

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Pencemaran Bakteri Pathogen Pada Makanan

Berdasarkan UU Makanan No 7 tahun 1996 (Mukhtar, S. et al., 2017), keamanan makanan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah makanan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia. Pangan menjadi tidak aman jika terdapat pencemar baik fisik, kimia maupun biologi. Pencemar biologi adalah pencemar yang berupa organisme hidup, diantaranya adalah mikroba patogen yaitu mikroba yang dapat menimbulkan penyakit. Pencemaran mikroba pada pangan seringkali dapat menyebabkan suatu perubahan kimiawi yang tentu saja akan mengurangi nilai gizi pangan dan juga berpotensi menimbulkan penyakit. Perubahan akibat adanya mikroba dalam pangan yang mudah dikenali adalah perubahan organoleptik, dan yang sulit dikenali oleh masyarakat umum adalah jumlah dan jenis mikroba yang mencemari makanan tersebut (patogen atau bukan patogen), serta nilai gizinya (Umniyatie, siti 2015).

Keberadaan bakteri patogen pada makanan biasanya didukung oleh kebutuhan nutrisi yang mencukupi dalam makanan sebagai tempat tumbuh bakteri patogen tersebut. Sehingga kondisi tersebut menguntungkan bakteri dalam segi laju pertumbuhannya (Lelieveld et al., 2000). Cemaran mikrobiologis pada makanan dapat melalui banyak cara. Cemaran tersebut dapat berasal dari bahan mentah, pekerja, peralatan, ruang produksi, serta sumber air. Cemaran ini dapat pula terjadi pada produk akhir melalui kontaminasi silang. Cemaran mikrobiologis pada pangan dapat terjadi pada setiap tahap rantai pengolahan pangan. (Worrsfold dan Griffth, 2003)

Beberapa jenis bakteri kontaminan pada bahan pangan yang dapat pula menginfeksi manusia adalah *Escherichia coli* (O157:H7), *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *E. coli* produsen toksin Shiga lainnya (selain O157)

(Zhao et al., 2014), *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholera O1*, *V. cholera O139*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*, dan *S. choleraesuis*. Patogen-patogen tersebut dapat ditemukan pada beberapa jenis bahan pangan, seperti bahan dasar pangan, makanan setengah matang (daging, seafood, unggas, dll), serta makanan siap saji (sayuran, buah, produk olahan susu, dll) (Zhao et al., 2016).

## 2.2. *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1. Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* Menurut Ferianto (2012):

Divisi : *Protophyta*

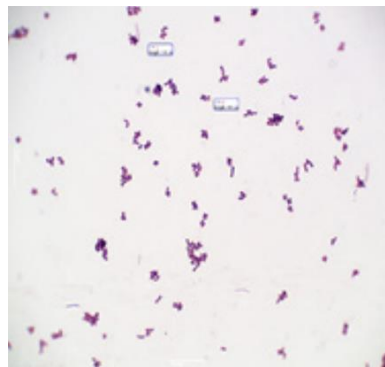
Kelas : *Schizomycetes*

Ordo : *Eubacteriales*

Famili : *Micrococceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*



. Gambar 2.1 *Staphylococcus Aureus* (Karimela. dkk, 2017)

### 2.2.2. Karakteristik dan Morfologi

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk kokus. *Staphylococcus aureus* bersifat non-motil, nonspora, anaerob

fakultatif, katalase positif dan oksidase negatif. *Staphylococcus aureus* tumbuh pada suhu 6,5-46° C dan pada pH 4,2-9,3 (Nurwantoro, 2001; Paryati, 2002). Koloni tumbuh dalam waktu 24 jam dengan diameter mencapai 4 mm. Koloni pada perbenihan padat berbentuk bundar, halus, menonjol dan berkilau. *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning emas tua.

*Staphylococcus aureus* membentuk pigmen lipochrom yang menyebabkan koloni tampak berwarna kuning keemasan dan kuning jeruk. Pigmen kuning tersebut membedakannya dari *Staphylococcus epidermidis* yang menghasilkan pigmen putih (Todar, 2002). Pigmen kuning keemasan timbul pada pertumbuhan selama 18-24 jam pada suhu 37° C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25° C). Pigmen tidak dihasilkan pada biak anaerobik atau pada kaldu. *Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada banyak pembenihan bakteri. Berbagai tingkat hemolisis dihasilkan oleh *S. aureus* dan kadang-kadang oleh spesies bakteri lain (Jawetz et al., 2001). *Staphylococcus aureus* pada media manitol salt agar (MSA) akan terlihat sebagai pertumbuhan koloni berwarna kuning dikelilingi zona kuning keemasan karena kemampuan memfermentasi manitol. Jika bakteri tidak mampu memfermentasi manitol, maka akan tampak zona.

*Staphylococcus aureus* menghasilkan tujuh tipe enterotoksin, yaitu: A, B, C, C1, C2, D dan E (Nurwantoro, 2001). Faktor virulensi *S. aureus* yang dapat menyebabkan infeksi meliputi:

- Protein permukaan yang mempromosikan kolonisasi dalam jaringan hospes (protein A, adhesin, hemaglutinin, glikoprotein, fibrinectin),
- Invasin membantu bakteri menyebar dalam jaringan (leukocidin, kinase, hyaluronidase),
- Faktor permukaan yang menghalangi fagositosis (kapsul, protein A),
- Faktor biokimia yang meningkatkan ketahanan bakteri di dalam fagosit (carotenoid, produksi katalase),
- Reaksi imunologis (protein A, coagulase, clotting factor),
- Toksin perusak membran (hemolysin, leukotoxin, leukocidin)

- Eksotoksin dalam jaringan menimbulkan kerusakan dan gejala penyakit (SEA-G, TSST, ET) (Todar, 1998).

### 2.2.3. Patogenisitas

Infeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang ditandai dengan abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, flebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Ryan dkk., 1994).

Manusia dan hewan merupakan sumber utama infeksi (Chotiah, 2009) Apabila jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* minimum mencapai  $1 \times 10^5$  CFU/g akan menyebabkan terbentuknya enterotoksin pada produk pangan (Salasia et al., 2009). Enterotoksin merupakan enzim yang mampu bertahan dalam kondisi panas dan tahan terhadap suasana yang bersifat basa di dalam usus yang dapat menyebabkan keracunan makanan (Jawetz et al., 2004).

Keracunan makanan dapat disebabkan kontaminasi enterotoksin dari *Staphylococcus aureus*. Waktu onset dari gejala keracunan biasanya cepat dan akut, tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Jumlah toksin yang dapat menyebabkan keracunan adalah 1,0 mg/gr makanan. Gejala keracunan ditandai oleh ras mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Ryan dkk., 1994).

Sindroma syok toksik (SST) pada infeksi *Staphylococcus aureus* timbul secara tiba-tiba dengan gejala demam tinggi, muntah, diare, mialgia, rum, dan hipotensi, dengan gagal jantung dan ginjal pada kasus yang berat. SST sering terjadi dalam lima hari permulaan haid pada wanita muda yang menggunakan tempon, atau pada anak-anak dan pria dengan luka yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* dapat diisolasi dengan vagina, tempon, luka atau infeksi lokasi lainnya, tetapi praktis tidak ditemukan dalam aliran darah (Jawetz dkk., 1995).

## 2.3 Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*)

### 2.3.1 Klasifikasi Tanaman Salam (Tjitrosoepomo, 2005)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Sub Kelas	: <i>Dialypetalae</i>
Bangsa	: <i>Myrtales</i>
Suku	: <i>Myrtaceae</i>
Marga	: <i>Syzygium</i>
Jenis	: <i>Syzygium polyanthum</i> (Wight) Walp.

### 2.3.2. Morfologi daun salam

Gambar 2.2 Daun Salam (Alfan Tammi, dkk, 2018)



*Syzygium*, merupakan genus yang sangat penting dari *Myrtaceae* dan banyak terdistribusi di daerah tropis dan subtropis khususnya di Asia Tenggara seperti Indonesia dan Malaysia. *Syzygium polyanthum* merupakan salah satu spesies dari genus *Syzygium* yang dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 1800 m di atas permukaan laut dan tersebar mulai dari Birma sampai Pulau Jawa (Sembiring et al 2017). *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. memiliki sinonim *Eugenia polyantha* Wight (1831), *Eugenia nitida* Duthie (1878), *Eugenia balsamea* Ridley (1922) (de Guzman and Simeosma, 1999). Vernacular name untuk *Syzygium polyanthum* antara lain: salam (umum), *Indonesia bay-leaf* (Inggris), *manting* (Jawa), *ubar serai* (Sumatra) (de Guzman

and Simeosma, 1999), *lomas* (Batak Toba), *lemas* (Batak Phakpak) (Silalahi, 2014).

### **2.3.3. Kandungan Daun Salam**

Daun salam diketahui mengandung flavonoid, minyak atsiri, seskuiterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, karbohidrat, selenium. Vitamin yang terkandung dalam daun salam, seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E berfungsi sebagai antioksidan. Daun salam juga mengandung tannin, saponin dan niacin yang berfungsi untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Agoes 2010). Menurut penelitian dalam daun salam (*Syzygium polyanthum*) terdapat kandungan Vitamin (B2, B3, dan C). Ditemukan bahwa setiap 100 mg serbuk kering *S. polyanthum* daun mengandung 1,24 mg riboflavin (Vitamin B2), 0,58 mg niacin (Vitamin B3), dan 0,40 mg asam askorbat (Vitamin C), dengan total kandungan vitamin 2,22 mg. (Karim.dkk, 2017)

### **2.3.4. Manfaat Daun Salam**

Tanaman salam telah banyak dikenal oleh masyarakat, biasanya dimanfaatkan sebagai salah satu bumbu dapur atau rempah yaitu penyedap karena memiliki aroma khas yang bisa menambah kelezatan masakan. Senyawa-senyawa seperti niasin, serat, tannin, dan vitamin C yang terkandung dalam daun salam diduga mampu menurunkan kadar trigliserida serum (Soeharto, 2004 dan Moeloek, 2006). Tanaman salam (*Eugenia polyantha*) merupakan salah satu tanaman yang sering dimanfaatkan masyarakat untuk pengobatan alternatif. Keberadaan tanaman salam yang sudah umum dalam masyarakat dan mudah didapatkan, diharapkan akan mempermudah edukasi dan pengenalan tanaman salam kepada masyarakat sebagai salah satu bahan alternatif sebagai obat herbal untuk kesehatan

## **2.4 Metode Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cairan penyari (Depkes RI, 2000). Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut (Mukhriani, 2014):

- a. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
- b. Pemilihan pelarut
  - Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
  - Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
  - Pelarut nonpolar: n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya..

Jenis-jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut :

#### **2.4.1 Infusa**

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Pembuatan dengan cara pemanasan simplisia di atas pemanas air selama 15 menit dihitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Setelah itu diangkat dan dilakukan penyarian dalam keadaan panas (Mulyana dkk., 2013). Infusa merupakan ekstraksi yang menggunakan pelarut polar yaitu air. Senyawa yang memiliki kepolaran yang sama akan lebih mudah tertarik atau terlarut dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama

#### **2.4.2 Maserasi**

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan. Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain waktu, suhu, jenis pelarut, perbandingan bahan dan pelarut, dan ukuran partikel. (Chairunnisa S et al, 2019) Ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kelebihan yaitu terjaminnya zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak (Pratiwi, 2010). Pada saat proses perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan (Novitasari dan Putri, 2016).

Prinsip dari ekstraksi maserasi adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk dalam cairan penyari yang sesuai selama sehari atau beberapa pada temperatur kamar terlindungi dari cahaya,

cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berlangsung sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengaduk dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. (Hasrianti dkk, 2016)

#### **2.4.3 Perkolasi**

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu. (Mukhriani, 2014)

#### **2.4.4 Perebusan**

Perebusan adalah proses pemasakan dalam air mendidih sekitar 100°C, dimana air sebagai media penghantar panas (Aisyah et al 2014). Ekstraksi melalui proses perebusan dilakukan dengan merebus simplisia dengan pelarut air. Banyaknya serutan kayu secang yang digunakan disesuaikan dengan jumlah ekstrak yang dibutuhkan untuk mewarnai pada rasio 1:30. Perebusan dilakukan pada suhu  $\pm 90^{\circ}\text{C}$  dengan waktu tertentu. Ekstrak yang diperoleh difiltrasi dengan saringan 400 mesh dan dibiarkan selama  $\pm 24$  jam (Sofyan et al., 2018).

#### **2.4.5 Reflux dan Destilasi Uap**

Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu.



Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari kedua metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Seidel V, 2006).

#### **2.4.6 Soxhletasi**

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih. (Mukhriani, 2014)

### **2.5 Aktivitas Antibakteri**

Antibakteri adalah obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifatnya, antibakteri ada yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (*bakteriostatik*) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (*bakterisida*) (Mukhtasari, 2012). Zat ini dapat berupa metabolit sekunder dari mikroba tertentu (antibiotika), diisolasi dari tumbuhan atau hewan dan hasil sintesis kimia (Sulistyaningsih, dkk., 2016: 3). Menurut Rahmadani (2015: 15), mekanisme kerja antibakteri ada lima yaitu:

- Menghambat sintesis dinding sel, struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah dinding sel setelah terbentuk.

- Mengganggu keutuhan membran sel mikroba, membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu yang ada di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran memelihara integritas komponen-komponen selular, kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.
- Menghambat sintesis protein sel mikroba, hidupnya suatu sel bergantung dengan terjaganya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alaminya. Suatu kondisi yang mengubah keadaan ini dengan mendenaturasi protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali, suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi) irreversible.
- Mengganggu metabolisme sel mikroba, setiap enzim dari banyaknya enzim ada yang di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Banyaknya zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimia, penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel.
- Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein, dalam kehidupan normal sel DNA, RNA dan protein memiliki peranan penting sehingga gangguan apapun yang akan terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

Tabel 2.1 Kategori Diameter Zona hambat (Davis, W.W and Stout, T.R. 1971).

Diameter zona hambat	Respons hambat bakteri
$\leq 5\text{mm}$	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
$\geq 21\text{ mm}$	Sangat kuat

Tabel 2.2 Kategori KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) (Holetz, F.B, 2002).

KHM	Respons hambat bakteri
>1000 µg/ml	Sangat lemah /Tidak memiliki aktivitas antibakteri
500 - 1000 µg/ml	Lemah
100-500 µg/ml	Cukup Kuat
<100 µg/ml	Sangat kuat

## 2.6 Metode Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan kerentanan bakteri patogen terhadap suatu antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode utama yaitu dilusi atau difusi. Metode standar diperlukan untuk dapat mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri.

### 2.6.1 Metode Dilusi

Substansi antibakteri dalam kadar bertingkat dicampurkan ke media bakteriologis cair atau padat. Dalam metode ini zat antibakteri dengan pengenceran dua kali lipat ( $\log_2$ ). Media kemudian diinokulasi dengan bakteri uji dan diinkubasi. Titik akhir dipilih sebagai jumlah zat antibakteri yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan atau untuk membunuh bakteri uji. Uji kepekaan agar dilusi memakan banyak waktu, dan penggunaannya terbatas pada keadaan khusus. Uji ini juga kurang praktis karena pengenceran zat uji yang digunakan hanya sedikit namun harus dilakukan pengenceran pada tabung reaksi (Jawetz, Melnick and Adelberg's, 2013).

Keuntungan dari uji dilusi adalah dapat memberikan hasil kuantitatif untuk dilaporkan, yang menunjukkan jumlah obat yang diperlukan untuk menghambat (atau membunuh) mikroorganisme yang diuji (Jawetz, Melnick and Adelberg's, 2013). Untuk pengukuran kuantitatif aktivitas

antimikroba, pengenceran antimikroba dapat digabungkan ke dalam kaldu atau media agar, yang kemudian diinokulasi dengan organisme yang diuji. Konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan setelah melalui inkubasi disebut konsentrasi hambat minimum/ KHM (minimum inhibitory concentration/MIC) zat tersebut (Vandepitte et al., 2011).

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (broth dilution) dan dilusi padat (solid dilution).

- Metode dilusi cair / broth dilution test (serial dilution). Metode ini mengukur MIC (minimum inhibitory concentration atau kadar hambat minimum, KHM) dan MBC (minimum bactericidal concentration atau kadar bunuh minimum, KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibakteri, dan diinkubasi selama 18 -24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM.
- Metode dilusi padat / solid dilution test. Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antibakteri yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa bakteri uji. (Pratiwi, 2008).

### **2.6.2 Metode Difusi**

Pada metode ini penentuan aktivitas didasarkan pada kemampuan difusi dari zat antibakteri dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambat yang akan terbentuk disekeliling zat antibakteri pada waktu inkubasi. Metode ini dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu cara cakram, cara parit, dan cara sumuran. (Eko Prayoga, 2013)

- Cara cakram dilakukan dengan menggunakan kertas saring (paper disc) yang ditetesi larutan uji antibakteri. Kertas saring tersebut kemudian diletakan pada lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri uji, lalu diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu sesuai dengan kondisi optimum dari bakteri uji. Pada umumnya hasil yang didapat bisa diamati setelah inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Uji difusi cakram merupakan metode yang paling sering digunakan. Diameter zona hambat yang jelas di sekitar cakram ditentukan sebagai ukuran daya hambat obat melawan jenis organisme uji tertentu. Metode ini subjektif pada berbagai faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisme (misalnya sifat medium, diffusibility, ukuran molekul, dan stabilitas obat) (Jawetz, Melnick and Adelberg's, 2013). Metode modifikasi Kirby-bauer merupakan metode difusi cakram, yang mulanya dijabarkan, dibakukan dan dievaluasi secara luas. Agensi-agensi resmi telah merekomendasikannya, dengan sedikit modifikasi, sebagai metode rujukan yang dapat digunakan sebagai teknik rutin dalam laboratorium klinik (Vandepitte et al., 40 2011).
- Cara parit dilakukan dengan membuat sebidang parit pada lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Parit tersebut berisi zat antibakteri, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk bakteri uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekitar parit.
- Cara sumuran dilakukan dengan membuat lubang pada lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji yang selanjutnya diisi dengan zat antibakteri uji. Setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan bakteri uji, lalu dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat di sekeliling lubang.