

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1 *Syzygium Cumini***2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Juwet (*Syzygium Cumini* Linn.)**

Tanaman juwet termasuk dalam famili *Myrtaceae*. Juwet dikenal dengan beberapa nama di Indonesia antara lain duwet (Jawa), juwet (Bali), jambu keling (Gayo), jambolan (Sulut, Flores), jamblang (Betawi, Sunda), jamun (Melayu) dan dalam bahasa Inggris disebut dengan *java plum* atau *black plum*. Tanaman juwet merupakan pohon besar setinggi 10 meter sampai 30 meter yang dapat tumbuh di daerah lembab maupun kering. Pohon juwet memiliki batang tebal dengan kulit batang berwarna coklat, daunnya tunggal berbentuk lonjong atau hampir lonjong sepanjang 6 cm sampai 12 cm dengan permukaan yang halus dan mengkilap, tebal, helaian daun letaknya berhadapan, bertepi rata dan tulang daunnya menyirip, daun yang masih muda berwarna merah muda, apabila sudah tua berwarna hijau dan daun yang akan gugur berubah warna menjadi kuning kecoklatan. Pohon juwet hanya sedikit menggugurkan daunnya di daerah dengan tingkat kelembaban dan curah hujan yang tinggi. Namun, di daerah yang kering pada musim kemarau umumnya akan meranggas selama waktu tertentu. Bunganya harum berwarna putih kehijauan serta buahnya berbentuk lonjong sampai bulat telur dengan kulit buah yang tipis dan berwarna merah tua sampai ungu kehitaman, berasa sepat masam sampai masam manis. Juwet tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 500 meter di atas permukaan air laut (BPPT, 2005; Orwa *et al.*, 2009; Ayyanar *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Tanaman Juwet (*Syzygium cumini* (L.) Skeels (BPPT, 2005)

Klasifikasi ilmiah tanaman juwet (Jadhav *et al.*, 2009) sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae
- Divisio : Magnoliophyta
- Classis : Magnoliopsida
- Ordo : Myrtales
- Familia : Myrtaceae
- Genus : *Syzygium*
- Species : *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Tanaman juwet mempunyai sinonim nama latin lain yakni *Eugenia jambolana* Lam., *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Eugenia djouant* Perr., *Calyptanthus jambolana* Willd., *Eugenia cumini* Linn. Druce., *Eugenia caryophyllifolia* Lam (Ayyanar *et al.*, 2012).

2.1.2 Kandungan Bahan Aktif Tanaman Juwet (*Syzygium Cumini* Linn.)

Penelitian – penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman juwet mempunyai aktivitas farmakologi yang bervariasi antara lain berfungsi sebagai antidiare, astringent, antidiabetes, antibakteri, antioksidan, antivirus, antiinflamasi

gastroprotektif dan antiulserasi. Macam-macam spesies dari genus *Syzygium* dilaporkan banyak mengandung tanin, flavonoid, *essential oils* dan konstituen fenolik yang lain (Sah *et al.*, 2011; Stephen, 2012; Ayyanar *et al.*, 2012).

Tanaman juwet menghasilkan banyak komponen bioaktif, menurut Ayyanar *et al.*, (2012); Sharma *et al.*, (2012) dan Sikder *et al.*, (2012) masing-masing bagian tanaman juwet mempunyai kandungan senyawa aktif sebagai berikut :

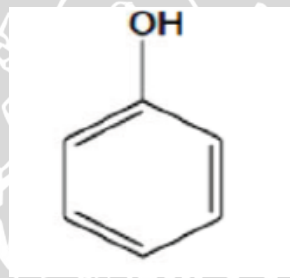
Tabel 2.1 Kandungan Bahan Aktif Tanaman Juwet

Bagian Tanaman	Senyawa Metabolit Sekunder
Akar	Glikosida flavonoid
Batang	Flavonoid, tanin, <i>gallic acid</i>
Buah	Glukosa, fruktosa, antosianin, serat, vitamin A, vitamin C, asam folat, riboflavin
Biji	Polifenol, turunan <i>gallic acid</i> , <i>ellagic acid</i>
Daun	<i>acylated flavonol glikosida</i> , tanin

Daun juwet biasa digunakan dalam pengobatan disentri. Menurut Migliato *et al.*, ekstrak daun *Syzygium cumini* memiliki aktivitas antibakteri. Bagian daun inilah yang diduga mempunyai senyawa metabolit sekunder terbanyak dalam memberikan efek antibakteri tersebut (Chanda, 2011). Daun juwet mengandung flavonoid dan tanin yang termasuk ke dalam senyawa golongan fenolik. Kelarutan zat aktif golongan fenol larut dengan baik dalam alkohol (Evans *et al.*, 2009). Literatur lain menyebutkan pula, senyawa tanin dan flavonoid sangat larut di dalam alkohol. Senyawa flavonoid diketahui praktis tidak larut di dalam air, sedangkan senyawa tanin kelarutannya sebanyak 1 gram tanin dapat larut dalam

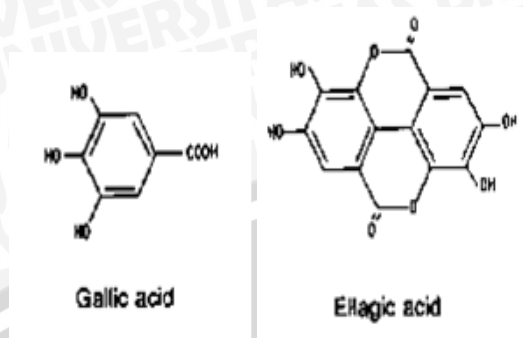
0,35 milliliter air (O'Neil *et al.*, 2001). Oleh karena itu, pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol. Konsentrasi etanol yang dipakai adalah etanol 70%. Alasan penggunaan etanol karena pelarut ini dapat mengekstrak senyawa yang diinginkan dan keamanannya terjamin. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi daun juwet adalah metode maserasi (Coutinho *et al.*, 2009).

Senyawa fenol di dalam daun juwet mempunyai gugus O–H yang mekanisme antibakterinya dengan merusak dinding sel dan menghambat sintesis protein dari bakteri gram positif maupun negatif (Prabhakaran *et al.*, 2011). Berikut adalah gambar struktur kimia fenol :



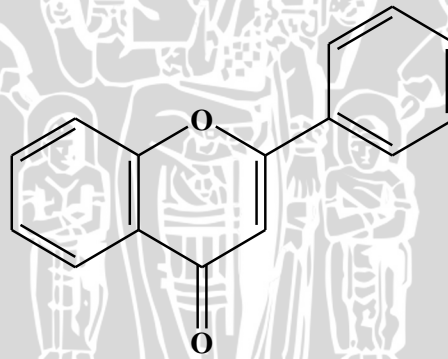
Gambar 2.2 Struktur Kimia Senyawa Fenol

Tanin dianggap sebagai nutrisi yang tidak diinginkan pada tanaman karena dapat mengendapkan protein, menghambat enzim pencernaan dan mempengaruhi penyerapan vitamin serta mineral, meskipun begitu beberapa tanin berfungsi sebagai antimikroba (Oliveira *et al.*, 2007; Gowri, 2010). Tanin diklasifikasikan menjadi dua yakni tanin terhidrolisis dan terkondensasi. Pada tanaman juwet dilaporkan banyak mengandung tanin yang terhidrolisis dalam bentuk *gallic acid* dan *ellagic acid*. Struktur kimia senyawa tanin tersebut adalah sebagai berikut :



Gambar 2.3 Struktur Kimia Senyawa Tanin Terhidrolisis

Flavonoid yang juga terdapat dalam daun juwet mengindikasikan bahwa juwet memiliki efek antibakteri (Bajracharya *et al.*, 2008). Flavonoid merupakan substansi fenolik terhidroksilasi yang dihasilkan oleh tumbuhan berfungsi sebagai respon terhadap infeksi mikroba. Secara umum, struktur kimia dari flavonoid adalah sebagai berikut :



Gambar 2.4 Struktur Kimia Senyawa Flavonoid

Baik flavonoid maupun tanin mempunyai kemampuan untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler, protein terlarut dan dinding sel bakteri (Shihabudeen *et al.*, 2010).

2.2 Bakteri *Shigella dysenteriae*

2.2.1 Morfologi dan Karakteristik *Shigella dysenteriae*

Bakteri *Shigella dysenteriae* adalah bakteri batang gram negatif, *non motil*, berukuran kecil ($0.5 \times 0.3\mu\text{m}$), bersifat fakultatif anaerob dengan beberapa pengecualian yakni tidak memfermentasikan laktosa tetapi karbohidrat lain yang menghasilkan asam, tidak menghasilkan gas dan tidak membentuk spora. Koloni bakteri *Shigella dysenteriae* berbentuk konveks, bulat, transparan dengan pinggiran utuh, pewarnaan gram negatif akan menghasilkan warna merah di bawah mikroskop. Habitat sebagai mikroba patogen terbatas pada saluran pencernaan manusia dan dapat menimbulkan infeksi yang disebut disentri basiler (Jawetz *et al.*, 2005).

2.2.2 Klasifikasi *Shigella dysenteriae*

Bakteri *Shigella dysenteriae* termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*. *Shigella dysenteriae* memiliki 12 jenis tipe serologis yang berbeda berdasarkan antigen O. Adapun klasifikasi *Shigella dysenteriae* (Jawetz *et al.*, 2005) sebagai berikut :

Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Proteobacteria
Classis	:	Gamma Proteobacteria
Ordo	:	Enterobacteriales
Familia	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	<i>Shigella</i>
Species	:	<i>Shigella dysenteriae</i>

2.2.3 Faktor virulensi dan antigen *Shigella dysenteriae*

Bakteri *Shigella dysenteriae* yang virulen mampu melakukan penetrasi ke dalam mukosa dan sel epitel tetapi jarang dapat menembus lamina propria. Internalisasi bakteri merupakan hasil dari endositosis yang diperantarai oleh reseptor atau disebabkan oleh produk bakteri. Proses internalisasi ini hanya dapat terjadi ketika sel hospes dan sel bakteri dalam keadaan metabolisme yang aktif. Awalnya bakteri *S. dysenteriae* berada di dalam fagosom lalu merusaknya dengan *plasmid-encoded contact hemolysin* dan berkembang biak dalam sitoplasma. Multiplikasi intraseluler ini dilanjutkan dengan invasi ke sel-sel yang berdekatan dan diikuti dengan terjadinya inflamasi serta kematian sel. *Plasmid-encoded contact hemolysin* ialah suatu komponen hemolitik yang membutuhkan kontak langsung antara bakteri dengan membran sel hospes. Adapun peranan faktor virulensi yang terdapat dalam bakteri *Shigella dysenteriae* antara lain adanya antigen O yang berperan dalam kemampuan untuk tetap hidup selama perjalanannya di saluran pencernaan melawan pertahanan hospes, struktur lipopolisakarida (LPS) yang juga memiliki plasmid yang menyandi *O-specific side chains* dan apabila plasmid ini hilang maka organisme menjadi avirulen. Selain itu, *Shigella sp* menghasilkan sitotoksin yang disebut dengan shigatoksin. Shigatoksin terutama diproduksi oleh *S.dysenteriae* tipe 1 yang meningkatkan keparahan penyakit. Toksin ini mempunyai efek *multiple* yaitu neurotoksik, sitotoksik dan enterotoksik. Shigatoksin dapat bertranslokasi dari saluran pencernaan ke sirkulasi darah. Mekanisme kematian sel disebabkan oleh sitotoksin ini dengan cara mengganggu sintesis protein (Dzen *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008).

2.2.4 Patogenesis

Bakteri *Shigella dysenteriae* sangat mudah menular. Dosis infeksiusnya rendah yaitu lebih kecil dari 200 organisme dan untuk menginfeksi, bakteri *S. dysenteriae* harus tetap hidup selama perjalanannya melalui saluran cerna bagian atas, melekat pada kolon dan melakukan penetrasi ke dalam sel epitel. Setelah memasuki sel epitel maka bakteri *S.dysenteriae* akan bermultiplikasi dan bertransmisi dari satu sel ke sel epitel lain yang berdekatan. Multiplikasi bakteri menyebabkan reaksi inflamasi, kematian sel (nekrosis), ulserasi, perdarahan dan gangguan absorpsi cairan pada kolon. Organisme ini sangat jarang menembus dinding usus dan menyebar ke bagian tubuh yang lain (Dzen *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2007).

2.2.5 Gambaran Klinis

Masa inkubasi bakteri *Shigella dysenteriae* sekitar satu sampai empat hari. Setelah itu, umumnya pasien akan mengalami diare ditandai dengan konsistensi feses yang cair, frekuensinya sering dan terdapat darah atau lendir. Nyeri, kram perut dan tenesmus ialah gejala yang umum terjadi pada disentri. Demam dan anoreksia juga sering dialami oleh pasien tetapi tidak spesifik. Pada fase awal penyakit, pasien mungkin hanya mengalami diare akut dengan konsistensi feses yang cair tanpa terlihat adanya darah atau lendir dan tanpa gejala disentri. Tingkat keparahannya lebih tergantung pada usia, status nutrisi dan imunologi dari penderita. Walaupun sebagian besar pasien telah memasuki masa penyembuhan selama kurang lebih 7 hari sampai 10 hari, tetapi komplikasi yang serius tetap dapat terjadi yaitu abnormalitas metabolik, sepsis, konvulsi, prolaps

rektal, *toxic megacolon*, perforasi usus dan *haemolytic-uraemic syndrome* (WHO, 2005; Fauci *et al.*, 2008).

2.2.6 Identifikasi *Shigella dysenteriae*

Identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan cara mengisolasi bahan pemeriksaan berupa feses yang mengandung darah, lendir dan potongan jaringan atau *swab* rektum. Selain itu, identifikasi spesimen juga dapat dilakukan dalam media perbenihan. Bahan pemeriksaan perbenihan diinokulasikan pada media diferensial misalnya agar *MacConkey* atau EMB dan media selektif seperti agar enterik hektoen atau agar *Salmonella-Shigella* yang dapat menekan *Enterobacteriaceae* yang lain dan organisme gram positif. Koloni yang teridentifikasi tidak berwarna (*lactose-negative fermenter*) kemudian diinokulasikan ke media agar TSI (Dzen *et al.*, 2003). Pada uji biokimia, *Shigella dysenteriae* dapat memproduksi asam hasil dari fermentasi laktosa, sukrosa, dulcitol tetapi tidak membentuk gas dari glukosa, uji indol dan citrat negatif (Collins *et al.*, 2004).

Pemeriksaan mikroskopik dari feses adalah cara yang paling sederhana, murah, relatif cepat dan mudah untuk dilakukan oleh fasilitas layanan kesehatan dalam *screening* tes untuk mendeteksi diare bakterial yang invasif. Diagnosis definitif dari infeksi *Shigella* hanya dapat dilakukan dari isolasi organisme dalam sampel feses dan *serotyping* dari isolat. Kultur juga dibutuhkan untuk menentukan antimikroba yang sensitif (WHO, 2005).

2.2.7 Pengobatan

Penanganan diare berdarah (disentri) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *S. dysenteriae* umumnya ditujukan terutama pada kondisi hidrasi dan nutrisi pasien terlebih dahulu. Apabila terjadi kasus dehidrasi berat dapat diberikan cairan infus diberikan dengan cepat sebanyak 20 – 30mL/kgBB dalam waktu 1 jam, untuk kasus dehidrasi ringan sampai sedang cukup diberikan rehidrasi oral. Pemberian tambahan nutrisi untuk pasien sebaiknya dimulai segera setelah rehidrasi selesai, hal ini memberikan keuntungan yang signifikan secara klinis. Setelah itu, dilanjutkan dengan pemberian antibiotik yang sesuai. Awalnya, infeksi *Shigella* memberikan respon yang cukup baik dalam pemberian antibiotik seperti Ampicillin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Cotrimoxazole dan Chloramphenicol. Namun, seiring berjalannya waktu makin banyak kasus resistensi yang terjadi contohnya *S. dysenteriae* tipe 1 yang telah resisten terhadap berbagai macam antibiotik. Berdasarkan WHO (2005), semua spesies dari genus *Shigella* telah resisten terhadap Ampicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole sehingga tidak dianjurkan dipakai dalam pengobatan disentri. Golongan antibiotik yang masih sensitif secara *in vitro* terhadap *Shigella sp.* adalah Gentamicin, Kanamisin, Cefazolin dan Cefoxitin. Selain itu, Ciprofloxacin juga digunakan karena masih sensitif dan menjadi obat pilihan lini pertama bagi pasien disentri. Dosisnya untuk anak-anak 15mg/kg dan untuk dewasa 500mg sehari dua kali satu tablet selama tiga hari secara per oral. Golongan Fluoroquinolone yang lain seperti Ceftriaxone juga dapat diberikan karena efektif untuk pengobatan *multi-resistant strains Shigella* (Dzen *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008).

2.2.8 Resistensi Bakteri Terhadap Obat

Resistensi bakteri terhadap obat-obat antibiotik dapat dibagi menjadi dua yaitu non-genetik dan genetik. Resistensi non-genetik terjadi karena hampir semua obat antimikroba hanya bekerja dengan baik saat masa pembelahan sel bakteri sehingga bakteri yang tidak aktif membelah akan mengalami resistensi sedangkan resistensi genetik disebabkan oleh adanya perubahan genetik dari bakteri. Resistensi genetik ini dapat terjadi secara kromosomal dan ekstrakromosomal. Menurut Dzen *et al.*, (2003) ada beberapa mekanisme resistensi bakteri yaitu :

- a. Mikroba memproduksi enzim yang merusak obat
- b. Mikroba mengubah permeabilitas membran selnya
- c. Mikroba mengubah struktur target terhadap obat
- d. Mikroba mengembangkan jalan metabolisme baru
- e. Mikroba mengembangkan enzim yang tetap berfungsi untuk metabolismenya, tetapi tidak dipengaruhi oleh obat
- f. Mikroba memperbesar produksi bahan metabolit

2.2.9 Obat Antimikroba

Obat-obatan antimikroba digolongkan menjadi tiga berdasarkan cara memperolehnya yakni antimikroba sintesis yang dibuat secara kimia di laboratorium, antimikroba alamiah (antibiotik) yang didapatkan dari hasil metabolit suatu mikroorganisme contohnya jamur atau bakteri, dan antimikroba semisintetis yang didapatkan dengan cara melakukan modifikasi rumus kimia dari senyawa alamiah yang telah ada (Dzen *et al.*, 2003).

Mekanisme kerja obat antimikroba antara lain dengan mengganggu struktur bagian mikroba yang peka yakni dinding sel, protein, asam nukleat dan metabolit intermedietnya. Antimikroba yang bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel yaitu golongan β -laktam dan non β -laktam. Antibiotik golongan Penicillin (sebagian dapat digunakan dalam bentuk kombinasi dengan klavulanat dan sulbaktam), Cephalosporin dan Karbapenem termasuk dalam antimikroba β -laktam, sedangkan untuk antibiotik golongan non β -laktam contohnya Vankomisin, Basitrasin, Fosfomisin. Antimikroba yang mekanisme kerjanya dengan merusak membran sel antara lain Polimiksin-B, golongan Poliene (Amfoterisin B), golongan Azole (Clotrimazole, Ketoconazole, Mikonazole, Itrakonazole). Antimikroba yang bekerja dengan menghambat sintesis protein bakteri contohnya Chloramphenicol dan Linkomisin yang bekerja pada unit ribosom 50S dengan menghambat perpanjangan rantai polipeptida, Streptomisin pada unit ribosom 30S yang mengakibatkan *misreading* oleh antikodon pada tRNA, Tetrasiklin yang bekerja pada unit ribosom 30S dengan mengganggu perlekatan tRNA pada kompleks mRNA-ribosom. Antimikroba yang bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat contohnya Rifampisin, asam nalidixat dan antibiotik golongan senyawa kuinolon (Ciprofloksasin, Ofloxacin). Antimikroba yang mekanisme kerjanya sebagai antagonis metabolit bekerja dengan hambatan secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial bakteri. Umumnya senyawa antimetabolit ini bersifat bakteriostatik, contohnya Cotrimoxazole yakni kombinasi senyawa sulfonamid dan trimetoprim (Dzen *et al.*, 2003).

2.3 Proses Ekstraksi

Proses awal pembuatan ekstrak yakni dengan membuat serbuk simplisia kering. Simplisia segar dicuci bersih dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibuat serbuk dengan alat tertentu, makin halus serbuk simplisia maka makin efektif dan efisien proses ekstraksinya. Namun, apabila serbuk makin halus maka makin rumit pula teknologi peralatan yang digunakan untuk tahap filtrasi (Depkes, 2000).

2.3.1. Pemilihan Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak sebaiknya optimal untuk mengekstrak kandungan bahan aktif yang berkhasiat pada tanaman. Pertimbangan dalam pemilihan pelarut terkait dengan segi selektivitas, kemudahan cara maupun proses bekerja dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanannya terjamin. Selain itu, pada pengujian tertentu seperti uji antimikroba juga harus diperhatikan homogenitas terhadap media uji mikroba. Pelarut yang boleh digunakan adalah air dan alkohol (etanol) atau campuran keduanya (Depkes, 2000).

2.3.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan pelarut ada dua cara yaitu (Depkes, 2000) :

2.3.2.1 Cara Dingin

- a. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut diikuti dengan beberapa kali pengadukan dan ditempatkan pada

temperatur ruang. Prinsip metode maserasi yakni pencapaian keseimbangan konsentrasi.

- b. Perkolasi adalah ekstraksi yang terdiri dari beberapa tahapan proses yang pelarutnya selalu baru dan dilakukan pada temperatur ruangan.

2.3.2.2 Cara Panas

- a. Refluks adalah cara ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan 3 sampai 5 kali pengulangan.
- b. Soxhlet adalah cara ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi yang berjalan kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- c. Digesti merupakan maserasi kinetik (diaduk secara kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan yakni 40°C sampai dengan 50°C.
- d. Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur yang terukur 96°C sampai 98°C) selama waktu tertentu sekitar 15 menit.
- e. Decocta merupakan proses ekstraksi yang dilakukan lebih lama daripada infusa yakni sekitar 30 menit dengan temperatur yang sama dengan proses infusa (Depkes, 2000).

2.3.3 Pemekatan

Pemekatan adalah proses lanjutan ekstraksi untuk memperoleh jumlah senyawa terlarut yang lebih terkonsentrasi dengan cara menguapkan pelarut hingga dihasilkan ekstrak yang menjadi lebih kental atau pekat (Depkes, 2000).

Rotary evaporator adalah alat yang digunakan dalam proses pemekatan tersebut. Ekstrak yang akan diuapkan diisikan ke dalam labu yang kemudian dipanaskan dengan bantuan penangas sambil diputar. Uap cairan yang dihasilkan didinginkan melalui kondensor dan ditampung pada suatu wadah (Senjaya *et al.*, 2007).

2.3.4 Screening Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk menganalisis komponen zat aktif yang ada di dalam ekstrak tanaman. Pengujian ini dapat dilakukan dengan berbagai macam metode sesuai dengan senyawa yang akan diuji contohnya untuk uji alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Wagner, Dragendorff apabila terbentuknya endapan menunjukkan positif mengandung alkaloid, untuk uji flavonoid dapat digunakan metode Wilstater yang hasil ujinya akan menunjukkan warna merah sampai jingga untuk senyawa flavon, merah tua pada senyawa flavonol atau flavonon dan warna hijau sampai biru pada aglikon atau glikosida, uji saponin menggunakan metode Forth terbentuk buih yang stabil, uji tanin menggunakan FeCl_3 apabila terbentuk endapan biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Dewi *et al.*, 2005; Gowri *et al.*, 2010).

2.4 Uji Aktivitas Antibakteri Secara *in vitro*

Uji kepekaan antibakteri bertujuan untuk mengetahui potensi efek bakterostatik atau bakteriosidal dari suatu antibiotik yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh bakteri tersebut. Uji kepekaan terhadap antibakteri *in vitro* pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara yakni metode dilusi dan metode difusi cakram (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1 Metode Dilusi

2.4.1.1 Dilusi Tabung

Menurut Sydney dan Ellen (1986), untuk mengetahui jumlah bakteri yang digunakan maka dilakukan pembuatan larutan perbenihan bakteri yakni di dalam 1 mL suspensi organisme uji sama dengan 1×10^6 CFU/mililiter. *Optical Density* (OD) dengan nilai 0,1 setara dengan konsentrasi bakteri uji 10^8 CFU/mililiter dan untuk mendapatkan suspensi bakteri uji 1×10^6 CFU/mililiter maka harus dilakukan pengenceran. *Optical Density* (OD) menggambarkan turbiditas yang menentukan ada atau tidaknya organisme di dalam spesimen.

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui dan menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari suatu obat antibakteri. Prinsip dilusi tabung adalah dengan menggunakan tabung reaksi yang berisi campuran media cair dan sel bakteri dalam jumlah tertentu serta ditambahkan obat antibakteri yang telah diencerkan secara serial. Tabung reaksi yang berisi sampel tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 sampai dengan 24 jam lalu diamati secara kualitatif tingkat kekeruhannya. Konsentrasi terendah obat antibakteri pada tabung yang tampak jernih adalah nilai dari KHM. Selanjutnya, biakan dari tabung yang jernih diinokulasikan pada

media agar padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 sampai dengan 24 jam kemudian diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Konsentrasi terendah obat antibakteri pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah nilai KBM (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1.2 Dilusi Agar

Dilusi agar adalah suatu metode pengujian zat antimikroba dengan menggunakan basis media agar. Metode ini hanya dapat mengetahui nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). Media standar yang biasa digunakan adalah *Mueller-Hinton* tetapi dapat pula diganti atau ditambahkan dengan bahan lain yang dibutuhkan untuk memfasilitasi pertumbuhan bakteri yang lebih baik. Proses dilusi agar yakni bakteri dengan konsentrasi 1×10^4 CFU diinokulasikan pada media agar padat yang telah dicampur dengan zat antibakteri kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 16 sampai dengan 24 jam. Setelah itu, *plate* biakan yang telah diinkubasi diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri (Forbes *et al.*, 2007).

2.4.2 Metode Difusi Cakram

Prinsip metode difusi cakram ialah dengan menjenuhkan antibiotik tertentu ke dalam *paper disc* (cakram kertas) lalu diletakkan pada permukaan media perbenihan agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Zat antibiotik berdifusi dengan cepat dan membentuk gradien konsentrasi disekitar *paper disc*. *Plate* kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 16 sampai dengan 24 jam. Selama inkubasi, bakteri akan tumbuh dipermukaan *plate* kecuali pada area gradien konsentrasi dari antibiotik yang telah ditanamkan.

Selanjutnya, biakan diamati ada tidaknya zona bening disekitar *paper disc*, diameternya diukur dalam satuan milimeter (Forbes et al., 2007).

Evaluasi hasil uji kepekaan bakteri dapat dilakukan dengan dua cara yaitu cara Kirby Bauer dan cara Joan-Stokes. Pertama, cara Kirby Bauer dengan membandingkan diameter zona hambat yang berada di sekitar *paper disc* dengan tabel standar yang dibuat oleh *National Committe for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) melalui tabel ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten. Kedua, cara Joan-Stokes dengan membandingkan radius zona hambat yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat antibakteri dengan isolat bakteri yang diuji (Dzen et al., 2003).

