

**EFEK EKSTRAK ETANOL SELEDRI (*Apium graveolens*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PERTUMBUHAN BAKTERI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus***

SECARA IN VITRO

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Jones Putra Wiranata

NIM. 165070107111020

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK ETANOL SELEDRI (*Apium graveolens*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PERTUMBUHAN BAKTERI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO*

Oleh :

Jones Putra Wiranata

NIM. 165070107111020

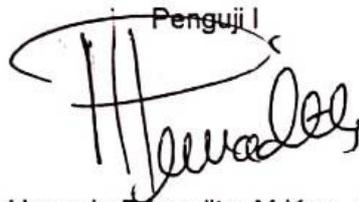
Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



dr. Hanggia Primadita, M.Kes., Sp.An.

NIP. 2016098209192001

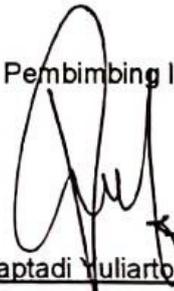
Pembimbing I,



dr. Dewi Erikawati, M.Si

NIP. 198510172009122007

Pembimbing II,



dr. Saptadi Yulianto, M.Kes, Sp. A (K).

NIP/NIK. 198009202012121003

Mengetahui,

Kepala Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahyu Astuti, M.Kes., Sp. P (K)

NIP. 196310221996012001

DAFTAR ISI

Halaman

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Singkatan	xvi
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB 2 Tinjauan Pustaka	5
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Taksonomi	5
2.1.2 Karakteristik Bakteri	5



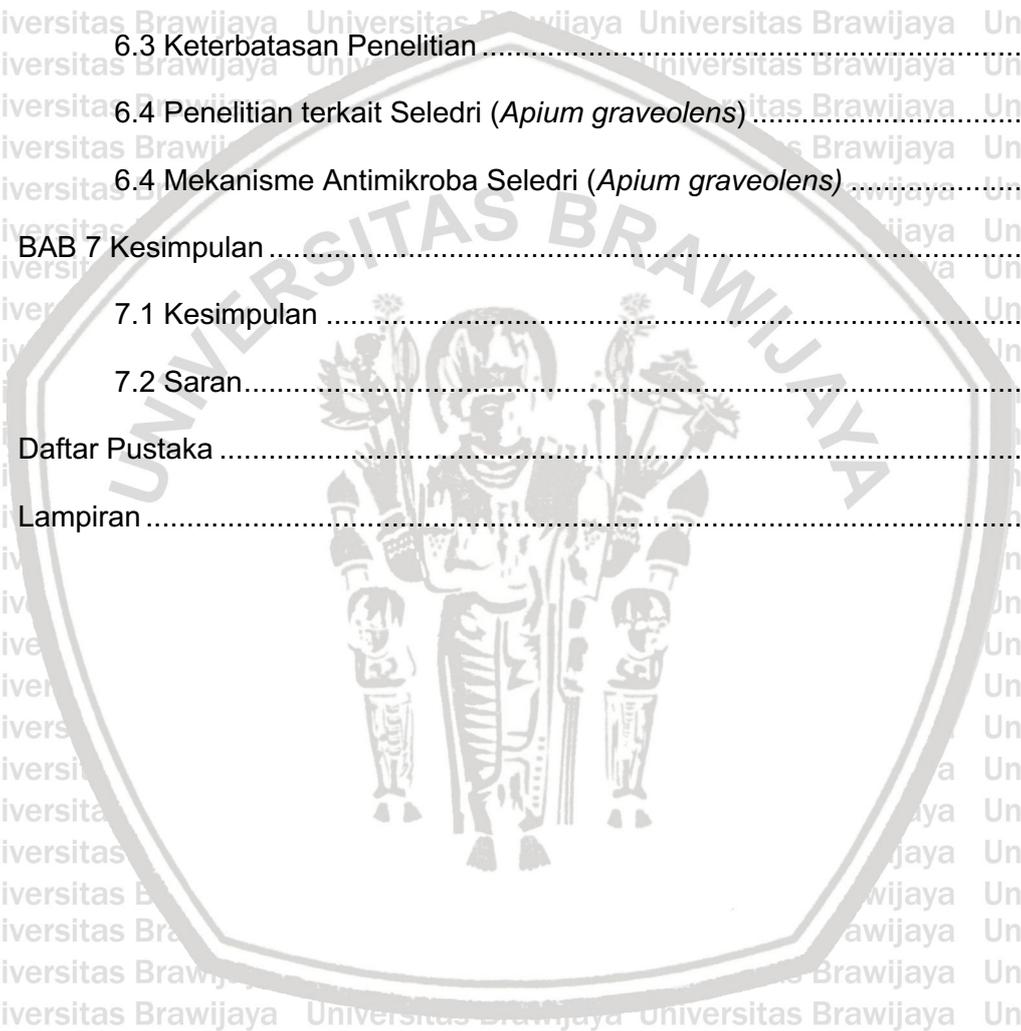
2.1.2.1 Ciri Khas Organisme.....	5
2.1.2.2 Sifat Kultur.....	6
2.1.2.3 Sifat Pertumbuhan.....	6
2.1.2.4 Struktur antigen.....	7
2.1.3 Identifikasi Bakteri.....	8
2.1.3.1 Pewarnaan Gram.....	8
2.1.3.2 Tes Katalase.....	9
2.1.3.2 Tes Koagulase.....	10
2.1.3.3 Uji <i>Cefoxitin</i>	12
2.1.4 Faktor Virulensi.....	13
2.1.4.1 Faktor Permukaan Sel.....	13
2.1.4.2 Faktor yang Disekresi.....	14
2.1.5 Pafisiologi.....	18
2.1.6 Manifestasi Klinis.....	19
2.2 MRSA.....	21
2.2.1 Mekanisme Resistensi MRSA.....	21
2.2.1 Penanggulangan MRSA.....	22
2.3 <i>Apium graveolens</i>	24
2.3.1 Taksonomi Seledri.....	24
2.3.2 Morfologi Seledri.....	24
2.3.3 Kandungan Kimia Seledri.....	25
2.7.4 Khasiat Seledri.....	29
BAB 3 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian.....	31
3.1 Kerangka Konsep.....	31
3.2 Hipotesis Penelitian.....	32
BAB 4 Metode Penelitian.....	33
4.1 Rancangan Penelitian.....	33



4.2 Sampel.....	33
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33
4.4 Variabel Penelitian.....	33
4.4.1 Variabel Bebas.....	34
4.4.2 Variabel Tergantung.....	34
4.5 Definisi Operasional.....	34
4.6 Instrumen Penelitian.....	35
4.6.1 Alat.....	35
4.6.2 Bahan.....	36
4.6.2.1 Untuk Identifikasi Bakteri MRSA.....	36
4.6.2.2 Untuk Pembuatan Ekstrak.....	36
4.6.2.3 Untuk Uji Kepekaan Ekstrak.....	36
4.7 Prosedur Penelitian.....	37
4.7.1 Persiapan Bakteri dan Identifikasi MRSA.....	37
4.7.2 Persiapan Suspensi Bakteri.....	40
4.7.2 Uji Aktivitas Antimikroba.....	40
4.8 Kerangka Operasional Penelitian.....	43
4.9 Analisis Data.....	44
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data.....	45
5.1 Hasil Identifikasi Bakteri Uji.....	45
5.2 Gambaran Ekstrak Seledri.....	47
5.3 Hasil Uji Hambat Pertumbuhan Bakteri.....	48
5.3.1 Hasil Uji Pendahuluan.....	48
5.3.2 Hasil Penelitian Inti.....	48
5.3.2.1 Analisis KHM.....	49
5.3.2.2 Analisis KBM.....	50
5.4 Analisis Data.....	53



5.4.1 Uji One-Way ANOVA.....	53
5.4.2 Uji Post Hoc Tukey.....	53
5.4.3 Uji Korelasi dan Regresi.....	54
BAB 6 Pembahasan.....	56
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian.....	56
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.....	58
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	58
6.4 Penelitian terkait Seledri (<i>Apium graveolens</i>).....	59
6.4 Mekanisme Antimikroba Seledri (<i>Apium graveolens</i>).....	61
BAB 7 Kesimpulan.....	62
7.1 Kesimpulan.....	62
7.2 Saran.....	62
Daftar Pustaka.....	64
Lampiran.....	73



ABSTRAK

Wiranata, Jones Putra. 2019. *Efek Ekstrak Etanol Seledri (Apium graveolens) Sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri MRSA Secara In Vitro*.

Tugas akhir. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si (2) dr. Saptadi Yulianto, M.Kes, Sp.A (K).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi. Sifat adaptif *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik menyebabkan lahirnya strain baru yang dikenal sebagai *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Berdasarkan alasan tersebut, perlu dikembangkan obat alternatif yang dapat melawan infeksi bakteri MRSA. Salah satu alternatifnya yaitu dengan menggunakan ekstrak tanaman sudah banyak diteliti khasiatnya, yaitu seledri (*Apium graveolens*). Seledri mengandung berbagai senyawa kimia yang berpotensi sebagai antimikroba, seperti, flavonoid, tannin, limonen, dan asam klorogenat. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek antimikroba seledri (*Apium graveolens*) terhadap bakteri MRSA dengan metode dilusi tabung. Konsentrasi ekstrak seledri (*Apium graveolens*) yang digunakan dalam penelitian adalah 27%, 29%, 31%, 33%, 35%, dan 37% dengan 4 kali pengulangan. Pengamatan Kadar Hambat Minimal (KHM) secara kualitatif didapatkan pada konsentrasi 27%. Perhitungan Kadar Bunuh Minimal (KBM) secara kuantitatif didapatkan pada konsentrasi 37%. Analisa statistik menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan pada setiap perubahan konsentrasi ekstrak seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA ($r=-0,982$; $p<0,05$). Berdasarkan penelitian ini, dapat

disimpulkan bahwa ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dapat menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.

Kata Kunci : MRSA, seledri, KHM, KBM



ABSTRACT

Wiranata, Jones Putra. 2019. *Effect of Ethanolic Extract of Celery (Apium graveolens) as Antibiofilm in MRSA through In Vitro Process*. Final Assignment.

Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr.

Dewi Erikawati, M.Si (2) dr. Saptadi Yulianto, M.Kes, Sp.A (K).

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of clinical infections. Adaptive nature of *Staphylococcus aureus* to antibiotics induced the emergence of new strain known as *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Based on these reasons, it is necessary to develop alternative drugs that can fight MRSA bacterial infections. One alternative is to use plant extracts that have many studied properties, namely celery (*Apium graveolens*). Celery contains various chemical compounds that have the potential as antimicrobial agents, such as flavonoids, tannins, limonene, and chlorogenic acid. This study aims to prove the antimicrobial effect of celery (*Apium graveolens*) on MRSA bacteria using the method of tube dilution. The concentration of celery extract (*Apium graveolens*) used in the study was 27%, 29%, 31%, 33%, 35%, and 37% with 4-time iterations.

Observation of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) qualitatively was recorded at a concentration of 27%. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is obtained at a concentration of 37%. Statistical analysis using One-Way ANOVA showed significant differences in each alteration of concentration of celery extract (*Apium graveolens*) with respect to the growth of MRSA colonies ($r = -0.982$; $p < 0.05$).

Based on this research, it was concluded that the ethanol extract from celery (*Apium graveolens*) could restrain the growth of MRSA through *in vitro* process.

Keywords : MRSA, seledri, MIC, MBC

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram-positif yang ditemukan sebagai flora normal pada tubuh manusia. Bakteri ini biasa ditemukan berkoloni pada kulit luar tubuh manusia, saluran pernafasan atas, dan saluran pencernaan.

Staphylococcus aureus adalah bakteri oportunistik, yaitu dapat menyebabkan infeksi pada tubuh manusia dalam situasi yang mendukung, seperti infeksi pada luka bekas operasi. Selain itu infeksi oleh *Staphylococcus aureus* dapat berupa pneumonia, mastitis infeksi kulit (impetigo, cellulitis dan *staphylococcal scalded skin syndrome*), osteomyelitis, endocarditis dan bakteremia. *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan keracunan makanan, sebagai akibat dari produksi enterotoksin (Stapleton dan Taylor, 2002).

Penicillin merupakan antibiotik beta-lactam pertama yang dikembangkan untuk mengobati infeksi *Staphylococcus aureus* (Boswihi dan Udo, 2018). Pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus* oleh penicillin efektif saat itu. Namun, tidak lama setelah penggunaan penicillin secara klinis, muncul *strain Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap penicillin. Kemudian, Methicillin diciptakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*.

Pada tahun 1961, tidak lama setelah Methicillin digunakan secara klinis, *strain Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin ditemukan di *United Kingdom* (David dan Daum, 2010). Sejak saat itu, *strain Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin menyebar secara cepat ke seluruh dunia.

Mekanisme resistensi methicillin pada *Staphylococcus aureus* dimediasi oleh gen *mecA* pada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). *mecA* mengkode sintesis *Penicillin binding protein* (PBP) 2a yang berbeda dari *native*

PBP. PBP 2a memiliki afinitas yang lebih rendah untuk berikatan dengan antibiotik beta-laktam daripada *native* PBP yang dikode pada inti genom *Staphylococcus aureus*. Kombinasi dari penurunan afinitas ikatan dengan penicillin dan peningkatan produksi dari PBP2a menjadi penyebab resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik beta-laktam (Harkins *et al.*, 2017).

Dulunya, bakteri MRSA hanya ditemukan di fasilitas kesehatan pada orang tua. Namun seiring berjalannya waktu bakteri MRSA juga ditemukan pada orang sehat tanpa riwayat kontak dengan fasilitas kesehatan (Boswihi dan Udo, 2018).

Strain MRSA yang ada di fasilitas kesehatan dan komunitas dikelompokkan sebagai *nosocomial* atau *healthcare-associated* MRSA (HA-MRSA) dan *community-associated* MRSA (CA-MRSA) (Udo, 2013). Selain itu, ditemukan juga tipe baru MRSA yang ditemukan pada hewan ternak, dikelompokkan sebagai *Livestock-associated MRSA* (LA-MRSA) (Udo, 2013). *Healthcare-associated infections* yang disebabkan oleh HA-MRSA antara lain infeksi aliran darah, infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernapasan, dan infeksi paska-operasi (Ferri *et al.*, 2005; Spaulding *et al.*, 2013). Infeksi yang disebabkan CA-MRSA antara lain impetigo, cellulitis, folliculitis, necrotizing fasciitis, post-influenza pneumonia, septic thrombophlebitis, septic arthritis, dan bakteremia (Udo, 2013). LA-MRSA telah dilaporkan menyebabkan infeksi invasif antara lain endocarditis, osteomyelitis, dan *ventilator-associated pneumonia* (Hetem *et al.*, 2013; Stefani *et al.*, 2012).

Selain itu, prevalensi MRSA di Indonesia tepatnya di Malang bisa dibilang cukup tinggi. Pada tahun 2010-2014, dilakukan penelitian mengenai prevalensi MRSA pada isolat klinik di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia. Secara keseluruhan, didapatkan 772 isolat *Staphylococcus aureus*, 38,2% diantaranya merupakan isolat MRSA. Prevalensi MRSA tertinggi didapatkan pada tahun 2012 (45,3%), sedangkan prevalensi terendah pada tahun 2013 (33,5%). Kasus MRSA paling sering ditemukan dari pus (49%). Penelitian ini membuktikan adanya

prevalensi MRSA yang tinggi dari spesimen klinik pasien yang dirawat di RSUD dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia pada tahun 2010-2014, disertai perubahan pola resistensi terhadap berbagai kelas antibiotik yang sering digunakan (Erikawati *et al.*, 2016).

Bakteri MRSA juga memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Biofilm didefinisikan sebagai komunitas bakteri yang diselubungi oleh substansi polimerik ekstraseluler yang menempel pada permukaan biotik atau abiotik. Infeksi yang disebabkan bakteri yang mampu membentuk biofilm sangat sulit untuk dieradikasi karena biofilm memblokir penetrasi antibiotik dan mencegah respons normal imun.

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus yang tumbuh dalam biofilm diketahui banyak menyebabkan *device-related infections* dan infeksi kronis lainnya (Cha *et al.*, 2013).

Penelitian untuk menghambat pertumbuhan mikroba menggunakan bahan alami seperti tanaman sudah banyak dilakukan. Salah satu tanaman yang sudah banyak diteliti yaitu seledri (*Apium graveolens*). Seledri memiliki kandungan kimia yang berpotensi sebagai antibakteri, antara lain flavonoid, tannin, limonen, dan asam klorogenat (Al-snafi dan Esmail, 2012; Liu *et al.*, 2017). Ekstrak tanaman seledri ditemukan memiliki efek inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* (Bananou *et al.*, 2013). Selain itu, penelitian telah menunjukkan bahwa flavonoid dan tannin yang terkandung dalam ekstrak *Alnus japonica* (alder) dapat menghambat pembentukan biofilm dari *S. aureus*. Terlebih lagi, ekstrak dari *A. japonica* dan kandungan flavonoid di dalamnya dapat mengurangi hemolysis dari *S. aureus* (Lee, 2013).

Berdasarkan uraian di atas, terdapat kemungkinan bahwa seledri berpotensi sebagai antimikroba pada bakteri MRSA. Hal ini menjadi dasar

penelitian mengenai efek ekstrak etanol seledri terhadap pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, dirumuskan masalah sebagai berikut :

“Apakah ekstrak dari seledri (*Apium graveolens*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak seledri (*Apium graveolens*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak seledri (*Apium graveolens*) dengan pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.

1.3.2.2 Mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian dari khasiat seledri (*Apium graveolens*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Menjadi dasar penelitian untuk mengembangkan pemanfaatan seledri sebagai antibakteri sehingga dapat menjadi alternatif dalam pengobatan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taksonomi

Kingdom	:	<i>Bacteriae</i>
Filum	:	<i>Firmicutes</i>
Kelas	:	<i>Bacilli</i>
Ordo	:	<i>Bacillales</i>
Famili	:	<i>Staphylococcaceae</i>
Genus	:	<i>Staphylococcus</i>
Spesies	:	<i>Staphylococcus aureus</i> (Rosenbach, 1884)

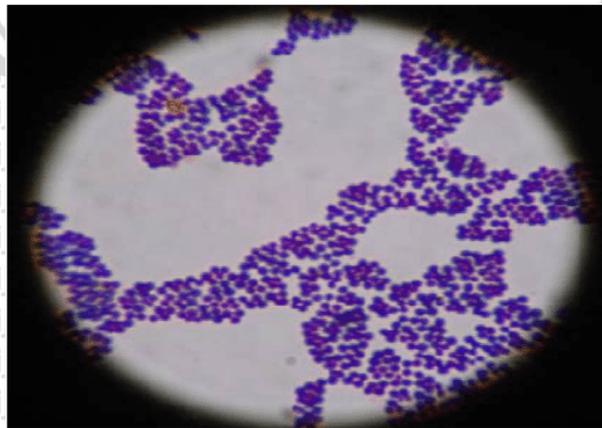
2.1.2 Karakteristik bakteri

2.1.2.1 Ciri khas organisme

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, tidak motil, dan dapat memproduksi pus. Secara mikroskopik, *Staphylococcus aureus* memiliki ukuran 0,5 – 1,5 μm yang bergerombol, seperti buah anggur.

Terdapat lebih dari 200 *strain* dari *Staphylococcus aureus* yang diketahui.

Staphylococcus aureus memiliki berbagai faktor virulensi yang berkontribusi pada keberhasilannya sebagai agen infeksi (Green *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* (Joshi *et al.*, 2014)

2.1.2.2 Sifat kultur

Kelompok *Staphylococci* dapat tumbuh pada media baik dalam kondisi aerob maupun mikroaerofilik. Suhu optimal yang dibutuhkan oleh *Staphylococci* untuk tumbuh maksimal adalah 37°C, tapi suhu optimal untuk pembentukan pigmen maksimal adalah suhu ruangan (20-25°C). Namun, *Staphylococci* tidak membentuk pigmen dalam keadaan anaerobic atau di dalam *broth*. Koloni *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat, halus, konveks, dan berkilau.

Staphylococcus aureus dapat membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning keemasan. Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga memproduksi berbagai derajat hemolisis. *Staphylococcus aureus* merupakan satu-satunya bakteri dalam kelompok *Staphylococci* yang dapat memfermentasi mannitol (Carrol et al., 2016).

2.1.2.3 Sifat pertumbuhan

Staphylococcus aureus merupakan organisme *mesophilic* dengan temperatur optimal untuk pertumbuhannya antara 37°C-40 °C. Temperatur minimal untuk pertumbuhan adalah sekitar 7.0 °C, tapi ada beberapa *strain* yang tidak menunjukkan pertumbuhan pada suhu 8.0 °C. *Staphylococcus aureus* dapat hidup dalam pembekuan dan di dalam daging pada suhu -18 °C selama paling sedikit 6 bulan tanpa pengurangan jumlah. Temperatur lebih tinggi dari 46 °C tidak dapat ditoleransi oleh sebagian besar dari *strain Staphylococcus aureus*, dengan beberapa *strain* pengecualian yang dapat tumbuh sampai suhu 50 °C. Inhibisi total *Staphylococcus aureus* dicapai pada pH kurang dari 5.0. Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang membedakannya dari bakteri patogenik lainnya adalah toleransinya yang tinggi terhadap angka *water activity* yang rendah dan konsentrasi NaCl yang tinggi sampai 20%. Telah dilaporkan bahwa *minimal water activity* untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah antara 0.83 sampai 0.86_{aw}. Untuk pertumbuhan, *Staphylococcus aureus* membutuhkan vitamin B (thiamin dan asam nikotinat), garam inorganik dan asam amino sebagai sumber

nitrogen, terutama arginin, sistein, prolin, dan valina. *Staphylococcus aureus* relatif sensitif terhadap *sorbic acid*, *peracetic acid* dan *hydrogen peroxide*. *Unsaturated fatty acids* and *alkaline dyes* dapat berefek inhibisi. Di sisi lain, *Staphylococcus aureus* resisten terhadap *phenol*, senyawa *mercury*, *cadmium*, dan *arsenates*. *Staphylococcus aureus* juga memiliki sifat toleransi yang tinggi terhadap senyawa *tellurite*, *mercuric chloride*, *neomycin*, *polymyxin* and *sodium azide* (Medvedová dan Valík, 2012).

2.1.2.4 Struktur antigen

Staphylococci memiliki polisakarida antigenik dan protein dan zat penting lainnya di struktur dinding selnya. Peptidoglikan memberikan *exoskeleton* yang kaku pada dinding sel dan menjadi tempat pelekatan adhesin. Selain itu, peptidoglikan juga penting dalam pathogenesis infeksi : Peptidoglikan menginduksi produksi dari *interleukin-1* dan antibodi opsonin oleh monosit, dapat bersifat kemoatraktan bagi sel leukosit polimorfonuklear, memiliki aktivitas seperti endotoksin, dan mengaktifasi komplemen. Komponen utama lain dari dinding sel *Staphylococcus aureus* adalah asam teichoic yang menyumbang sekitar 40% massa dari dinding sel. Asam teichoic terdiri dari 2 tipe, yaitu *cell wall teichoic acid* dan *cell membrane associated lipoteichoic acid* (Harris *et al.*, 2002). Asam teichoic terikat dengan peptidoglikan dan penting dalam metabolisme sel (Carrol *et al.*, 2016).

Protein A adalah komponen dinding sel dari *Staphylococcus aureus* dan merupakan salah satu protein dalam kelompok adhesin yang bernama *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs).

MSCRAMM memediasi pelekatan bakteri ke sel inang. Protein A berikatan dengan bagian FC dari molekul IgG, kecuali IgG3. MSCRAMM lain yang penting dalam faktor virulensi adalah faktor penggumpalan pada permukaan dinding sel. Faktor penggumpalan berikatan dengan fibrinogen dan platelet, menyebabkan agregasi

bakteri. Kebanyakan *strain* dari *Staphylococcus aureus* memiliki kapsul polisakarida, yang menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear.

Terdapat 11 *serotype* yang sudah teridentifikasi, dengan tipe 5 dan 8 yang berkontribusi terhadap mayoritas dari infeksi (Carrol *et al.*, 2016).

2.1.3 Identifikasi bakteri

2.1.3.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram mengklasifikasikan bakteri menjadi 2 kelompok besar :

Gram positif dan Gram negatif. Perbedaan pada struktur dinding sel menjadi dasar klasifikasi pada pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif memiliki lapisan tebal peptidoglikan pada dinding selnya, sehingga bisa mempertahankan kompleks CV-

Iodine setelah dibilas oleh alkohol. Sedangkan bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis pada dinding selnya, sehingga tidak dapat mempertahankan kompleks CV-Iodine setelah dibilas dengan alkohol (Thairu *et*

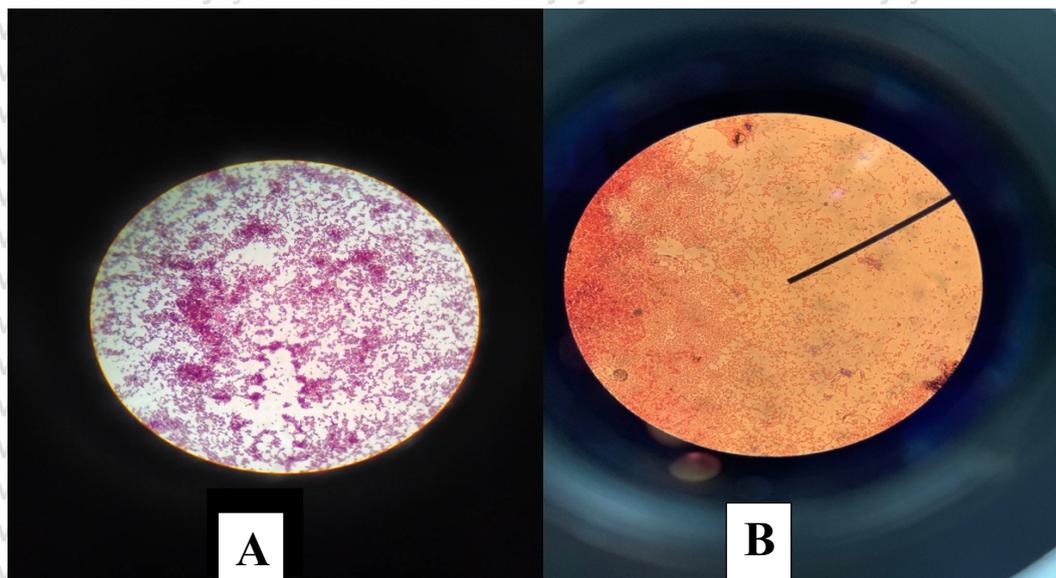
al., 2014). Prosedur pelaksanaan pewarnaan Gram yang pertama adalah meneteskan aquades di atas *object glass*. Kemudian ambil koloni bakteri menggunakan ose yang sudah disterilkan dan meletakkannya di atas tetesan

aquades. Setelah itu ratakan perlahan-lahan dan biarkan kering. Lalu fiksasi *sample* dengan melewati *object glass* di atas api Bunsen 3-4 kali. Selanjutnya teteskan kristal violet, biarkan selama 1 menit, dan dicuci dengan air mengalir.

Kemudian teteskan Lugol, tunggu selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir.

Setelah itu teteskan alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik. Lalu dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya teteskan safranin dan dibiarkan selama 30 detik.

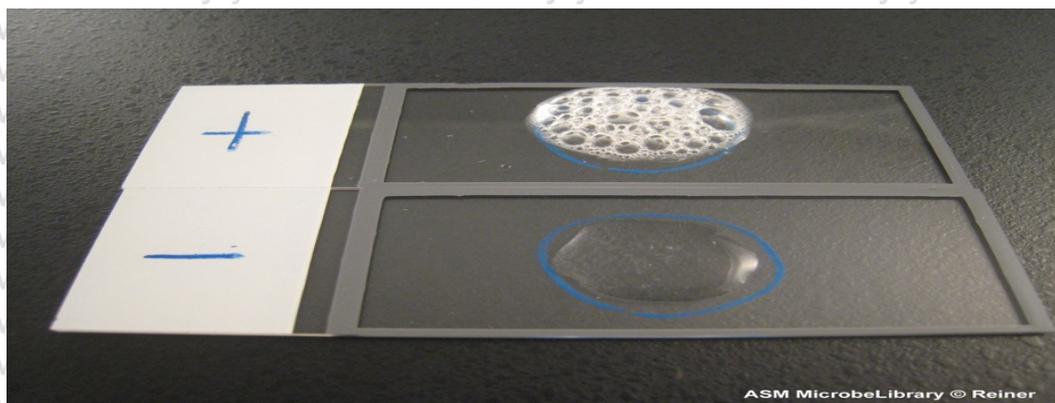
Setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tissue. Kemudian amati dengan menggunakan minyak emersi dan perbesaran 1000x di bawah mikroskop.



Gambar 2.2 Hasil Pewarnaan Gram dengan perbesaran 1000x. A, Gram positif berwarna ungu. B, Gram negatif berwarna merah.

2.1.3.2 Tes Katalase

Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dengan cara mendeteksi enzim katalase pada bakteri. Untuk bertahan hidup, organisme harus mengandalkan mekanisme pertahanan yang membuat mereka terhindar dari kerusakan oksidatif dari hidrogen peroksida (H_2O_2). Enzim katalase memfasilitasi perubahan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen ($2H_2O_2 + \text{Katalase} \rightarrow 2H_2O + O_2$). Pembentukan gelembung menandakan hasil positif (+) pada reaksi ini (Reiner, 2010). Prosedur pelaksanaannya yang pertama adalah dengan mengambil koloni bakteri menggunakan ose yang sudah disterilkan dan mengoleskannya ke atas *object glass* yang kering. Kemudian teteskan 3% hidrogen peroksida (H_2O_2) ke *sample* bakteri. Setelah itu observasi apakah terbentuk gelembung atau tidak. Jika terbentuk banyak gelembung maka dinyatakan sebagai hasil positif (+). Sedangkan jika tidak terbentuk atau sangat sedikit gelembung yang terbentuk makanya dinyatakan sebagai hasil negatif (-).



Gambar 2.3 Tes Katalase (Reiner, 2010)

2.1.3.3 Tes Koagulase

Tes koagulase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari *Staphylococcus epidermidis* dan spesies lain yang menghasilkan koagulase negatif. *Staphylococcus aureus* memproduksi 2 bentuk enzim koagulase yaitu koagulase terikat dan bebas. Koagulase terikat adalah koagulase yang terikat pada dinding sel bakteri dan akan langsung bereaksi dengan fibrinogen saat suspensi bakteri dicampur dengan plasma. Reaksi antara koagulase terikat dengan fibrinogen menyebabkan perubahan fibrinogen menjadi fibrin. Akibatnya terjadi penggumpalan sel-sel bakteri. Koagulase bebas akan bereaksi dengan *coagulase-reacting faktor* untuk membentuk *staphylothrombin*. *Staphylothrombin* mengkatalis perubahan fibrinogen menjadi gumpalan fibrin (Chamberlain 2009).

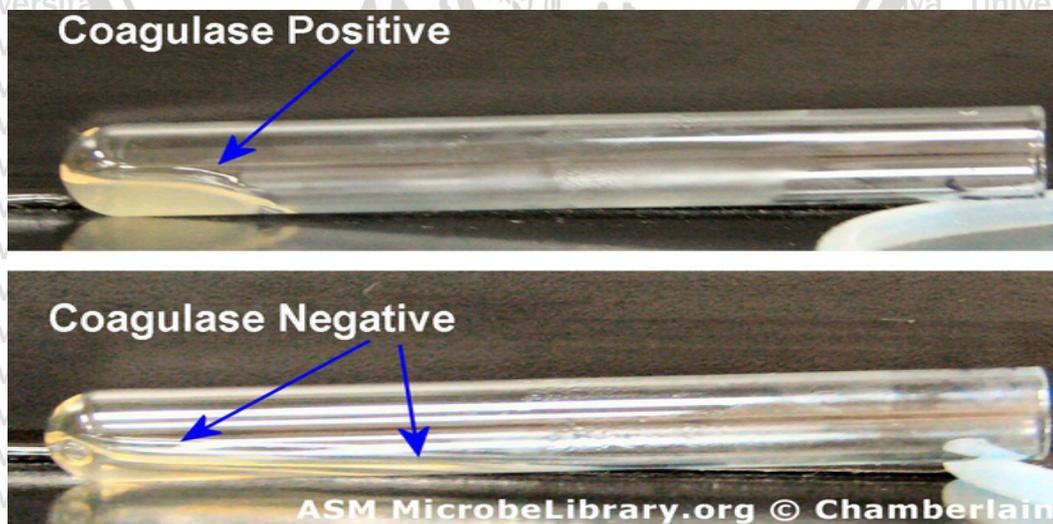
Tes koagulase dapat dilakukan menggunakan 2 prosedur : *slide test* dan *tube test*. *Slide test* sangat mudah dilakukan dan memberikan hasil dalam waktu cepat, tapi bisa memberikan *false negatif*. *Tube test* memberikan hasil yang pasti, tapi membutuhkan waktu yang lama untuk dilakukan. Penggumpalan menandakan hasil positif pada kedua prosedur.

Prosedur pelaksanaan *slide test* adalah mencampurkan suspensi sel bakteri ke *EDTA-treated plasma*. Jika terbentuk gumpalan dalam 10 detik setelah pencampuran sel bakteri ke plasma, maka dinyatakan sebagai hasil positif (+).

Sedangkan jika tidak ada gumpalan yang terbentuk, maka dinyatakan sebagai hasil negatif (-). *Strain* yang mendapat hasil negatif pada *slide test* perlu diperiksa lebih lanjut dengan *tube test*. *Tube test* dilaksanakan dengan mencampurkan sel bakteri ke plasma dengan volume lebih banyak. Bakteri akan bermultiplikasi dalam plasma dan mensekresi *staphylocoagulase*. *Staphylocoagulase* akan menginisiasi koagulasi dengan merubah fibrinogen menjadi fibrin, menyebabkan terbentuknya gumpalan fibrin. Terbentuknya gumpalan dalam 24 jam memberikan hasil positif (+), sedangkan tidak terbentuknya gumpalan memberikan hasil negative (-) (Katz, 2010).



Gambar 2.4 Tes koagulase *slide test* (Katz, 2010)



Gambar 2.5 Tes koagulase *tube test* (Chamberlain, 2009)

2.1.3.4 Uji Cefoxitin

Pengujian kepekaan terhadap antibiotik dilakukan setelah proses identifikasi koloni bakteri *Staphylococcus aureus* selesai. Digunakan metode *disc diffusion* (*Kirby Bauer method*) dan pedoman menurut tabel yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014. Pada metode ini digunakan kertas-kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah berisi antibiotika dalam konsentrasi tertentu. Beberapa koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang terpisah dan murni diambil dengan ose steril kemudian dilarutkan dalam 2 ml larutan NaCl fisiologis sampai mencapai konsentrasi 0.5 Mc Farland atau setara dengan kepadatan sel bakteri sebesar $1,5 \times 10^8$ bacteria/ml. Larutan NaCl fisiologis yang sudah berisi bakteri tersebut kemudian divortex agar homogen. Lidi kapas steril di masukkan ke dalam tabung larutan NaCl tersebut untuk mengambil inokulum bakteri dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya, larutan NaCl fisiologis yang telah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator, lidi kapas ditekan pelan ke permukaan bagian dalam dinding tabung yang berisi larutan NaCl tersebut, dipastikan tidak ada kelebihan cairan, kemudian lidi kapas ditarik keluar dari tabung. Lidi kapas digoreskan di atas Agar Mueller Hinton untuk membuat *streaking* pada permukaan Agar tersebut. Pembuatan *streaking* ini bertujuan untuk menumbuhkan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada seluruh permukaan Agar. Agar Mueller Hinton dibiarkan mengering selama 2 menit, kemudian kertas cakram antibiotik *cefoxitin*, *chloramphenicol*, *ciprofloxacin*, *erythromycin*, *gentamicin*, *tetracycline*, dan *trimethoprim-sulfametoxazole* diletakkan di atas Agar Mueller Hinton dengan jarak sebesar 24mm dari bagian tengah kertas cakram satu antibiotik ke antibiotik lainnya. Agar Mueller Hinton diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam setelah semua kertas cakram antibiotik terpasang (Erikawati *et al.*, 2016).

Hambatan pertumbuhan bakteri di atas Agar Mueller Hinton selanjutnya diamati di sekitar cakram antibiotik *cefoxitin*, *chloramphenicol*, *ciprofloxacin*, *erythromycin*, *gentamicin*, *tetracycline*, dan *trimethoprim-sulfametoxazole* setelah waktu inkubasi selesai. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri untuk setiap jenis cakram antibiotika. Hasil pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri tersebut kemudian disesuaikan dengan tabel pengukuran kepekaan antibiotik yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2014, sehingga dapat ditentukan apakah bakteri yang diujikan masih sensitif atau sudah resisten terhadap suatu antibiotik. Bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA teridentifikasi apabila didapatkan hasil resisten terhadap antibiotik cefoxitin (didapatkan hambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berdiameter <21mm) (Dewi *et al.*, 2016).

2.1.4 Faktor virulensi

2.1.4.1 Faktor permukaan sel

1) *Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs)

MSCRAMMs terkait pada peptidoglikan sel dan melekat secara spesifik pada komponen plasma atau matriks ekstraseluler. Molekul ini mengenali komponen paling dominan dari ECM atau plasma darah, seperti fibrinogen, fibronectin, dan kolagen. Anggota dari kelompok MSCRAMMs antara lain *Staphylococcal protein A (SpA)*, *fibronectin-binding proteins A dan B (FnbpA and FnbpB)*, *collagen-binding protein*, and *clumping faktor proteins (Clf) A dan B (Bien et al., 2011)*. *Staphylococcal protein A (SpA)* akan berikatan dengan IgG untuk melindungi bakteri terhadap opsonisasi dan fagositosis. *Fibronectin-binding proteins* memfasilitasi pelekatan sel bakteri dengan sel inang dengan cara berikatan dengan fibronectin. *Collagen-binding protein* memfasilitasi pelekatan sel

bakteri dengan jaringan kolagen dan kartilago. *Clumping factor proteins* memediasi penggumpalan plasma darah dan pelekatan dengan fibrinogen (Costa *et al.*, 2013).

2) *Capsular polysaccharides*

Kapsul yang dimiliki bakteri bertindak sebagai mekanisme pertahanan untuk menghadapi perubahan terhadap lingkungan sekitar. Seperti patogen lainnya, *Staphylococcus aureus* mempunyai kapsul pada permukaan selnya.

Terdapat 13 *serotype* dari kapsul *Staphylococcus aureus* yang sudah diidentifikasi (Chan *et al.*, 2014). Kapsul meningkatkan virulensi dengan membuat bakteri resisten terhadap fagositosis, sehingga bakteri lebih sulit untuk dieradikasi (O’Riordan dan Lee, 2004).

3) *Staphyloxantine*

Staphyloxantine adalah pigmen *carotenoid* pada membran *Staphylococcus aureus*. *Staphyloxantine* meningkatkan virulensi bakteri dengan cara berperan dalam pertahanan terhadap kerusakan yang disebabkan akibat *reactive oxygen species* (ROS) (Clauditz *et al.*, 2006).

2.1.4.2 Faktor yang disekresi

1) Hemolisin

Hemolisin adalah toksin yang melisis sel darah merah dan biasanya memerlukan reseptor untuk aktivitas hemolitiknya. *Staphylococcus aureus* mensekresi beberapa hemolisin, antara lain α -hemolysin, β -hemolysin, γ -hemolysin, dan δ -hemolysin. α -hemolysin merupakan sitotoksin *pore-forming* yang menyebabkan lisis pada sel darah merah dan leukosit, tapi bukan neutrofil (Kong *et al.*, 2016). β -hemolysin merupakan sphingomyelinase yang bekerja dengan cara menghidrolisis sphingomyelin, yang merupakan lipid yang terkandung dalam membran plasma. Lisis dari sel darah merah oleh β -hemolysin hanya ditemukan dalam keadaan temperatur rendah, menandakan bahwa

aktivitas litik dari β -hemolysin memiliki tingkat efisiensi yang lebih rendah daripada hemolisin lainnya, setidaknya terhadap eritrosit (Vandenesch *et al.*, 2012). γ -hemolysin dan PVL merupakan toksin *bi-component* yang dapat berkombinasi untuk membentuk molekul toksin yang melisiskan sel inang dan dapat menimbulkan respons inflamasi. γ -hemolysin terdiri dari 3 subunit, yaitu *hlgA* dan *hlgC* (Komponen S), dan *hlgB* (Komponen F) (Dinges *et al.*, 2000). δ -hemolysin diklasifikasikan sebagai *phenol-soluble modulins* (PSM) yang tidak memerlukan reseptor untuk aktivitas hemolitiknya (Kong *et al.*, 2016). δ -hemolysin memiliki kemampuan untuk melisiskan eritrosit dan sel mamalia lainnya dengan cara mendisrupsi membran sel (Dinges *et al.*, 2000).

2) *Staphylococcal Exfoliative Toxins* (ETs)

Toksin eksfoliatif merupakan toksin yang menjadi agen penyebab *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSSS), penyakit yang biasanya menyerang bayi dan neonatus. Individu yang terinfeksi akan mengalami gejala kulit melepuh dan hilangnya lapisan kulit superfisial, dehidrasi dan infeksi sekunder. Mekanisme aksi dari ETs yaitu dengan menghancurkan pelekatan sel desmosom pada lapisan superfisial kulit, sehingga menyebabkan *epidermal detachment* dari epidermis kulit. Disrupsi dari lapisan epidermis kulit akan memfasilitasi progresivitas dari infeksi (Kong *et al.*, 2016).

3) Enterotoksin

Staphylococcal Enterotoxins (SEs) menyebabkan mual dan diare dan menjadi salah satu penyebab tersering *food-borne disease*. Toksin ini disekresi oleh *Staphylococcus aureus* pada makanan, bersifat stabil terhadap panas dan tidak terdegradasi dalam proses memasak. SEs merupakan *superantigen* yang memicu aktivasi dan proliferasi dari T-cell (Kong *et al.*, 2016). Jumlah toksin yang diperlukan untuk menyebabkan penyakit adalah kurang dari 1 μ g. Gejala yang ditimbulkan yaitu mual, muntah, sakit abdomen, keram, dan diare (Pinchuk *et al.*,

2010). Telah dilaporkan terdapat lebih dari 20 SEs yang teridentifikasi sampai sekarang yang dibedakan berdasarkan variasi antigen (SEA—SEIV) (Hennekinne *et al.*, 2012).

4) *Toxic-Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1)*

TSST-1 merupakan toksin yang termasuk dalam golongan *pyrogenic toxin superantigens* (PTSAgs) dan menjadi salah satu agen penyebab *Toxic Shock Syndrome* (TSS). TSST-1 akan menstimulasi pelepasan kemokin dari sel inang yang akan menyebabkan inflamasi dan disrupsi dari sel mukosa. Hal ini menyebabkan interaksi lebih lanjut antara toksin dengan sel T dan makrofag, yang kemudian akan menimbulkan TSS (Kong *et al.*, 2016). Gejala yang dapat timbul akibat TSST, yaitu demam, ruam, deskuamasi kulit, hipotensi, mual, dan diare.

Komplikasi dari TSS yang dapat mengancam nyawa adalah *acute respiratory distress syndrome* dan *disseminated intravascular coagulation* (Dinges *et al.*, 2000).

5) *Panton-Valentine leukocidin (PVL)*

PVL adalah toksin *pore-forming* yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat mematikan sel leukosit dan menyebabkan nekrosis jaringan (Adler *et al.*, 2006). Hanya 2-3% dari *strain Staphylococcus aureus* yang memproduksi PVL. PVL terdiri dari 2 subunit, yaitu LukS-PV (Komponen S) dan LukF-PV (komponen F). Pada *strain Staphylococcus aureus* yang dapat memproduksi γ -hemolysin dan PVL, terdapat 3 komponen S (HlgA, HlgC, and LukS-PV) dan 2 komponen F (HlgB and LukF-PV) yang tersedia. Komponen S dan F dapat berkombinasi untuk membentuk molekul toksin, sehingga terdapat 6 kemungkinan kombinasi dari γ -hemolysin/PVL. Telah dilaporkan bahwa subunit dari toksin memiliki tingkat aktivitas yang berbeda-beda : LukS-PVL > HlgC > HlgA untuk komponen S; komponen F yaitu LukF-PVL dan HlgB memiliki tingkat aktivitas yang sama (König *et al.*, 1997). Namun saat ditambahkan ke eritrosit, kombinasi

subunit juga memiliki tingkat aktivitas yang berbeda-beda. HlgA–LukF–PV, HlgA–HlgB, and HlgC–HlgB memiliki aktivitas hemolitik yang tinggi, dengan HlgA–HlgB yang tertinggi. Kombinasi yang lain memiliki tingkat hemolitik yang jauh lebih rendah. Semua kombinasi dapat melisis leukosit secara efisien (Dinges *et al.*, 2000).

6) Enzim

Hampir semua strain dari *Staphylococcus aureus* mensekresi beberapa enzim ekstraseluler yang berfungsi untuk merusak jaringan inang dan/atau mengganggu mekanisme antimikroba dari inang. Hal ini dilakukan untuk memperoleh nutrisi untuk pertumbuhan bakteri dan memfasilitasi penyebaran bakteri (Costa *et al.*, 2013). Enzim-enzim yang diproduksi *Staphylococcus aureus* antara lain enzim protease, lipase, nuclease, hyaluronidase, staphylokinase, koagulase.

Enzim protease berkontribusi terhadap virulensi dengan cara mendegradasi molekul plasma, mendegradasi molekul sistem imun, mengontrol adhesi, dan mengaktivasi enzim lain. Enzim lipase memfasilitasi hidrolisis dari ikatan ester antara gliserol dan asam lemak untuk membentuk trigliserida. Reaksi ini akan membantu bakteri dengan merusak jaringan inang untuk membebaskan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Enzim lipase juga mengganggu fungsi granulosit dan menginaktivasi lipid yang bersifat bakterisidal (Vijayakumar, 2013). Enzim nuklease menyebabkan resistensi bakteri terhadap aktivitas *neutrophil extracellular traps* (NETs) dari neutrophil (Berends *et al.*, 2010). Enzim hyaluronidase mendegradasi asam hyaluronat dan berperan dalam penyebaran infeksi (Ibberson *et al.*, 2014). Enzim Staphylokinase mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin, yang mendegradasi bekuan fibrin. Hal ini akan mengganggu fungsi fibrin dalam melokalisasi infeksi bakteri, sehingga memfasilitasi penyebaran infeksi *Staphylococcus aureus* (Otto, 2014).

Staphylococcus aureus juga memproduksi 2 enzim koagulase : *Staphylocoagulase* dan *von Willebrand faktor* (vWF). Kedua enzim ini berkontribusi terhadap pembentukan bekuan fibrin dengan cara berikatan dengan protrombin membentuk kompleks *staphylothrombin*, yang memicu perubahan fibrinogen menjadi fibrin. Hal ini akan menyebabkan pembentukan bekuan fibrin pada permukaan sel bakteri, yang akan menghambat fagositosis dan membentuk abscess (Otto, 2014).

2.1.5 Patofisiologi

Infeksi dimulai ketika ada inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* ke luka terbuka. Jalan alternatif infeksi yaitu masuknya bakteri *Staphylococcus aureus* melalui mukosa saluran pernapasan atas yang rusak akibat infeksi virus, yang biasanya timbul seminggu setelah onset dari infeksi influenza. Saat masuk ke jaringan inang, peptidoglikan dan lipoprotein dari *Staphylococcus aureus* dikenali oleh *host pattern recognition molecules*. Produksi dari bakteri untuk merusak hyaluronan dan *endogenous toll like receptor ligands* (RNA, DNA, HMGB1) yang dilepaskan oleh jaringan nekrotik saat terjadinya infeksi akan memicu pemanggilan sitokin proinflamasi yang akan mengaktifasi sel imun lokal dan rekrutmen dari neutrofil dan makrofag (Liu, 2009).

Pada lingkungan ekstraseluler, *Staphylococcus aureus* harus mengatasi opsonisasi oleh komplemen dan antibodi yang dapat membunuh *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* juga harus menghindari fagositosis dari sel fagosit melalui Fc atau reseptor komplemen. *Staphylococcus aureus* menghindari opsonfagositosis dengan cara mengekspresikan kapsul pada permukaannya, *clumping faktor* A, protein A dan sejumlah inhibitor komplemen, yang semuanya akan menginaktivasi atau mencegah opsonin dari inang untuk berikatan atau menargetkan bakteri untuk menghancurkan bakteri tersebut (Liu, 2009).

Staphylococcus aureus dapat berlindung di dalam sel epitel, sel endotel,

dan makrofag. *Staphylococcus aureus* memiliki strategi untuk menangkal aktivitas neutrofil untuk membunuh bakteri. Pertama, *Staphylococcus aureus* mensekresi 2 molekul, yaitu CHIP (*Chemotaxis Inhibitory Protein*) dan Eap (*Extracellular adherence protein*) yang akan memblokir pengenalan neutrofil terhadap faktor kemotaksis dan mencegah pengikatan neutrofil dengan molekul adhesi ICAM-1. Inhibisi pengikatan dengan ICAM-1 mencegah perpindahan leukosit dari aliran darah ke lokasi infeksi (Liu, 2009).

Saat tiba di lokasi infeksi, neutrofil melepaskan substansi antrimikroba, yaitu peptida antimikroba dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Pertahanan *Staphylococcus aureus* terhadap ROS dimediasi oleh enzim katalase yang bersifat antioksidan (Foster, 2005). Sedangkan pertahanan terhadap peptida antimikroba akan dimediasi oleh enzim staphylokinase yang akan menetralkan peptida antimikroba (Jin *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus* juga mensekresi toksin yang dapat melisis sel-sel inang, seperti hemolisin, PSM, dan PVL (Liu, 2009).

Selain menghindari dari sistem imunitas inang, kemampuan bakteri untuk bertahan hidup di dalam tubuh inang juga ditentukan oleh kemampuan bakteri untuk mendapatkan nutrisi yang diperlukan untuk kelangsungan hidup bakteri, seperti zat besi. Saat mendeteksi rendahnya zat besi, *Staphylococcus aureus* menginisiasi transkripsi dari iron acquisition program yang akan menangkap heme dan haptoglobin pada permukaan sel, mentranspor kompleks zat besi melewati membran plasma, dan mendegradasi heme dalam sitoplasma (Maresso, 2006).

Staphylococcus aureus juga dapat membentuk biofilm yang berguna untuk menangkal sistem pertahanan inang dan antibiotik (Foster, 2005).

2.1.6 Manifestasi Klinis

Staphylococcus aureus merupakan patogen yang dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi, antara lain infeksi kulit dan jaringan lunak, infeksi tulang dan sendi, pneumonia, dan bakteremia (Kang *et al.*, 2011). Furunkel, karbunkel,

abses kulit, impetigo, selulitis, *necrotizing fasciitis*, pyomyositis, dan mediastinitis merupakan contoh-contoh infeksi kulit dan jaringan lunak yang dapat disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* (Tong *et al.*, 2015). Gejala-gejala yang dapat timbul akibat infeksi kulit dan jaringan lunak oleh *Staphylococcus aureus*, yaitu munculnya kemerahan, ruam, bengkak, krusta, dan *blister* pada kulit. Infeksi kulit dan jaringan lunak yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat berlanjut ke tahap infeksi yang lebih serius yang melibatkan tulang dan otot dan dapat menyebar ke paru-paru atau katup jantung (McCaig *et al.*, 2006).

Staphylococcus aureus merupakan patogen tersering pada 3 kelompok utama infeksi osteoarticular, yaitu osteomyelitis, *native joint septic arthritis*, dan *prosthetic joint infection*. Gejala-gejala yang dapat timbul akibat infeksi tulang dan sendi oleh *Staphylococcus aureus* adalah bengkak, panas, merah, dan nyeri tekan pada tulang dan sendi yang terinfeksi. Pada kasus infeksi tulang dan sendi dapat juga ditemukan demam pada pasien. Infeksi kateter oleh *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan gejala-gejala seperti demam, nyeri tekan, eritema, dan purulensi pada lokasi insersi kateter. Toxic Shock Syndrome (TSS) yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan gejala-gejala seperti demam tinggi, hipertensi, *diffuse macular erythematous rash* yang diikuti deskuamasi, mual dan diare, dan myalgia. Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga merupakan agen penyebab meningitis yang dapat menimbulkan gejala-gejala seperti demam, sakit kepala, muntah, dan penurunan kesadaran (Tong *et al.*, 2015). Enterotoksin yang diproduksi *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan *food poisoning* dengan gejala-gejala seperti mual, muntah, nyeri abdomen, diare, demam, gemeteran, dan pusing (Hennekinne *et al.*, 2012).

Orang yang lebih tua memiliki kerentanan yang lebih tinggi terhadap infeksi daripada orang dewasa yang lebih muda (Yoshikawa, 2000). Bakteremia, pneumonia, dan infeksi saluran kemih lebih sering terjadi pada kelompok orang

usia lanjut, dengan pneumonia yang tersering. Sedangkan infeksi kulit dan jaringan lunak dan *surgical site infection* merupakan infeksi yang lebih sering terjadi pada kelompok orang dengan usia yang lebih muda, dengan infeksi kulit dan jaringan lunak yang tersering (Kang *et al.*, 2011).

2.2 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Berdasarkan kerentanan terhadap antibiotik, *Staphylococcus aureus* dibagi menjadi 2 kelompok : Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) dan Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infeksi MRSA adalah salah satu penyebab utama dari infeksi nosokomial dan biasanya dikaitkan dengan morbiditas, mortalitas, durasi rawat, dan beban biaya yang tinggi (Siddiqui dan Koirala, 2018). Sesuai namanya, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan kelompok *strain Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin dan obat lain dalam dalam golongannya (Green *et al.*, 2012). Sejak kemunculannya pada tahun 1961, MRSA telah menyebar secara global yang menjadi penyebab utama dari infeksi bakteri dalam lingkungan rumah sakit dan komunitas. Kesuksesan MRSA dalam menyebabkan infeksi merupakan akibat dari gabungan antara banyaknya faktor virulensi yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* dengan resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap obat golongan β -lactam dan golongan antibiotik lainnya. MRSA dapat menyebabkan penyakit spektrum luas dari yang ringan, sedang, sampai berat dengan mortalitas yang tinggi (Lee *et al.*, 2018). Selain itu, MRSA tidak terbatas pada area geografik tertentu. Infeksi MRSA dapat terjadi di mana saja dan merupakan masalah dunia (Carroll, 2008).

2.2.1 Mekanisme resistensi MRSA

Mekanisme utama dari resistensi methicillin pada *Staphylococcus aureus* adalah melalui ekspresi dari PBP2a, yang resisten

terhadap aksi dari methicillin. Pada umumnya sintesis dari PBP2a rendah, tapi tingkat sintesis dapat meningkat bila terjadi mutasi pada gen regulator. Perbedaan antara MRSA dengan MSSA secara genetik adalah adanya gen *mecA* yang mengkode PBP2a pada MRSA. Gen *mecA* terletak di dalam wilayah kromosom yang bernama *staphylococcal chromosome cassette mec* (SCC*mec*), tepatnya dalam *resistance island* dari SCC*mec* (Hiramatsu *et al.*, 2001). Gen *mecA* dimiliki oleh 95% *strain Staphylococcus aureus* yang memiliki sifat resisten terhadap methicillin dan terdeteksi pada semua *strain Staphylococcus aureus* yang bersifat *multiresistant* (Wielders *et al.*, 2002). PBP2a memiliki persamaan bentuk struktural dengan PBP lainnya tapi memiliki afinitas yang jauh lebih rendah untuk berikatan dengan antibiotik β -lactam. Pada kromosom *staphylococcal*, *mecA* berdekatan dengan 2 gen, yaitu *mecR1* dan *mecl*. Gen *mecR1* mengkode *membrane-bound signal transduction protein* (MecR1), sedangkan *mecl* mengkode *transcriptional regulator* (Mecl). Sintesis PBP2a diregulasi oleh protein MecR1 dan Mecl. MecR1 dan Mecl bersifat homologi terhadap BlaR1 dan Blal secara berurutan. BlaR1 dan Blal merupakan protein yang berperan dalam ekspresi gen β -lactamase, *blaZ*. Bagian operator dari BlaR1 dan Blal yang mirip dengan MecR1 dan Mecl memberikan kemampuan bagi Blal untuk meregulasi ekspresi PBP2a (Stapleton dan Taylor, 2002).

2.2.2 Penanggulangan MRSA

Penanganan didasarkan pada tipe dari infeksi, lokasi, dan keparahan. Pasien harus mencegah penyebaran infeksi dan tidak menggunakan kompres basah. Untuk abses kulit, perawatan medis dengan insisi dan drainase adalah pengobatan pilihan. Terapi *multidrug* diperlukan untuk penanganan inisial yang gagal untuk infeksi MRSA, seperti kombinasi vankomisin dengan satu atau lebih antibiotik. Pasien harus diingatkan untuk mengikuti pengobatan secara penuh dan menghubungi dokter yang memberikan perawatan bila timbul efek samping. Efek

samping yang biasa timbul dalam pengobatan menggunakan antibiotik antara lain, *gastrointestinal distress*, seperti diare, mual, and nyeri abdomen; ruam; gatal; demam atau menggigil; *jaundice*; *dyspnea*; *dysphagia*; dan sakit kepala. Medikasi untuk MRSA juga dapat menimbulkan efek samping terhadap sistem muskuloskeletal, seperti sakit persendian, kaki sendi atau bengkak, kelemahan otot, nyeri pada dada dan punggung, dan pendarahan atau memar. Obat golongan florokuinolon jarang digunakan dalam penanganan pasien MRSA, tapi dapat digunakan sebagai terapi *multidrug* untuk infeksi osteomyelitis atau osteoarticular (Green *et al.*, 2012).

Dalam beberapa tahun belakangan, terdapat peningkatan Kadar Hambat Minimum (KHM) vankomisin terhadap beberapa *strain* MRSA, sehingga terapi alternatif mulai dikembangkan dan digunakan untuk penanganan infeksi MRSA. Agen alternatif untuk bakteremia MRSA dan *endocarditis* adalah antimikroba baru seperti daptomisin, linezolid, dan quinupristin–dalfopristin. Baru-baru ini, salah satu obat golongan *cephalosporin* bernama ceftaroline, yang memiliki aktivitas melawan MRSA, diakui untuk penanganan infeksi kulit dan *community-acquired pneumonia* (Carroll *et al.*, 2016). Teicoplanin diakui oleh *European Medicines Agency* untuk digunakan dalam kasus bakteremia, dan dianggap efektif dan aman dalam menangani bakteremia *Healthcare-Associated* MRSA. Linezolid yang diindikasi untuk pneumonia dan infeksi kulit oleh *Staphylococcus aureus*, efektif sebagai *salvage therapy* untuk bakteremia MRSA. Telavancin diakui untuk digunakan dalam infeksi kulit bakteri Gram positif dan *hospital-acquired and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia* (HABP/VABP). Quinupristin/dalfopristin diindikasikan untuk penanganan *complicated Skin and Skin Structure Infections* (cSSSI) oleh MSSA, tapi memiliki aktivitas *in vitro* terhadap MRSA (Hassoun *et al.*, 2017).

2.3 *Apium graveolens*

2.3.1 Taksonomi Seledri

Kingdom : Plantae

Divisi : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Apiales

Famili : Apiaceae

Genus : *Apium*

Spesies : *Apium graveolens* (Lansdown, 2013)

2.3.2 Morfologi Seledri

Seledri merupakan tanaman yang dapat tumbuh sampai tinggi 60-90 cm dengan tangkai daun yang panjang dan daun yang berkembang dengan baik.

Batangnya bercabang, *angular*, dan terhubung dengan sangat jelas. Daunnya *radical, pinnate*, terbagi menjadi 3 segmen, dan bergerigi pada puncaknya. Puncak

daun mudanya (*leaflet*) berbentuk oval atau *suborbicular, 3-lobed*, dengan panjang

2-4.5 cm. Bunganya kecil, berwarna putih, dan susunan bunganya adalah bunga

majemuk dengan bentuk payung. Buahnya bersifat *schizocarp* dengan 2

mericarps, berbentuk *suborbicular* atau *ellipsoid*, berdiameter 1-2 mm, aromatik,

dan sedikit pahit. Bijinya (*mericarp*) merupakan hasil dari pembelahan dari

buahnya (*schizocarp*) dan bergaris-garis dan lebih kecil dari biji wortel (Malhotra,

2006).



Gambar 2.6 Tanaman seledri (*Apium graveolens*)

(New World Encyclopedia, 2008)

2.3.3 Kandungan kimia seledri

Tabel 2.1 Komponen biji seledri (Fazal dan Singla, 2012)

Komposisi	Persentase dalam biji seledri
Konten air	5-11%
Protein	0.8%
Minyal esensial	1.5-3%
Minyak non esensial	5.8-14.2%
Ekstrak air dingin	5.9-12.9%
Konten mineral	6.9-11.0%
Mineral tidak larut dalam asam	0.5-4.0%

Komposisi biji seledri terdiri dari asam kafeat, asam klorogenat, apiin, apigenin, rutaretin, ocimene, bergapten, isopimpinellin, seslin, osthenoil, isoimperatorin, gravebioside A dan B, dan umbelliferone (Al-Asmari *et al.*, 2017).



Biji seledri dalam distilasi uap menghasilkan minyak yang mengandung limonene (80%) sebagai kandungan utama (Fazal dan Singla, 2012). Selain itu ditemukan juga asam palmitat, asam stearate, asam oleat, asam linoleate, asam petroselinum, selinene, terpineol, dan santolol dalam minyak biji seledri (Al-Asmari *et al.*, 2017).

Tabel 2.2 Komponen daun dan batang seledri (Fazal dan Singla, 2012)

Komposisi	Persentase dalam daun dan batang seledri
Air	80.30-93.5%
Protein	0-0.8%
Lemak	0.6-0.1%
Serat	1.4-1.2%
Kandungan mineral	2.1-0.9%
Kalsium	0.23-0.3%
Fosfor	0.14-0.4%
Zat besi	0.06-0.05%
Vitamin A	5800-7500 IV
Vitamin B	TRACE
Vitamin C	62.6 mg/100gm

Akar seledri mengandung falcarinol, falcarindiol, panaxidol, and polyacetylene 8-O-methylfalcarindiol (Zidorn *et al.*, 2005). Komponen utama dalam batang seledri adalah *pectic polysaccharide* (apiuman) yang mengandung d-galacturonic acid, 1-rhamnose, 1-arabinose, and d-galactose (Ovodova *et al.*, 2009). Sedangkan komponen utama dalam daun seledri adalah 1-dodecanol, 9-octadecen-12-ynoic acid, methyl ester, and tetradecene-1-ol acetate (Nagella *et*

al., 2012).

Tabel 2.3 Komposisi nutrisi seledri (Fazal dan Singla, 2012)

Komponen	Tangkai daun	Batang	Daun	Blji
Energi	29	34	64	392
Air	96	95	81	6
Protein	0.7	0.9	6	18.1
Lemak	0.1	0.1	0.6	3
Karbohidrat	1.2	1.2	8.6	41.4
Vitamin	90	120	80	52
Tiamina	0.03	0.03	Trace	Trace
Riboflavin	0.02	0.04	Trace	Trace
Niasin	0.3	0.3	Trace	Trace
Kalsium	25	10	6.3	17
Zat besi	0.3	0.5	23	1767
Magnesium	10	14	6	45
Potassium	27	34	14	547

Komposisi utama dari minyak esensial daun seledri adalah limonen, flavonoid, tannin, dan asam klorogenat. Limonen memiliki kemampuan antibakteri dengan cara merusak protein dan lipopolisakarida pada membran sel bakteri untuk menginaktivasi sel bakteri (Espina *et al.*, 2013). Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan mekanisme antara lain inhibisi sintesis asam nukleat, inhibisi fungsi membran sitoplasma, dan inhibisi metabolisme energi (Cushnie dan Lamb, 2005). Flavonoid ditemukan menginhibisi sintesis asam nukleat dengan cara mengganggu fungsi kerja DNA gyrase, enzim yang berfungsi untuk

meringankan tegangan DNA dalam proses replikasi DNA (Plaper *et al.*, 2003; Ohemeng *et al.* 1993). Selain itu, flavonoid juga ditemukan dapat menghambat kerja enzim topoisomerase IV yang penting untuk kelangsungan hidup sel bakteri. Inhibisi enzim topoisomerase IV menyebabkan respons SOS dan gangguan pertumbuhan dari bakteri (Bernard *et al.*, 1997). Flavonoid dapat menghambat fungsi membran sitoplasma dengan cara mengubah permeabilitas membran sehingga mengganggu fungsi membran dalam menjaga kestabilan osmotik pada sel.

Selain itu, flavonoid juga ditemukan dapat merusak membran sel bakteri. Mekanisme flavonoid dalam merusak membran sel dapat dijelaskan melalui 2 teori. Pertama, flavonoid mampu menembus membran dan mengganggu fungsi membran. Kedua, flavonoid dapat menyebabkan fusi membran, proses yang mengakibatkan keluarnya material intramembran dan agregasi (Cushnie dan Lamb, 2005). Flavonoid mengganggu metabolisme energi dengan cara menghambat sintesis protein dan konsumsi oksigen dalam sel bakteri (Haraguchi *et al.*, 1998; Salvatore *et al.*, 1998).

Tannin ditemukan dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri usus seperti *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, dan *Escherichia coli* dengan cara berikatan dengan zat besi. Zat besi dibutuhkan oleh sel bakteri untuk menjalankan fungsi-fungsi penting sel. Tannin memiliki efisiensi yang tinggi untuk berikatan dengan zat besi, sehingga membuat zat besi tidak tersedia untuk mikroorganisme. Selain itu, tannin juga ditemukan dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan cara berinteraksi dengan membran sel, dan dapat menghambat koagulasi plasma oleh *Staphylococcus aureus*. Mekanisme inhibisi koagulasi plasma oleh tannin yaitu dengan inhibisi produksi dan reaksi enzim. Tannin juga ditemukan dapat

meningkatkan aktivitas *antistaphylococcal* dari antibiotic β -lactam (Akiyama *et al.*, 2001).

Asam klorogenat memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Sebuah penelitian menemukan nilai MIC dari asam klorogenat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 40 μ g/mL. Penelitian ini juga menjelaskan mekanisme anti bakterial asam klorogenat terhadap patogen.

Asam klorogenat ditemukan meningkatkan permeabilitas membran luar dari sel bakteri, mengakibatkan hilangnya fungsi perlindungan dari membran sel.

Akibatnya bakteri menjadi lebih rentan terhadap efek antibiotik. Penelitian menemukan bahwa potensi ampicillin dan vankomisin terhadap MRSA dapat ditingkatkan jika diberikan bersamaan dengan asam klorogenat (Hemaiswarya dan Doble, 2010). Peningkatan permeabilitas membran sel juga akan menginduksi kebocoran dari nukleotida dan isi sitoplasma (Lou *et al.*, 2011).

2.3.4 Khasiat Seledri

Seledri merupakan tanaman yang memiliki khasiat yang banyak sebagai obat. Seledri dapat digunakan untuk mencegah penyakit kardiovaskular, *jaundice*, penyakit liver dan lien, obstruksi saluran kemih, gout, *rheumatic disorders*. Seledri juga dapat mengurangi glukosa dan lemak darah, dan tekanan darah. Biji seledri berguna dalam penanganan bronchitis, asthenopia, asma, kelainan kulit kronis, muntah, demam, dan tumor. Akar dari seledri bersifat diuretik dan digunakan dalam penanganan *colic* (Kooti dan Daraei, 2017). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa seledri memiliki efek antifungal (Momin dan Nair, 2001) dan antiinflamasi (Mencherini *et al.*, 2007). Minyak esensial seledri memiliki efek antibakteri (Atta dan Alkofahi, 1998). Selain digunakan sebagai obat, seledri juga digunakan sebagai bahan makanan. Seledri kaya akan nutrisi yang baik untuk kesehatan tubuh. Minyak esensial yang diekstraksi dari seledri merupakan agen perasa dalam industri makanan yang digunakan untuk menambah rasa dan aroma

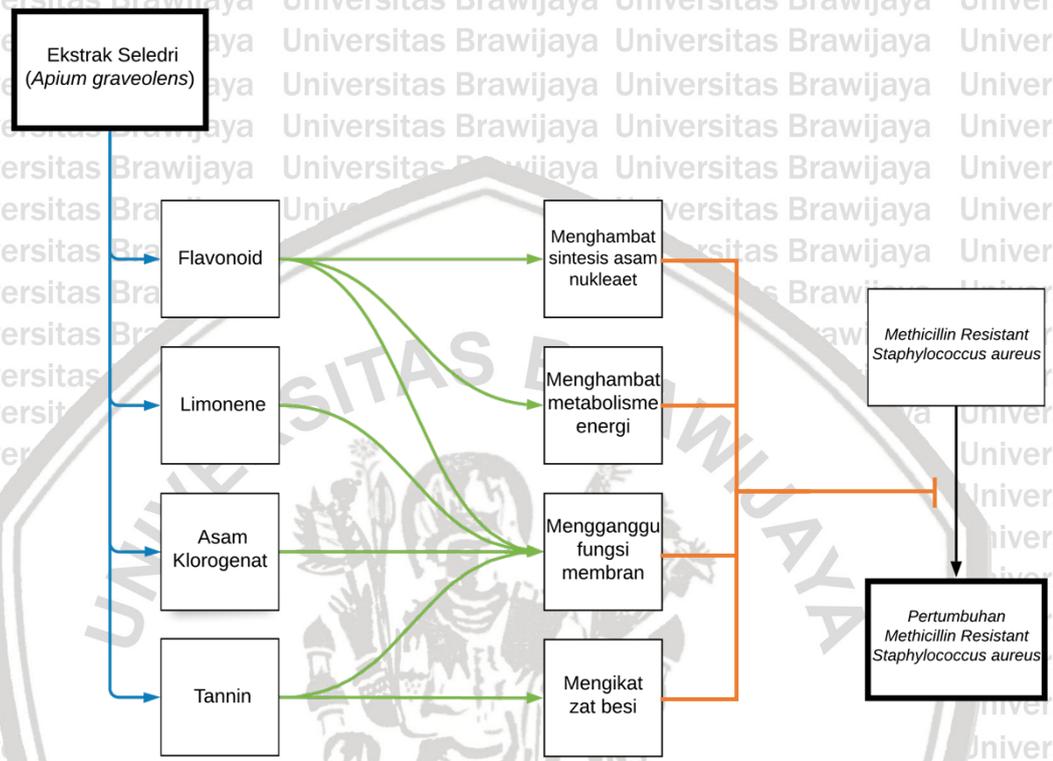
dari berbagai macam hidangan (Helaly et al., 2014).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan

- : Menghasilkan
- : Mekanisme kerja
- ⊥ : Mempengaruhi
- : Variabel diamati
- : Variabel tidak diamati

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) yang diduga dapat menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*. Komposisi utama dari minyak esensial daun seledri adalah limonen, flavonoid, tannin, dan asam klorogenat. Limonen memiliki kemampuan antibakteri dengan cara merusak protein dan lipopolisakarida pada membran sel bakteri. Flavonoid memiliki



kemampuan sebagai antibakteri dengan beberapa mekanisme, antara lain mengganggu sintesis protein, fungsi membran sitoplasma, dan metabolisme energi dari sel bakteri

Aktivitas antibakteri tannin dapat dijelaskan melalui kemampuannya dalam mengikat zat besi, sehingga menyebabkan bakteri tidak mendapat kebutuhan zat besi yang penting untuk menjalankan fungsi sel. Selain itu, tannin dapat mengganggu fungsi membran sel dan menghambat koagulasi plasma oleh *Staphylococcus aureus*. Asam klorogenat ditemukan mempunyai aktivitas antibakteri dengan cara meningkatkan permeabilitas membran luar pada sel bakteri. Akibatnya adalah kebocoran isi sitoplasma dan sekaligus membuat bakteri lebih rentan terhadap antibiotik. Dari fungsi yang didapatkan dalam kandungan seledri terhadap bakteri MRSA, maka dapat disimpulkan bahwa seledri mampu menghambat pertumbuhan MRSA.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.



BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group experimental* untuk mengetahui pengaruh antimikroba ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri MRSA.

Prosedur penelitian menggunakan metode dilusi tabung untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah bakteri MRSA yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito sebagai berikut (Lukito, 1998):

$$p(n-1) \geq 16$$

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22 \rightarrow n \geq 3,667 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (6 konsentrasi ekstrak *Apium graveolens*)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan April 2019.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun seledri dengan dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi ekstrak 1,675%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50% digunakan pada penelitian pendahuluan pertama. Pada penelitian pendahuluan kedua digunakan konsentrasi ekstrak 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%. Penelitian inti dilakukan dengan konsentrasi ekstrak 27%; 29%; 31%; 33%; 35%; 37%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kejernihan cairan pada tabung uji dan jumlah koloni bakteri MRSA pada medium NAP.

4.5 Definisi Operasional

- Daun seledri (*Apium graveolens*) yang dipakai untuk penelitian ini diperoleh dari Pasar Batu dan diekstrak di Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang.
- Ekstrak etanol *Apium graveolens* adalah daun seledri (*Apium graveolens*) yang telah dikeringkan dan diekstraksi dengan metode maserasi dan evaporasi menggunakan etanol 96%.
- Isolat bakteri MRSA adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat akan diidentifikasi ulang sebelum digunakan dalam penelitian.
- Standar kepadatan bakteri MRSA yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 10^6 CFU/mL (Murray *et al.*, 1999).
- Uji efektivitas ekstrak etanol seledri (*Apium graveolans*) sebagai antimikroba terhadap MRSA dilakukan dengan menilai hasil KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak seledri terendah yang dapat menghambat pertumbuhan MRSA. Jumlah ini ditandai dengan hilangnya kekeruhan pada tabung untuk pertama kalinya.
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak seledri terendah yang dapat membunuh bakteri MRSA. Jumlah ini ditandai dengan tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada medium NA yang telah dilakukan *streaking* dengan campuran larutan ekstrak dan bakteri atau dengan jumlah koloni bakteri $< 0,1\%$ *original inoculum*.
- Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok yang diberikan ekstrak *Apium graveolens* dengan konsentrasi 27%, 29%, 31%, 33%, 35%, dan 37%.
- *Original inoculum* adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml pada media agar padat yang digunakan untuk mencari kategori KBM.
- Kontrol bakteri adalah tabung berisi bakteri dengan konsentrasi ekstrak etanol sebesar 0% yang dapat digunakan untuk memastikan apakah ada kontaminasi bakteri lain.
- Kontrol bahan adalah bahan berupa larutan ekstrak etanol seledri untuk memastikan apakah bahan yang digunakan steril.
- Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan MRSA berdasarkan ketebalan garis hitam yang tampak di balik tabung.
- Pengamatan kuantitatif digunakan untuk mengukur pertumbuhan bakteri MRSA dengan menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*.

4.6 Instrumen penelitian

4.6.1 Alat

- *Object glass*
- *Bunsen burner*
- *Ose*
- *Disc/Plate* kosong steril

- Korek api
- Vortex
- Inkubator
- Mikroskop
- Nampan
- Timbangan

- Ekstraktor Soxhlet
- Waterbath
- Rotatory evaporator
- Cawan petri
- Mikropipet
- Spektrofotomer

4.6.2 Bahan

4.6.2.1 Untuk Identifikasi Bakteri MRSA

- | | |
|------------------|-------------------------|
| ➤ Kristal violet | ➤ Katalase kit |
| ➤ Lugol | ➤ Koagulase kit |
| ➤ Alkohol 96% | ➤ Kertas penghisap |
| ➤ Safranin | ➤ Cefoxitin <i>disc</i> |
| ➤ Aquadest | ➤ Mikroskop |
| ➤ Minyak imersi | |

4.6.2.2 Untuk Pembuatan Ekstrak Etanol *Apium graveolans*

- | | |
|--------------------------------|-----------------|
| ➤ Daun <i>Apium graveolans</i> | ➤ Air pendingin |
| ➤ 450 ml etanol | |

4.6.2.3 Untuk Uji Kepekaan Ekstrak Etanol *Apium graveolans*

- | | |
|--|--------------------|
| ➤ Isolat MRSA | ➤ Rak Tabung |
| ➤ Ekstrak etanol <i>Apium graveolans</i> | ➤ Tabung Reaksi |
| ➤ NaCl | ➤ Inkubator |
| ➤ Aquadest steril | ➤ Vortex |
| ➤ Nutrient Agar | ➤ Spektrofotometer |
| ➤ Nutrient Broth | ➤ Mikropipet |



4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Persiapan Bakteri dan indentifikasi MRSA

1. Inokulasi pada NAP

Lakukan *streaking* bakteri pada NAP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni *Staphylococcus aureus* pada NAP berwarna kuning emas, berbentuk bulat, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat, dan konsistensi lunak.

2. Pewarnaan Gram

- Ambil *object glass* lalu lewatkan diatas nyala api bunsen
- Teteskan setetes aquades steril diatas *object glass*
- Ambil inokulum bakteri yang akan diperiksa, lalu letakkan diatas tetesan aquades dan ratakan perlahan-lahan
- Tunggu sampai apusan kering
- Lakukan fiksasi dengan cara melewati apusan tersebut diatas nyala api dengan cepat
- Letakkan apusan diatas kawat penyangga yang berada diatas mangkuk pewarna.
- Teteskan larutan kristal violet pada apusan dan biarkan selama 60 detik
- Cuci dengan air mengalir
- Teteskan larutan iodin pada apusan, tunggu selama 60 detik
- Cuci larutan idoin dengan air mengalir
- Rendam dengan alkohol 96% selama 5-10 detik
- Teteskan larutan safranin, biarkan selama 30 detik
- Cuci dengan air mengalir lalu keringkan
- Amati sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x

- Hasil pengamatan di mikroskop berupa bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus warna biru atau ungu (gram positif).

3. Uji katalase

Uji katalase dilakukan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*

- Tuangkan 0,2 mL H₂O₂ 3% ke dalam tabung reaksi
- Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose
- Usapkan ose pada dinding tabung diatas permukaan cairan
- Tutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H₂O₂ 3% dapat mengenai usapan biakan bakteri

- Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung, menunjukkan bakteri *Staphylococcus*
- Hasil negatif ditandai dengan tidak adanya gelembung, menunjukkan bakteri *Streptococcus*

4. Uji koagulase

Slide Test

- Teteskan satu ose plasma darah dengan EDTA pada gelas objek yang kering dan bersih (gelas objek A)
- Teteskan air distilasi / air salin sebagai kontrol pada gelas objek B
- Ambil sedikit biakan kuman dengan ose. Buat suspensi dengan masing-masing gelas objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik
- Hasil positif ditandai dengan adanya penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada gelas objek A dan tidak ada penggumpalan pada gelas objek B. Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*.
- Hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua gelas objek. Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus* koagulase negatif.

5. Uji Cefoxitin

- Menggunakan metode *disc diffusion* (*Kirby Bauer method*) dan pedoman menurut tabel yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014.
- Koloni bakteri MRSA yang terpisah dan murni diambil dengan ose steril kemudian dilarutkan dalam 2 ml larutan NaCl fisiologis sampai mencapai konsentrasi 0.5 Mc Farland atau setara dengan kepadatan sel bakteri sebesar $1,5 \times 10^8$ bakteri/ml.
- Lidi kapas steril dimasukkan kedalam tabung larutan NaCl tersebut untuk mengambil inokulum bakteri dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit.
- Selanjutnya, larutan NaCl fisiologis yang telah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator, lidi kapas ditekan pelan ke permukaan bagian dalam dinding tabung yang berisi larutan NaCl tersebut, dipastikan tidak ada kelebihan cairan, kemudian lidi kapas ditarik keluar dari tabung.
- Lidi kapas digoreskan di atas Agar Mueller Hinton untuk membuat *streaking* pada permukaan Agar tersebut. Pembuatan *streaking* ini bertujuan untuk menumbuhkan koloni bakteri MRSA pada seluruh permukaan Agar.
- Agar Mueller Hinton dibiarkan mengering selama 2 menit, kemudian kertas cakram antibiotik *cefoxitin* diletakkan di atas Agar Mueller Hinton dengan jarak sebesar 24mm dari bagian tengah kertas cakram satu antibiotik ke antibiotik lainnya.
- Agar Mueller Hinton diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam setelah semua kertas cakram antibiotik terpasang.
- Hambatan pertumbuhan bakteri di atas Agar Mueller Hinton

selanjutnya diamati di sekitar cakram antibiotik.

- Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri untuk setiap jenis cakram antibiotika.
- Hasil pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri tersebut kemudian disesuaikan dengan tabel pengukuran kepekaan antibiotik yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014, sehingga dapat ditentukan apakah bakteri yang diujikan masih sensitif atau sudah resisten terhadap suatu antibiotik.
- Bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA teridentifikasi apabila didapatkan hasil resisten terhadap antibiotik cefoxitin (didapatkan hambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berdiameter <21mm).

4.7.2 Persiapan Suspensi Bakteri

MRSA yang sudah ditanam dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dikultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Suspensi bakteri MRSA pada medium NB dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 625nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya ($OD = \text{Optical density}$). Kemudian diencerkan dengan rumus pengenceran $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$, sehingga didapatkan kepadatan bakteri 10^6 CFU/mL.

4.7.3 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens*) Terhadap MRSA

Rangkaian uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens*) adalah sebagai berikut (diadopsi dengan penyesuaian dosis dari Murray *et al.*, 1999):

1. Siapkan 7 tabung steril, beri tanda KK, A, B, C, D, E, dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan (KB) adalah ekstrak etanol seledri. Kontrol bakteri (KB) adalah biakan bakteri MRSA dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml.
2. Masukkan 1,46 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda A, lalu tambahkan 0,54 ml ekstrak seledri.
3. Masukkan 1,42 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda B, lalu tambahkan 0,58 ml ekstrak seledri.
4. Masukkan 1,38 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda C, lalu tambahkan 0,62 ml ekstrak seledri.
5. Masukkan 1,34 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda D, lalu ditambahkan 0,66 ml ekstrak seledri.
6. Masukkan 1,3 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda E, lalu ditambahkan 0,7 ml ekstrak seledri.
7. Masukkan 1,26 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda F, lalu ditambahkan 0,74 ml ekstrak seledri.
8. Memasukkan 2 ml ekstrak seledri ke dalam tabung bertanda KB.
9. Dari tabung bertanda KF diambil 1 ose untuk diinokulasikan pada NAP (sebagai *original inoculum* (OI)).
10. Semua tabung dan plate *original inoculum* diinkubasi pada suhu 37° - $37,5^\circ$ C selama 18-24 jam.
11. Setelah 18-24 jam, derajat kekeruhan pada semua tabung diperhatikan dan dicatat. Derajat kekeruhan dapat dibaca dengan cara meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.

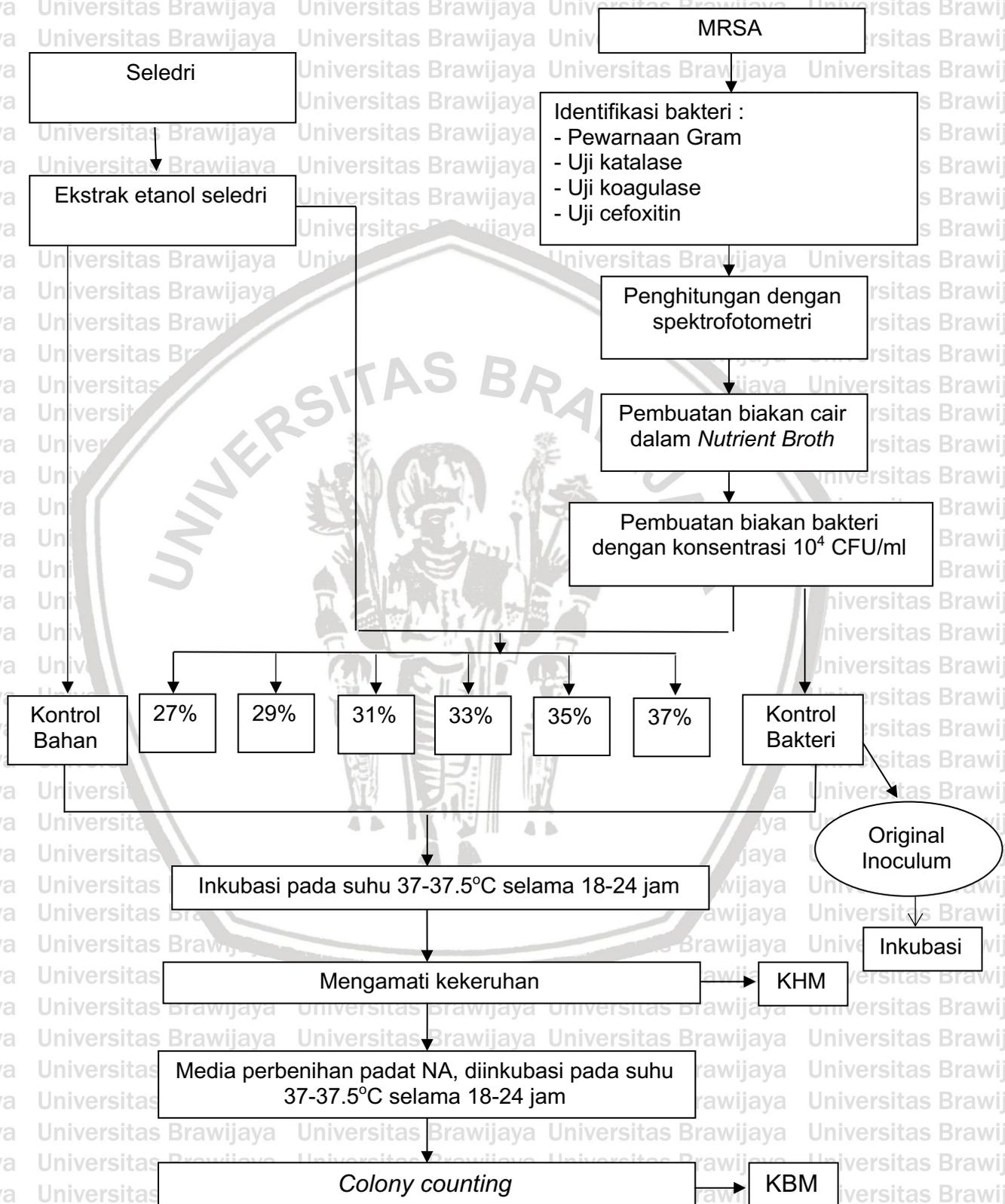
12. Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.

13. Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.

14. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni MRSA yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* adalah KBM.



4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

4.8 Analisis Data

Uji statistik dengan langkah – langkah pengujian sebagai berikut (Wijaya, 2011):

1. Uji normalitas data dengan menggunakan Kolmogorov Smirnov *test* jika terdapat lebih dari 50 data, untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik). Jika terdapat kurang dari 50 data, menggunakan Shapiro-Wilk *test*.
2. Uji homogenitas data dengan menggunakan Levene *test* untuk menguji apakah varian data homogen atau tidak homogen.
3. Berdasarkan hasil uji normalitas dan uji homogenitas, maka dapat dipilih jenis uji statistik yang akan digunakan:

	Data tersebar normal	Data tidak tersebar normal
Data homogen	uji parametrik	uji non-parametrik
Data tidak homogen	uji non-parametrik	uji non-parametrik

Jenis data untuk uji parametrik adalah data yang bersifat kuantitatif (interval atau rasio). Apabila jenis data bukan termasuk data kuantitatif melainkan data kualitatif (nominal atau ordinal), maka data tersebut tergolong pada data non-parametrik.

4. Uji komparasi digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* terhadap jumlah koloni bakteri MRSA. Uji komparasi untuk data parametrik dilakukan dengan cara berikut:
 - a) T - test, dengan syarat :
 - i. Uji ini dilakukan dengan jumlah data yang sedikit (kurang dari 30).
 - ii. Uji ini dilakukan apabila hanya terdapat satu perlakuan dalam variabel independen.
 - b) ANOVA, dengan syarat :

- i. Uji ini lebih baik dilakukan pada jumlah data yang lebih dari 30.
- ii. Uji ini dilakukan apabila terdapat lebih dari satu perlakuan dalam variabel independen

Jika data merupakan data non-parametrik maka uji komparasi yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis.

5. Uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui pengaruh dari tiap-tiap variabel independen terhadap variabel dependen. Uji *Post Hoc* pada data parametrik dilakukan dengan Tukey HSD. Jika data non parametrik maka digunakan uji *Mann Whitney*.

6. Uji korelasi digunakan untuk mengetahui kekuatan dan bentuk hubungan antara konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* dengan pertumbuhan MRSA. Uji korelasi pada data parametrik dilakukan dengan uji *Pearson*. Apabila data non-parametrik maka digunakan uji *Spearman*.

7. Uji Regresi dilakukan untuk besarnya probabilitas perubahan variabel dependen yang disebabkan oleh perubahan pada variabel independen setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian. Uji regresi dilakukan apabila data bersifat parametrik.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

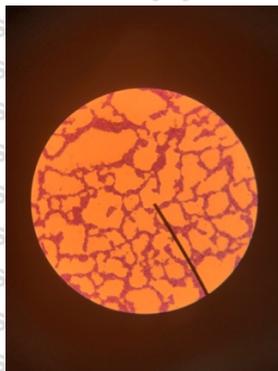
5.1 Hasil Identifikasi Bakteri Uji

Bakteri MRSA yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat yang dikultur di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Untuk identifikasi, isolat bakteri dikulturkan pada medium Nutrient Agar Plate (NAP), lalu dilakukan pewarnaan gram, tes katalase, tes koagulase, dan uji kepekaan antibiotik. Semua isolat yang dikultur pada medium NAP menghasilkan koloni berbentuk bulat, sedikit cembung dan berwarna kuning keemasan. Pada pewarnaan gram, didapatkan bakteri kokus berbentuk bulat dan berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri kokus gram positif. Pada tes katalase didapatkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara. Terbentuknya gumpalan seperti pasir pada tes koagulase menunjukkan hasil positif. Pada uji kepekaan antibiotik (cefoxitin), diameter zona inhibisi sebesar 11mm menunjukkan bahwa isolat tersebut adalah *strain* MRSA.

Tabel 5.1 Hasil Identifikasi Bakteri MRSA

Gram	Tes Katalase	Tes Koagulase	Uji Cefoxitin (zona inhibisi < 21 mm)
+	+	+	+





Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan gram *Staphylococcus aureus*

Pada pewarnaan gram isolat *Staphylococcus aureus*, ditemukan gambaran bakteri bulat bergerombol seperti anggur berwarna ungu. Warna ungu menandakan adanya lapisan peptidoglikan yang tebal pada dinding sel bakteri, yang berarti bakteri tergolong dalam bakteri Gram positif.



Gambar 5.2 Hasil Tes katalase Isolat *Staphylococcus*

Bakteri *Staphylococcus* menghasilkan enzim katalase yang membedakannya dari *Streptococcus*. Hasil tes katalase menunjukkan gambaran terbentuknya gelembung udara menandakan hasil positif tes katalase.



Gambar 5.3 Hasil Tes Koagulasi Isolat *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dibedakan dengan spesies *Staphylococcus* lainnya dengan enzim koagulasi yang dihasilkannya. Hasil tes koagulasi menunjukkan terbentuknya gumpalan seperti pasir menandakan hasil positif tes koagulasi.



Gambar 5.4 Hasil Uji Cefoxitin Isolat MRSA

Bakteri *Staphylococcus aureus strain* MRSA teridentifikasi apabila didapatkan hasil resisten terhadap antibiotik cefoxitin (didapatkan hambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berdiameter <21mm).

5.2. Gambaran Ekstrak Seledri

Ekstrak seledri berwarna hijau kekuningan. Ekstraknya cair dan terdapat banyak ampas seledri yang tidak larut.



Gambar 5.5 Ekstrak Seledri

5.3 Hasil Uji Hambat Pertumbuhan Bakteri

5.3.1 Hasil Uji Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan dengan konsentrasi 1,675%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%. Hasil penelitian pendahuluan digunakan sebagai dasar pemilihan konsentrasi untuk penelitian inti. Penelitian pendahuluan menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 25% pada tabung, kemudian dilakukan *streaking* dari tabung ke medium NAP. Hasil *streaking* tidak adanya bakteri yang tumbuh pada konsentrasi 50%.

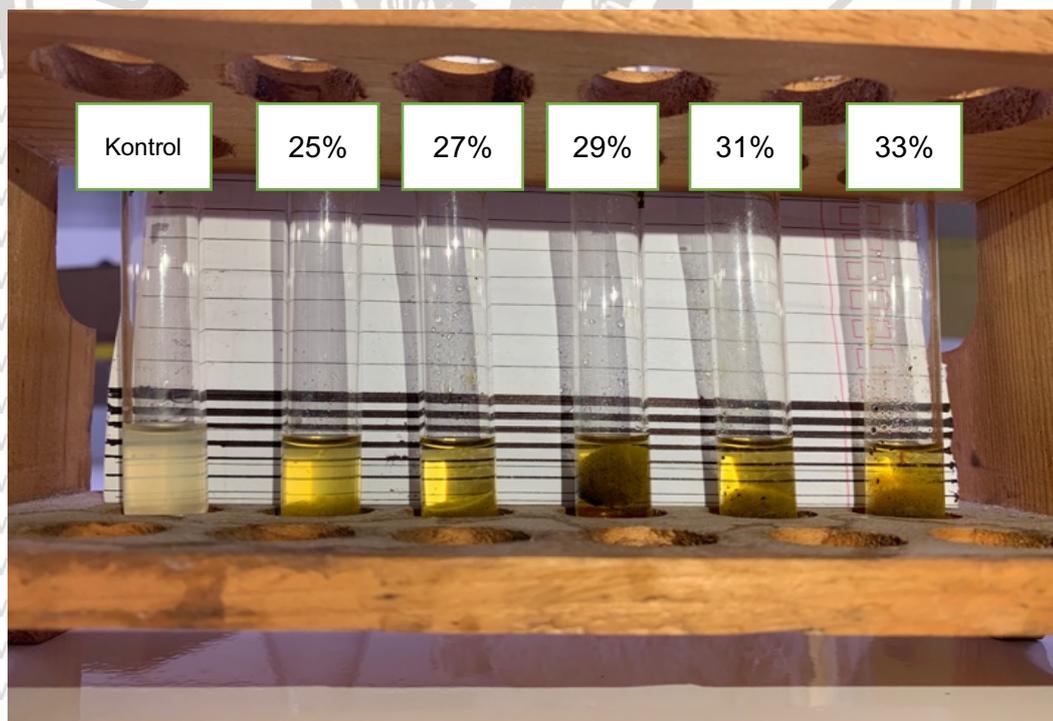
Untuk mempersempit interval konsentrasi, dilakukan penelitian pendahuluan kedua dengan konsentrasi 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 0% sebagai kontrol negatif. Hasil pengamatan pada tabung menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 25%. Setelah itu dilakukan *streaking* dari tabung ke medium NAP. Hasil *streaking* menunjukkan adanya tidak adanya bakteri yang tumbuh pada konsentrasi 35%.

5.3.2 Hasil Penelitian Inti

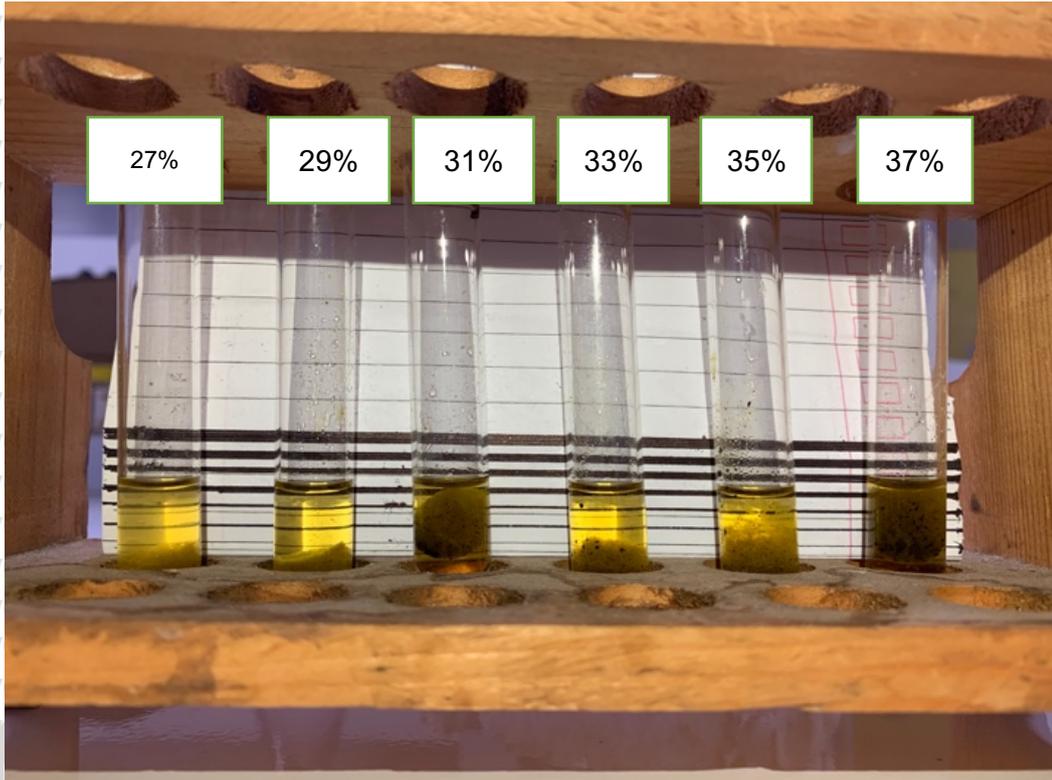
5.3.2.1 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM

Pada penelitian inti digunakan 6 macam konsentrasi yaitu 27%, 29%, 31%, 33%, 35%, 37%, dan 0% sebagai kontrol negatif. Kadar Hambar Minimal (KHM) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari antimikroba yang menghambat pertumbuhan dari suatu organisme yang tampak secara visual setelah inkubasi semalaman (Andrews, 2001).

Berdasarkan hasil pengamatan, tabung dengan konsentrasi 25% menunjukkan kekeruhan. Sedangkan pada tabung dengan konsentrasi 27% tidak didapatkan adanya kekeruhan pada cairan. Hasil ini ditunjukkan dengan terlihatnya semua garis di belakang tabung dengan jelas. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa KHM dari ekstrak seledri terhadap pertumbuhan bakteri MRSA adalah 27% (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Hasil Pengamatan Kekeruhan Isolat MRSA



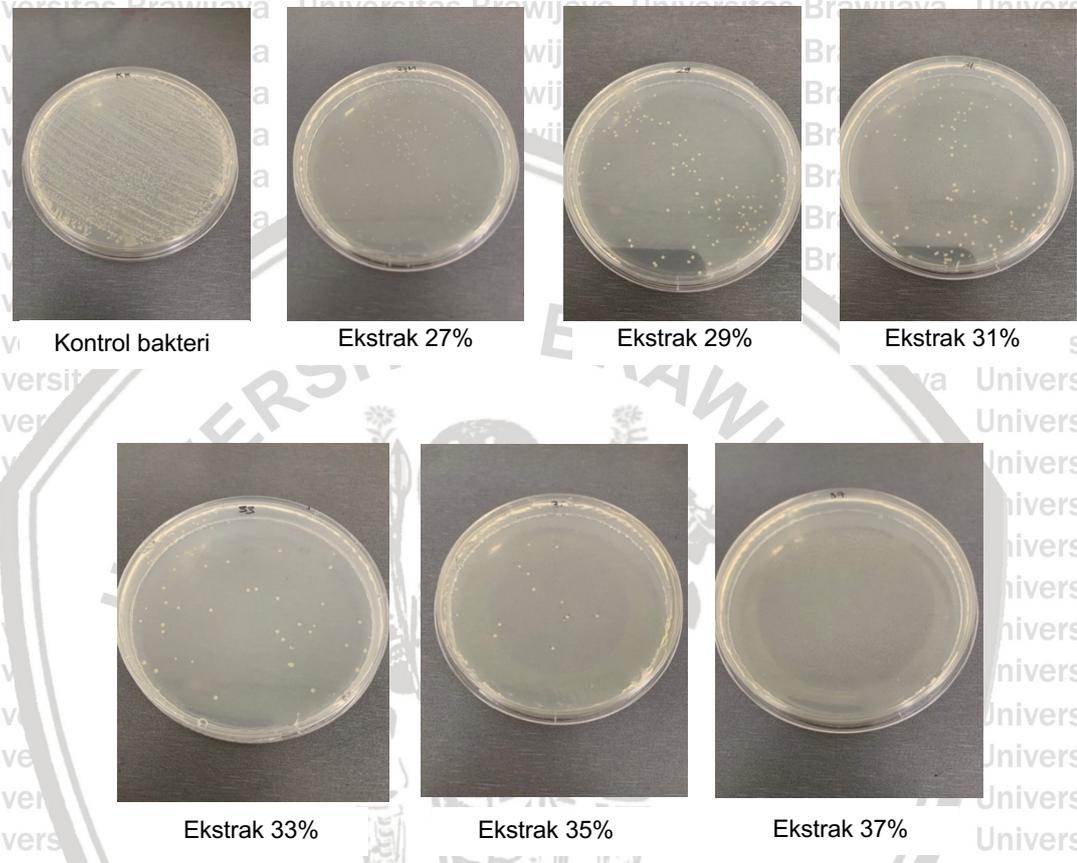
Gambar 5.7 Hasil Pengamatan Kekeruhan Isolat MRSA

5.3.2.2 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM

KBM (Kadar Bunuh Minimal) dapat didefinisikan sebagai kadar terendah dari antimikroba yang dapat membunuh suatu organisme (ditandai dengan tidak tumbuhnya organisme pada medium) atau pertumbuhan koloninya $<0,1\%$ dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum / OI*). Hasil *streaking* bakteri MRSA pada NAP dapat dilihat pada Gambar 5.8.

Setelah mengamati tingkat kekeruhan tabung untuk menentukan KHM, setiap konten tabung diinokulasikan pada medium NAP, lalu NAP diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah inkubasi, dilakukan penghitungan koloni bakteri yang tumbuh pada medium NAP menggunakan *colony counter*, kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

KBM dari ekstrak seledri terhadap MRSA dapat ditentukan berdasarkan hasil inokulasi dan penghitungan koloni bakteri MRSA pada medium NAP. Hasil penghitungan koloni yang tumbuh di medium NAP dengan menggunakan *colony counter* dapat dilihat pada Tabel 5.2.



Gambar 5.8 Pertumbuhan Koloni MRSA pada *Nutrient Agar Plate*

Tabel 5.2 Hasil Penghitungan Koloni Bakteri yang Tumbuh Pada NAP

KONSENTRASI EKSTRAK	JUMLAH KOLONI PER KONSENTRASI EKSTRAK				RATA - RATA
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	
0%	∞	∞	∞	∞	∞
27%	207	212	199	202	205
29%	135	126	140	138	134,75
31%	104	97	92	101	98,5
33%	52	54	57	49	53
35%	15	17	19	20	17,75
37%	0	0	0	0	0

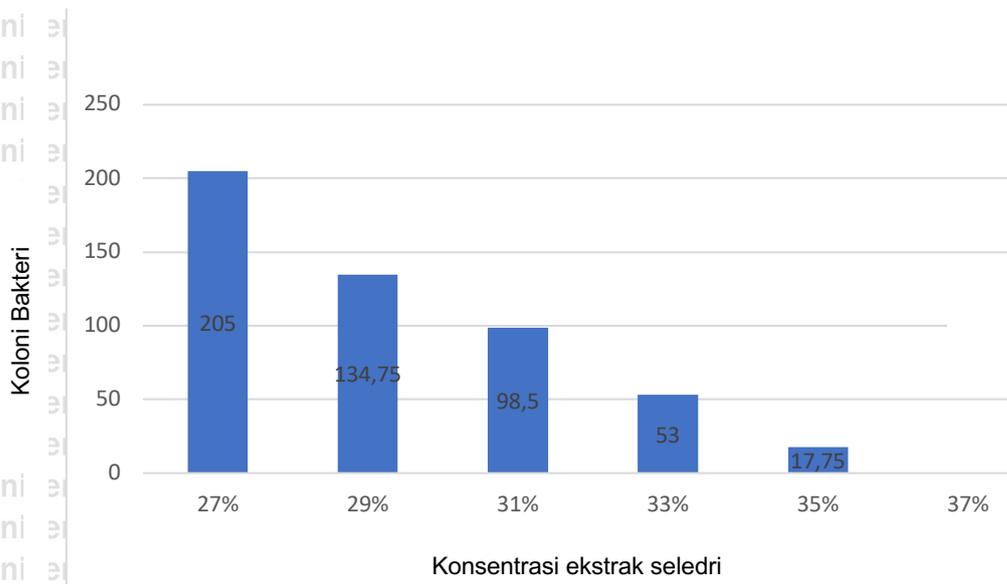
Keterangan: ∞ = Tidak terbatas (tidak bisa dihitung karena terlalu banyak)

Data pada Gambar 5.6 dan Tabel 5.2 merupakan data hasil perhitungan jumlah koloni lalu digambarkan ke dalam sebuah grafik rerata jumlah koloni yang menunjukkan hubungan antara pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak seledri terhadap jumlah koloni MRSA yang tumbuh pada medium NAP (Gambar 5.9).

Grafik rerata jumlah koloni menunjukkan penurunan pada setiap peningkatan 2% ekstrak seledri dan KBM pada konsentrasi 37% yang ditandai dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada agar. Gambaran tentang interaksi antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni yang tumbuh dapat dilihat pada Gambar

5.9.





Gambar 5.9 Grafik Hasil Jumlah Koloni terhadap Berbagai Konsentrasi Ekstrak Seledri

5.4 Analisis Data

Analisis hasil penelitian ini menggunakan analisis statistik SPSS versi 16.0.

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

5.4.1 Uji *One-Way ANOVA*

Pengujian *One-Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui perbedaan nyata antara konsentrasi ekstrak seledri terhadap rerata pertumbuhan koloni empat kali pengulangan isolat MRSA. Dari hasil uji *One-Way ANOVA* (Lampiran 3.1) didapatkan angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini berarti efek perubahan konsentrasi ekstrak seledri terhadap jumlah koloni rata-rata adalah berbeda secara signifikan pada taraf kepercayaan 95%.

5.4.2 Uji *Post Hoc Tukey*

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) untuk mengetahui signifikansi antara masing-masing kelompok

data. Perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok data ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$).

Untuk mengetahui kelompok konsentrasi mana yang rata-ratanya tidak berbeda dilakukan uji lanjut *Homogenous Subsets* pada lampiran 3.3.

Hasil *Post Hoc test (Tukey's Test)* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara konsentrasi ekstrak seledri dengan jumlah koloni bakteri MRSA yang tumbuh pada medium NAP.

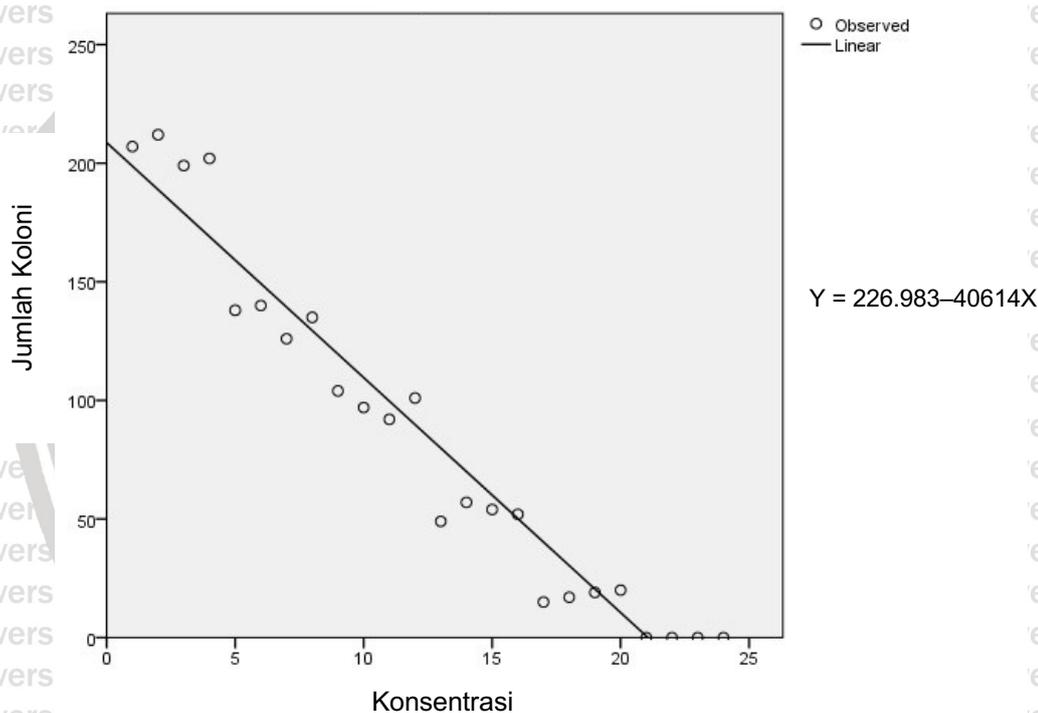
5.4.3 Uji Korelasi dan Regresi

Uji Korelasi (Lampiran 4.1) menunjukkan angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak seledri dengan jumlah koloni bakteri MRSA yang tumbuh. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu $R = -0,982$. Tanda negatif menandakan hubungan terbalik antara konsentrasi seledri dengan jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak seledri maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh, begitu juga sebaliknya. Nilai 0,982 menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara perbedaan konsentrasi dengan jumlah pertumbuhan bakteri karena nilai koefisien (0,982) yang lebih besar dari 0,5.

Uji regresi digunakan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menganalisis hubungan antara dua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini, uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan penghambatan pertumbuhan koloni bakteri.

Koefisien Determinasi R Kuadrat (R^2) sebesar 0,965 berarti bahwa kontribusi pemberian ekstrak seledri dalam menurunkan jumlah koloni bakteri MRSA sebesar 96,5% sedangkan sisanya 3,5% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut bisa merupakan akibat dari lama penyimpanan ekstrak atau akibat resistensi bakteri.

Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak seledri dengan pertumbuhan koloni bakteri MRSA dapat dinyatakan dengan rumus $Y = 226.983 - 40614X$. Y adalah jumlah koloni bakteri MRSA sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak seledri. Hal ini berarti tanpa pemberian ekstrak seledri maka jumlah koloni bakteri MRSA yang tumbuh di medium NAP akan meningkat konstan yaitu 226.983. Dengan pengaruh ekstrak maka setiap peningkatan konsentrasi ekstrak seledri sebesar 1% menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri hingga 40.614 koloni bakteri.



Gambar 5.10 Grafik Persamaan Linier Uji Regresi dari Jumlah Koloni MRSA terhadap Konsentrasi Ekstrak Etanol Seledri

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak seledri sebagai penghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Bakteri MRSA yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Seledri (*Apium graveolens*) merupakan tanaman mudah ditemui dan sangat umum digunakan masyarakat. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan banyaknya manfaat yang dimiliki seledri. Kandungan dalam seledri yang diduga berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri adalah tannin, flavonoid, asam klorogenat, dan limonene. Seledri yang digunakan dalam penelitian didapatkan dalam bentuk simplisia dan diekstraksi di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

Pada penelitian ini, metode dilusi tabung digunakan untuk menguji efek ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri. Kadar Hambat Minimal (KHM) ditentukan melalui pengamatan secara kualitatif dengan cara melihat tabung dengan konsentrasi ekstrak minimal yang jernih. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan cara melakukan *streaking* masing-masing konsentrasi dilusi tabung ke medium *Nutrient Agar Plate* (NAP), lalu menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh menggunakan *colony counter*.

Penelitian pendahuluan dilakukan sebelum penelitian inti sebagai dasar untuk memilih konsentrasi ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian inti.

Penelitian pendahuluan dilakukan 2 kali, dengan konsentrasi 1,675%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50% pada penelitian pendahuluan pertama. Penelitian pendahuluan pertama menunjukkan kejernihan pada tabung dengan konsentrasi ekstrak 25%. Hasil *streaking* pada medium NAP menunjukkan bahwa pada

konsentrasi ekstrak 50% tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Untuk mempersempit interval konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan kedua dengan konsentrasi 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%. Penelitian pendahuluan kedua menunjukkan kejernihan pada tabung dengan konsentrasi ekstrak 25%. Hasil *streaking* pada medium NAP menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 35% tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan penelitian inti dengan konsentrasi ekstrak 25%; 27%; 29%; 31%; 33%; 35%. Namun hasil penelitian inti tidak sesuai dengan penelitian pendahuluan. Penelitian inti menunjukkan bahwa konten dari tabung masih keruh pada konsentrasi ekstrak 25% dan jernih pada konsentrasi 27%. Selain itu, hasil *streaking* pada medium NAP menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 35% masih terdapat pertumbuhan bakteri. Penulis memperkirakan hal ini terjadi karena adanya penurunan potensi antibakteri dari ekstrak seledri. Hal bisa terjadi karena adanya perbedaan waktu selama 2 minggu antara penelitian pendahuluan dan penelitian inti dikarenakan libur Hari Raya Idul Fitri.

Berdasarkan temuan tersebut, dilakukan penelitian inti dengan konsentrasi ekstrak 27%; 29%; 31%; 33%; 35%; 37%. Hasil penelitian inti menunjukkan bahwa rerata jumlah koloni bakteri yang tumbuh berkurang seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak seledri. Hal tersebut membuktikan bahwa seledri memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Dalam penelitian ini didapatkan KHM adalah 27%, ditunjukkan dengan kejernihan pada tabung reaksi dengan konsentrasi ekstrak 27%. KBM didapatkan pada konsentrasi 37%, ditunjukkan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada konsentrasi ekstrak 37%.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak seledri (*Apium graveolens*) memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri MRSA.

Kenaikan konsentrasi ekstrak akan meningkatkan efek hambatan. Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari penelitian ini adalah potensi penggunaan seledri (*Apium graveolens*) sebagai alternatif terapi pada infeksi MRSA. Potensi hambatan pertumbuhan MRSA dari seledri diharapkan dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan infeksi MRSA, serta dapat menjadi alternatif terapi untuk mengurangi risiko timbulnya resistensi bakteri terhadap antibiotik.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Confounding factor dalam penelitian ini adalah lamanya penyimpanan ekstrak yang kemungkinan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Belum jelas apakah lama penyimpanan ekstrak berpengaruh terhadap tingkat efektifitas.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah pengamatan yang dilakukan secara visual untuk melihat Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak seledri terhadap pertumbuhan bakteri MRSA. Selain itu, ampas ekstrak seledri yang tidak larut pada tabung menyulitkan pengamatan visual terhadap kejernihan larutan dalam tabung. Lama inkubasi dan waktu pengamatan hasil dilusi tabung serta *streaking* juga tidak konsisten antar penelitian.

Ekstrak seledri yang digunakan dalam penelitian ini tidak melalui proses ekstraksi yang secara spesifik menghasilkan satu jenis zat aktif. Berdasarkan keterbatasan tersebut, tidak diketahui zat aktif manakah yang paling berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai potensi masing-masing zat aktif yang terkandung dalam seledri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Diharapkan penelitian mengenai

efek ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dapat dilanjutkan dan kelak akan berguna bagi masyarakat luas.

6.4 Penelitian terkait Seledri (*Apium graveolens*)

Seledri adalah salah satu tanaman yang sangat umum digunakan sebagai bumbu masakan dan tanaman obat di Indonesia. Penelitian pada tahun 2005 menunjukkan bahwa ekstrak daun dan akar seledri menghambat sebagian besar pertumbuhan bakteri uji seperti *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Bacillus cereus*, dan *Enterobacter faecalis*. Pada penelitian ini, *Bacillus cereus* ditemukan sebagai bakteri yang paling sensitif terhadap ekstrak seledri. Hal ini ditunjukkan dengan didapatkannya zona inhibisi pada semua konsentrasi dari ekstrak seledri yang diujikan. Akan tetapi, ekstrak seledri ditemukan tidak aktif terhadap *Citrobacter freundii* dan *Proteus vulgaris*. (Sipaillene *et al.*, 2005).

Penelitian pada tahun 2015 dengan metode *disc diffusion* menunjukkan aktivitas antibakteri seledri terhadap sejumlah bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif yang dimaksud adalah *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*, sedangkan bakteri Gram negatif yang dimaksud adalah *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Salmonella*. Selain itu seledri juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap sejumlah fungi antara lain *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Aspergillus niger*, dan *Penicillium digitatum*. Komponen utama pada seledri yang teridentifikasi pada penelitian ini adalah limonene (Mousa *et al.*, 2015).

Penelitian pada tahun 2016 membuktikan bahwa ekstrak etanol seledri memiliki aktivitas antibakteri yang poten terhadap bakteri uropatogen yaitu *Eschericia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. Amikacin digunakan sebagai antibiotik referensi pada penelitian ini. Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh seledri tidak jauh berbeda dari amikacin. Selain itu, penelitian ini menunjukkan bahwa

terdapat perbedaan signifikan ($p < 0.05$) dalam efektivitas dari 2 konsentrasi ekstrak yang digunakan. Hal ini menandakan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak akan meningkatkan potensi antibakteri dari ekstrak tersebut (Ghazi *et al.*, 2016).

Type of extract	Concentration	Zone of inhibition against isolates(mm)	
		E.coli	K.pneumoniae
Celery extract	100 mg/ml	17.48±0.91	20.1±0.33
	200 mg/ml	26.82±1.03	26.98±0.9
Amikacin	10 µg	28.84±2.12	26.12±1.42
Negative control	---	0±0	0±0

Tabel 6.1 Efek inhibisi dari seledri dibandingkan dengan amikacin terhadap bakteri uropatogen (Ghazi *et al.*, 2016)

Pada penelitian ini dipilih ekstrak etanol dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan, akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan luar sel sehingga metabolit sel yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Selain itu, ekstraksi senyawa dengan metode ini akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Hosettmann, 1991).

Penelitian mengenai efektivitas antimikroba tanaman lainnya terhadap MRSA sudah pernah dilakukan. Penelitian pada tahun 2011 menguji efektivitas daun ceplukan (*Physalis angulata L*) sebagai antimikroba terhadap MRSA.

Kandungan fitokimia yang terkandung dalam daun ceplukan diantaranya adalah plifenol, flavonoid, dan alkaloid. Pada penelitian ini, pembuatan ekstrak daun ceplukan dilakukan melalui proses pengeringan dan ekstraksi dengan etanol 96%.

Metode penelitian adalah dilusi tabung untuk menentukan KHM dan KBM. KHM tidak bisa diamati karena kekeruhan pada ekstrak, sedangkan didapatkan KBM daun ceplukan terhadap MRSA adalah 70% (Fitrianti *et al.*, 2011). Bila

dibandingkan dengan aktivitas antimikroba ekstrak etanol seledri terhadap MRSA, maka ekstrak etanol seledri lebih efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata L.*)

6.5 Mekanisme Antimikroba Seledri (*Apium graveolens*)

Zat dengan potensi antibakteri yang terkandung dalam seledri antara lain flavonoid, tannin, limonene, dan asam klorogenat. Keempat zat ini memiliki mekanisme kerja yang berbeda-beda terhadap sel bakteri. Ada zat yang kurang efektif jika bekerja sendiri tetapi jika dikombinasikan dengan zat lain dapat meningkatkan efek zat terhadap bakteri. Contoh pada kasus ini adalah asam klorogenat yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas membran luar sel bakteri. Hal ini mengakibatkan hilangnya fungsi perlindungan dari sel bakteri, sehingga meningkatkan penetrasi zat lain ke sel bakteri (Lou *et al.*, 2011).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dijelaskan dengan 3 hal antara lain inhibisi sintesis asam nukleat, inhibisi fungsi membran sitoplasma, dan inhibisi metabolisme energi (Cushnie dan Lamb, 2005). Tannin dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara berikatan dengan zat besi. Zat besi dibutuhkan oleh bakteri untuk menjalankan fungsi-fungsi sel. Efisiensi ikatan yang tinggi antara tannin dengan zat besi mengakibatkan zat besi tidak tersedia untuk bakteri (Akiyama *et al.*, 2001). Limonen memiliki kemampuan untuk merusak protein dan lipopolisakarida pada membran sel bakteri (Espina *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak seledri mempunyai efek antibakteri terhadap MRSA secara *in vitro*.

Hal ini makin diperkuat dengan adanya bukti – bukti tentang penelitian terkait yang telah dilakukan sebelumnya.

BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun seledri (*Apium graveolens*) dapat menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*. Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak seledri untuk menghambat pertumbuhan MRSA adalah 27%, sedangkan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak seledri untuk mencegah pertumbuhan MRSA dicapai pada konsentrasi 37%. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa terdapat penurunan rerata jumlah koloni bakteri yang tumbuh seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan saya menyarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Penelitian lebih lanjut mengenai efek lama simpan ekstrak terhadap efektivitas ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) sebagai penghambat pertumbuhan bakteri MRSA.
2. Peneliti selanjutnya diharapkan untuk melakukan penelitian dengan memperhatikan lama inkubasi dan waktu pengamatan hasil dilusi tabung serta *streaking* supaya konsisten antar penelitian.
3. Penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif yang terkandung dalam seledri (*Apium graveolens*) yang dapat berperan sebagai penghambat pertumbuhan bakteri.
4. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif seledri (*Apium graveolens*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri tanpa menimbulkan efek toksik.

5. Penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan metode lain untuk bisa menentukan KHM ekstrak seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri MRSA secara objektif.
6. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak seledri (*Apium graveolens*) dalam menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vivo*.
7. Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak seledri (*Apium graveolens*).



Daftar Pustaka

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., & Iwatsuki, K. 2001. JAC Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*, 487–491.

Al-Asmari, AbdulrahmanKhazim & Athar, Tanwir & Kadasah, SaeedG. 2017. An Updated Phytopharmacological Review on Medicinal Plant of Arab Region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacognosy Reviews*. 11. 13. 10.4103/phrev.phrev_35_16.

Al-snafi, A. E. 2017. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS), (January 2014).

Ali Mohammed Ghazi Jaber Afat Alwan Al-waily, K. H. A. 2016. The inhibitory effect of celery, peppermint extracts and their mixture in comparison with amikacin on uropathogenic isolates: an in vitro study. *Journal of Kerbala University*, 12(0), 229–237.

Andrews, J. M. 2001. JAC Determination of minimum inhibitory concentrations, 5–16.

AR, Dwi & AS, Noorhamdani & Karyono, Setyawati. 2011. Efektivitas Ekstrak Daun Ceplukan sebagai Antimikroba terhadap Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 26. 212-215. 10.21776/ub.jkb.2011.026.04.6.

Atta, A. H., & Alkofahi, A. 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 117–124.

Baananou, S., Bouffira, I., & Mahmoud, A. 2013. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters Antitumorogenic and antibacterial activities of *Apium graveolens* essential oil and extract, (June), 37–41.

Berends, E. T. M., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & Von Köckritz-Blickwede, M. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus*

facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of Innate Immunity*, 2(6), 576–586.

Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens*, 2011, 601905.

Boswihi, Samar & Udo, Edet. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : An update on the Epidemiology, treatment options and Infection Control. *Current Medicine Research and Practice*. 8.

Carroll, K. C. 2008. Rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Current status. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 12(1), 15–24.

Carroll, R. K., Weiss, A., Broach, W. H., Wiemels, R. E., Mogen, A. B., Rice, K. C., & Shaw, N. 2016. Analysis of Regulatory or Small RNA Gene Expression in *Staphylococcus aureus*, 7(1), 1–13.

Cha, J.-O., Yoo, J. I., Yoo, J. S., Chung, H.-S., Park, S.-H., Kim, H. S., ... Chung, G. T. 2013. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 4(5), 225–232.

Chan, Y. G. Y., Kim, H. K., Schneewind, O., & Missiakas, D. 2014. The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15680–15690.

Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K. P., Peschel, A., & Götz, F. 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and Immunity*, 74(8), 4950–4953.

Costa, A.R., Batistão, D.W., Ribas, R.M., Sousa, A.M., Pereira, M.O., & Botelho, C.M. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease.

D. Sue Katz. 2010. Coagulase test protocol.

David, M. Z., & Daum, R. S. 2010. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616–687.

Dinges, Martin & Orwin, Paul & Schlievert, Patrick. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 13. 16-34, table of contents. 10.1128/CMR.13.1.16-34.2000.

Erikawati, D., Santosaningsih, D., Santoso, S., Dewi, K., Laboratorium, E., Fakultas, M., ... Malang, J. V. 2016. Tingginya Prevalensi MRSA pada Isolat Klinik Periode 2010- 2014 di RSUD Dr . Saiful Anwar Malang , Indonesia The High Prevalence of MRSA in Clinical Isolates in the period of 2010-2014 in Dr Saiful Anwar General Hospital Malang , Indonesia, 29(2), 149–156.

Espina, L., Gelaw, T. K., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. 2013. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. *PLoS ONE*, 8(2), 1–10.

Fazal, Syed & Singla, Rajeev K. 2012. Review on the Pharmacognostical & Pharmacological Characterization of *Apium Graveolens* Linn. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2. 36-42.

Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 948–958.

Green, B. N., Johnson, C. D., Egan, J. T., Rosenthal, M., Griffith, E. A., & Evans, M. W. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview for manual therapists. *Journal of Chiropractic Medicine*, 11(1), 64–76.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125–129.

Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., ... Holden, M. T. G. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biology*, 18(1), 130.

Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G., Lambert, P., Stickler, D., & Eley, A. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4, 39–60.

Hassoun, A., Linden, P. K., & Friedman, B. 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care (London, England)*, 21(1), 211.

Helaly, Alaaeldin & El-Refy, Ali & Mady, Emad & Mosa, Kareem & Craker, Lyle. 2014. Morphological and Molecular Analysis of Three Celery Accessions. *Journal of Medicinally Active Plants*. 2. 2.

Hemaiswarya, S., & Doble, M. 2010. Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria Printed in Great Britain, 1469–1476.

Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836.

Hetem, D. J., Bootsma, M. C., Troelstra, A., & Bonten, M. J. (2013). Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, 19(11), 1797–1802.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10), 486–493.

Ibberson, C. B., Jones, C. L., Singh, S., Wise, M. C., Hart, M. E., Zurawski, D. V., & Horswill, A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. *Infection and Immunity*, 82(10), 4253–4264.

Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., & Tarkowski, A. 2004. *Staphylococcus aureus* Resists Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1169–1176.

Kang, C. I., Song, J. H., Ko, K. S., Chung, D. R., & Peck, K. R. 2011. Clinical features and outcome of *Staphylococcus aureus* infection in elderly versus younger adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(1), e58–e62.

Karen Reiner. 2010. Catalase test protocol.

Kenny, J. G., Moran, J., Kolar, S. L., Ulanov, A., Li, Z., Shaw, L. N., ... Horsburgh, M. J. 2013. Mannitol Utilisation is Required for Protection of *Staphylococcus aureus* from Human Skin Antimicrobial Fatty Acids. *PLOS ONE*, 8(7), 1–9.

Kong, C., Neoh, H. M., & Nathan, S. 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, 8(3), 1–21.

Kooti, W., & Daraei, N. 2017. A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens* L). *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22(4), 1029–1034.

Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18033.

Lee, J. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., & Lee, J. 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29(5), 491–499.

Liu, G., Zhuang, L., Song, D., Lu, C., & Xu, X. (2016). *Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (Apium graveolens L. var. dulce Mill./Pers.)*. *Journal of Separation Science*, 40(2), 472–479.

Liu, George, Y. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. Pediatric research. *Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, 65(5 pt 2), 71R–77R.

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid, 76(6).

LR, A Tiwari, SP Devkota, S Khatiwada, S Paudyal and KR Pande, 2014.

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy farms of Pokhara, Nepal. *Inter J Vet Sci*, 3 (2): 87-90.

Malhotra, S. K. 2006. Celery. *Handbook of Herbs and Spices*, 317–336.

Marezzo, A. W., & Schneewind, O. 2006. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *BioMetals*, 19(2), 193–203.

McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S., & Jernigan, D. B. 2006.

Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11), 1715–1723.

Medvedova, A., & Valik, L. 2012. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. *Structure and Function of Food Engineering*, 32.

Mencherini, T., Cau, A., Bianco, G., Loggia, R. Della, Aquino, R. P., & Autore, G. 2007. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(6), 891–897.

Mohamed Mousa, Esraa Ahmed & HM, Hassanen & AMF, Eissa & SAM, Hafez.

2015. Antioxidant and antimicrobial activity of celery (*Apium graveolens*) and coriander (*Coriandrum sativum*) herb and seed essential oils. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3. 284-296.

Momin, R. A., & Nair, M. G. 2001. Mosquitocidal, Nematicidal, and Antifungal Compounds from *Apium graveolens* L. Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 142–145.

Nagella, P., Ahmad, A., Kim, S. J., & Chung, I. M. 2012. Chemical composition, antioxidant activity and larvicidal effects of essential oil from leaves of *Apium graveolens*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 34(2), 205–209.

Neal Chamberlain. 2009. Coagulase test for staphylococcus species.

O'Riordan, K., & Lee, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 218–234. doi:10.1128/cmr.17.1.218-234.2004

Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225–230.

Otto, M. 2014. Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17(1), 32–37.

Ovodova, R. G., Golovchenko, V. V., Popov, S. V., Popova, G. Y., Paderin, N. M., Shashkov, A. S., & Ovodov, Y. S. 2009. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. *Food Chemistry*, 114(2), 610–615.

Paudyal, Sushil & Joshi, Lok Raj & katiwada, sushil. 2014. Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Dairy Farms of Pokhara, Nepal. *International Journal of Veterinary Science*. 3. 87-90.

Pers, M., Liu, G., Zhuang, L., Song, D., Lu, C., & Xu, X. (2017). SEPARATION, 40(2), 2–10.

Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. 2010. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, 2(8), 2177–2197.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., & Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase, 306, 530–536.

S., Crouzet, J., & Blanche, F. 1997. Glycosylated Flavones as Selective Inhibitors of Topoisomerase IV, 41(5), 992–998.

Salvatore, M. J., King, A. B., Graham, A. C., Onishi, H. R., Bartizal, K. F., Abruzzo, G. K., ... Witherup, K. M. (1998). Antibacterial Activity of Lonchocarpol A, 3864(Mlc), 640–642.

Siddiqui AH & Koirala J. 2019. Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). *In StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;

Sipailiene, Ausra & Venskutonis, Rimantas & Sarkinas, Antanas & Cypiene, V. 2005. Composition and antimicrobial activity of celery (*Apium graveolens*) leaf and root extracts obtained with liquid carbon dioxide. *Acta Horticulturae*. 677. 71-77. 10.17660/ActaHortic.2005.677.9.

Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85(Pt 1), 57-72.

Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 273–282.

Thairu Y, Nasir IA, Usman Y. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan Afr J Med* 2014;1:168-74.

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.

Toudert, N., Djilani, S. E., & Djilani, A. 2009. Antimicrobial activity of flavonoids of *Ampelodesma mauritanica*. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2), 227–228.

Udo, E. E. 2013. *Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: The New Face of an Old Foe? Medical Principles and Practice*, 22(s1), 20–29.

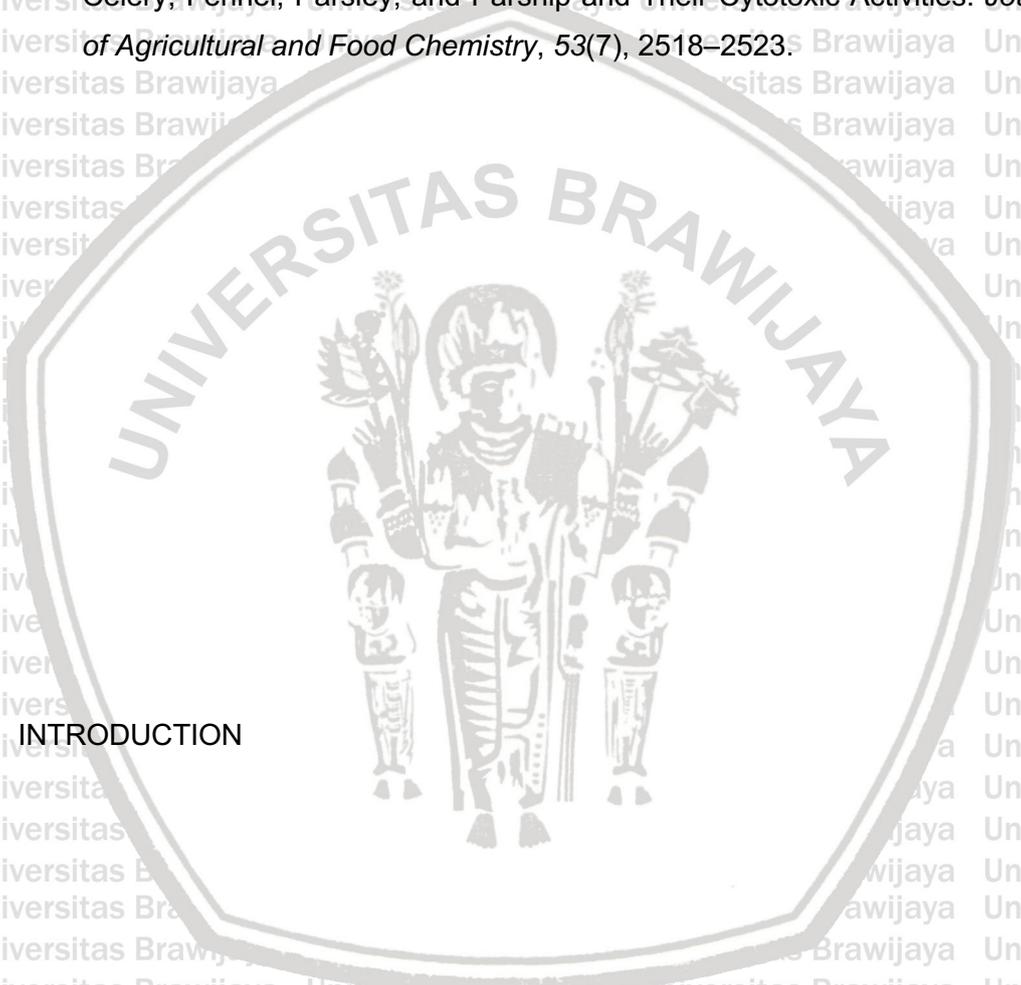
Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. 2012. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(February), 1–15.

Vijayakumaran, Vithooshan, "Characterization of *Staphylococcus aureus* Lipase" 2013. *Electronic Thesis and Dissertation Repository*. 1584.

Wielders, C. L. C., Fluit, A. C., Brisse, S., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. 2002. Gene Is Widely Disseminated in, 40(11), 3970–3975.

Yoshikawa, T. T. 2000. Epidemiology and Unique Aspects of Aging and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 30(6), 931–933.

Zidorn, C., Jöhrer, K., Ganzera, M., Schubert, B., Sigmund, E. M., Mader, J., ... Stuppner, H. (2005). Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2518–2523.



INTRODUCTION