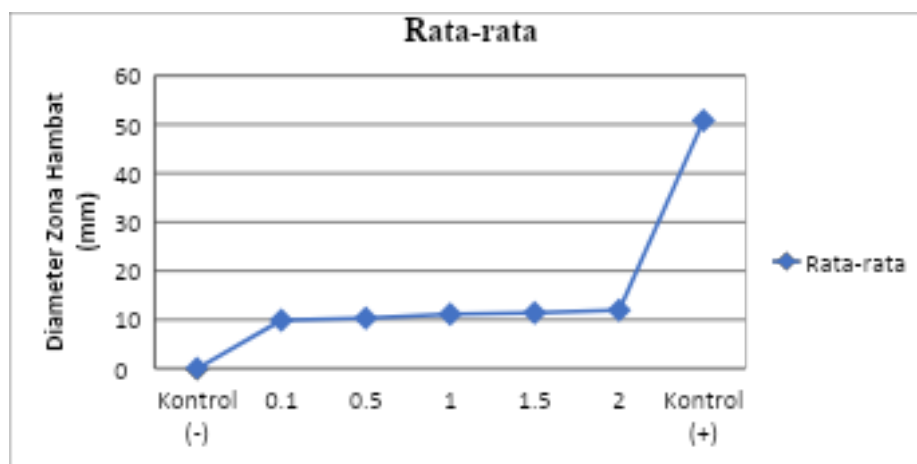
Perlakuan (konsentrasi)	Replikasi (mm)			Jumlah (mm)	Rata-rata (mm)
	I	II	III		
0.1	10.2	10	9.6	29.8	9.9
0.5	10.5	10.5	10	31	10.3
1	10.6	12.2	10.5	33.3	11.1

Perlakuan (konsentrasi %)	Replikasi (mm)			Jumlah (mm)	Rata-rata (mm)
1.5	10.6	12.1	11.6	34.3	11.4
2	11.3	12.7	11.6	35.6	11.9
Kontrol +	49.9	50.4	52.2	152.5	50.8
Kontrol -	0	0	0	0	0

Pada tabel 6 menunjukkan adanya zona hambatan yang terbentuk dari berbagai seri konsentrasi. Zona hambatan rata-rata pada konsentrasi 0,1% membentuk zona hambatan sebesar 9,9 mm, 0,5% sebesar 10,3 mm, 1% sebesar 11,1 mm, 1,5% sebesar 11,4 mm dan rata-rata konsentrasi 2% membentuk zona hambatan sebesar 11,9 mm. Pada tabel 6 dapat dilihat bahwa zona hambatan yang paling kecil adalah konsentrasi 0,1% dengan daerah zona hambatan sebesar 9,9 mm, sedangkan zona hambatan yang paling besar adalah konsentrasi 2% dengan membentuk daerah zona hambatan sebesar 11,9 mm. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin besar zona hambatan yang terbentuk, seperti yang terlihat pada gambar 4.



Gambar 4 . Grafik Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 5 . Grafik Rata-rata Hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Data hasil pengukuran diameter zona hambat minyak atsiri daun gringsingan kemudian dianalisis menggunakan uji anova. Dalam uji anova, data yang digunakan harus berdistribusi normal yaitu nilai $p > 0,05$. Namun data yang diperoleh dari hasil test normality menunjukkan data tidak berdistribusi normal, yaitu nilai p ($0,016 < 0,05$) seperti yang terlihat pada lampiran 16.

Data yang diperoleh tidak terdistribusi secara normal, Untuk itu dilakukan transformasi data untuk memperoleh data yang berdistribusi normal. Kemudian didapatkan data yang dinamakan transformasi zona hambat. Data tersebut dilakukan tes normality sehingga memperoleh nilai p $0,044 > 0,05$ (tidak berdistribusi normal). Sehingga dilakukan uji anova menggunakan uji tamhane T2 untuk melihat homogenitas data dan perbedaan bermakna. Setelah dilakukan uji tersebut diperoleh data yang menunjukkan nilai p $0,000 < 0,05$, sehingga dapat dikatakan bahwa minyak atsiri daun gringsingan memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, Namun dari hasil uji Homogenitas diketahui bahwa nilai signifikan antara kelompok kontrol positif, konsentrasi 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5% dan konsentrasi 2% lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna dari setiap kelompok tersebut.

Penelitian ini menggunakan minyak atsiri daun gringsingan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.), salah satu tanaman obat yang telah banyak dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Daun gringsingan dilaporkan memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiseptik, antipiretik, analgesik, anti jamur, anti inflamasi, serta digunakan secara empiris untuk mengatasi kutu air dan sakit kepala. Aktivitas biologis tersebut berkaitan dengan kandungan metabolit sekundernya, terutama minyak atsiri yang mengandung senyawa eugenol, 1,8-sineol, β -kariofilena, sabinena, limonena, flavonoid, tanin, dan saponin. Berbagai penelitian fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak maupun minyak atsiri *H. suaveolens* memiliki aktivitas antimikroba, antioksidan, larvasida, dan insektisida yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber bahan baku obat berbasis alam (Medeiros et al., 2021; Moghaddam & Mehdizadeh, 2022; Salehi et al., 2023).

Metode isolasi minyak atsiri pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode destilasi sederhana (hidrodestilasi), yaitu teknik pemisahan yang memanfaatkan perbedaan titik didih dan sifat volatil komponen penyusun campuran. Pada proses ini, bahan tanaman dipanaskan bersama air sehingga komponen minyak atsiri yang mudah menguap terbawa uap air, kemudian dikondensasikan dan dipisahkan berdasarkan perbedaan massa jenis antara minyak dan air. Hidrodestilasi merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam isolasi minyak atsiri karena relatif sederhana, ekonomis, serta mampu mempertahankan sebagian besar komponen volatil tanaman obat (Azmir et al., 2021; Chemat et al., 2022).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Kedua bakteri tersebut dipilih karena merupakan patogen penyebab berbagai penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat. *Salmonella typhi* merupakan penyebab utama demam tifoid, sedangkan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang sering menyebabkan infeksi kulit, jaringan lunak, hingga infeksi sistemik serta menunjukkan peningkatan resistensi terhadap berbagai antibiotik. Minyak atsiri diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri melalui mekanisme kerusakan membran sel, peningkatan permeabilitas membran, gangguan metabolisme sel, serta denaturasi protein intraseluler akibat aktivitas senyawa fenolik dan terpenoid yang dikandungnya (World Health Organization, 2024; Nazzaro et al., 2021; Bassolè & Juliani, 2023).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi minyak atsiri daun gringsingan diikuti dengan meningkatnya daya hambat terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Fenomena tersebut menunjukkan adanya hubungan dosis-respons, dimana semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri maka semakin banyak senyawa aktif yang berdifusi ke dalam media sehingga aktivitas antibakteri semakin meningkat. Temuan

ini sejalan dengan berbagai penelitian yang melaporkan bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri *Hyptis suaveolens* dipengaruhi oleh kandungan senyawa fenolik dan monoterpen yang bekerja secara sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Moghaddam & Mehdizadeh, 2022; Salehi et al., 2023).

4. KESIMPULAN

Minyak atsiri daun gringsingan terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Peningkatan konsentrasi minyak atsiri meningkatkan diameter zona hambat, dengan aktivitas terbaik pada konsentrasi 2%, yaitu 13,7 mm terhadap *S. typhi* dan 11,9 mm terhadap *S. aureus*. Secara keseluruhan, minyak atsiri daun gringsingan menunjukkan daya hambat yang lebih kuat terhadap *Salmonella typhi* dibandingkan *Staphylococcus aureus*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., et al. (2021). Techniques for extraction of bioactive compounds from medicinal plants: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. (2023). *Hyptis suaveolens*: Phytochemistry, pharmacology and therapeutic potential—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 317, 116903.
- Azwanida, N. N. (2021). A review on the extraction methods used in medicinal plants: Principles, strengths, and limitations. *Medicinal Plants*, 13(1), 1–10.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2023). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 28(9), 3815.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2023). *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications* (3rd ed.). CRC Press.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *Staphylococcus aureus* (including MRSA).
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2022). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4458.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2024). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (35th ed., CLSI Supplement M100).
- Elshamy, A. I., Abd-ElGawad, A. M., El Gendy, A. E. N. G., et al. (2022). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Hyptis suaveolens*: An updated review. *Plants*, 11(21), 2896.
- European Pharmacopoeia Commission. (2023). *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Council of Europe.
- Field, A. (2024). *Discovering statistics using IBM SPSS Statistics* (6th ed.). Sage.
- GBD Typhoid and Paratyphoid Collaborators. (2024). Global burden of typhoid and paratyphoid fever: Updated systematic analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(3), e102–e114.
- Guenther, E. (1972). *The essential oils* (Vol. 1). Krieger Publishing Company.
- IBM Corp. (2023). *IBM SPSS Statistics for Windows* (Version 30.0).
- International Organization for Standardization. (2014). *ISO 11133: Microbiology of food, animal feed and water—Preparation, production, storage and performance testing of culture media*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2023). *Farmakope Herbal Indonesia* (Edisi III).
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2025). *Profil Kesehatan Indonesia 2024*.
- Medeiros, F. C. M., Silva, J. K. R., Maia, J. G. S., & Andrade, E. H. A. (2021). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Hyptis suaveolens*: A review. *Plants*, 10(11), 2402.

- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2022). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 1, 100005.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2021). Essential oils and antimicrobial activity: A review. *Pharmaceuticals*, 14(7), 678.
- Ramesh, K., Kumar, S., & Singh, V. (2022). Antibacterial and antioxidant potential of *Hyptis suaveolens* extracts: A systematic review. *Molecules*, 27(19), 6384.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Quispe, C., et al. (2023). Medicinal properties, phytochemistry and pharmacological activities of *Hyptis suaveolens*. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1184523.
- Sharma, P., Singh, R., Kumar, S., & Verma, A. K. (2021). Chemical composition and biological activities of *Hyptis suaveolens* essential oil: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 33(6), 503–516.
- World Health Organization. (2022). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.
- World Health Organization. (2023a). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2023.
- World Health Organization. (2023b). Typhoid.
- World Health Organization. (2024a). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2024.
- World Health Organization. (2024b). WHO bacterial priority pathogens list 2024.