

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella* Typhi2.1.1 Klasifikasi *S. Typhi*

Klasifikasi *S. Typhi* adalah sebagai berikut:

- Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Proteobacteria*
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Salmonella* (Todar, 2008)
Spesies : *Salmonella enterica* subspecies enteric serotype Typhi
atau *Salmonella Typhi* (Brooks *et al*, 2008).



Gambar 2.1. *S. Typhi* (pewarnaan Gram, berbentuk batang Gram negatif) (Todar, 2008)

2.1.2 Morfologi dan Fisiologi *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi berbentuk batang dengan ukuran diameter 0,7-1,5 μm dan panjang 2-5 μm (Fox *et al*, 2006). Panjang *Salmonella* bervariasi. Sebagian besar isolat motil dengan flagel peritrika (*peritrichous flagella*) (Brooks *et al*, 2008). Bakteri ini bersifat gram negatif, berflagella, tidak berkapsul, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, memfermentasikan glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, dan mensintesis flagella peritrikus dalam keadaan motil (Fox *et al*, 2006). *Salmonella* resisten terhadap bahan kimia tertentu (misal, hijau brilliant, natrium tetrasetat, natrium deoksikolat) yang menghambat bakteri enterik lain. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut berguna untuk inokulasi isolat salmonella dari feses pada medium (Brooks *et al*, 2008).

Salmonella digolongkan ke dalam bakteri gram negatif sebab *salmonella* adalah jenis bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat metal ungu pada pewarnaan gram dan semua gram negatif berwarna merah atau merah muda. Sifat patogen bakteri ini berkaitan dengan komponen pada dinding sel gram negatif terutama lapisan lipopolisakarida atau endotoksin (Ita, 2011).

2.1.3 Struktur Antigenik *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi memiliki antigen somatik O, flagella H, dan kapsular Vi (Bergeys *et al*, 1994). Antigen kapsular Vi perannya kecil dalam klasifikasi, tetapi mempunyai kepentingan patogenitas. Antigen Vi dapat mencegah destruksi intraseluler di dalam sel hospes. Antigen ini jarang ditemukan pada serotipe *salmonella* yang lain (Dzen *et al*, 2010).

Antigen O dan H adalah antigen utama yang digunakan untuk penggolongan *salmonella*. Antigen O mirip dengan antigen O dari

Enterobacteriaceae yang lain, tetapi antigen H berbeda karena adanya mekanisme *diphase*. Antigen H dapat muncul sebagai salah satu atau dua dari fase antigenik mayor yaitu fase-1 yang merupakan fase yang spesifik atau fase-2 yang merupakan fase nonspesifik. Antigen H terdapat pada protein flagella. Hanya organisme yang berflagella yang memiliki antigen H. Antigen H fase-1 dimiliki oleh hanya beberapa organisme, dan bereaksi hanya dengan antisera homolog, sedangkan antigen H fase 2 dimiliki oleh banyak mikroorganisme dan bereaksi dengan antisera heterolog (Dzen *et al*, 2010). Antigen H pada *salmonella* adalah antigen yang spesifik, karena dapat berubah-ubah menjadi antigen H fase 1 atau fase 2. Organisme tersebut dapat menggunakan antigen ini untuk mengelabui respon imun (Parija, 2009).

Antigen O merupakan rantai samping dari unit-unit gula yang diproyeksikan dari lapisan terluar lipopolisakarida dinding sel bakteri (Parija, 2009). Antigen ini bersifat hidrofilik dan memungkinkan bakteri untuk membentuk suspensi yang stabil dan homogen pada larutan salin (Wray *et al*, 2000). Antigen O bersifat tahan panas, tidak terpengaruh oleh pemanasan pada suhu 100°C selama 2-5 jam, stabil dalam alkohol, pada perlakuan dengan 96% etanol pada suhu 37°C selama 4 jam (Parija, 2009).

2.1.4. Patofisiologi

S. Typhi bersifat infeksius untuk manusia, dan infeksi oleh organisme tersebut didapatkan dari manusia. Namun, sebagian besar *Salmonella* bersifat patogen terutama bagi hewan yang menjadi reservoir untuk infeksi manusia, yaitu unggas, babi, hewan pengerat, hewan ternak, binatang piaraan

(dari kura-kura hingga burung kakaktua), dan banyak lainnya (Brooks *et al*, 2008).

Organisme ini hampir selalu masuk melalui rute oral, biasanya bersama makanan atau minuman yang terkontaminasi. Dosis inefektif rata-rata untuk menimbulkan infeksi klinis atau subklinis pada manusia adalah 10^5 - 10^8 *Salmonella* (mungkin cukup dengan 10^3 organisme *S. Typhi*). Beberapa faktor pejamu yang menimbulkan resistansi terhadap infeksi *Salmonella* adalah keasaman lambung, flora mikroba usus, dan kekebalan usus setempat (Brooks *et al*, 2008).

Bakteri yang masuk sebagian akan dimusnahkan dalam lambung oleh asam lambung tetapi ada sebagian yang lolos menuju usus dan berkembang biak. Jika respon imun humoral mukosa usus (IgA) kurang baik, maka bakteri ini akan menembus sel epitel (terutama sel M, dimana sel-M atau microfold cell merupakan epitel usus yang banyak mengandung limfosit, sedikit sel goblet, berbentuk kuboid serta memiliki lipatan-lipatan atau microfold dan bukan sel mikrovili) dan selanjutnya menuju lamina propria. Di lamina propria bakteri berkembang biak dan kemudian difagosit oleh makrofag. Di dalam makrofag sendiri, bakteri terus berkembang biak dan menuju plak peyeri ileum distal, lalu menuju aliran kelenjar getah bening mesentrika, duktus torasikus dan kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah (bakterimia pertama bersifat asimtomatik) dan menyebar ke seluruh organ retikuloendothelial tubuh (terutama hati dan limpa). Di organ-organ tersebut bakteri akan keluar dari makrofag dan berkembang biak diluar sel dan masuk ke sirkulasi darah (bakterimia kedua yang bersifat simtomatik). Di dalam hati, bakteri masuk ke kandung empedu, berkembang biak, dan bersama cairan empedu di ekskresikan ke dalam lumen usus, sebagian

bakteri akan dikeluarkan melalui feces dan sebagian kembali menembus usus dan masuk sirkulasi darah. Kemudian terjadi pelepasan mediator inflamasi dan kemudian akan menimbulkan gejala reaksi inflamasi sistemik akibat makrofag yang hiperaktif. Selain menimbulkan gejala inflamasi sistemik, hipereaktif makrofag juga menyebabkan induksi reaksi hipersensitivitas tipe lambat, hiperplasia jaringan organ dan nekrosis organ. Perdarahan saluran cerna dapat terjadi karena adanya nekrosis dan hiperplasia akibat akumulasi sel-sel mononuclear di dinding usus. Proses patologis jaringan limfoid ini dapat berkembang hingga menembus lapisan mukosa dan otot dan dapat mengakibatkan perforasi (Widodo, 2009)

2.1.5 Manifestasi Klinis

Minggu pertama infeksi, gejalanya adalah letargi, demam, malaise, dan nyeri tubuh. Konstipasi lebih sering terjadi daripada diare. Selama waktu ini, bakteri mengadakan penetrasi ke dalam dinding usus dan menginfeksi sistem limfatik. Sebagian lainnya akan masuk ke dalam peredaran darah dan menginfeksi sistem retikuloendotelial. Pada kedua tempat ini, bakteri akan dimakan oleh sel-sel monosit tetapi tidak terbunuh, bahkan masih bisa mengadakan multiplikasi di dalam sel monosit tersebut (Dzen *et al*, 2010).

Selama minggu kedua dari penyakitnya, bakteri masuk lagi ke dalam aliran darah, menyebabkan bakteremia yang kedua. Infeksi pada saluran empedu dan lain-lain terjadi pada waktu ini. Penderita tampak sakit berat dengan panas tinggi sampai 40°C. Diare dapat terjadi pada minggu kedua atau ketiga dari penyakitnya. Setelah minggu ketiga penderita tampak lelah dan masih panas tetapi menunjukkan adanya perbaikan apabila tidak mengalami komplikasi.

Komplikasi yang dapat terjadi berupa perforasi usus, perdarahan hebat, pneumonia, dan pembentukan abses. Angka kematian berkisar antara 2%-10%. Sekitar 20% penderita akan mengalami kekambuhan (Dzen *et al*, 2010).

2.1.6 Diagnosis Laboratorium

2.1.6.1 Spesimen

Darah untuk biakan harus diambil berulang kali. Pada demam enterik dan septisemia, biakan darah sering positif dalam minggu pertama penyakit. Biakan sumsum tulang dapat bermanfaat. Biakan urine dapat positif setelah minggu kedua. Spesimen feses juga harus diambil berulang-ulang. Pada demam enterik, feses akan memberikan hasil positif mulai minggu kedua atau ketiga; pada enterokolitis, selama minggu pertama. Biakan positif dari drainase duodenum menunjukkan adanya *Salmonella* di traktus biliar pada orang *carrier* (Brooks *et al*, 2008).

2.1.6.2 Metode Bakteriologi (untuk Isolasi)

Biakan pada medium diferensial, medium EMB dan MacConkey memungkinkan deteksi cepat organisme yang tidak memfermentasikan laktosa. Medium BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) memungkinkan deteksi cepat *Salmonella* yang membentuk koloni hitam (*Black Jet Colony*) karena produksi H₂S (Brooks *et al*, 2008).

Biakan pada medium selektif, spesimen diinokulasi pada agar *Salmonella-Shigella* (SS), atau agar enterik Hektoen, atau XLD, atau agar deoksilat-sitrat, yang membantu pertumbuhan *Salmonella* dan *Shigella* melebihi *Enterobacteriaceae* lain (Brooks *et al*, 2008).

Identifikasi akhir, koloni yang dicurigai pada medium padat diidentifikasi dengan pola reaksi biokimia dan uji aglutinasi *slide* dengan serum spesifik (Brooks *et al*, 2008).

2.1.6.3 Metode Serologi

Teknik serologi digunakan untuk mengidentifikasi biakan yang tidak diketahui dengan serum yang telah diketahui dan juga dapat digunakan untuk menentukan titer antibodi pada pasien yang tidak diketahui penyakitnya, walaupun penentuan titer antibodi ini tidak terlalu bermanfaat untuk diagnosis infeksi *Salmonella* (Brooks *et al*, 2008).

Uji aglutinasi, serum yang telah diketahui dan biakan yang tidak diketahui dicampur diatas *slide*. Bila terjadi gumpalan, dapat dilihat dalam beberapa menit. Pemeriksaan ini terutama berguna untuk identifikasi preliminier biakan dengan cepat. Terdapat alat-alat untuk mengaglutinasi dan menentukan serogrup *Salmonella* melalui antigen O-nya: A, B, C₁, C₂, D, dan E, yang dijual bebas di pasaran (Brooks *et al*, 2008).

Uji aglutinasi pengenceran tabung atau tes widal. Aglutinin serum meningkat tajam selama minggu kedua dan ketiga pada infeksi *Salmonella*. Sedikitnya dua spesimen serum, yang diambil dengan selang waktu 7-10 hari, dibutuhkan untuk membuktikan adanya kenaikan titer antibodi. Pengenceran serial (dua kali lipat) dari serum yang tidak diketahui diuji terhadap antigen *Salmonella*. Interpretasi hasilnya adalah sebagai berikut: (1) Titer O yang tinggi atau meningkat ($\geq 1:160$) menandakan adanya infeksi aktif. (2) Titer H yang tinggi ($\geq 1:160$) menunjukkan riwayat imunisasi atau infeksi masa lampau. (3) Titer antibodi yang tinggi terhadap antigen Vi yang timbul pada beberapa *carrier*. Hasil pemeriksaan serologi pada infeksi *Salmonella* harus diinterpretasikan

dengan hati-hati. Kemungkinan adanya antibodi yang bereaksi silang, membatasi penggunaan serologi dalam diagnosis infeksi *Salmonella* (Brooks *et al*, 2008).

2.2.7 Pengobatan

Terapi antimikroba untuk infeksi *salmonella* yang invasif adalah dengan menggunakan ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, atau sevalosporin generasi ke-3 (Brooks *et al*, 2008). Selain itu, kloramfenikol juga merupakan obat pilihan untuk demam tifoid. Kloramfenikol diberikan secara per oral atau secara IV 25mg/kg sampai 14-21 hari (Fauci *et al*, 2008). Pada saat ini mulai muncul strain yang muncul terhadap kloramfenikol, ampisilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol atau dikenal sebagai MDR (Dzen *et al*, 2010). Pengobatan pilihan untuk MDR diantaranya adalah ciprofloxacin, ceftriaxon, dan azitromycin (Fauci *et al*, 2008). Beberapa penderita karier kronik dapat diobati hanya dengan menggunakan ampisilin, tetapi pada beberapa kasus kolesistektomi harus dikombinasikan dengan terapi obat (Brooks *et al*, 2008).

2.2 Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)

2.2.1 Taksonomi Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)

Adapun sistematika penamaan (taksonomi) dari tanaman lengkuas merah adalah sebagai berikut (Wagner *et al*, 1990):

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Kelas : Liliopsida (berkeping satu / monokotil)
- Sub Kelas : Zingiberidae
- Ordo : Zingiberales
- Famili : Zingiberaceae – ginger famili
- Genus : *Alpinia* Roxb
- Spesies : *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum



Gambar 2.2 Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)
(Seidemann, 2005)

2.2.2 Morfologi dan Persebaran

Di Indonesia lengkuas memiliki nama yang beraneka ragam sesuai dengan daerah tempat tumbuhnya. Di Sumatra dikenal dengan nama lengkueueh, kelawasn dan lawas. Di Jawa dikenal dengan nama laja dan laos. Sementara itu, di Kalimantan dikenal dengan nama lengkuas dan di Sulawesi diebut lengkuasa, aliku serta lingkui (Winarto, 2003).

Lengkuas merupakan tanaman berbatang semu yang tingginya bisa mencapai 2 meter dan batang muda sebagai tunas dari pangkal batang tua (Winarto, 2003). Daun lengkuas merah berbentuk lonjong dengan panjang 30-70 cm dan lebar 10-22 cm licin dengan apex pendek ujung meruncing. Bunganya terletak pada ujung tunas daun dengan silinder 15-30 cm biasanya tumbuh memanjang sesuai dengan usia tumbuhan lengkuas. Benang sari berukuran 6-7 mm. Ovarium memanjang berukuran 3-4 mm, tidak berbulu. Buah-buahan berbentuk kapsul hampir bulat dengan diameter 2-3cm. Rimpangnya ada yang berwarna merah dan ada juga yang berwarna merah muda (Wagner *et al*, 1990).

Herbal ini bisa tumbuh di daerah tropis dan subtropis dengan ketinggian mencapai 1.200 dpl. Tanaman lengkuas dapat tumbuh baik didaerah terbuka denga sedikit naungan. Tanaman ini akan tumbuh subur ditanah berstruktur gembur dan banyak mengandung bahan organik. Tanaman lengkuas bisa diperbanyak dengan menggunakan potongan rimpang (Winarto, 2003).

2.2.3 Kandungan Kimia dan Kegunaan Rimpang Lengkuas Merah

Bagian tanaman dari lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) yang sering digunakan adalah rimpang. Rimpang lengkuas merah mengandung minyak atsiri yang terdiri dari metilsinamat, sineol, kamfer, δ -pinen, galangin, dan eugenol. Rimpang lengkuas juga mengandung kamfor, galangol, seskuiterpen dan kristal

kuning (Hembing, 2001). Selain itu, rimpang lengkuas merah mengandung senyawa flavonoid, kaempferol-3-rutinoside dan kaempferol-3-oliucronide (Victorio *et al*, 2009). Rimpang lengkuas merah dapat digunakan untuk mengobati masuk angin, diare, gangguan perut, penyakit kulit, radang telinga, bronkhitis, dan pereda kejang (Soenanto dan Sri, 2009). Di samping itu kulit batangnya mengandung saponin, tanin, flavonoid (Permadi, 2008).

2.2.3.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenol terbesar di alam, terdapat pada semua tumbuhan hijau, termasuk pada ekstrak temu-temuan yang banyak dikonsumsi masyarakat sebagai obat tradisional (Suradikusumah, 1989). Flavonoid telah dikenal luas memiliki aktivitas sebagai senyawa antioksidan, antimelanogenesis, dan antimikroba yang potensi (Sulistyo dan Soeka, 1999). Menurut Dwidjoseputro, flavonoid merupakan senyawa fenol sementara senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein. Penelitian secara *In vitro* maupun *in vivo* menunjukkan aktivitas biologis dan farmakologis dari senyawa flavonoid sangat beragam (Sabir, 2005), salah satu diantaranya yakni memiliki aktivitas antibakteri (Mirzoeva, 1997). Senyawa flavonoid di duga mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri (Pelczar, 1998). Senyawa flavonoid bisa diekstraksi menggunakan pelarut etanol (Sabir, 2005).

2.2.3.2 Minyak Atsiri

Rimpang lengkuas merah mengandung minyak atsiri yang terdiri dari metilsinamat, sineol, kamfer, δ -pinen, galangin, dan eugenol. Rimpang lengkuas juga mengandung kamfor, galangol, seskuiterpen dan kristal kuning (Hembing, 2001). Minyak atsiri atau yang disebut juga dengan *essential oils*, *etherial oils* (minyak eteris), atau *volatile oils* (minyak yang mudah menguap) adalah salah

satu komoditi yang memiliki potensi besar di Indonesia (Wulandari, 2009). Minyak atsiri adalah ekstrak alami dari jenis tumbuhan tertentu, baik berasal dari daun, bunga, kayu, biji-bijian bahkan putik bunga. Kegunaan minyak atsiri sangat banyak, tergantung dari jenis tumbuhan yang diambil hasil sulungnya dan dapat digunakan sebagai antiseptik internal, obat anti nyeri, sedative, dan stimulan (Wulandari, 2009). Minyak atsiri dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol (Hertiani, 2002).

Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen (Farida *et al*, 2007). Telah dilaporkan bahwa minyak atsiri (*volatile oil*) yang diisolasi dari rimpang lengkuas merah mempunyai efek anti mikroba (Yuharmen *et al*, 2011). Sebagai senyawa sequesterpenoid, mekanisme antibakteri minyak atsiri (*volatile oil*) diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri oleh komponen lipofiliknya (Cowan, 1999). Selain itu minyak atsiri juga bekerja dengan cara mengganggu proses terbentuknya dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Ajizah, 2004).

2.2.3.3 Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa alami yang dikenal aman untuk digunakan. Misalnya carvone, yang bersifat antibakteri dan antifungal, telah digunakan berabad-abad dalam ekstrak minyak biji, jauh sebelum mekanismenya diteliti. Senyawa terpenoid bisa diekstraksi menggunakan pelarut etanol (Arifin *et al*, 2006). Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan golongan terpenoid pada lengkuas merah adalah terpenoid alkohol (Rosyidah, 2009). Senyawa terpenoid

menekan aktivitas bakteri dan sekaligus merusak membran sel bakteri (Togashi, *et al* 2008).

2.2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alam

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan, hewan dan beberapa jenis biota laut. Zat-zat aktif terdapat didalam sel namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula dengan ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut. Untuk mengekstraksi senyawa kimia yang ada dalam tumbuhan terlebih dahulu bahan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan derajat halus tertentu lalu diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Untuk mendapatkan sari yang kental dapat dilakukan dengan menguapkan hasil ekstraksi dengan bantuan *rotary evaporator*. Pelarut untuk ekstraksi terdiri atas, pelarut non polar, seperti N-heksan, diklorometan, kloroform, benzena, dietil eter. Pelarut polar seperti air, metanol, etanol. Dan terdapat pelarut semipolar seperti aseton, etil asetat, dan lain-lain (Ansel, 2008).

Jenis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi dan perkolasi. (Hamdani, 2011)

2.2.5 Mekanisme Penghambatan Mikroorganisme oleh Antimikroba

Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba anatara lain disebabkan oleh beberapa faktor antara lain: (Kunaepah, 2008)

a. Mengganggu pembentukan dinding sel

Mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen limfofilat yang terdapat pada dinding atau membrane sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Efek penghambatan senyawa antibakteri lebih efektif terhadap bakteri gram positif daripada bakteri gram negative. Hal ini disebabkan perbedaan komponen penyusun dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut.

b. Bereaksi dengan membran sel

Mengganggu dan mempengaruhi integritas membrane sitoplasma sehingga mengakibatkan kebocoran materi intraseluler.

c. Menginaktivasi enzim

Mekanisme yang terjadi menunjukkan kerja enzim terganggu dalam mempertahankan kelangsungan aktivitas mikroba, sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energy dalam jumlah besar untuk aktivitasnya. Akibatnya energy untuk pertumbuhan menjadi berkurang, sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat dan inaktif apabila berlangsung lama.

d. Menginaktivasi fungsi material genetic

Merusak materi genetic sehingga mengganggu proses pembelahan sel untuk pembiakan.

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswarna, 1995).

2.2.6 Uji Sensitivitas Bakteri terhadap Antimikroba

2.2.6.1 Metode Dilusi

2.2.6.1.1 Metode Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari obat anti mikroba. Menggunakan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Prinsipnya dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Ada satu tabung yang hanya diisi bahan aktif tanpa bakteri sebagai kontrol negatif dan ada pula satu tabung yang hanya diisi oleh bakteri biakan sebagai kontrol positif. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM obat. KHM ini adalah kemampuan dari agen antimikroba yang menghambat multiplikasi bakteri uji (sebagai bakteristatik). Untuk mengukur kemampuan antimikroba membunuh mikroorganisme perlu dilakukan tes aktivitas bakterisidal dengan menggunakan modifikasi dari tes dilusi tabung. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya (18-24 jam) diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan atau adanya pertumbuhan $< 0,1\%$ inokulum original disebut Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari bahan antimikroba (Dzen *et al*, 2010).

2.2.6.1.2 Metode Dilusi Agar

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi agar (*Agar Dilution test*). Metode dilusi agar, larutan antimikroba yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan ke dalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat, dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri. Dibutuhkan satu cawan untuk kontrol positif tanpa antimikroba. Dengan metode ini, satu atau lebih bakteri terisolasi yang tercampur per cawan (Parija, 2009). Pada dilusi agar, zat antibakteri diletakkan dalam medium agar lalu teteskan bakteri yang akan diuji dengan konsentrasi 10^4 CFU/ spot (CLSI, 2006). Pada metode dilusi agar, diperlukan larutan antimikroba dengan kadar menurun yang dibuat menggunakan tehnik pengenceran serial. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, cawan diamati serta dihitung pertumbuhan bakteri (parija, 2009).

2.2.6.2 Metode Difusi

Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Dalam metode ini, inokulum bakteri yang akan diuji disesuaikan dengan konsentrasi tertentu, diinokulasikan ke seluruh permukaan agar padat seperti *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan kapas steril. Bahan uji dijenuhkan ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung bahan tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri tersebut, kemudian diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Diameter zona jernih inhibisi disekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu. Selama inkubasi, bahan uji berdifusi dari kertas saring ke dalam agar-agar itu, sebuah

zona inhibisi dengan demikian akan terbentuk. Diameter zona sebanding dengan jumlah bahan uji yang ditambahkan ke kertas saring. Metode ini secara rutin digunakan untuk menguji sensitivitas antibiotik untuk bakteri patogen (Jawetz *et al*, 2010; Jiang.L, 2011; Meyer *et al*, 2011).

