

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*2.1.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (ITIS, 2016)

2.1.2 Konsep Pertumbuhan Bakteri

Kebanyakan bakteri bergantung pada pembelahan biner untuk memperbanyak diri. Secara konseptual, ini adalah proses yang sederhana; sel hanya perlu tumbuh dua kali ukuran awal dan kemudian terbelah dua. Tapi, tetap layak dan kompetitif, bakteri harus membagi pada waktu yang tepat, di tempat yang tepat, dan harus memberikan setiap sel anak dengan salinan lengkap dari materi genetik penting. Sebelum pembelahan biner, terjadi proses penyalinan materi genetik (DNA) dan segregasi salinan tersebut ke kutub yang berlawanan. Kemudian banyak jenis protein yang terdiri dari mesin pembelahan sel merakit di lokasi divisi yang akan membelah. Sebuah komponen kunci dari mesin ini adalah protein FtsZ. Monomer protein FtsZ merakit di dalam struktur cincin seperti inti sel. Komponen lain

dari aparatus kemudian berkumpul di cincin FtsZ. Mesin ini diposisikan sehingga divisi membagi sitoplasma dan tidak merusak DNA dalam proses. Sebagai divisi yang mengalami proses, sitoplasma dibelah dua dan pada kebanyakan bakteri dinding sel baru disintesa. Urutan dan waktu proses ini (replikasi DNA, pemisahan DNA, pemilihan lokasi pembagian, invaginasi dari *cell envelope*, dan sintesis dinding sel baru) yang dikontrol ketat (Department of Microbiology Cornell University, 2016).

2.1.3 Biokimia dan Molekuler Genetik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram-positif berbentuk bulat dengan diameter kira – kira 1 μm dan selnya berbentuk seperti kluster anggur. *S. aureus* sering ditemukan sebagai komensal dihubungkan dengan kulit, kelenjar kulit, dan membran mukosa, secara partikuler di dalam hidung individu yang sehat. Telah diperkirakan sebanyak 20 – 30% dari populasi umum merupakan *S. aureus* karier. Pada *plate* agar darah domba, koloni *S. aureus* sering menyebabkan β - hemolisis. Pigmentasi emas dari koloni *S. aureus* dikarenakan adanya karotenoid dan telah dilaporkan menjadi sebuah faktor virulensi pelindung patogen melawan oksidan yang diproduksi oleh sistem kekebalan. *Staphylococci* merupakan anaerob fakultatif mampu mengenerasi energi melalui respirasi aerob dan melalui fermentasi yang sebagian besar asam laktat. *Staphylococcus* sp. merupakan katalase positif, suatu ciri pembedanya dengan *Streptococcus* sp., dan *Staphylococcus* sp. merupakan oksidase negatif dan membutuhkan nutrien kompleks, contohnya asam amino

dan vitamin B untuk tumbuh. *S. aureus* sangat toleran dengan konsentrasi NaCl yang tinggi, mencapai 1,7 molar. Keistimewaan lain dari genus *Staphylococcus* adalah struktur dinding sel peptidoglikan yang mengandung residu *glycine multiple* di dalam *crossbridge* yang mana menyebabkan kerentanan terhadap *lysotaphin*. *S. aureus* memproduksi koagulasi yang mana berinteraksi dengan protrombin di dalam darah menyebabkan plasma berkoagulasi melalui perubahan fibrinogen menjadi fibrin. Koagulasi darah digunakan untuk membedakan *S. aureus* dari anggota *genus* yang lain, yang mana secara kolektif menunjuk sebagai *Staphylococci* koagulasi negatif. Karena ini merupakan agen etiologi yang sering dari penyakit manusia dan menunjukkan resistensi untuk angka pertumbuhan agen terapeutik, *S. aureus* juga merupakan satu dari spesies bakteri yang secara intensif diteliti (Plata *et al.*, 2009).

2.1.4 Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus*

S. aureus dilengkapi dengan variasi hebat faktor virulensi yang mana keduanya itu termasuk secara struktural dan produksi sekret terlibat dalam patogenesis dari infeksi (Plata *et al.*, 2009). Patogenesis infeksi *S. aureus* merupakan hasil interaksi berbagai protein permukaan bakteri dengan berbagai reseptor pada permukaan sel inang. Penentuan faktor virulen mana yang paling berperan sulit dilakukan karena demikian banyak dan beragam faktor virulen yang dimiliki *S. aureus* (DeLeo *et al.*, 2009). Dalam sebuah infeksi, *S. aureus* memiliki sejumlah permukaan protein yang disebut "*microbial surface components recognizing adhesive matrix*

molecules" (MSCRAMMs), yang memediasi penempelan pada jaringan *host*. Molekul pengikat MSCRAMMs, seperti kolagen, fibronektin, dan fibrinogen, dan MSCRAMMs berbeda menempel pada komponen jaringan *host* yang sama. MSCRAMMs nampaknya memiliki peran kunci dalam menginisiasi infeksi endovaskuler, infeksi tulang dan sendi, dan infeksi *prosthetic – device* (Gordon and Lowy, 2016).

Strain S. aureus yang berbeda memiliki kumpulan MSCRAMMs yang berbeda dan dengan demikian kemungkinan menjadi penyebab beberapa macam infeksi tertentu. *S. aureus* memiliki banyak karakteristik lain yang membantunya untuk menghindari dari sistem imun selama infeksi. Perlindungan dirinya berupa produksi dari sebuah mikrokapsul antifagositik. Kapsul zwitterionic (baik muatan positif dan negatif) dapat juga menginduksi pembentukan abses. Protein MSCRAMMs A mengikat bagian Fc dari imunoglobulin dan sebagai hasil yaitu dapat mencegah opsonisasi. *S. aureus* dapat juga mensekresi protein pencegah kemotaksis dari *Staphylococci* atau protein adhesens seluler yang mana mengganggu dengan ekstravasasi neutrofil dan kemotaksis ke dalam tempat infeksi. Sebagai tambahan, *S. aureus* memproduksi leukosidin yang menyebabkan pengrusakan oleh pembentukan pori – pori di dalam membran sel. Selama infeksi, *S. aureus* memproduksi sejumlah enzim, seperti protease, lipase, dan elastase yang memungkinkannya untuk menginvasi dan menghancurkan jaringan *host* dan bermetastase ke tempat lain (Gordon and Lowy, 2016).

Selain itu, *S. aureus* mampu menimbulkan syok septik melalui interaksi dan aktivasi sistem imun dari *host* dan proses koagulasi. Peptidoglikan, *lipoteichoic acid*, dan α - toksin yang berperan sepenuhnya. Karena dapat menyebabkan syok septik, beberapa strain *S. aureus* memproduksi superantigen, menghasilkan beberapa toksin, selayaknya racun makanan dan sindrom syok toksik. Superantigen dapat memproduksi sindrom seperti sepsis melalui inisiasi sebuah “*cytokine storm*”. Beberapa strain juga memproduksi *epidermolysins* atau toksin eksfoliatif yang mampu menyebabkan *scalded skin syndrome* atau *bullous impetigo*. Regulasi dari ekspresi faktor virulensi berperan utama dalam patogenesis. Ekspresi dari MSCRAMMs secara umum terjadi selama pertumbuhan logaritmik (replikasi), sedangkan protein tersekresi, seperti toksin, diproduksi selama fase stasioner. Selama infeksi, ekspresi awal protein MSCRAMM memfasilitasi kolonisasi awal dari tempat jaringan, mengingat kemudian perluasan dari racun memfasilitasi penyebaran. *Accessory gen regulator (agr)* merupakan sistem *quorum-sensing* yang berperan kritis dalam regulasi virulensi *Staphylococcal*. Mutan *agr* nampak mengurangi virulensi dan tipe – tipe *agr* tertentu dihubungkan dengan beberapa sindrom klinis. Regulator penting lainnya termasuk regulator aksesoris dari *Staphylococcal* yaitu ArIR dan ArIS, SaeRS, RoT dan mgr (Gordon and Lowy, 2016).

Seperti yang telah dijabarkan sebelumnya bahwa *S. aureus* memiliki sejumlah mekanisme untuk menyebabkan penyakit dan melemahkan pertahanan tubuh *host*. Namun demikian, tidak semua

strain *S. aureus* dapat menimbulkan hal yang sama. Strain *S. aureus* yang berbeda dapat mengandung adhesin atau toksin atau dapat memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan biofilm dan melawan fagositosis. Distribusi dari beberapa faktor virulensi dihubungkan dengan tipe koloni, mengingat kehadiran dari yang lainnya dihubungkan dengan faktor genetik. Suatu hal penting untuk memperhatikan bahwa terdapat informasi terbatas pada ekspresi dari gen selama infeksi (Gordon and Lowy, 2016).

2.1.5 Toksin dan Enzim Ekstraseluler Aktif secara Biologis

a. α -Toxin

α -Toxin merupakan protein disekresi oleh sebagian besar strain *S. aureus*, tetapi bukan oleh stafilokokus koagulase negatif. Alfa toksin melepas membran sitoplasmik melalui insersi langsung ke dalam *lipid bilayer* untuk membentuk pori – pori transmembran. Resultan *egrees* dari molekul – molekul vital menimbulkan kematian sel. aksi ini mirip dengan *cytolisins* aktif secara biologis seperti streptolisin O, komplemen, dan protein efektor dari limfosit sitotoksik C (Ryan and Ray, 2004).

b. Eksfoliatin

Eksfoliatin menyebabkan pemisahan interseluler dari epidermis antara stratum spinosum dan stratum granulosum, sepertinya melalui pengrusakan penghubung interseluler. Dua macam antigen dari eksfoliatin adalah antigen dalam manusia, dan mensirkulasi antibodi memberikan kekebalan terhadap efeknya (Ryan and Ray, 2004).

c. **Pyrogenic Toxin Superantigens**

Pyrogenic Toxin Superantigens (PTSAGs) merupakan anggota dari protein yang disekresi untuk menstimulasi efek sistemik melalui penyerapan dari tempat dimana mereka diproduksi melalui penggandaan staphylococci. Suatu strain dapat memproduksi satu atau lebih toksin, tetapi kurang dari 10% strain *S. aureus* memproduksi beberapa PTSAG. Toksin ini berbagi *physiochemical* dan aktivitas biologis sama dengan masing – masing lainnya dan PTSAGs diproduksi oleh kelompok streptokokus A. Sebagai superantigen, mereka secara kuat bermitogenik untuk sel T dan tidak membutuhkan proses proteolisis berdasarkan pengikatan dengan molekul MHC kelas II pada *antigen – presenting cells*. Mereka berinteraksi dengan molekul MHC kelas II bagian luar galur peptid antigenik, dan spesifik untuk regio V β dari reseptor sel T. Dengan demikian, sel T dengan unsur V β yang tepat dapat secara langsung diaktivasi melalui toksin. Stimulasi ini, keduanya, baik sel T dan makrofag melepas sejumlah besar sitokin, secara partikuler nekrosis *tumor necrosis factor- α* dan interleukin- 1. Aktivitas lain dari toksin ini adlaah progenisitas dan meningkatkan kerentanan terhadap efek letal dari endotoksin (Ryan and Ray, 2004).

d. **Staphylococcal Enterotoxins**

Kemampuan enterotoksin *S. aureus* untuk menstimulasi gejala gastrointestinal (terutama muntah) pada manusia dan

hewan telah lama diketahui. Terdapat beberapa yang berat molekul rendah secara antigen berbeda di dalam kelas ini (contohnya enterotoksin A, B, C), beberapa yang mana disandikan oleh bakteriofag berhawa dingin. Ketika terbentuk, toksin ini cukup stabil, aktivitas penahanan setelah mendidih atau paparan terhadap lambung dan enzim jejunum. Sebagai tambahan kepada aksi termediasi superantigen, mereka nampak beraksi langsung pada reseptor *neural* di dalam saluran gastrointestinal bagian atas, menimbulkan stimulasi pusat muntah di dalam otak (Ryan and Ray, 2004).

e. **Toxic Shock Syndrome Toxin**

Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), penyebab mayor dari sindrome syok toksik staphylococcal, membagi banyak sifat dengan *staphylococcal enterotoxins* dan pada faktanya meragukan dengan satu diantaranya selama perjalanan penemuannya. TSST-1 juga menstimulasi pelepasan sitokin melalui mekanisme superantigen, tetapi juga dapat memiliki efek toksin langsung pada sel endotelial. Aksi yang terakhir dapat menyebabkan kebocoran kapiler, hipertensi, dan syok (Ryan and Ray, 2004).

2.1.6 Resistensi *Staphylococcus aureus*

Pada tahun 1940, penisilin diperkenalkan untuk pengobatan infeksi, tahun 1942, beberapa *strain S. aureus* resisten terhadap penisilin telah dideteksi di rumah sakit. Selama 2 dekade, setidaknya 80% dari isolat *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari rumah sakit

dan komunitas resisten terhadap penisilin. Pengenalan *methicillin* pada 1961 secara cepat diikuti oleh laporan mengenai *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap *methicillin*. Hari ini, galur MRSA ditemukan di seluruh dunia, dan paling banyak *multidrug resistant*. Penelitian isolat awal MRSA menunjukkan bahwa komponen genetik kunci yang bertanggung jawab terhadap resistensi adalah *mecA*, dimana bukan asli genome *Staphylococcus aureus*. Kaset kromosom stafilokoki *mec* (SCCmec) memiliki karakteristik yaitu sebagai sebuah *novel*, unsur resisten aktif yang berbeda dari kedua *transposons* dan bakteriofage. MRSA secara khas menyebar melalui klon, namun hal itu diketahui bahwa gen *mec* telah ditransmisikan antara galur *Staphylococcus aureus* dan kemungkinan antar spesies lain stafilokoki (Appelbaum, 2007).

Galur CA-MRSA tidak hanya pelarian dari fasilitas kesehatan, genotipnya menunjukkan bahwa mereka tidak terkait erat dengan klon rumah sakit endemik dan galur komunitas ini rentan terhadap berbagai antibiotik yang bakteri galur rumah sakit secara rutin tahan. Dua penanda molekuler tidak ditemukan di MRSA rumah sakit yang khas adalah sangat terkait dengan munculnya CA-MRSA terlepas dari asal geografis: sebuah *cassette element encoding mecA* spesifik dan gen yang mengkode *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL). Infeksi kulit dan jaringan lunak adalah jenis infeksi CA-MRSA yang paling umum, terhitung sekitar 90% dari kasus, dimana 90% adalah abses dan atau selulitis dengan drainase purulen (Chambers and DeLeo, 2009).

2.1.7 Perbenihan *Staphylococcus aureus*

Untuk membiakkan stafilocokus diperlukan suhu optimal antara 28 – 38°C, atau sekitar 35°C. Apabila bakteri tersebut diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37°C. pH optimal untuk pertumbuhan *S. aureus* adalah 7,4. Pada umumnya, stafilocokus dapat tumbuh pada medium – medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi, misalnya sebagai berikut (Dzen *et al.*, 2003).

A. 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 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensinya lunak (Dzen *et al.*, 2003).



Gambar 2.1 Koloni *Staphylococcus aureus* pada NAP (College of The Canyons, 2016)

B. Blood Agar Plate (BAP)



Gambar 2.2 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Blood Agar Plate (BAP) setelah inkubasi 24 jam. Koloni kuning abu - abu dengan diameter 3 – 4 cm di dalam plate berukuran 10 cm. Koloni dikelilingi oleh zona jelas hemolisis sekitar 1 cm (Brooks *et al.*, 2013).

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* (Dzen *et al.*, 2003).

Pada umumnya, untuk membiakkan *Staphylococcus aureus* perlu 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, perlu medium yang mengandung garam NaCl konsentrasi tinggi, misalnya 7,5% atau medium yang mengandung polimiksin (*Polymixin Staphylococcus medium*) (Dzen *et al.*, 2003).

Paling banyak *strain* dari *Staphylococcus aureus* memproduksi pigmen kuning keemasan (*aureus*). Koloni putih *strain S. aureus*

secara penuh virulen. Pigmentasi merupakan karakteristik dari spesies ketika tumbuh secara aerob. Pada medium *milk agar* setelah inkubasi semalam, koloni *S. aureus* lebih lebar dibanding pada NAP dan pigmentasi berkembang baik dan secara mudah dikenal melawan *background* putih buram. Pada media *phneolphtalein phosphate agar* nampak koloni *S. aureus* menjadi berwarna merah muda cerah ketika *plate* kultur terbalik atas amonia selama 1 menit atau lebih (Kumar, 2016).

Menurut Dzen *et al.* (2003), pembentukan pigmen paling baik apabila dieramkan pada medium NAP pada suhu kamar (20°C).

Pigmen ini mempunyai sifat – sifat:

- Mudah larut dalam alkohol, eter, dan benzen,
- Termasuk bahan yang bersifat lipokrom,
- Tetap tinggal dalam koloni bakteri,
- Tidak berdifusi ke dalam medium.

Hubungan antara warna pigmen dengan patogenisitas tidak selalu tetap. Sebagai contoh, stafilokokus yang menghasilkan pigmen warna kuning emas (*aureus*) tidak selalu menghasilkan tes koagulase yang positif, tetapi kadang – kadang menghasilkan tes koagulase yang negatif. Sebaliknya, stafilokokus yang menghasilkan pigmen warna kuning sitrun (*citreus*) dan yang tidak menghasilkan pigmen (*albus*) pada umumnya menghasilkan tes koagulase negatif, namun kadang – kadang dapat juga menghasilkan tes koagulase yang positif. Pada umumnya, bakteri yang menghasilkan warna kuning emas (*aureus*)

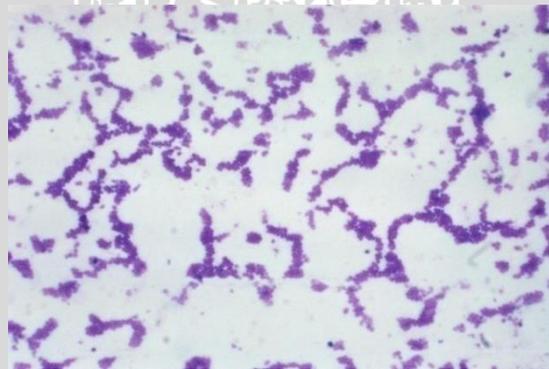
adalah patogen. Pigmen ini tidak terbentuk pada keadaan anaerob dan juga tidak terbentuk pada perbenihan cair (Dzen *et al.*, 2003).

2.1.8 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* meliputi pengamatan secara mikroskopis koloninya yang berbentuk kluster dengan sebelumnya diberi pewarnaan Gram, uji katalase positif dan memproduksi koagulase (Tille, 2014).

1. Pewarnaan Gram

Pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram dapat dipergunakan untuk mengetahui bentuk morfologis bakteri, misalnya kokus atau batang. Selain itu, juga dapat dipergunakan untuk mengetahui sifat pewarnaan bakteri terhadap metode pewarnaan tersebut, misalnya bersifat Gram positif atau Gram negatif (Dzen *et al.*, 2003).

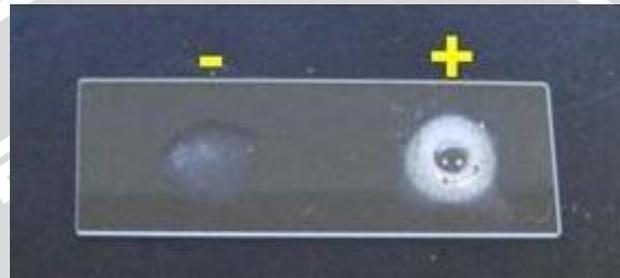


Gambar 2.3 *Photomicrograph* dari *Staphylococcus aureus* dengan perbesaran 320X, nampak gambaran bakteri Gram positif berbentuk kokus (Hardin, 2010)

2. Uji Katalase

Setetes larutan hidrogen peroksida diletakkan di gelas obyek, kemudian ditambahkan juga setetes biakan koloni bakteri di

dalam larutan tersebut. Terbentuknya gelembung (pelepasan oksigen) menandakan hasil uji katalase positif. Uji ini juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hidrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur di agar miring dan meneliti adanya gelebung udara yang mucul (Brooks *et al.*, 2007).



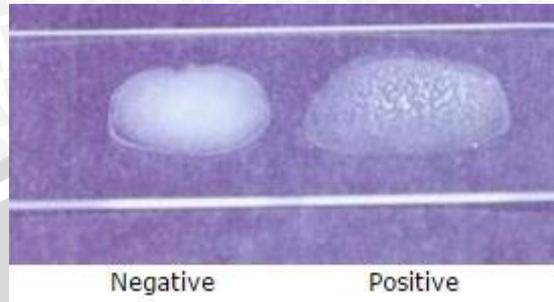
Gambar 2.4 Hasil tes katalase positif dan negatif *Staphylococcus aureus* (<http://vlab.amrita.edu/>, 2011)

Tes katalase yang diambil dari biakan koloni bakteri yang ditanam di *blood agar* harus dilakukan secara hati – hati agar tidak ada *blood agar* yang terambil, karena hemoglobin dalam darah akan bereaksi dengan katalase dan menyebabkan reaksi *false positive*. Gelembung yang mucul selama 10 detik menunjukkan hasil tes katalase positif dan dapat dipresumsikan teridentifikasi spesies *Staphylococcus* (Estridge and Reynolds, 2012).

3. Uji Koagulase

Plasma kelinci atau manusia yang mengandung sitrat dan diencerkan 1:5 dicampur dengan biakan kaldu atau pertumbuhan koloni pada agar dengan volume yang sama dan diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung plasma yang dicampur dengan kaldu steril disertakan sebagai kontrol. Jika terbentuk bekuan dalam 1- 4 jam, menandakan tes ini positif. Kepentingan dari tes ini adalah untuk

membedakan antara *Staphylococcus* koagulase positif dan *Staphylococcus* koagulase negatif (Brooks *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 Hasil Tes Koagulase Positif *Staphylococcus aureus* (<http://vlab.amrita.edu/>, 2011)

Patogenisitas *S. aureus* memproduksi enzim koagulase yang akan menyebabkan penggumpalan *clotting* plasma. Tes koagulase negatif yang dilakukan di *slide* dapat dikonfirmasi melalui tes koagulase tabung. Tes koagulase yang dilakukan di tabung bisa dicek setiap jam karena beberapa *S. aureus* dapat juga memproduksi sebuah enzim yang melarutkan gumpalan menyebabkan hasil *false negative*. Tes koagulase positif dapat dilaporkan sebagai “Gram positif secara morfologis mirip *Staphylococcus* koagulase positif”. Hal ini adalah identifikasi presuntif dari *S. aureus* (Estridge and Reynolds, 2012).

2.1 Mastitis

2.2.1 Patologi Mastitis

Mastitis merupakan proses inflamasi dalam payudara, biasanya merupakan akibat infeksi bakteri. Infeksi melibatkan jaringan penghubung interlobular dan atau obstruksi duktus (Crossley *et al.*, 2009). Gejala mastitis supuratif jarang tampak sebelum akhir minggu pertama pascapartum dan biasanya tidak sampai minggu ketiga atau

keempat. Infeksi hampir selalu bersifat unilateral, dan pembengkakan yang bermakna biasa terjadi sebelum inflamasi. Gejala mencakup menggigil atau benar – benar kaku, yang segera diikuti oleh demam dan takikardia. Payudara menjadi keras dan kemerahan, dan terdapat nyeri berat. Sekitar 10% wanita yang menderita mastitis berkembang menjadi abses. Deteksi fluktuasi dapat sulit dilakukan, dan sonografi dapat membantu mendeteksi abses (Cunningham *et al.*, 2012).

2.2.2 Etiologi Mastitis

Pada penelitian sebelumnya oleh Matheson *et al* (1998) *Staphylococcus aureus* merupakan organisme yang paling banyak ditemukan. Penelitian tersebut melaporkannya pada 40% wanita yang mengalami mastitis. Organisme yang sering diisolasi lainnya adalah stafilocokus negatif koagulase dan streptokokus viridans. Sumber organisme langsung yang menyebabkan mastitis hampir selalu adalah hidung dan tenggorokan bayi. Bakteri memasuki payudara melalui papila mammae pada fisura atau abrasi kecil. Organisme yang menginfeksi biasanya dapat dikultur dari ASI. Sindrom syok toksik karena mastitis yang disebabkan oleh *S. aureus* telah dilaporkan (Cunningham *et al.*, 2012).

Ada kalanya, mastitis supuratif mencapai tingkat epidemi di antara ibu – ibu yang menyusui. Wabah seperti ini sering terjadi bersamaan dengan munculnya strain stafilocokus resisten antibiotik. Contoh yang sama adalah *community-acquired methicilin resistant S. aureus* (CA-MRSA), yang telah secara cepat menjadi spesies stafilocokus yang paling banyak diisolasi di beberapa daerah. Pada

rumah sakit Parkland dari tahun 2000 sampai 2004, Libl *et al.* (2005) dalam Cunningham *et al.* (2012) melaporkan bahwa seperempat dari CA-MRSA diisolasi dari ibu – ibu yang menderita mastitis puerperal. *Hospital-acquired* MRSA dapat menyebabkan mastitis ketika bayi tertular setelah kontak tangan dengan petugas yang membawa kuman tersebut. Selanjutnya bayi – bayi tersebut dapat menyebabkan CA-MRSA (Center for Disease Control and Prevention, 2006 dalam Cunningham *et al.*, 2012). Insiden abses ikutan lebih tinggi pada penderita mastitis dengan CA-MRSA (Safford *et al.*, 2008 dalam Cunningham *et al.*, 2012)

2.2.3 Penatalaksanaan dan Terapi Mastitis

Jika terapi yang tepat untuk mastitis diberikan sebelum terjadinya supurasi, maka infeksi biasanya sembuh dalam 48 jam. Pembentukan abses lebih sering pada infeksi *S. aureus* (Matheson, *et al.*, 1998 dalam Cunningham *et al.*, 2012). Sangat direkomendasikan untuk mengambil *swab* dari air susu yang dihasilkan oleh payudara yang mengalami kelainan kemudian dikultur, sebelum dimulai terapi. Identifikasi bakteri dan sensitivitas antimikroba memberikan informasi yang sangat penting untuk keberhasilan program surveilans infeksi nosokomial. Pilihan antimikroba awal dipengaruhi oleh pengalaman institusi dalam menghadapi infeksi stafilokokus pada saat itu. Walaupun sebagian besar dan tersering adalah organisme yang terdapat di komunitas, termasuk CA-MRSA. Dicloxacillin , 500 mg oral empat kali sehari, dapat dimulai secara empiris. Eritromisin diberikan kepada wanita yang sensitif terhadap penisilin. Jika infeksi disebabkan

oleh stafilocokus penghasil penisilinase yang resisten, atau dicurigai terdapatnya organisme yang resisten ketika menunggu hasil kultur, maka vankomisin atau antimikroba anti-MRSA lainnya harus diberikan. Walaupun respon klinis cepat terlihat, namun terapi harus dianjurkan 10 – 14 hari (Cunningham *et al.*, 2012).

Efek samping penggunaan obat dicloxacillin/ amoxicillin adalah mual, muntah, kemerahan, stomatitis, kejang atau *seizures*, dan *pseudomembraneous colitis* (Kee *et al.*, 2015). Untuk penggunaan terapi eritromisin memiliki efek samping yang hampir sama pula dengan dicloxacillin. Efek samping yang sering muncul dihubungkan dengan penggunaan terapi eritromisin diantaranya *nausea*, *vomiting*, diare, dan anoreksia (Brucker and King, 2016).

Pemberian ASI harus tetap dilakukan. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa dihasilkannya ASI yang banyak sudah merupakan terapi sendiri yang cukup. Kadang, bayi tidak disusui pada payudara yang mengalami inflamasi. Ini mungkin tidak berhubungan dengan perubahan apapun pada rasa ASI, namun karena pembengkakan dan edema, yang dapat membuat areola terasa keras untuk digenggam. Pemompaan dapat mengurangi hal ini. Jika kedua payudara digunakan untuk menyusui, maka yang terbaik adalah memulai menyusui pada payudara yang tidak terkena. Ini memungkinkan *let-down* terjadi sebelum pindah ke payudara yang sakit (Cunningham *et al.*, 2012).

2.3 Ekstrak Etanol Daun Tahi Ayam sebagai Antibakteri

2.3.1 Taksonomi Tanaman Tahi Ayam

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Verbenaceae
Genus	: Lantana
Spesies	: <i>Lantana camara</i> L. (USDA, 2016)

2.3.2 Morfologi dan Habitat Tanaman Tahi Ayam

Tanaman tahi ayam merupakan tanaman perdu dengan tinggi 0,5 – 1,5 meter (Sudarmo dan Mulyaningsih, 2014). Tanaman tahi ayam memiliki batang berkayu, segi empat, berduri, bercabang, berambut, saat masih muda berwarna hijau, setelah tua berwarna putih kotor (Tim KEHATI, 2000), sedangkan kulit batang berwarna coklat dengan permukaan kasar. Permukaan daun kasar karena terdapat bulu (Mulyaningsih dan Sudarmo, 2014). Daun tunggal, berbentuk bulat telur dengan ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, berbulu, panjang 5 – 8 cm, lebar 3,5 – 5 cm, pertulangan daun menyirip, berwarna hijau tua dan kedudukan daun berhadapan. Bunga majemuk, bentuk bulir, daun pelindung lonjong, panjang \pm 5 mm, kelopak berbentuk lonceng, mahkota bagian dalam berambut,

bertaju 4 – 5, warna bunga beraneka ragam, seperti merah muda, jingga dan kuning ungu, benang sari berjumlah 4, ujungnya melekok ke bawah (Tim KEHATI, 2000). Memiliki buah seperti buah buni (Mulyaningsih dan Sudarmo, 2014), bulat, tangkai berbulu, diameter \pm 2,5 cm, masih muda berwarna hijau, setelah tua berwarna hitam. Biji bulat berwarna hitam. Akar tunggang, bulat, berwarna kuning kecoklatan (Tim KEHATI, 2000).



Gambar.2.6 Tanaman tahi ayam (*Lantana camara* L.) (Hasim S, 2009)



Gambar 2.7 Daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) (Hasim S, 2009)

Tanaman tahi ayam tumbuh di daerah beriklim hangat, dimana tanaman dapat mentolerir berbagai kondisi lingkungan, yaitu dapat berkembang di kedua iklim, kering dan lembab. Tanaman tahi ayam terutama ditemukan pada tanah yang subur, yaitu pada dataran rendah, lereng gunung dan di lembah-lembah di ketinggian 1800 sampai 2000 meter di atas permukaan laut. Tanaman ini biasanya tumbuh sebagai gulma di sepanjang tepi jalan, tepi anak sungai, pagar, dan di tempat - tempat pembuangan sampah, serta merupakan komponen umum padang rumput (Cuthbertson and Parsons, 2001).

2.3.3 Manfaat Tanaman Tahi Ayam

Daun tanaman tahi ayam bersifat nematosida, insektisida, fungisida, antimikrobakteri, dan *repellent* (Mulyaningsih dan Sudarmo, 2014). Menurut Tim KEHATI (2000), daunnya memiliki manfaat sebagai *antruritic*, antitoksik, dan anti – *swelling*. Akarnya memiliki khasiat sebagai antipiretik, antitoksik, dan analgesik. Sedangkan bunganya sebagai hemostatik. Menurut Rajesh dan Suman (2006) dalam Saxena *et al.* (2012), di India, daun tanaman tahi ayam direbus untuk dijadikan teh dan didekok untuk mengobati batuk. Selain itu, digunakan sebagai *lotion* untuk luka dan daunnya dapat digunakan sebagai bobok untuk luka, borok, dan pembengkakan. Disebutkan juga dalam Pradeep *et al.* (2011), lantanosida, linarosida, dan *camarinic acid* yang diisolasi dari *Lantana* berpotensi sebagai nematosida. Minyak *Lantana* terkadang digunakan untuk pengobatan gatal di kulit, sebagai antiseptik untuk luka, dan digunakan pada lepra dan skabies di bagian eksternal. Ekstrak tanaman ini digunakan dalam pengobatan

tradisional untuk mengobati kanker, *chicken pox*, measles, asma, borok, pembengkakan, eksim, tumor, tekanan darah tinggi, tetanus, rematik, dan malaria. Batang dan ranting *Lantana camara* L. disajikan sebagai minyak untuk memasak pada banyak negara berkembang. Aktivitas antiinflamasi dari senyawa bioaktif asam oleanik yang diisolasi dari tanaman tahi ayam telah diuji menggunakan karagen pada induksi model edema kaki tikus (Pradeep *et al.*, 2011).

2.3.4 Kandungan Kimia Daun Tahi Ayam

Tanaman tahi ayam bersifat antifungi karena terbukti berhasil menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Saxena *et al.*, 2012). Potensi aktivitas antifungi dari tanaman *lantana camara* telah terbukti melawan *Alternaria sp.* Bakteri putih dan coklat penghancur kayu juga dapat dilawan oleh ekstrak etanol dan ekstrak air panas tanaman *lantana camara* (Kalita *et al.*, 2012). Pada penelitian yang dilakukan oleh Rizvi *et al.* (2013) menunjukkan aktivitas antifungi tanaman tahi ayam terhadap *Fusarium solani*, *Alternaria solani*, dan *Mucor*. Suatu uji kualitatif mengenai kandungan bioaktif tanaman tahi ayam yang dilakukan oleh Pradeep *et al.* (2013) menunjukkan bahwa tanaman tahi ayam mengandung terpenoid dan flavonoid dalam konsentrasi tinggi dan alkaloid dalam konsentrasi rendah. Penelitian lain yang dilakukan oleh Hidayati *et al.* (2005) membuktikan bahwa akar, daun dan buah *Lantana camara* mengandung saponin, flavonoid dan minyak atsiri. Dari tiga bagian tanaman yang diuji tersebut, kandungan tertinggi dari saponin, flavonoid dan minyak atsiri terdapat dalam daun.

2.3.5 Senyawa Bioaktif Daun Tali Ayam yang Bersifat Antibakteri

a. Flavonoid

Flavonoid adalah substansi fenol hidroksilasi yang disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba (Abyaneh and Rai, 2013). Flavonoid merusak membran bakteri melalui pembentukan hidrogen peroksida, menghambat faktor virulensi bakteri, dan menghambat kunci enzim bakteri. Melalui penghambat enzim – enzim tersebut, flavonoid menghambat sintesa DNA melalui penghambatan topoisomerase dan atau dihidrofolat reduktase, menghambat metabolisme energi melalui penghambatan ATP sintase, menghambat sintesis dinding sel melalui penghambatan D-alanine-Dalanine ligase) dan sintesis membran sel melalui penghambatan FabG, FabI, dan lain – lain (Swanson, 2016).

Bagaimanapun, karena flavonoid juga dapat menginduksi agregasi bakteri, hal tersebut belum jelas apakah kemampuannya untuk menghambat aktivitas enzim melalui interaksi langsung antara flavonoid dan enzim atau terjadi sebagai mekanisme yang kedua untuk pengaruh agregasi (Swanson, 2016). Aglikon flavonoid bebas dikeluarkan oleh jaringan tanaman (daun atau akar) dapat diambil dari permukaan dengan pelarut nonpolar, seperti metilen klorida, etil eter, atau asetat. Namun, konjugat glikosidik lebih polar dalam flavonoid larut dalam pelarut polar (etanol dan metanol), dan pelarut organik ini telah diaplikasikan untuk prosedur ekstraksi dalam *soxhlet apparatus*. Campuran

alkohol dan air juga bisa diaplikasikan dalam rasio berbeda pada ekstraksi flavonoid dan konjugasinya dari bahan biologis padat (Grotewold, 2008). Alifatik alkohol yang memiliki sampai dengan 3 atom karbon, atau campuran alkohol dengan air, merupakan pelarut dengan kekuatan ekstraksi terhebat untuk sebagian besar substansi alami dengan berat molekul rendah, contohnya flavonoid (Wijesekera, 1991).

b. Terpenoid

Terpenoid juga diketahui sebagai isoprenoid, membentuk kelas lebar fitonutrien pada makanan hijau dan biji padi-padian. Terpenoid diturunkan dari jalur biosintesis umum didasarkan pada mevalonat sebagai induk, dan dinamakan terpenoid, terpen, atau isoprenoid, dengan sub kelompok steroid. Molekul terpenoid yang berbeda memiliki sifat antimikroba, antifungi, antiparasitik, antivirus, anti-alergenik, antispasmodik, antihiperglikemia, antiinflamasi, kemoterapeutik dan imunomodulator (Prakash and Sharma, 2014). Investigasi terhadap pengaruh terpenoid yaitu pada membran bakteri yang aktivitasnya dikarenakan sifat lipofilik dari keberadaan terpen. Potensi kelompok fungsional dan kelarutannya dalam air. Lokasi aksinya tampak pada fosfolipid bilayer, dikarenakan oleh mekanisme biokimia terkatalase melalui fosfolipid bilayer dari sel. Proses ini termasuk penghambatan transpor elektron, translokasi protein, langkah fosforilasi, dan reaksi lain yang bergantung oleh enzim. Ekstrak tanaman secara

jelas menunjukkan sifat antibakteri, meskipun proses mekanistik sulit dimengerti (Lis-Balchin, 2006).

c. Saponin

Mekanisme utama aksi saponin sebagai antibakteri adalah dengan menimbulkan kekacauan pada membran sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas membran. Hal itu nampak bahwa separuh triterpenoid dari saponin mengikat lemak sterol pada membran. Penempelan pada gula dapat melawan membran untuk berbelok ketika konsentrasi saponin lokal tinggi. Ini dapat menyebabkan gangguan pada rakitan lemak atau pembetukan lubang pori (Villa and Crespo, 2014). Teori lain menyebutkan bahwa saponin sendiri inaktif dan hanya meliputi bentuk transpor larut air. Aglikon atau komponen membranolisis aktif terbentuk jika terdapat glikosida membran sel. Alifatik alkohol yang memiliki sampai dengan 3 atom karbon, atau campuran alkohol dengan air, merupakan pelarut dengan kekuatan ekstraksi terhebat untuk sebagian besar substansi alami dengan berat molekul rendah, contohnya saponin (Wijesekera, 1991).

d. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa – senyawa organik yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan, bersifat basa, dan struktur kimianya mempunyai sistem lingkar heterosiklis dengan nitrogen sebagai hetero atomnya. Unsur – unsur penyusun alkaloid adalah karbon, hidrogen, nitrogen dan oksigen. Alkaloid yang struktur kimianya tidak mengandung oksigen hanya ada beberapa saja. Ada pula

alkaloid yang mengandung unsur lain selain keempat unsur yang telah disebutkan. Adanya nitrogen dalam lingkaran pada struktur kimia alkaloid menyebabkan alkaloid tersebut bersifat alkali. Oleh karena itu, golongan senyawa – senyawa ini disebut alkaloid (Sumardjo, 2008). Mekanisme antibakteri alkaloid diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga lapisan dinding tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga terbentuknya sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding sel hanya meliputi membran sel. Mekanisme kerusakan ini dapat menyebabkan dinding sel bakteri mudah mengalami lisis, baik secara fisik maupun osmotik dan menyebabkan kematian sel (Retnowati *et al.*, 2011). Alifatik alkohol yang memiliki sampai dengan 3 atom karbon, atau campuran alkohol dengan air, merupakan pelarut dengan kekuatan ekstraksi terhebat untuk sebagian besar substansi alami dengan berat molekul rendah, contohnya alkaloid (Wijesekera, 1991).

e. Minyak Atsiri

Minyak atsiri adalah salah satu kandungan tanaman yang sering disebut minyak terbang. Minyak atsiri dinamakan demikian karena minyak tersebut mudah menguap. Selain itu, minyak atsiri juga disebut *essential oil* (dari kata *essence*) karena minyak tersebut memberikan bau pada tanaman (Koensoemardiyah, 2010). Pada dasarnya semua minyak atsiri mengandung campuran senyawa kimia dan biasanya campuran tersebut sangat

kompleks. Beberapa tipe senyawa organik mungkin terkandung dalam minyak atsiri, seperti hidrokarbon, alkohol, oksida, ester, aldehida dan eter (Agusta, 2000).

Molekul minyak atsiri dapat mengganggu kerja enzim - enzim yang terikat pada membran sel, sehingga mengganggu pembentukan membran sel. Dengan kata lain minyak atsiri dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroba (Ridawati *et al.*, 2011). Pada penelitian yang dilakukan oleh Hidayati *et al.* (2005) minyak atsiri dapat diekstraksi menggunakan pelarut berupa etanol.

2.3.6 Metode Ekstraksi

Depkes RI (2000) telah menjabarkan mengenai metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut ada beberapa cara, yaitu:

1. Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia menggunakan pelarut beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan terus menerus. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak atau perkolat yang jumlahnya 1 – 5 kali bahan.

2. Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3 – 5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

b. Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi berkelanjutan dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

c. Digesti

Digesti merupakan maserasi kinetik (dengan pengadukan secara berkelanjutan) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 – 50°C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air, yaitu bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih dengan temperatur terukur 96 – 98°C selama waktu tertentu (15 – 20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air, yakni 30 menit pada suhu 90 – 100°C.

2.4 Uji Antibakteri secara *In Vitro*

Metode uji antibakteri adalah metode yang secara langsung menilai aktivitas antimikroba dengan melibatkan pemberian agen antimikroba sesuai dengan kepentingan dan bakteri penginfeksi bersama di dalam suatu lingkungan *in vitro* untuk menunjukkan pengaruh yang kuat dari kehadiran obat terhadap pertumbuhan atau kelangsungan hidup bakteri. Pengukuran langsung dari aktivitas antimikroba dapat menggunakan metode pengukuran kerentanan konvensional seperti dilusi tabung, dilusi agar, dan difusi cakram (Tille, 2014).

2.4.1 Metode Dilusi

2.4.1.1 Metode Dilusi Tabung

Uji dilusi tabung melibatkan bakteri dan agen antibakteri yang sesuai di dalam sebuah lingkungan cair. Masing – masing agen antibakteri diuji menggunakan rentang konsentrasi tertentu, secara umum ditunjukkan dengan satuan mikrogram (μg) dari obat aktif per mililiter (mL) dari *broth* atau cairan (yaitu

$\mu\text{g/mL}$). Rentang konsentrasi diuji untuk beberapa obat bergantung pada kriteria spesifik, termasuk konsentrasi terapeutik teraman yang mungkin di dalam serum pasien. Dengan demikian, rentang konsentrasi yang diuji sering bervariasi dari satu obat terhadap obat lain, tergantung terhadap sifat farmakologi dari agen antibakteri tersebut. Bahkan, rentang konsentrasi dapat didasarkan pada tingkat obat yang dibutuhkan untuk dapat mendeteksi mekanisme resistensi tertentu. Pada hal ini, konsentrasi uji untuk obat dapat bervariasi berdasarkan organisme dan hal tersebut dihubungkan dengan resistensi. Secara tipikal, rentang konsentrasi yang digunakan untuk masing – masing antibiotik adalah serangkaian dilusi ganda (contohnya adalah 16, 8, 4, 2, 1 $\mu\text{g/mL}$); konsentrasi terendah antibakteri dengan sepenuhnya melawan pertumbuhan bakteri yang terlihat, dideteksi secara visual atau dengan sebuah metode otomatis atau semiotomatis dicatat sebagai *minimal inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimal (KHM) (Tille, 2014).

Uji dilusi tabung dibagi menjadi 2 kategori umum, yaitu mikrodilusi dan makrodilusi. Prinsip dari masing – masing uji adalah sama, yang berbeda hanya volume dari cairan yang diuji. Untuk uji mikrodilusi, volume total cairan adalah 0,05 sampai 0,1 mL; untuk uji makrodilusi, volume cairan selalu 1 mL atau lebih besar. Suspensi bakteri standar yang cocok dengan turbiditas dari standar McFarland (yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL)

selalu dijadikan sebagai titik awal untuk dilusi yang akhirnya mencapai standar konsentrasi akhir dari bakteri yang dibutuhkan, yaitu $0,5 \times 10^5$ CFU/mL di dalam masing – masing sumur mikrotiter. Hal ini perlu disiapkan inokulum standar dari organisme uji yang segar, dalam waktu semalam, dan dari kultur murni organisme uji. Tabung inokulasi diinkubasi di bawah kondisi lingkungan optimal untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri tanpa intervensi dengan aktivitas antibakteri. Setelah uji antibakteri, untuk interpretasi hasil setelah inkubasi, tabung mikrodilusi diuji untuk melihat pertumbuhan bakteri. Masing – masing tabung, termasuk kontrol pertumbuhan yang tidak mengandung agen antibakteri dan kontrol steril yang tidak diinokulasi. Saat pertumbuhan di dalam kontrol pertumbuhan dan tidak ada pertumbuhan di dalam kontrol steril dapat dikonfirmasi, profil pertumbuhan untuk masing – masing dilusi dan KHM dapat ditetapkan (Tille, 2014).

2.4.1.2 Metode Dilusi Agar

Dengan metode dilusi agar, konsentrasi dan organisme yang akan diuji diletakkan pada media agar. Masing – masing dilusi ganda dari agen antibakteri disatukan ke dalam satu *plate* agar; dengan demikian, pengujian beberapa seri dari 6 dilusi dari suatu obat yang digunakan menggunakan 6 *plate*, ditambah 1 *plate* kontrol pertumbuhan positif tanpa antibiotik. Kondisi standar dan media untuk uji dilusi agar adalah 1×10^4

CFU/ mL. Metode ini mengizinkan pengujian dari satu atau lebih isolat bakteri per *plate*. Setelah *plate* diinkubasi kemudian diuji pertumbuhannya, yaitu untuk menentukan KHM. Jika diperoleh konsentrasi terendah dari agen antibakteri di dalam agar yang secara tuntas menghambat pertumbuhan yang terlihat dari bakteri maka menunjukkan KHM. *Breakpoints* dan kategori interpretasi yang sama digunakan oleh metode dilusi tabung diaplikasikan juga untuk interpretasi hasil dari metode dilusi agar. Dengan cara yang sama, hasil uji dapat dilaporkan hanya sebagai KHM (Tille, 2014).

2.4.2 Metode Difusi

2.4.2.1 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram digunakan untuk menguji pengaruh agen antibakteri terhadap beberapa *strain* bakteri. Dengan uji kerentanan metode difusi cakram, resistensi antibakteri dideteksi melalui pengujian isolat bakteri dengan cakram antibiotik ditempatkan pada area *agar plate* yang telah ditanam bakteri. Ketika cakram mengandung konsentrasi agen antibakteri yang diketahui ditempatkan dalam area *plate* inokulasi yang segar, agen dengan segera mulai berdifusi ke dalam agar dan penetapan gradien konsentrasi di sekitar *paper disk*. Konsentrasi tertinggi adalah yang terdekat terhadap cakram. Sewaktu inkubasi, terjadi pertumbuhan bakteri pada area *plate* kecuali di tempat konsentrasi antibiotik di dalam gradien sekitar masing – masing cakram yang cukup tinggi

untuk menghambat pertumbuhan. Setelah inkubasi, diameter dari zona hambat sekitar masing – masing cakram diukur dalam satuan milimeter. Ukuran zona hambat yang diperoleh kemudian dikorelasikan dengan nilai KHM yang diperoleh dari dilusi agar atau cair, dan sebuah analisa regresi dilengkapi dibandingkan ukuran zona di dalam satuan milimeter dibandingkan dengan KHM. Jika KHM dari strain bakteri yang diuji meningkat, ukuran zona yang cocok menurun. konsentrasi inokulum yang digunakan adalah sesuai dengan standarisasi suspensi yang cocok dengan turbiditas dari standar turbiditas standar McFarlad 0,5 yang ekuivalen dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Sebagian besar organisme diinkubasi pada suhu 35°C di dalam ruangan berudara, tetapi peningkatan CO_2 digunakan untuk uji dari bakteri yang sulit (Tille, 2013).

Menurut Dzen *et al.* (2010), untuk mengevaluasi hasil uji kepekatan tersebut, apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat, dapat dilakukan cara sebagai berikut:

- A. Cara Kirby Bauer, yaitu dengan membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) di sekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS ini, dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten.
- B. Cara Joan-Stokes, yaitu dengan membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang

sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri kontrol dan bakteri uji, dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar.

2.4.2.2 Metode Difusi Lubang atau Sumuran

Inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL dituang pada *petri dish* yang berisi *Mueller Hinton* cair steril (Kusmayati dan Agustini, 2006). Sumur dibentuk dengan membuat lubang pada *gel* agar dengan diameter 7 mm, dengan jarak 20 mm dari lubang yang lain (Valgas *et al.*, 2007). Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian (Kusmayati dan Agustini, 2006). Kemudian, sistem diinkubasi selama 24 jam pada suhu $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, dibawah kondisi aerob. Setelah inkubasi, konfluen pertumbuhan bakteri diobservasi, maksudnya adalah pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang. Hambatan pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm (Valgas *et al.*, 2007).

2.4.2.3 Metode Difusi Silinder

Metode uji antibakteri difusi silinder yaitu dengan meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah dicampur suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, kemudian diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat

ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

