

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Bakteri stafilocokus pertama kali dikenal oleh Pasteur (1880) dan Ogston (1881) dari pus seorang penderita. Selanjutnya Backer pada tahun 1883 berhasil melakukan biakan murni (Dzen *et al.*, 2013).

Genus *Staphylococcus* terdiri dari sekurangnya 30 spesies. Namun, dalam genus *Staphylococcus* terdapat tiga macam spesies yang penting secara klinik yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus saprophyticus*. Bakteri golongan stafilocokus memiliki bentuk sel bulat dan tersusun bergerombol seperti anggur (Brooks *et al.*, 2010 dan Dzen *et al.*, 2013).

Beberapa di antaranya tergolong flora normal pada kulit dan selaput mukosa manusia (Brooks *et al.*, 2010). Infeksi oleh jenis bakteri ini dapat menimbulkan penyakit pada manusia. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses (Warsa *et al.*, 1994).

Sifat umum dari *S. aureus* adalah bersifat aerob atau anaerob fakultatif, sehingga *S. aureus* dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan terdapat oksigen maupun tidak terdapat oksigen (Dzen *et al.*, 2013).



2.1.1 Taksonomi

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Garrity <i>et al.</i> , 2007).

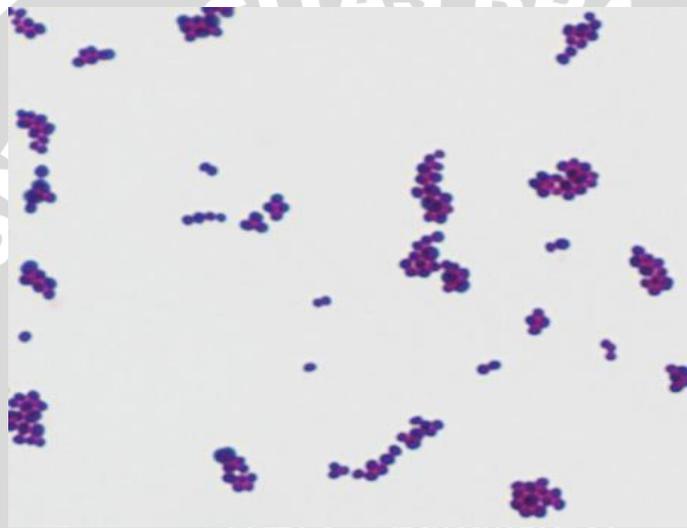
2.1.2 Morfologi

Bakteri ini berbentuk bulat (spheres) atau kokus dengan diameter rata-rata 1 μm . Bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur mungkin sisinya agak rata karena tertekan. Pada sediaan langsung yang berasal dari nanah dapat terlihat sendiri, berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek. Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat akan memperlihatkan susunan bakteri yang bergerombol seperti buah anggur, sedangkan yang berasal dari perbenihan cair atau kaldu biasanya terlihat bentuk bakteri yang lepas sendiri-sendiri, berpasangan atau rantai pendek yang pada umumnya terdiri lebih dari empat sel (Warsa *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2010; Dzen *et al.*, 2013).

Bakteri tersebut tidak membentuk spora dan tidak dapat bergerak. Meskipun demikian dengan cara tetes gantung dapat ditemukan suatu gerakan *Brown*. Bakteri ini hidup bebas dalam lingkungan dan membentuk kelompok teratur yang terdiri atas empat atau delapan kokus. Koloni bakteri ini berwarna kuning emas (Brooks *et al.*, 2010; Dzen *et al.*, 2013).

Menurut Dzen *et al.* (2013), dengan pewarnaan Gram, bakteri bersifat Gram positif. Namun dalam keadaan tertentu dapat pula bersifat Gram negatif, misalnya:

- Organisme yang berasal dari bagian tengah koloni
- Organisme yang mengalami fagositosis oleh sel
- Organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *S. aureus* menunjukkan bahwa bakteri terlihat sendiri, berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek (perbesaran 1000x) (Brooks *et al.*, 2010).

2.1.3 Pertumbuhan dan Perbenihan

Untuk membiakkan stafilokokus, diperlukan suhu optimal antara 28-38°C. Di laboratorium, stafilokokus tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37°C, untuk pembentukan pigmen paling baik yaitu pada suhu kamar (20-25°C). Pertumbuhan terbaik dan khas ialah pada suasana aerob, namun bakteri ini pun bersifat anaerob fakultatif dan pH optimal untuk pertumbuhan *S. aureus* adalah 7.4 (Warsa *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2010; Dzen *et al.*, 2013).

Menurut Dzen *et al.* (2013), pada umumnya stafilocokus dapat tumbuh pada medium-medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi misalnya sebagai berikut:

- *Nutrient Agar Plate (NAP)*

Medium tersebut penting untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen dan *S. aureus* akan membentuk pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensinya lunak.

- *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 di sekitar koloni yang mirip dengan koloni *Streptococcus β -hemolyticus*.



Gambar 2.2 Koloni *S. aureus* pada media *blood agar plate* setelah 24 jam inkubasi. Koloni berwarna kuning abu-abu berdiameter 3-4 mm. Koloni dikelilingi oleh zona hemolisa yang jernih dengan diameter 1 cm (Brooks *et al.*, 2010).

Pada umumnya untuk membiakkan *S. aureus* perlu medium yang mengandung asam amino dan vitamin-vitamin, misalnya threonin, asam nikotinat, dan biotin (Dzen *et al.*, 2013).

Koloni yang masih sangat muda tidak berwarna, tetapi dalam pertumbuhannya akan terbentuk pigmen. Pigmen ini larut dalam eksudat jaringan sehingga nanah berwarna sedikit kuning keemasan yang dapat merupakan petunjuk tentang adanya infeksi oleh bakteri ini. Atas dasar pigmen yang dibuatnya, stafilokokus dibagi dalam beberapa spesies. Yang berwarna kuning keemasan dinamakan *Staphylococcus aureus*, yang putih dinamakan *Staphylococcus albus*, dan yang kuning dinamakan *Staphylococcus citreus*. Pada umumnya bakteri yang menghasilkan warna kuning emas (*aureus*) adalah patogen. Pigmen ini tidak terbentuk pada keadaan anaerob dan juga tidak terbentuk pada perbenihan cair (Warsa *et al.*, 1994; Dzen *et al.*, 2013).

2.1.4 Daya Tahan

Stafilokokus relatif resisten terhadap pengeringan, panas (bakteri ini tahan terhadap suhu 50°C selama 30 menit), dan terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat zat kimia tertentu, seperti heksaklorofen 3% (Brooks *et al.*, 2010).

Diantara bakteri yang tidak membentuk spora, maka *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang paling kuat daya tahannya. Pada agar miring atau keadaan beku dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain dan dalam nanah dapat tetap hidup selama 6-14 minggu (Warsa *et al.*, 1994).

Beberapa galur dari *S. aureus* menghasilkan enzim penisilinase sehingga resisten terhadap golongan obat penisilin, tapi biasanya masih peka terhadap

golongan penisilin yang tahan terhadap penisilinase, misalnya metisilin dan oksasilin. Namun demikian, juga telah dikenal galur stafilokokus yang resisten terhadap metisilin yang disebut *Methicilin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) dan *Methicilin Resistant Staphylococcus Epidermidis* (MRSE). Galur ini sering menimbulkan masalah di klinik karena sifatnya yang resisten terhadap berbagai antibiotika golongan β -laktam, tetapi biasanya masih peka terhadap vankomisin atau golongan aminoglikosida (Dzen *et al.*, 2013).

2.1.5 Struktur Antigen

Stafilokokus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigen. Polisakarida yang ditemukan pada jenis yang virulen disebut polisakarida A (Ag-KH tipe A), dan yang ditemukan pada jenis yang tidak patogen disebut polisakarida B (Ag-KH tipe B) (Warsa *et al.*, 1994).

Polisakarida dan protein merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang terangkai, merupakan eksoskeleton kaku pada dinding sel. Peptidoglikan dapat dihancurkan oleh asam kuat atau lisozim (Brooks *et al.*, 2010).

2.1.6 Metabolit Bakteri

2.1.6.1 Metabolit Non Toksin

Yang termasuk metabolit nontoksin ialah antigen permukaan, koagulasi, hialuronidasa, fibrinolisin, gelatinasa, protease, lipase, tributirinasa, fosfatasa, dan katalasa (Warsa *et al.*, 1994). Berikut ini adalah penjelasan dari metabolit non toksin dari *S. aureus*:

1) Antigen permukaan (materi kapsul)

Antigen ini berfungsi untuk mencegah fagositosis oleh faga, mencegah reaksi koagulase, mencegah melekatnya bakteriofaga (Dzen *et al.*, 2013).

2) Koagulase

S. aureus menghasilkan koagulase, suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma. Faktor serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan menyebabkan aktivitas pembekuan, dengan cara yang mirip dengan pengaktifan protrombin menjadi thrombin. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Brooks *et al.*, 2010).

3) Hialuronidase

Dihasilkan oleh 93.6% galur dengan koagulase yang positif, tapi tidak dibentuk oleh galur dengan koagulase negatif. Secara *in vitro*, dapat dihasilkan bila medium diperkaya dengan tirosin dan triptofan. Dengan menghasilkan hialuronidase maka bakteri bersifat invasif, tapi sifat ini terjadi pada fase awal dari infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan (Dzen *et al.*, 2013). Penyebaran bakteri dipermudah dengan adanya enzim ini, oleh karena itu enzim ini juga disebut sebagai *spreading factor* (Warsa *et al.*, 1994).

4) Stafilokinase (fibrinolisin)

Enzim ini dapat melisiskan bekuan darah dalam pembuluh darah yang sedang meradang, sehingga bagian-bagian dari bekuan yang penuh bakteri terlepas dan menyebabkan terjadinya lesi metastatik di tempat lain (Warsa *et al.*, 1994). Stafilokinase mengakibatkan fibrinolisis tetapi kerjanya jauh lebih lambat daripada streptokinase; proteinase; lipase; dan β -laktamase (Brooks *et al.*, 2010). Menurut Dzen *et al.* (2013), metabolit tersebut 80% dihasilkan oleh galur

koagulase positif dan dihasilkan juga oleh galur dengan koagulase negatif. Enzim ini bekerja sebagai activator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (*heat labile*).

5) Protease

Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi, termasuk jaringan tulang (Dzen *et al.*, 2013).

6) Lipase dan Tributirinase

Enzim ini bersifat antigenik. Lipase terutama dihasilkan oleh jenis koagulase positif, tetapi tidak mempunyai peranan yang khas. Tributirinase atau *egg-yolk factor* merupakan suatu *lipase-like enzyme* yang menyebabkan terbentuknya *fatty droplets* dalam suatu perbenihan kaldu yang mengandung glukosa dan kuning telur (Warsa *et al.*, 1994; Dzen *et al.*, 2013).

7) Fosfatase

Fosfatase erat hubungannya dengan patogenitas dan galur koagulase positif pada umumnya menghasilkan lebih banyak fosfatase daripada galur koagulase negatif, namun kadang-kadang ada juga galur koagulase negatif yang menghasilkan fosfatase lebih banyak. Oleh karena itu, apabila fosfatase digunakan sebagai indikator patogenitas, nilainya kurang (Dzen *et al.*, 2013).

2.1.6.2 Eksotoksin

Eksotoksin stafilokokus bersifat mematikan, tidak tahan panas (*thermo labile*), dan dapat menyebabkan nekrosis lapisan dermis (Dzen *et al.*, 2013).

Dengan elektroforesis, dapat dipisahkan beberapa eksotoksin, yaitu sebagai berikut:

1) Toksin alfa (α -toxin)

Toksin alfa (α -toxin) bersifat mematikan leukosit dan makrofag (*leucocidal*). Dapat menyebabkan lisis eritrosit kelinci dan merusak trombosit. Memiliki sifat sitotoksik terhadap biakan jaringan manusia. Pada penyuntikan intrakutan dapat menyebabkan nekrosis dan mempunyai efek letal. Toksin alfa ini mempunyai daya kerja kuat pada otot polos pembuluh darah dan dapat dipakai untuk menentukan virulensi (Warsa *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2010; Dzen *et al.*, 2013).

2) Toksin beta (β -toxin)

Toxin beta merusak sfingomielin dan bersifat racun untuk berbagai jenis sel, termasuk sel darah manusia (Brooks *et al.*, 2010). Pada eritrosit sapi mempunyai sifat *hold cold type* artinya pada BAP darah sapi pada 37°C tampak dekolorisasi di sekitar koloni dan pada waktu didinginkan dalam almari es selama 24 jam terjadi hemolisis komplit (Dzen *et al.*, 2013).

3) Toksin delta (δ -toxin)

Toksin delta bersifat non toksik, dapat merusak sel eritrosit manusia dan kuda (Dzen *et al.*, 2013).

4) Panton-Valentin (PV) atau leukosidin

PV bersifat tahan terhadap pemanasan non-hemolitik dan dinetralsir oleh kolesterol (Dzen *et al.*, 2013). Peranannya dalam pathogenesis masih belum jelas, sebab stafilokokus patogen tidak dapat mematikan sel-sel darah putih. Namun, bakteri patogen mampu berkembang biak dengan sangat aktif di dalam sel, sedangkan organisme non patogen cenderung mati bila berada di dalam sel (Brooks *et al.*, 2010).

2.1.6.3 Enterotoksin

Terutama dihasilkan oleh galur yang mengandung faga grup III, atau 30% oleh galur dengan tes koagulase positif. Enterotoksin ini merupakan protein dengan berat molekul sekitar 35.000 Da tahan terhadap pemanasan atau pendidihan selama 30 menit, tahan terhadap daya kerja enzim-enzim usus, dan sering merupakan penyebab dari kasus keracunan makanan. Seseorang yang menelan enterotoksin lebih 25 µg akan menyebabkan muntah dan diare. Efek emetic ini akibat rangsangan pada CNS (*emetic center*) (Dzen *et al.*, 2013).

Penyembuhannya biasanya terjadi setelah 24-48 jam dan jarang berakibat fatal. Efek muntah terjadi karena toksin merangsang pusat muntah di susunan saraf pusat. Belum ditemukan suatu cara yang mudah yang dapat menyatakan bahwa suatu perbenihan bakteri stafilokokokus mengandung enterotoksin, yang jelas ada hubungan antara pembentukan enterotoksin dan koagulasa. Namun, perlu diingat bahwa enterotoksin bersifat termostabil, sehingga jika makanan yang tersangka telah dipanaskan mungkin tidak dapat ditemukan bakteri lagi, meskipun di dalamnya terkandung jumlah besar enterotoksin (Warsa *et al.*, 1994).

2.1.6.4 Toksin Epidemolitik atau eksfoliatif

Toksin ini dihasilkan oleh stafilokokokus grup II dan merupakan suatu protein ekstraseluler yang tahan panas tetapi tidak tahan asam. Toksin ini menyebabkan terjadinya *scalded skin syndrome*. Sindroma ini berupa pengelupasan epidermis kulit sebagai akibat lisisnya perlekatan antar sel pada *stratum germinativum*, tanpa disertai peradangan dan kematian sel. *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSS) meliputi dermatitis eksfoliativa pada neonatus (*Ritter's disease*), impetigo bulosa, *Staphylococcal scaltitiform*

rash dan toksin epidermal nekrolisis pada orang dewasa. (Warsa *et al.*, 1994; Dzen *et al.*, 2013).

2.1.6.5 Toxic Shock Syndrome Toxin

Toksin ini menyebabkan terjadinya sindrom klinik berupa panas (febris), ruam kulit, hipotensi bahkan sampai syok. Diperkirakan toksin ini merangsang sel-sel imunokompeten dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga digolongkan sebagai super antigen (Dzen *et al.*, 2013).

2.1.7 Patogenesis dan Infeksi

Stafilokokus merupakan sebagian dari flora normal pada kulit manusia, saluran pernapasan dan saluran pencernaan makanan (Warsa *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2010). *S. aureus* dapat menginfeksi vagina dan menyebabkan munculnya reaksi inflamasi atau biasa disebut sebagai vaginitis. Bakteri patogen, seperti *S. aureus* akan lebih mudah berkembang jika *Lactobacillus* spp, sebagai bakteri normal vagina jumlahnya $<10^3$ CFU/ml (Lakshmi *et al.*, 2013).

Infeksi akibat bakteri dapat memunculkan reaksi inflamasi. Reaksi inflamasi merupakan sistem kekebalan tubuh yang dapat muncul akibat adanya produksi sitokin proinflamasi yang cukup tinggi, terutama IL-1 β , IL-6, dan IL-8 (Donders *et al.*, 2002). Pada penelitian Marconi *et al.* (2013), sitokin IL-8 dan IL-6 akan lebih banyak diproduksi pada kasus vaginitis yang diakibatkan bakteri aerobik daripada bakteri anerobik.

Vaginitis dapat menyebabkan korioamnionitis, *preterm premature rupture of membrane* (PPROM), dan persalinan kurang bulan (Donders *et al.*, 2002; Zarbo *et al.*, 2013). Mekanisme Hubungan antara peningkatan sitokin IL-1 β , IL-6, dan IL-8 terhadap kejadian ketuban pecah dini, kelahiran *preterm*, dan korioamnionitis dapat ditunjukkan dalam beberapa penelitian (Massaro *et al.*,

2009). Infeksi pada selaput ketuban dapat meningkatkan produksi mediator seperti prostaglandin, sitokinin, dan protein hormon yang merangsang aktivitas “*matrix degrading enzim*”, sehingga menyebabkan aktivitas kolagen berubah dan menyebabkan selaput ketuban pecah. Ketuban pecah dini dapat menyebabkan persalinan kurang bulan dan koriamnionitis (Saifuddin *et al.*, 2009).

2.1.8 Gambaran Klinik

Bakteri ini dapat menyerang seluruh tubuh. Bentuk klinisnya tergantung dari bagian tubuh yang terkena infeksi. Pada kulit dapat menimbulkan furunkel, karbunkel, impetigo, *scalded skin syndrome*, dan lain-lain. Pada kuku dapat menimbulkan paronikhia. Pada tulang dapat menimbulkan osteomielitis. Pada sistem pernapasan dapat menimbulkan tonsillitis, bronchitis, dan pneumonitis. Pada otak dapat menimbulkan meningitis dan ensefalomielitis. Pada traktus urogenitalis dapat menimbulkan sistitis dan pielitis, serta dapat menimbulkan *toxic shock syndrome*, yaitu suatu keadaan ditandai dengan panas mendadak, diare, syok, *diffuse macula erythematous rash*, hiperemi pada konjungtiva dan orofarings (Dzen *et al.*, 2013).

Infeksi bakteri pada vagina menyebabkan vaginitis. Donders *et al.* (2002), membagi menjadi dua tipe dari bakterial vaginitis, yaitu vaginitis anaerobik dan vaginitis aerobik.

2.1.8.1 Vaginitis anaerobik

Vaginitis anaerobik atau sering disebut sebagai bakterial vaginosis disebabkan oleh tergantikannya bakteri normal vagina dengan bakteri anaerob seperti *Gardnerella vaginalis*. Gambaran klinik dari bakterial vaginosis adalah keputihan berwarna putih abu-abu dan berbau amis, keputihan jarang menimbulkan rasa gatal, pada identifikasi mikroskopik terdapat sel-sel clue yaitu

sel-sel epitel vagina dengan kerumunan bakteri menempel pada membran sel, pH cairan vagina ≥ 4.5 , uji *Whiff* positif ditandai dengan adanya bau amis pada penambahan KOH di cairan vagina (Saifuddin *et al.*, 2009).

2.1.8.2 Vaginitis aerobik

Vaginitis aerobik disebabkan oleh turunya jumlah bakteri normal vagina dan meningkatnya bakteri patogen aerobik seperti *Eschericia coli*, *Streptococcus grup B*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis* (Donders *et al.*, 2002).

Vaginitis aerobik dapat menimbulkan tanda gejala seperti keputihan yang berwarna kekuningan dan gatal, dispareuni, pada pemeriksaan vagina didapatkan peningkatan pH vagina hingga >6 , tes amine atau KOH negatif, dan munculnya sel parabasal (Zarbo *et al.*, 2013).

2.1.9 Diagnosis Laboratorium *S. aureus*

2.1.9.1 Bahan dan Sediaan

Menurut Dzen *et al.* (2013), bahan pemeriksaan yang diambil tergantung pada bentuk klinisnya, misalnya:

- 1) Eksudat dari abses atau mukus diambil dengan lidi kapas steril secara aseptis kemudian dimasukkan ke dalam medium cair.
- 2) Sputum bila ada infeksi saluran pernapasan bagian bawah.
- 3) Feses dan sisa-sisa bahan makanan terutama pada kasus keracunan makanan.
- 4) Darah bila terdapat bakterimia.
- 5) Urin pada infeksi saluran kemih diambil dengan cara tertentu.
- 6) Pada karier bahan pemeriksaan diambil dari hidung bagian bawah depan dan daerah perineal.

2.1.9.2 Biakan dan Identifikasi

Menurut Dzen *et al.* (2013), dari bahan-bahan tersebut kemudian dilakukan:

- 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:

a) Identifikasi

Dengan tes katalase yang memberikan hasil positif. Tes ini untuk membedakan dengan streptokokus yang memberikan hasil negatif (Dzen *et al.*, 2013). Tes katalase ini dilakukan dengan cara meletakkan setetes larutan hydrogen peroksida (H_2O_2) di atas kaca objek, dan sedikit pertumbuhan bakteri diletakkan di atas larutan tersebut. Pembentukan gelembung udara (pelepasan oksigen) menunjukkan tes positif. Tes juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hydrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur pada agar miring dan meneliti gelembung yang muncul (Brooks *et al.*, 2010).

b) Tes patogenisitas

Tes patogenisitas dilakukan sesuai dengan kemampuan laboratorium, dapat berupa tes koagulase (gelas objek atau tabung), tes produksi DNase, dan fermentasi manitol (Dzen *et al.*, 2013). Tes koagulase dapat dilakukan dengan cara, plasma manusia yang telah diberi sitrat dan diencerkan 1:5 dicampur dengan biakan kaldu yang sama banyaknya dan kemudian dieramkan pada $37^{\circ}C$. Sebagai kontrol, dalam

suatu tabung dicampur plasma dan kaldu steril, kemudian dieramkan. Jika terjadi pembekuan dalam waktu 1-4 jam, maka tes itu dikatakan positif. Semua stafilocokus yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Brooks et al., 2010).

4) Penentuan tipe bakteriofaga (lisotopi)

Penentuan tipe faga tersebut besar sekali manfaatnya dalam hubungannya dengan kejadian luar biasa (*outbreak*) suatu penyakit atau infeksi nosokomial yang disebabkan oleh stafilocokus. Penentuan tipe bakteriofaga (lisotopi) dapat untuk menentukan petanda epidemiologi dari suatu *outbreak* (Dzen et al., 2013).

Penentuan tipe faga hanya dipakai untuk melacak infeksi dalam penelitian epidemiologi pada wabah infeksi *S. aureus* yang luas (Brooks, et al., 2010). Selain itu dengan lisotopi dapat pula ditentukan apakah suatu jenis berasal dari hewan atau dari manusia lain (Warsa et al., 1994).

2.1.10 Transmisi

Menurut Dzen et al. (2013), cara penularan infeksi stafilocokus tergantung pada bentuk klinis, misalnya:

- a) Kontak langsung, terjadi pada peradangan yang menyerang kulit dan kuku. Penularan ini terjadi apabila kulit dalam keadaan tidak intak, misalnya ada lesi.
- b) Penularan lewat udara (*airbone infection*).

Airbone infection di dalam kamar operasi dapat dicegah dengan pemakaian sinar ultraviolet. Perlu dilakukan tindakan yang tepat terhadap tenaga kesehatan yang bekerja di rumah sakit atau yang berhubungan dengan masyarakat.

2.1.11 Resistensi *Staphylococcus aureus*

Bakteri yang sering menimbulkan resistensi terhadap antibiotik adalah bakteri *Staphylococcus aureus* atau yang biasa disebut MRSA (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*). MRSA merupakan galur multiresisten (bakteri yang tidak peka) terhadap semua golongan betalaktam, dan terhadap antibiotik non betalaktam seperti golongan aminoglikosida (eritromisin), inhibitor sintesa protein (tetrasiklin, kloramfenikol) dan golongan kuinolon (Yowono, 2013).

Terdapat berbagai mekanisme yang menyebabkan bakteri *S. aureus* bersifat resisten terhadap obat, diantaranya:

- 1) Bakteri *S. aureus* resisten terhadap antibiotik β -laktam dengan cara menghasilkan enzim yang dapat menghancurkan obat golongan β -laktam. Genus stafilokokus yang resisten terhadap penisilin disebabkan karena stafilokokus menghasilkan enzim β -laktamase yang memecahkan cincin β -laktam dari penisilin, sehingga obat penisilin tidak aktif bekerja (Warsa, *et al.*, 1994).
- 2) Bakteri *S. aureus* resisten terhadap antibiotik non betalaktam melalui dua cara yaitu mutasi pada gen *gyrA* yang menyebabkan kegagalan formasi *supercoiling* kromosom dan *active efflux* yaitu pengeluaran obat secara aktif segera setelah obat tersebut masuk ke dalam sel bakteri. Gen yang menyandi protein pompa (*efflux*) ini adalah gen *norA* yang berlokasi di kromosom (Yuwono, 2013).

2.2 Secang (*Caesalpinia sappan L*)

2.2.1 Taksonomi dan Nama daerah

Sinonim : *Biancaea sappan* (L.) Tadaro.

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Fabales

Suku : Fabaceae

Marga : *Caesalpinia*

Jenis : *Caesalpinia sappan* L.

Nama umum : Kayu secang, secang (Sherley *et al.*, 2008).

Nama daerah di dunia: Sappan wood, Indian red wood (inggris). Sappan (prancis). Malaysia: sepang (umum). Filipina: sibukao (Tagalog, Bisaya), sapang (Tagalog, Bisaya, Ilokano). Burma: teing-nyet. Cambodia: sbaeng. Laos: faang deeng. Thailand: faang (umum), faang som (kanchanaburi), ngaai (Karen, kanchanaburi). Vietnam: vang nhuom, to moc (Lemmens dan Soetjipto, 1992).

Nama daerah di Indonesia : Seupeng (Aceh); Sopang (Batak); Cacang, sapang, lacang (Minangkabau); Sepang (Sunda, bugis, gayo, sasak); Kayu secang, Soga Jawa (Jawa); Kaju secang (Madura); Cang (Bali); Supa, Supang (Bima); Sepel (Timor); Hape (Sawu); Hong (Alor); Sepe (Roti); Kayu sema (Manado); Sapang (Makassar); Dolo (Bare); Sefen (Halmahera Selatan); Sawala, Hiniaga, Sinyiang, Singiang (Halmahera Utara); Sunyiha (Ternate); Roro (Tidore), (Sherley *et al.*, 2008; Achmad *et al.*, 2008).

2.2.2 Deskripsi

Habitus secang berupa semak atau pohon kecil, tinggi lebih dari 10 m. Ranting - ranting berlentisel dan berduri, bentuk duri bengkok dan tersebar. Daun majemuk, panjang 25-40 cm, bersirip, 9-14 pasang sirip, setiap sirip mempunyai sepuluh sampai dua puluh pasang anak daun yang berhadapan. Anak daun tidak bertangkai, bentuk lonjong, ujung bundar serta sisinya agak sejajar, panjang anak daun 10-25 mm, lebar 3-11 mm. Perbungaan berupa malai, pinggir kelopak berambut, berwarna kuning, Polong berwarna hitam, berbentuk lonjong, pipih dengan panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm, berisi 3-4 biji (Sherley *et al.*, 2008).



(a)

(b)

(c)

Gambar 2.3 Pohon (a) , Kayu (b), dan Biji Secang (c) (Sherley *et al.*, 2008)

2.2.3 Persebaran dan Ekologi Tanaman

Asal dari tumbuhan secang masih belum diketahui, tetapi tersebar di daerah tengah dan selatan india meliputi Burma, Thailand, Indo-China dan selatan Cina sampai semenanjung Malaysia. Secang banyak tumbuh dan dibudidayakan di Malesia (Indonesia, Filipina, Papua Nugini) dan juga di India, Sri langka, Taiwan, pulau Solomon, dan Hawaii (Lemmens dan Soetjpto, 1992).

Secang tersebar luas dan dapat tumbuh di daerah tropika dan subtropika (Ahmad *et al.*, 2008).

Pada keadaan di bawah kondisi normal, secang tumbuh paling banyak pada daerah perbukitan dengan tanah liat dan batu berkapur pada ketinggian rendah dan sedang. Di Semenanjung Malaysia, secang tumbuh dengan baik di pinggir sungai berpasir. Sedangkan di Indonesia secang ditanam sebagai tanaman pagar. Secang tidak dapat tumbuh pada kondisi tanah yang kering. Secang dapat hidup dengan presipitasi 700-4300 mm pertahun, dan pada suhu 24-27.5°C, dan pada pH tanah 5-7,5. Perkembangbiakan secang dapat melalui biji dan memperbarui semak-semak secang (Lemmens dan Soetjipto, 1992).

2.2.4 Kandungan Kimia

Secang kaya dengan kandungan kimia. Secang memiliki kandungan senyawa berupa brazilin, brazilein, saponin dan minyak atsiri (Sugiyanto *et al.*, 2013). Senyawa brazilin, brazilein, dan 3'-O-metilbrazilin merupakan senyawa pewarna alami dan disebut sebagai komposit brazilin (Astina, 2010). Batang dan daun secang mengandung alkaloid, tannin, saponin yang melimpah dan fitosterol dan buahnya mengandung 40% tannin (Lemmens dan Soetjipto, 1992). Pada kayu kering secang juga ditemukan beberapa senyawa flavonoid, seperti kuercetin dan rametin (Ahmad *et al.*, 2008).

Menurut Hariana (2013) dan Sukarsono *et al.* (2010), daunnya mengandung 0.16% - 0.20% minyak atsiri yang beraroma enak dan hampir tidak berwarna.

Diantara beberapa kandungan senyawa dari kayu secang, senyawa saponin, alkaloid, flavonoid dan tannin memiliki fungsi sebagai antimikroba (Poeloengan dan Praptiwi, 2010).

Berikut ini merupakan penjabaran dari kandungan senyawa pada kayu secang:

2.2.4.1 Brazilin

Brazilin ($C_{16}H_{14}O_5$) adalah zat warna merah dari kayu secang yang terbentuk pada ekstrak cair pada suasana pH netral. Pigmen warna alami kayu secang dipengaruhi oleh tingkat keasamannya. Pada suasana asam (pH 2-4) berwarna kuning sedangkan pada suasana netral dan alkali (pH 6-8) berwarna merah keunguan (Padmaningrum *et al.*, 2012). Senyawa brazilin memiliki kelarutan yang sangat baik pada etanol dibandingkan dengan aquadest, sehingga kemampuan penyarian aquadest terhadap brazilin lebih kecil daripada etanol (Astina, 2010).

Selain itu, brazilin mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dan bakteriostatik (Kumala *et al.*, 2009). Berdasarkan penelitian Batubara (2010), senyawa brazilin memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik daripada protosappanin A dan saponin B. Namun, mekanisme brazilin untuk menghambat bakteri masih belum diketahui.

2.2.4.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung nitrogen dan bersifat basa seperti yang ditunjukkan oleh namanya. Alkaloid tersebar luas di dunia tumbuhan, presentase jenis tumbuhan yang mengandung alkaloid sekitar 15-30% (Robinson, 1995). Alkaloid banyak ditemukan pada kelompok tanaman angiospermae, pada kelompok tanaman gymnospermae seperti paku-pakuan, lumut dan tumbuhan rendah umumnya tidak ditemukan senyawa alkaloid (Harborne, 1987).

Mekanisme alkaloid yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan mengakibatkan pembentukan sel tidak sempurna. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis, baik berupa fisik maupun osmotik dan menyebabkan kematian sel (Mahanani *et al.*, 2012).

Bakteri *S. aureus* merupakan gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal. Sehingga lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang punya potensi merusak atau menghambat sintesis dinding sel. Diduga kerja alkaloid terlebih dahulu merusak dinding sel dan dilanjutkan kerja flavonoid yang merusak membran sel bakteri (Retnowati *et al.*, 2011).

Uji kandungan fitokimia alkaloid menurut Tarigan *et al.* (2008), dapat dilakukan dengan cara, menimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram, dan ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, kemudian memanaskan di atas pemanas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh di pakai untuk test alkaloida sebagai berikut :

- 1) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambah dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.
- 2) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
- 3) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Wagner, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat.

2.2.4.3 Flavonoida

Flavonoid merupakan kelompok bahan alam dengan struktur fenolik dan memiliki berat molekul yang rendah. Secara umum, senyawa flavonoid banyak terdapat pada tumbuhan dan tersebar dalam seluruh bagian tumbuhan. Flavonoid dapat ditemukan pada sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan, biji, batang, dan daun. Flavonoid memiliki aktivitas farmalogikal, diantaranya adalah sebagai antioksidan, hepatoprotektif, anti kanker, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, sebagai obat pada penyakit neurodegeneratif, dan vasodilatasi (Robinson, 1995; Sandhar *et al.*, 2011).

Fungsi flavonoid sebagai antimikroba telah banyak ditemukan melalui beberapa penelitian *in vitro*, bahwa flavonoid merupakan zat yang dapat menghambat mikroba secara luas. Flavonoid sebagai antibakteri dapat menyerang lebih dari satu target dalam sel bakteri. Peranan flavonoid sebagai antimikroba dihubungkan dengan kemampuannya untuk menonaktifkan adhesi mikroba, enzim, pertukaran protein pada dinding sel, dan lain-lain. Flavonoid bersifat lipofilik sehingga dapat mengganggu dari membran mikroba. Semakin lipofilik suatu flavonoid, kemampuannya dalam merusak dinding sel semakin kuat (Kumar dan Pandey, 2013).

Menguji kandungan fitokimia flavonoid dapat dilakukan dengan cara menambahkan etanol lebih kurang $\frac{1}{2}$ dari larutan dan ditambahkan serbuk Mg 5 mg dan 1 ml HCl pekat ke dalam 0.5 gram ekstrak etanol kayu secang, kemudian dikocok dengan kuat dan membiarkan larutan hingga memisah, lalu mengamati perubahan yang terjadi, jika terbentuk warna merah orange dalam etanol menandakan adanya flavonoid (Yunita *et al.*, 2010).

2.2.4.4 Tanin

Tanin terdapat luas pada tumbuhan berpembuluh. Tanin dapat larut dalam pelarut organik yang polar, tetapi tidak larut dalam pelarut organik nonpolar seperti benzene atau kloroform (Robinson, 1995).

Menurut beberapa penelitian, tanaman yang mengandung tanin dapat menghambat serangan dari bakteri, sehingga tanin dapat bersifat sebagai antibakteri dan astringen (Kumala *et al.*, 2009).

Mekanisme tanin sebagai antibakteri diduga dikarenakan tanin memiliki kemampuan untuk menonaktifkan adhesin sel mikroba, menonaktifkan enzim, dan mengganggu sintesis protein pada lapisan dalam sel. Tanin dapat menghambat enzim transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak terbentuk (Cowan, 1999). Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Tanin dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada konsentrasi tinggi, tanin bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma bakteri, sehingga terbentuk ikatan yang stabil dengan protein bakteri pada saluran pencernaan, tannin juga diketahui mampu menggugurkan toksin (Poeloengan dan Praptiwi, 2010).

Uji fitokimia tanin dapat dilakukan dengan cara, menimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram, kemudia masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml air, dididihkan, lalu disaring. Tambahkan beberapa tetes FeCl 0,1% pada filtrat dan amati hasilnya. Sampel positif dapat dikatakan apabila hasil menunjukkan warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Tarigan *et al.*, 2008).

2.2.4.5 Saponin

Saponin merupakan senyawa bioaktif yang terutama di produksi pada tumbuhan. Saponin berasal dari kata “sapo” diturunkan dari bahasa latin yang berarti pembentukan gelembung sabun atau buih yang stabil pada larutan air. Senyawa saponin memiliki sifat lyobipolar, sehingga menyebabkan saponin dapat mempengaruhi membran sel dan juga dapat menurunkan tekanan permukaan pada larutan air (Thakur *et al.*, 2011). Terdapat dua jenis saponin, yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter (Robinson, 1995).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor sehingga mengakibatkan kematian sel (Ngajow *et al.*, 2013).

Uji senyawa saponin dapat dilakukan dengan cara, menimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram, dan masukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dan didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Tarigan *et al.*, 2008).

2.2.5 Pemanfaatan

Kayu dari secang merupakan sumber utama sebagai pewarna. Sampai saat ini masih digunakan sebagai pewarna namun dalam skala yang kecil. Di Indonesia, irisan kayu secang digunakan sebagai minuman (wedang uwuh) yang berkhasiat dalam mengatasi perut kembung dan penghangat tubuh (Lemmens dan Soetjipto, 1992 dan Sugiyanto *et al.*, 2013).

Kayu secang juga digunakan sebagai obat di India, Indonesia dan Filipina. Rebusan dari kulit kayu dan kayu secang digunakan untuk mengobati tuberculosis, diare dan disentri. Bijinya dapat digunakan sebagai sedatif. Selain itu, secang telah terdaftar secara resmi dalam Farmakope Cina dan digunakan dalam obat tradisional Cina untuk gangguan menstruasi, sebagai analgesik, sebagai antiinflamasi, dan kayu secang digunakan untuk menyembuhkan luka dan wazir (Ahmad *et al.*, 2008).

Menurut Srinivasan *et al.* (2012), secara tradisional secang digunakan sebagai agen untuk menyembuhkan infeksi pada kulit dan anemia. Rebusan dari hati kayunya secara umum digunakan untuk mengobati arthritis, pembersih darah, dan antidiabetes. Beberapa aktivitas biologi dari secang dilaporkan dapat digunakan sebagai antikomplementari, antikejang, antibakteria, antimikroba, antioksidan, antikanker, dan hepatoprotektif.

2.3 Mekanisme Kerja Antibakteri

Mekanisme kerja obat antibakteri adalah dengan cara: inhibisi sintesis dinding sel, inhibisi fungsi membran sel, inhibisi sintesis protein (yaitu inhibisi translasi dan transkripsi bahan genetik), dan inhibisi sintesis asam nukleat (Brooks *et al.*, 2010).

2.3.1 Inhibisi Dinding Sel

Bakteri mempunyai lapisan luar yang kaku, yaitu dinding sel. Dinding sel mempertahankan bentuk dan ukuran mikroorganisme, yang mempunyai tekanan osmotik internal tinggi. Cedera pada dinding sel (misal, karena lisozim) atau inhibisi pada pembentukannya dapat menyebabkan sel menjadi lisis (Brooks *et al.*, 2010). Pada lingkungan yang hipertonis (misalnya sukrosa 20%), meskipun terjadi kerusakan dinding sel tetapi bakteri masih mampu hidup disebut *L-form*, menghasilkan bentuk bakteri yang bulat yang disebut *protoplast* (bila berasal dari bakteri gram positif) atau *spheroplast* (bila berasal dari bakteri gram negatif). Apabila bakteri *L-form* ini dipindahkan ke dalam lingkungan yang isotonis atau 'ordinary tonicity' maka sel bakteri tersebut akan pecah (Dzen *et al.*, 2013).

Contoh-contoh agen yang bekerja dengan cara inhibisi sintesis dinding sel adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan sikloserin. Beberapa obat lain, termasuk basitrasin, teikoplanin, vankomisin, ristosetin, dan novobiosin, menghambat langkah awal dalam biosintesis peptidoglikan (Brooks *et al.*, 2010). Obat antimikroba yang menghambat pembentukan dinding sel efektif pada saat bakteri sedang aktif membelah (Dzen *et al.*, 2013).

2.3.2 Fungsi Membran Sel

Membran sel menjaga komposisi internal dari sel dengan cara berfungsi di dalam permeabilitas selektif dan proses transport aktif. Rusaknya membran sel dapat menyebabkan metabolit penting di dalam sel lolos keluar sel dan mengakibatkan kematian sel (Dzen *et al.*, 2013).

Sitoplasma semua sel yang hidup diikat oleh membran sitoplasma, yang bekerja sebagai barrier permeabilitas selektif, berfungsi sebagai transport aktif, sehingga mengontrol komposisi internal sel. Jika integritas fungsional membran

sitoplasma terganggu, makromolekul dan ion dapat keluar dari sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Membran sitoplasma bakteri dan jamur mempunyai struktur yang berbeda dari sel-sel hewan dan dapat lebih mudah dirusak oleh agen tertentu (Brooks *et al.*, 2010).

Detergen mengandung kelompok lipofilik dan hidrofilik yang dapat mengganggu membran sitoplasma dan dapat membunuh sel. Contoh antibiotik yang memiliki mekanisme tersebut adalah polimiksin, yang dapat merusak membran yang mengandung fosfatidylethanolamine, sebuah komponen terbesar dari membran bakteri. Antibiotik yang secara spesifik mempengaruhi fungsi biosintesis membran sitoplasma adalah seperti asam nalidixic dan novobiocin yang dapat menghambat sintesis DNA. Daptomicin merupakan antibiotik lipopeptida yang memiliki mekanisme berikatan dengan membran sel bakteri. Sehingga, obat ini digunakan untuk mengobati akibat infeksi *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram positif lainnya yang resisten terhadap β -lactam dan vankomisin (Warsa *et al.*, 1994).

2.3.3 Inhibisi Sintesis Protein

Bakteri mempunyai ribosom 70S, sedangkan sel mamalia mempunyai ribosom 80S. Sub unit setiap tipe ribosom, komposisi kimianya, dan spesifisitas fungsionalnya yang berbeda dapat menjelaskan mengapa obat antimikroba dapat menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri tanpa berefek besar pada ribosom mamalia. Contoh obat yang dapat menghambat sintesis protein adalah eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, glisilsiklin, aminoglikosida, dan kloramfenikol (Brooks *et al.*, 2010).

2.3.4 Merusak Asam Nukleat

Komponen bioaktif antimikroba dapat mengganggu asam nukleat (RNA dan DNA). Sintesis DNA dan RNA merupakan fungsi pokok dalam pembelahan dan pertumbuhan sel. Penghambatan sintesis DNA secara cepat akan menghambat pembelahan sel. Penghambatan sintesis DNA akan merubah biosintesis dan menyebabkan bahan-bahan ekstrakromosom dari DNA seperti episome dan plasmid akan keluar ke interseluler. Selain itu, penghambatan dalam sintesis RNA akan menghambat dari sintesis protein (Franklin dan Snow, 1989). Antimikroba dapat bekerja dengan cara menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi misalnya rifampisin atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel (Dzen *et al.*, 2013). Kuinolon dan flurokuinolon dapat menghambat sintesis DNA mikroba (Brooks *et al.*, 2010).

2.4 Metode Uji Kepekaan bakteri terhadap Antibakteri Secara *In Vitro*

Uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara *in vitro* bertujuan untuk mengetahui obat antimikroba yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba tersebut. Uji kepekaan terhadap obat antimikroba pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu: metode dilusi, dan metode difusi (Dzen *et al.*, 2013).

2.4.1 Metode Dilusi

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (kadar hambat minimal) dan KBM (kadar bunuh minimal) dari obat antimikroba. Prinsip dari metode dilusi adalah 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. 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 dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. Untuk menentukan KHM obat, dapat juga dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode E test (Dzen *et al.*, 2013).

2.4.2 Metode Difusi

2.4.2.1 Difusi Disk

Prinsip dari metode difusi cakram adalah sebagai berikut, obat dijenuhkan ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Dzen *et al.*, 2013).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara seperti berikut ini.

1) Cara Kirby Bauer

Dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan table standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten (Dzen *et al.*, 2013).

2) Cara Joan Stokes

Dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat 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 (Dzen *et al.*, 2013).

2.4.2.2 Difusi Lubang (Sumuran)

Metode lubang atau sumuran serupa dengan metode *disc diffusion*, metode ini dilakukan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmiyati dan Agustini, 2007; Pratiwi, 2008).

2.5 Simplisia dan Metode Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alam

2.5.1 Simplisia

Simplisia atau herbal adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C. Simplisia segar adalah bahan alam segar yang belum dikeringkan (Kemenkes, 2009).

2.5.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan, hewan, dan beberapa jenis biota laut. Sedangkan ekstrak adalah sediaan kering, kental

atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Kemenkes, 2009).

Beberapa metode ekstraksi menggunakan pelarut dapat dibagi menjadi dua yakni cara dingin dan cara panas.

2.5.2.1 Cara Dingin

1) Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Pengestrakan dengan cara ini dapat menarik zat-zat yang tahan terhadap pemanasan maupun tidak (Permata, 2014). Berdasarkan hasil penelitian Senja *et al.* (2014), maserasi dengan pelarut etanol 96% menghasilkan rendemen tertinggi daripada dengan pelarut etanol 70%, 80%, 95%.

2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak/perkolat (Ditjen POM, 2000).

2.5.2.2 Cara Panas

1) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Ditjen POM, 2000). Biasanya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama, yakni 3-5 kali sehingga termasuk proses ekstraksi sempurna (Permata, 2014).

2) Soxhletasi

Proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru dan dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara terus menerus dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendinginan balik (Permata, 2014).

3) Digesti

Digesti adalah maserasi dengan pengadukan secara terus menerus pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar, yaitu pada 40-50°C (Ditjen POM, 2000).

4) Infus

Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C selama 15-20 menit (Permata, 2014).

5) Dekok

Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 30 menit. Campur simplisia dengan derajat halus yang sesuai dalam panci (wadah) dengan air secukupnya, panaskan diatas tangas air selama 30 ;menit terhitung mulai suhu 90 °C sambil sekali-sekali diaduk (Permata, 2014).