

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antimikroba

Antimikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat aktivitas mikroba dengan berbagai macam cara. Yang termasuk dalam antimikroba adalah antibakteri, antivirus, dan antijamur. Senyawa antimikroba terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya atau tujuan penggunaannya, yaitu antimikroba yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antimikroba yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membran sel, antimikroba yang menghambat sintesis protein, dan antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel. Aktivitas antimikroba dibagi menjadi 2 macam, yaitu aktivitas bakteristatik (hanya menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen) (Brooks *et al.*, 2005).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok (Setiabudy, 2008) :

a. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamid, trimetoprim. Dari mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteristatik, mikroba patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya apabila sulfonamid

mampu bersaing dengan PABA untuk membentuk asam folat maka terbentuklah analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan mikroba terganggu.

b. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, bacitrasin, dan sikloserin. Obat-obat tersebut menghambat reaksi sintesis dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel mikroba lebih tinggi dari luar sel maka akan terjadi kerusakan dinding sel mikroba patogen yang menyebabkan terjadinya lisis dan merupakan dasar efek bakterisidal.

c. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam golongan ini adalah polimiksin golongan polien, dan berbagai antimikroba kemoterapeutik seperti antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa ammonium-kuaterner dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Antimikroba polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungus sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Antiseptik yang mengubah tegangan permukaan dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba sehingga menyebabkan keluarnya komponen penting dari dalam sel mikroba.

d. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam golongan ini adalah aminoglikosida, makrolida, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua subunit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Obat-obat tersebut menghambat sintesis sel mikroba dengan berikatan dengan salah satu ribosom.

e. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nuklat sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin dan golongan kuinolon. Rifampisin berikatan dengan enzim polimerasi-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada mikroba yang fungsinya menata kromosom.

2.2 Kotrimoksazol

Kotrimoksazol adalah kombinasi antara sulfametoksazol dan trimetoprim yang bekerja dengan menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahapan yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi keduanya memberikan efek sinergi (Katzung, 2003).

Kotrimoksazol digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Pada Gram negatif digunakan pada bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella*

Typhi, sensitivitas kotrimoksazol terhadap bakteri *Salmonella* Typhi sebesar 80% (Silvan, 2012). Pada Gram positif digunakan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan tingkat sensitivitasnya mencapai 90% (Shirly,2010).

Aktivitas antimikroba kombinasi sulfametoksazol dan trimetropim yaitu pada dua tahap yang berurutan pada reaksi enzimatik untuk pembentukan asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol bekerja dengan cara mengganggu sintesis dan pertumbuhan asam folat bakteri melalui penghambatan dari pembentukan asam para-aminobenzoat menjadi asam dihidrofolat, sedangkan trimetropim dengan menghambat reduksi dihidrofolat untuk menghasilkan tetrahidrofolat. Untuk mendapatkan efek sinergi diperlukan perbandingan kadar yang optimal dari kedua obat. Rasio kadar yang optimal dari sulfametolsazol:trimetoprim adalah 5:1 (Craig, 2003).

Pengujian sensitivitas dari kotrimoksazol dapat dilakukan dengan metode tes cakram dan dilusi yang direkomendasikan oleh *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI). Kriteria yang direkomendasikan adalah sebagai berikut :

Tabel 2.1 Kriteria sensitivitas kotrimoksazol menurut CLSI

	Tes Dilusi *	Tes Cakram
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Zona Diameter Hambat (mm)
Sensitif	≤ 40	≥ 16
Sensitif sedang		11-15
Resisten	≥ 160	≤ 10
*disk : kotrimoksazol 25 $\mu\text{g/ml}$		

Kotrimoksazol memiliki data farmakodinamik dan farmakokinetik yaitu memiliki absorpsi oral 90 sampai 100%, untuk ikatan proteinnya untuk sulfametoksazol sebesar 68% dan trimetropim sebesar 45%. Sulfametoksazol di metabolisme oleh N-acetil dan glukoronidase, sedangkan trimetropim dimetabolisme oleh metabolit hidroksilasi dan oksida. Waktu paro eliminasi dari sulfametoksazol adalah sembilan jam dan trimetropim enam sampai tujuh belas jam, untuk *time to peak* antara satu sampai empat jam. Sulfametoksazol di ekskresi di urin sebagai metabolit dan obat tidak berubah (Charles *et al.*,2008).

2.3 Obat

Obat adalah bahan atau paduan bahan yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosa, pencegahan penyakit, penyembuhan penyakit, pemulihan, dan peningkatan kesehatan termasuk kontrasepsi dan sediaan biologis (Depkes RI, 2005)

Penggolongan obat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu obat paten dan obat generik. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor Hk.02.02/Menkes/068/I/2010, obat paten adalah obat dengan zat aktif pertama yang ditemukan oleh suatu industri farmasi dan dilindungi oleh hak paten selama 20 tahun, sedangkan obat generik adalah obat paten yang sudah habis masa berlakunya. Terdapat dua jenis obat generik yaitu Obat Generik Berlogo (OGB) dan Obat Generik Bermerek atau *Branded generic* (MENKES RI, 2010).

Obat generik dibagi menjadi dua yaitu obat generik bermerek dagang dan obat generik berlogo. Obat generik berlogo adalah obat dengan nama resmi yang telah ditetapkan dalam Farmakope Indonesia dan *Internatonal Non-proprietary Names World of Health Organization* (INN WHO) untuk zat berkhasiat yang dikandungnya, Sedangkan obat generik bermerek adalah obat generik dengan nama dagang yang menggunakan nama milik produsen yang bersangkutan (MENKES RI, 2010).

Obat generik berlogo langsung menggunakan nama zat aktifnya seperti Kotrimoksazol, amoksisilin, asetaminofen, dan paracetamol. Obat generik bermerek dagang, kandungan zat aktif diberi nama merek atau nama dagang dengan mendaftarkan nama dagang sesuai UU No.14 tahun 2001 tentang merek (Ani, 2003).

2.4 Bakteri

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniselular, pleomorfik dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Sel-selnyasecara khas berbentuk bola (kokus), batang (basilus), dan spiral (spirilium). Ukurannya berkisar antara 0,1-0,3 μm dengan diameter sekitar 0,5-1,0 μm . Berdasarkan pewarnaan Gram, bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Keduanya mempunyai respon yang berbeda terhadap antimikroba karena adanya perbedaan struktur dan komposisi dari dinding selnya. Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam persentasi lebih tinggi dari yang dikandung bakteri Gram positif.

Dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis dibanding bakteri Gram positif. Struktur bakteri Gram negatif memiliki membran lapisan luar yang menyelimuti lapisan tipis peptidoglikan, struktur luar peptidoglikan ini adalah lapisan ganda yang mengandung fosfolipid, protein dan lipopolisakarida (LPS). LPS terletak pada lapisan luar dan merupakan karakteristik bakteri Gram negatif. Sementara sel bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal dimana didalamnya mengandung senyawa teikoat dan lipoteikoat (Brooks *et al.*, 2007).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* (Modrick, 2011):

Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.4.1.1 Sifat Umum

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tes katalase positif dan tahan hidup dalam lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi, misalnya NaCl 10% (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1.2 Morfologi dan Sifat Pewarnaan

Staphylococcus berbentuk bulat atau kokus dengan diameter 0,4-1,2 μm . Hasil pewarnaan yang berasal dari pembenihan padat akan memperlihatkan susunan bakteri yang bergerombol seperti buah anggur, sedangkan yang berasal dari pembenihan cair bis terlihat berbentuk kuman lepas sendiri-sendiri, berpasangan, atau rantai pendek dengan pewarnaan Gram bersifat Gram positif. Namun dalam keadaan tertentu dapat pula bersifat Gram negatif, misalnya organisme yang berasal dari bagian tengah dari koloni, organisme yang mengalami fagositosis oleh sel, dan organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1.3 Perbenihan

Untuk perkembangbiakan bakteri *Staphylococcus* diperlukan suhu optimal antara 28-38°C. Apabila bakteri diisolasi dari tubuh penderita maka suhu optimal yang diperlukan 37°C dengan pH pertumbuhan 7,4. Pada umumnya *Staphylococcus* dapat tumbuh pada medium-medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi misalnya sebagai berikut (Dzen *et al.*, 2003) :

1) *Nutrient Agar Plate (NAP)*

Medium tersebut penting untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen dan *Staphylococcus aureus* akan membentuk pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat, berdiameter 102 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat, dan konsistensi lunak.

2) *Blood Agar Plate (BAP)*

Medium tersebut dipakai secara rutin. Koloninya akan tampak lebih besar, dan pada galur yang ganas biasanya memberikan zona hemolisa yang jernih disekitar koloni yang mirip dengan *Streptococcus hemolyticus*. Pada umumnya, untuk mengembangbiakkan *Staphylococcus aureus* diperlukan medium yang mengandung asam amino dan vitamin-vitamin misalnya : threonin, asam nikotinat, dan biotin.

Untuk isolasi primer dari infeksi campuran, terutama yang berasal dari tinja atau luka-luka diperlukan medium yang mengandung garam NaCl konsentrasi tinggi atau medium yang mengandung polimiksin. Pembentukan pigmen paling baik apabila dieramkan pada medium NAP pada suhu kamar (20°C).

2.4.1.4 Daya Tahan

Diantara bakteri yang tidak membentuk spora, *Staphylococcus* adalah yang paling tahan terhadap bahan-bahan kimia, sehingga galur *Staphylococcus* tertentu digunakan untuk standart tes evauasi bahan-bahan antiseptika atau antimikroba misalnya *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Dzen *et al.*, 2003).

Dalam suhu kamar pada agar miring atau keadaan beku, bakteri tersebut tahan hidup sampai beberapa bulan. Sedangkan, dalam keadaan kering ada pus dapat hidup 14-16 minggu dan relatif tahan terhadap pemanasan suhu 60°C selama 30 menit. Daya tahan terhadap bahan kimia bervariasi, misalnya dalam fenol 2% mati dalam waktu 15

menit, sedangkan dalam hidrogen peroksida 3% mati dalam waktu 3 menit dan dalam *tinctura iodii* mati dalam 1 menit (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1.5 Diagnosis Laboratorium

Bahan pemeriksaan yang diambil tergantung pada bentuk klinisnya, misalnya eksudat atau pus dari abses diambil dengan lidi kapas steril secara aseptis kemudian dimasukkan kedalam medium cair, sputum bila ada infeksi pada bagian saluran pernafasan bagian bawah, feses dan sisa makanan terutama pada kasus keracunan makanan, darah apabila terdapat bakteremia, urin pada infeksi saluran kemih dengan diambil menggunakan cara tertentu, dan pada karier bahan pemeriksaan diambil dari hidung bagian bawah depan daerah perineal. Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan ditanam bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* pada NAP, diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Sebelum digunakan dalam penelitian, *Staphylococcus aureus* harus diidentifikasi ulang. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram, kultur diferensiasi pada media *Manitol Salt Agar (MSA)* dengan konsentrasi garam NaCl 7,5-10% Untuk mengetahui sifat fermentasi terhadap manitol, uji katalase, dan uji koagulase (Dzen *et al.*, 2003).

Dari bahan-bahan tersebut kemudian dilakukan beberapa hal berikut :

- 1) Hapusan langsung dengan pewarnaan Gram
- 2) Perbenihan pada medium *Blood Agar Plate* (BAP) atau pada medium selektif *Manitol Salt Agar* (MSA), kemudian dari koloni yang tumbuh dilakukan pewarnaan Gram.
- 3) Tes biokimia untuk keperluan identifikasi

2.4.1.5.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan memberikan beberapa zat seperti kristal violet, larutan lugol, alkohol, dan safrain. Didapatkan hasil positif jika setelah diaati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x didapatkan bakteri berbentuk kokus, bergerombol dan berwarna ungu,

2.4.1.5.2 Tes katalase

Tes ini untuk membedakan dengan *Streptococcus* yang memberikan hasil negatif. Tes katalase menunjukkan hasil positif jika terdapat gelembung udara setelah ditambahkan larutan H₂O₂ 3%

2.4.1.5.3 Tes Manitol

Staphylococcus aureus dapat meragikan manitol yang tidak dijumpai pada *Staphylococcus epidermidis* maupun *Staphyococcus saprophyticus*. Untuk mengetahui sifat fermentasi terhadap manitol digunakan Manitol Salt Agar (MSA) dengan konsentrasi garam NaCl 7,5-10% dengan melihat

adanya daerah terang (halo) berwarna kuning disekitar koloni

Staphylococcus aureus.

2.4.1.5.4 Tes koagulase

Tes koagulase penting dilakukan untuk menentukan patogenesis *Staphylococcus aureus* yang memberikan hasil positif, bila hasil negatif maka harus dilanjutkan dengan tes koagulase pada tabung. Koagulase merupakan suatu antigen protein yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*, bersifat sebagai *clotting agent*, proteolitik, dan esterolitik. Dikatakan positif jika terdapat gumpalan putih setelah dicampurkan dengan plasma darah.

2.4.1.6 Bentuk Klinis

Bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat, dan saluran usus. Infeksi dari *Staphylococcus aureus* dapat berupa jerawat, bisul, abses, dan luka (Brooks *et al.*, 2007).

2.4.2 *Salmonella* Typhi

Klasifikasi *Salmonella* Typhi (Todar, 2008):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella</i> Typhi

2.4.2.1 Sifat umum

Salmonella Typhi merupakan bakteri Gram negatif yang bersifat aerob dan fakultatif aerob (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Morfologi dan Sifat Pewarnaan

Salmonella Typhi berbentuk batang dengan diameter 1-3,5 μm x 0,5-0,8 μm . Bakteri *Salmonella Typhi* bergerak dengan *flagel peritrich* (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.2.3 Perbenihan dan Reaksi Biokimia

Salmonella Typhi mudah tumbuh pada media biasa dan tumbuh dengan baik pada media yang mengandung empedu. *Salmonella* tumbuh dengan mudah pada medi sederhana tetapi hampir semuanya tidak meragikan laktosa atau sukrosa. *Salmonella* membentuk asam dan kadang-kadang gas dari glukosa dan manosa, serta membentuk H_2S dari thiosulfat. Tes yang membantu membedakan erbagai subgrup dari serotipe yang sering diisolasi adalah sebagai berikut.

Tabel 2.2 Tes Karakterisasi *Salmonella enterica* subspecies *enterica*

Jenis Tes	Bioserotipe <i>cholerasius</i>	Bioserotipe Typhi	Bioserotipe yang lain
Sitrat	-	-	+
Ornitin-dekarbamilase	+	-	+
Gas dari glukosa	+	-	+
Fermentasi :			
1) Dulsitol	-	-	+
2) Trehalosa	-	+	+

(Dzen *et al.*, 2003)

Pengembangbiakan *Salmonella Typhi* diperlukan suhu optimal yaitu 15-41°C, apabila bakteri diisolasi dari tubuh penderita maka suhu

optimum untuk pertumbuhan yaitu 37,5°C dan pH pertumbuhan 6-8 (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.2.4 Daya Tahan

Sebagian besar bersifat patogen pada binatang dan merupakan sumber infeksi bagi manusia. Bakteri ini dapat mati pada suhu 56°C dan pada keadaan kering, dalam air tahan selama 4 minggu. Hidup subur pada medium yang mengandung garam empedu. Dalam air susu dapat berkembang biak dan hidup lebih lama sehingga sering merupakan media untuk penularan penyakit. Pada manusia bakteri ini menimbulkan penyakit *typhus abdominalis* dengan masa inkubasi antara 7-14 hari. Bakteri ini masuk ke dalam aliran darah dan berkembang biak dalam kantung empedu (Brooks *et al.*, 2007).

2.4.2.5 Diagnosis Laboratorium

2.4.2.5.1 Bahan Pemeriksaan

Bahan Pemeriksaan darah yang diperlukan untuk kultur harus diambil secara berulang. Pada demam enterik dan septisima, kultur darah biasanya positif pada minggu pertama penyakitnya. Kultur urin bisa positif setelah minggu kedua. Bahan pemeriksaan yang berasal dari tinja juga harus diambil secara berulang.

2.4.2.5.2 Metode Isolasi Salmonella

Kultur pada medium diferensial EMB, MacConkey's atau medium deoksikhoat bisa mendeteksi adanya *lactose non-fermenter* dengan cepat (tidak hanya untuk *Salmonella* dan *Shigella* tetapi juga untuk *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, dll). Medium ini juga dapat menghambat organisme Gram positif.

Kultur pada medium selektif. Dengan cara bahan pemeriksaan ditanam pada agar *Salmonella-Shigella* (agar SS), agar enterik Hectoen, atau agar deokshikholat sitrat yang baik untuk pertumbuhan *Salmonella* dan *Shigella*. Medium bismuth sulfit digunakan untuk mendeteksi *Salmonella Typhi* dengan cepat dimana akan terbentuk koloni hitam (*black jet*) karena bakteri ini menghasilkan H₂S.

2.4.2.5.3 Metode Serologi

Teknik serologi yang berupa tes aglutinasi dipakai untuk identifikasi biakan yang tidak diketahui menggunakan serum yang diketahui atau menggunakan titer antibodi penderita. Tes aglutinasi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan gelas objek dan dilusi tabung (tes widal). Pada tes aglutinasi dengan gelas objek serum yang diketahui dicampur dengan biakan yang tidak diketahui pada gelas objek. Reaksi positif adalah bila ada gumpalan (*clumping*) dalam beberapa menit. Tes aglutinasi dilusi tabung (Tes widal) pada *Salmonella Typhi*, antibodi aglutinin didalam serum meningkat tajam selama minggu kedua dan ketiga. Untuk keperluan diagnosis laboratorium dilakukan dengan melakukan pengenceran serial dari

serum yang tidak diketahui dan kemudian direaksikan dengan antigen *Salmonella Typhi*. Interpretasi hasil adalah jika titer O yang tinggi (≥ 160) menunjukkan adanya infeksi aktif. Tes ini menggunakan serum dengan volume yang semakin menurun dan dibaca dengan melihat adanya gumpalan.

2.5 Uji Sensitivitas Terhadap Antimikroba

2.5.1 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram dilakukan dengan menjenuhkan obat ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat antimikroba tertentu ditanam pada media pembenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang akan diuji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya zona jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Apabila ada zona inhibisi yang cukup luas (sesuai skala yang dipakai) maka menunjukkan bahwa antimikroba bekerja efektif, tetapi apabila tidak ada zona inhibisi menunjukkan bahwa mikroba resisten terhadap antimikroba tersebut (Dzen *et al.*, 2003).

Untuk mengetahui hasil uji kepekaan antimikroba dapat dilakukan dengan dua cara yaitu :

- 1) Kirby Bauer, yaitu dengan membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) di sekitar cakram dengan tabel standart yang dibuat oleh CLSI (*Clinical and Laboratory Standart Institute*). Dengan

menggunakan tabel CLSI dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet, dan resisten.

- 2) Joan Stokes, yaitu dengan membandingkan radius zona hambatan antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap antimikroba tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara Joan Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar.

2.5.2 Metode Dilusi

Metode ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari antimikroba. Prinsipnya dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi dengan media cair dan sejumlah tertentu mikroba yang diuji. Masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Ada satu tabung yang hanya diisi bahan aktif tanpa kuman sebagai kontrol negatif dan satu tabung yang hanya diisi oleh kuman biakan sebagai kontrol positif. Selanjutnya seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM obat. KHM adalah kemampuan antimikroba menghambat multiplikasi bakteri uji sebagai bakteriostatik. Untuk mengukur kemampuan antimikroba untuk 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, diinkubasi selama 22-24 jam dan selanjutnya diamati ada atau tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan 0,1% inokulum original disebut kadar bunuh minimal (KBM) (Dzen *et al.*, 2003).

