

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes merupakan salah satu bakteri patogen penting dalam bidang mikrobiologi klinik yang sering dijadikan objek kajian karena karakteristik biologis dan perannya dalam berbagai infeksi pada manusia. Untuk memahami sifat dasar dan kedudukannya secara ilmiah, diperlukan penjelasan mengenai klasifikasi taksonomi bakteri ini (Tille, 2017).

a. Klasifikasi *Streptococcus pyogenes*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Whitman, 2015) menyatakan bahwa *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri Gram positif yang masuk dalam kelompok bakteri asam laktat dan dikenal luas sebagai penyebab berbagai infeksi pada manusia. Susunan klasifikasi taksonominya adalah sebagai berikut:

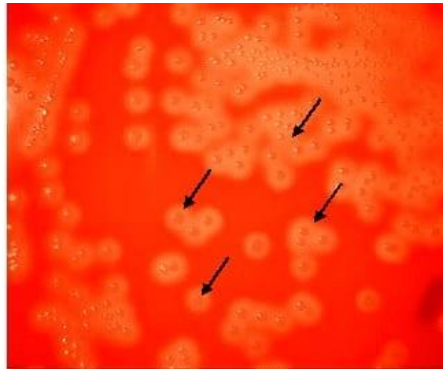
Domain : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Spesies : *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus β -hemolitik grup A (*Group A Streptococcus* / GAS) merupakan bakteri Gram positif yang mampu menyebabkan hemolisis β , yaitu lisis eritrosit secara sempurna pada media agar darah. Spesies utama kelompok ini adalah *Streptococcus pyogenes* yang dikenal sebagai patogen penting pada manusia dan penyebab berbagai infeksi, seperti faringitis, tonsilitis, impetigo, serta demam skarlet (Murray dkk., 2020). Bakteri ini tumbuh baik pada *Blood Agar Plate* dan membentuk zona hemolisis β yang jelas, sehingga sering digunakan sebagai organisme uji dalam penelitian media agar darah (Nurhidayanti, 2019).

Klasifikasi *Streptococcus pyogenes* berkaitan dengan sifatnya sebagai bakteri fakultatif anaerob yang mampu tumbuh pada kondisi mikroaerofilik. Bakteri ini digunakan dalam penelitian di Indonesia untuk menilai kinerja media darah, termasuk darah manusia pascakedaluwarsa (Djannatun, dkk., 2018; Maulana dan Wijayanti, 2023; Putri, dkk., 2024), sehingga pemahaman taksonominya penting dalam pengamatan aktivitas hemolisis.

Klasifikasi *S. pyogenes* penting untuk identifikasi laboratorium karena memudahkan pengenalan sifat fisiologis dan biokimiawinya, seperti katalase negatif, hemolisis β , dan kepekaan terhadap bacitracin (Tille, 2017). Berdasarkan karakter tersebut, *S. pyogenes* sering digunakan sebagai organisme uji standar untuk menilai performa media agar darah dengan berbagai variasi jenis dan lama penyimpanan darah.

b. Morfologi dan Karakteristik Umum



Gambar 1. Morfologi *Streptococcus pyogenes* pada BAP

Sumber : Microbiology Class, 2024.

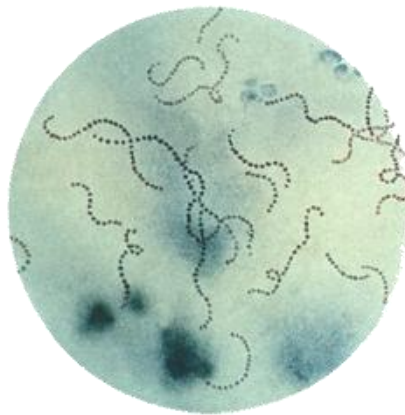
Morfologi koloni merupakan gambaran makroskopis pertumbuhan bakteri pada media padat yang mencakup bentuk, ukuran, tepi, permukaan, dan warna. Koloni *Streptococcus pyogenes* pada agar darah umumnya bulat, kecil–sedang, berpermukaan halus, tepi rata, dan berwarna putih keabu-abuan hingga transparan. Variasi morfologi koloni dipengaruhi oleh jenis media dan kecukupan nutrisi, sehingga dapat menjadi indikator kemampuan media dalam mendukung pertumbuhan *S. pyogenes* (Tille, 2017).

Koloni *Streptococcus pyogenes* dilihat secara makroskopis pada agar darah biasanya tampak kecil, halus, dan cembung dengan warna abu-abu keputihan, disertai zona jernih di sekeliling koloni sebagai tanda hemolisis β . Karakteristik hemolisis yang terlihat pada koloni tersebut berkaitan dengan kemampuan *Streptococcus pyogenes* dalam menghasilkan streptolisin O dan streptolisin S, dua toksin hemolitik yang menyebabkan destruksi eritrosit secara lengkap sehingga

membentuk zona hemolisis β yang jelas pada media agar darah (Carroll dkk., 2019).

Putri dkk. (2024) menunjukkan bahwa media berbahan darah manusia pascakedaluwarsa tetap dapat menghasilkan zona β -hemolisis yang jelas pada *S. pyogenes*, meskipun tingkat kejernihan zona tersebut dipengaruhi oleh lamanya darah disimpan.

Karakteristik sel bakteri merupakan ciri mikroskopis yang diamati melalui pemeriksaan sediaan apus dan pewarnaan Gram. *Streptococcus pyogenes* termasuk bakteri Gram positif berbentuk kokus yang tersusun berantai dan tidak membentuk spora. Pengamatan karakteristik sel bakteri dilakukan untuk memastikan identitas bakteri yang ditumbuhkan serta menilai kestabilan sifat sel bakteri selama pertumbuhan pada media agar darah dengan variasi jenis darah yang digunakan (Whitman dkk., 2015; Tille, 2017).



Gambar 2. Pengamatan Mikroskopis *Streptococcus pyogenes*

Sumber : CDC, 2025.

Diameter koloni merupakan salah satu parameter kuantitatif yang digunakan untuk menilai tingkat pertumbuhan bakteri pada media

padat. Pengukuran diameter koloni mencerminkan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan nutrisi yang tersedia pada media serta kondisi lingkungan pertumbuhan yang mendukung. Koloni dengan diameter yang lebih besar menunjukkan pertumbuhan bakteri yang lebih optimal, sehingga parameter diameter koloni dapat digunakan sebagai indikator efektivitas media agar darah dalam mendukung pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* (Tille, 2017).

Streptococcus pyogenes merupakan bakteri fakultatif anaerob yang mampu tumbuh baik pada kondisi dengan maupun tanpa oksigen, dengan pertumbuhan optimal pada lingkungan mikroaerofilik. Bakteri ini memfermentasi glukosa menjadi asam laktat sebagai produk akhir metabolisme sehingga termasuk dalam kelompok lactic acid bacteria. Pertumbuhan *S. pyogenes* berlangsung optimal pada suhu 35–37°C dan pH netral sekitar 7,0–7,4. Paparan suhu di atas 45°C dapat menghambat pertumbuhan bakteri akibat terganggunya aktivitas enzimatik (Murray dkk., 2020).

Streptococcus pyogenes secara biokimia menunjukkan hasil negatif pada uji katalase, oksidase, dan urease, tetapi memberikan hasil positif pada uji PYR (*pyrrolidonyl arylamidase*). Selain itu, bakteri ini umumnya sensitif terhadap bacitracin, sehingga uji PYR dan bacitracin sering digunakan sebagai metode pendukung dalam identifikasi *S. pyogenes* di laboratorium mikrobiologi klinik (Carroll dkk., 2019). Dengan mempertimbangkan karakter morfologi, fisiologi, dan

biokimianya, *S. pyogenes* kerap dijadikan organisme uji standar dalam berbagai penelitian yang menilai kualitas media agar darah, termasuk media yang memakai darah manusia pascakedaluwarsa (Putri, dkk., 2024).

c. Faktor virulensi dan patogenitas

Streptococcus pyogenes memiliki sejumlah faktor virulensi yang berperan penting dalam kemampuannya menimbulkan infeksi pada manusia. Irianto (2018) menyebutkan bahwa faktor-faktor tersebut terdiri atas komponen dinding sel serta berbagai produk ekstraseluler yang membantu bakteri menghindari mekanisme pertahanan imun dan merusak jaringan inang. Salah satu komponen yang paling berpengaruh adalah protein M, yaitu protein permukaan yang berfungsi menghambat fagositosis oleh leukosit. Selain itu, protein M turut meningkatkan kemampuan bakteri melekat pada sel epitel sehingga proses kolonisasi berlangsung lebih efektif.

S. pyogenes juga menghasilkan kapsul polisakarida yang tersusun atas asam hialuronat. Struktur kapsul ini menyerupai jaringan ikat manusia, sehingga keberadaannya sulit dikenali oleh sistem imun (Murray dkk., 2020). Bakteri ini pun memproduksi sejumlah enzim yang memfasilitasi penyebaran infeksi, seperti streptokinase yang melisiskan fibrin sehingga memperluas area invasi, serta hyaluronidase yang

menguraikan matriks jaringan ikat dan mempercepat penetrasi ke jaringan yang lebih dalam.

Streptococcus pyogenes menghasilkan toksin hemolitik utama berupa streptolisin O (*oxygen-labile streptolysin*) dan streptolisin S (*oxygen-stable streptolysin*) yang berperan dalam proses patogenesis. Streptolisin O bersifat labil terhadap oksigen, sedangkan streptolisin S stabil pada kondisi aerob, dan keduanya berkontribusi terhadap terbentuknya zona β -hemolisis yang khas pada media agar darah. Beberapa strain juga menghasilkan toksin pirogenik streptokokus yang berperan dalam timbulnya ruam pada demam skarlet (Todar, 2018).

Patogenisitas *S. pyogenes* tidak hanya dipicu oleh kemampuan merusak jaringan, tetapi juga aktivitas imunologis yang ditimbulkannya. Irianto (2018) menjelaskan bahwa infeksi berulang dapat memicu reaksi autoimun, seperti demam rematik atau glomerulonefritis pasca-streptokokus, akibat terbentuknya antibodi yang bereaksi silang dengan jaringan tubuh. Dengan beragam faktor virulensi tersebut, *S. pyogenes* digolongkan sebagai patogen oportunistik yang mampu menyebabkan infeksi dari derajat ringan hingga berat, bergantung pada kondisi inang dan lingkungan.

2. Media Agar Darah (*Blood Agar Plate/BAP*)

Media agar darah (*Blood Agar Plate/BAP*) merupakan salah satu media yang paling sering digunakan dalam pemeriksaan mikrobiologi klinis karena kemampuannya mendukung pertumbuhan bakteri patogen sekaligus

memperlihatkan aktivitas hemolisis, sehingga pemahaman mengenai pengertian dan fungsi media ini menjadi penting (Djannatun dkk., 2018).

a. Pengertian dan Fungsi

Media agar darah atau *Blood Agar Plate* (BAP) merupakan jenis media padat yang termasuk dalam kategori media diperkaya sekaligus diferensial. Media ini banyak digunakan dalam pemeriksaan mikrobiologi klinis untuk menumbuhkan bakteri patogen serta mengamati pola hemolisis yang ditimbulkannya Djannatun dkk. (2018). BAP tersusun dari media dasar agar yang kemudian ditambahkan darah segar sebanyak 5–10% sebagai sumber faktor pertumbuhan sekaligus indikator aktivitas hemolitik. Jenis media ini mampu mendukung pertumbuhan bakteri fastidious seperti *Streptococcus*, *Neisseria*, dan *Haemophilus*, yang tidak dapat berkembang optimal pada media nutrisi standar.

Agar darah juga digunakan dalam proses identifikasi bakteri melalui pengamatan kemampuan organisme tersebut dalam melisis eritrosit. Krihariyani, dkk., (2016) menyatakan bahwa reaksi hemolisis menjadi salah satu ciri penting untuk membedakan beberapa spesies bakteri, khususnya dari kelompok *Streptococcus*. Melalui BAP, karakteristik koloni seperti bentuk, warna, serta kejernihan zona di sekitar koloni dapat diamati dengan jelas, sehingga media ini sangat bermanfaat dalam diagnostik infeksi bakteri hemolitik.

Blood Agar Plate memiliki peran utama yaitu untuk mengevaluasi aktivitas hemolitik yang dihasilkan bakteri melalui enzim hemolisin. Sebagai contoh, *Streptococcus pyogenes* menghasilkan β -hemolisin yang menyebabkan lisis total eritrosit dan membentuk zona bening di sekitar koloni. Dengan demikian, BAP tidak hanya dipakai untuk isolasi dan perbanyakan bakteri, tetapi juga untuk membedakan spesies berdasarkan karakter biokimia dan pola hemolisisnya.

b. Komposisi Media

Media agar darah pada dasarnya terdiri atas dua bagian utama, yakni media dasar dan darah sebagai komponennya. Maulana dan Wijayanti (2023) menyebutkan bahwa media dasar yang lazim dipakai adalah *Blood Agar Base*, yang mengandung protein dan peptida sebagai sumber utama nutrisi, jejak karbohidrat dan lipid dari ekstrak daging, mineral yang menjaga keseimbangan osmotik, serta sedikit vitamin alami. Sebagian besar komposisi berupa agar sebagai pematat, sehingga medium mampu menyediakan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri.

Penambahan darah dilakukan pada suhu sekitar 45–50°C agar eritrosit tidak mengalami kerusakan sebelum digunakan. Biasanya volume darah yang dicampurkan berkisar antara 5–10% dari total media cair Djannatun dkk. (2018). Darah domba merupakan pilihan yang paling umum karena mampu menghasilkan pola hemolisis yang

konsisten dan mudah diamati, sementara darah manusia dapat dijadikan alternatif bila darah hewan tidak tersedia.

Tabel 1. Komposisi *Blood Agar Plate*

Nutrien	Presentase	Keterangan
Protein	30-35 %	Sumber asam amino dan nitrogen
Karbohidrat	< 5 %	Jejak glukosa dari ekstrak daging
Lipid	< 1 %	Jejak alami, tidak ditambahkan khusus
Mineral	15 - 20 %	Menjaga tekanan osmotik dan fungsi enzim
Vitamin	< 1 %	Jejak vitamin alami
Agar	40 - 45 %	Agen pematat, bukan nutrisi
Darah	5%	Menambah nutrisi

Sumber : Maulana dan Wijayanti, 2023

Beberapa faktor penting dalam proses pembuatan media berbasis darah adalah kondisi media dan kualitas darah yang digunakan. Media harus mampu menyediakan lingkungan optimal, seperti suhu yang stabil, agar mikroorganisme dapat tumbuh dengan baik. Selain itu, kondisi darah juga berpengaruh terhadap keberhasilan pertumbuhan dan deteksi bakteri, karena kualitas sampel dapat memengaruhi hasil kultur. Oleh karena itu, pemilihan bahan dan pengolahan media yang tepat sangat menentukan efektivitas media dalam mendukung pertumbuhan mikroorganisme (Hardy dkk., 2024).

c. Prinsip Hemolisis (α , β , γ)

Prinsip kerja media agar darah bertumpu pada kemampuan enzim hemolisin yang diproduksi bakteri untuk merusak eritrosit sehingga hemoglobin terlepas ke medium. Mekanisme hemolisis terjadi ketika hemolisin merusak membran eritrosit sehingga sel darah merah

mengalami lisis dan membentuk zona bening di sekitar koloni. Berdasarkan tingkat kerusakan sel darah merah, dikenal tiga tipe hemolisis, yaitu α (alfa), β (beta), dan γ (gamma). Hemolisis alfa ditandai oleh perubahan warna kehijauan di sekitar koloni akibat oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin, sedangkan hemolisis beta ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening sebagai hasil lisis eritrosit secara sempurna. Hemolisis gamma tidak menunjukkan perubahan pada media agar darah karena tidak terjadi perusakan eritrosit (Murray dkk., 2020).

Dharmawangsa (2019) menjelaskan bahwa kejelasan zona hemolisis sangat dipengaruhi oleh jenis serta mutu darah yang digunakan dalam pembuatan media. Meski darah manusia yang telah melewati masa simpannya masih dapat menunjukkan reaksi hemolitik, kejernihan zona yang terbentuk cenderung lebih rendah dibandingkan penggunaan darah domba segar. Kondisi ini berkaitan dengan perubahan integritas membran eritrosit selama penyimpanan yang membuatnya kurang responsif terhadap kerja enzim hemolitik.

3. Darah Domba

a. Alasan Penggunaan darah Domba

Darah domba merupakan bahan yang paling sering digunakan dalam pembuatan media agar darah karena memiliki karakteristik biologis yang mendukung pengamatan aktivitas hemolitik bakteri. Badawi dan Al-Hadithy (2018) menyatakan bahwa darah domba

memiliki kadar hemoglobin yang tinggi sebesar 8.6–15.1 g/dL serta ukuran eritrosit yang relatif seragam, sehingga mampu menghasilkan pewarnaan media yang homogen dan zona hemolisis yang tampak jelas. Kondisi ini menjadikan darah domba sangat sesuai untuk mendeteksi aktivitas hemolitik bakteri seperti *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus aureus*.

Darah domba tidak mengandung antibodi terhadap antigen manusia, sehingga potensi terjadinya reaksi silang yang dapat mengaburkan zona hemolisis menjadi lebih kecil (Fitriani dan Kusuma, 2023). Eritrosit domba juga diketahui lebih tahan terhadap perubahan suhu dan tekanan saat proses pembuatan media, sehingga tidak mudah mengalami hemolisis spontan.

Tabel 2. Komposisi Darah Domba

Komponen Darah	Jumlah
Eritrosit (RBC)	$5.78 \times 10^6/\text{mm}^3$ - $6.95 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hemoglobin (Hb)	8.6–15.1 g/dL
Leukosit (WBC)	$8.05\text{--}13.71 \times 10^6/\mu\text{L}$
Hematokrit (PCV)	24.35–29.70%

Sumber : Badawi dan Al-Hadithy, 2018

Stabilitas tersebut membuat darah domba menjadi pilihan standar dalam berbagai prosedur laboratorium mikrobiologi yang memerlukan media diferensial seperti *Blood Agar Plate* (BAP).

b. Keunggulan dan Keterbatasannya

Keunggulan utama penggunaan darah domba adalah kemampuannya menghasilkan zona hemolisis yang jelas dan mudah

diamati. Stark dan White (2021) menjelaskan bahwa eritrosit domba memiliki membran yang kuat serta elastis, sehingga tetap stabil meskipun mengalami pemanasan ringan pada suhu 45–50°C saat dicampurkan ke dalam media dasar. Sifat tersebut membantu mempertahankan warna media yang seragam dan mencegah kerusakan struktur media. Selain itu, warna merah darah domba memberikan kontras yang baik dengan zona hemolisis, sehingga pengukuran diameter zona pada uji hemolitik dapat dilakukan dengan lebih mudah.

Media agar darah yang menggunakan darah berkualitas baik akan menghasilkan pertumbuhan mikroorganisme dan pola hemolisis yang lebih jelas dan konsisten. Selain itu, kualitas dan keamanan darah yang digunakan menjadi faktor penting dalam menunjang keberhasilan kultur mikrobiologi. Oleh karena itu, pemilihan sumber darah yang tepat sangat berpengaruh terhadap efektivitas media agar darah dalam mendukung pertumbuhan dan deteksi mikroorganisme (Hardy dkk., 2024).

Darah domba yang digunakan dalam penelitian memiliki beberapa keterbatasan. Putri dkk. (2024) menyebutkan bahwa kualitas darah dapat berbeda-beda, tergantung pada umur serta kondisi kesehatan hewan dan teknik pengambilan darah. Selain itu, prosedur pengambilan darah domba memerlukan pertimbangan biaya yang lebih tinggi dibandingkan pemanfaatan darah manusia pascakedaluwarsa dari Unit Donor Darah (UDD). Karena alasan tersebut, beberapa penelitian

memilih memakai darah manusia pascakedaluwarsa sebagai alternatif yang lebih mudah diakses dan etis, asalkan aspek keamanan serta kontrol mutu tetap diperhatikan.

4. Darah Manusia Pascakedaluwarsa

a. Potensi penggunaannya dalam media BAP

Darah manusia yang telah melewati masa simpannya memiliki potensi besar sebagai pengganti darah domba dalam pembuatan *Blood Agar Plate* (BAP), terutama ketika darah hewan sulit diperoleh atau memerlukan biaya yang lebih tinggi. Secara fisiologis, darah manusia mengandung komponen yang sama dengan darah hewan termasuk eritrosit, hemoglobin, serta protein plasma, sehingga masih mampu menunjang pertumbuhan bakteri dan memperlihatkan pola hemolisis yang diperlukan dalam identifikasi mikrobiologis (Tille, 2017).

Tabel 3. Komposisi Darah Manusia Pascakedaluwarsa

Komponen Darah	Jumlah
Eritrosit (RBC)	$\pm 4,0 \times 10^6 - 5,5 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$
Hemoglobin (Hb)	$\pm 12,0 - 15,0 \text{ g/dL}$
Leukosit (WBC)	-
Hematokrit (PCV)	$\pm 36 - 45\%$

Sumber : Patel dan Naik (2021)

Penelitian yang memanfaatkan darah manusia, termasuk darah pascakedaluwarsa, sebagai komponen *Blood Agar Plate* (BAP) umumnya tidak melaporkan karakteristik donor secara rinci, seperti usia, jenis kelamin, dan golongan darah. Hal ini karena darah yang digunakan berasal dari sampel klinis atau unit darah siap pakai untuk

keperluan diagnostik, sehingga identitas donor tidak dijadikan variabel penelitian. Fokus penelitian lebih diarahkan pada performa media atau sistem kultur dalam mendukung pertumbuhan dan deteksi mikroorganisme (Hudd, 2026).

Literatur di bidang transfusi menunjukkan bahwa karakteristik biologis donor, seperti usia, jenis kelamin, serta faktor genetik, berpengaruh terhadap terjadinya *storage lesion* eritrosit dan kecenderungan hemolisis selama penyimpanan darah, yang dapat menyebabkan variasi kualitas darah antar unit. Sementara itu, pengaruh golongan darah ABO lebih banyak dibahas dalam konteks imunologi dan kompatibilitas transfusi, dan belum menjadi fokus utama dalam penelitian yang secara khusus mengkaji hemolisis spontan darah simpan untuk pembuatan media agar darah (McCullagh dkk., 2020).

Darah manusia pascakedaluwarsa masih dapat dimanfaatkan untuk formulasi agar darah, sebagaimana ditunjukkan oleh berbagai penelitian. Djannatun dkk. (2018) menyatakan bahwa media yang dibuat menggunakan jenis darah ini masih mampu menampilkan zona hemolisis yang cukup jelas pada bakteri β -hemolitik, meskipun tingkat intensitasnya dapat bervariasi. Temuan ini mengindikasikan bahwa struktur eritrosit masih cukup stabil sehingga media tetap layak digunakan untuk analisis mikrobiologi dasar.

Darah manusia pascakedaluwarsa yang tidak lagi memenuhi syarat transfusi dapat dijadikan sumber yang lebih ekonomis bagi

laboratorium pendidikan dan penelitian. Pemanfaatan ini juga sejalan dengan prinsip etika 3R karena mengurangi penggunaan darah hewan (Djannatun, dkk., 2018).

Nurhidayanti (2019) juga menyatakan bahwa *Streptococcus pyogenes* masih menunjukkan zona β -hemolisis pada media berbahan darah manusia pascakedaluwarsa, meskipun kejernihan zona dipengaruhi oleh lamanya penyimpanan darah. Hasil serupa ditemukan oleh Putri dkk. (2024), yang menunjukkan bahwa variasi waktu simpan darah tidak memberikan perbedaan berarti terhadap diameter zona hemolisis *Staphylococcus aureus*.

Darah manusia pascakedaluwarsa memiliki potensi kuat sebagai alternatif darah domba dalam pembuatan BAP dengan mempertimbangkan kesamaan komponen biologis, kemampuan menopang pertumbuhan bakteri, biaya yang lebih rendah, serta aspek etis. Namun demikian, penelitian lebih lanjut masih dibutuhkan untuk menilai sejauh mana masa pascakedaluwarsa memengaruhi kejernihan dan kualitas zona hemolisis.

b. Pengaruh lama penyimpanan terhadap integritas eritrosit

Sel darah merah mengalami penurunan mutu akibat lama penyimpanan darah, terutama pada sampel yang telah melewati tanggal pascakedaluwarsa. Selama penyimpanan, sel darah merah mengalami berbagai perubahan biokimia serta transformasi bentuk yang dikenal sebagai *storage lesions*. Laurén dkk. (2023) menyebutkan bahwa

perubahan tersebut mencakup berkurangnya elastisitas membran, meningkatnya kerapuhan sel, serta terjadinya kebocoran hemoglobin ke bagian plasma. Perubahan ini pada akhirnya mengurangi kemampuan eritrosit dalam mempertahankan struktur utuhnya saat dimanfaatkan untuk pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP).

Membran eritrosit yang mengalami alterasi akibat penyimpanan berkepanjangan menunjukkan perubahan respons terhadap hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri. Rahman dkk. (2021) menjelaskan bahwa semakin lama darah disimpan, risiko terjadinya hemolisis spontan akan semakin tinggi karena membran sel mengalami degradasi. Kondisi ini menyebabkan zona hemolisis pada media agar darah tampak kurang tajam, lantaran sebagian eritrosit telah mengalami lisis sebelum terpapar enzim hemolitik seperti streptolisin O maupun streptolisin S.

Barshtein dkk. (2022) menyatakan bahwa darah dengan masa simpan lebih dari 15 hari menunjukkan kerapuhan eritrosit yang meningkat. Hal tersebut berhubungan dengan terbentuknya *echinocyte* dan *spherocyte* akibat perubahan tekanan osmotik selama periode penyimpanan.

Penelitian yang dilakukan oleh Nurhidayanti (2019) menegaskan bahwa durasi penyimpanan berpengaruh terhadap kejernihan zona β -hemolisis yang dihasilkan *Streptococcus pyogenes*. Sampel darah yang disimpan lebih lama cenderung memberikan tampilan hemolisis yang lebih sulit diamati dibandingkan darah yang

baru melewati masa pakainya. Sejalan dengan itu, Miguel dkk. (2024) melaporkan bahwa media yang menggunakan darah dengan lama simpan lebih dari 30 hari menunjukkan penurunan uniformitas warna dan sensitivitas hemolitik, sehingga berpotensi memengaruhi ketepatan interpretasi di laboratorium.

Peningkatan lama penyimpanan darah secara umum berdampak langsung pada penurunan integritas eritrosit, yang selanjutnya memengaruhi kualitas pembentukan zona hemolisis. Oleh sebab itu, penilaian terhadap durasi pascakedaluwarsa darah manusia perlu dilakukan sebelum menetapkan sebagai substitusi darah domba dalam pembuatan media agar darah.

5. Pertumbuhan Koloni dan Zona Hemolisis

a. Pertumbuhan Koloni

Pertumbuhan koloni merupakan proses multiplikasi sel bakteri yang terjadi pada permukaan media padat sehingga menghasilkan kumpulan sel yang tampak secara makroskopis. Koloni terbentuk ketika satu sel bakteri tunggal atau sekelompok kecil sel membelah secara berulang dan berkembang menjadi massa sel yang cukup besar untuk diamati dengan mata telanjang. Menurut Karp (2018), koloni bakteri adalah kumpulan sel yang berasal dari satu sel induk (clone), sehingga karakteristik koloni dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri berdasarkan sifat morfologinya.

Pertumbuhan koloni pada media padat dipengaruhi oleh kemampuan bakteri untuk beradaptasi dengan kondisi lingkungan seperti nutrisi, suhu, pH, dan kelembapan. Karp (2018) menjelaskan bahwa bakteri mengalami fase pertumbuhan yang meliputi fase lag, log (eksponensial), stasioner, dan fase kematian. Koloni yang terbentuk pada permukaan agar merupakan hasil dari fase log, di mana pembelahan sel berlangsung cepat dan teratur.

Karakteristik koloni secara makroskopis meliputi bentuk, ukuran, tekstur, permukaan, tepian, elevasi, dan warna. Ciri-ciri ini sangat penting dalam pemeriksaan mikrobiologi klinik karena beberapa bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, atau *Pseudomonas aeruginosa* memiliki tampilan koloni khas yang membantu proses identifikasi (Tille, 2017). Selain itu, perubahan pada koloni seperti adanya zona hemolisis pada media agar darah dapat memberikan informasi tambahan mengenai aktivitas fisiologis bakteri, khususnya kemampuan menghasilkan enzim hemolisin.

b. Zona Hemolisis

Zona hemolisis digunakan sebagai parameter pelengkap untuk menilai kualitas media *Blood Agar Plate* (BAP) karena pola hemolisis mencerminkan respons eritrosit terhadap enzim hemolitik bakteri. Pada bakteri β -hemolitik seperti *Streptococcus pyogenes*, kejernihan dan luasnya zona hemolisis sangat bergantung pada kondisi membran eritrosit. Oleh sebab itu, perubahan fisiologis yang terjadi selama

penyimpanan darah dapat berpengaruh langsung terhadap hasil pengamatan hemolisis pada media.

Ohlinger dkk. (2022) menyatakan bahwa eritrosit yang disimpan selama beberapa minggu akan mengalami serangkaian perubahan yang dikenal sebagai *storage lesion*. Perubahan tersebut meliputi peningkatan kekakuan membran, berkurangnya fleksibilitas, hingga kebocoran hemoglobin. Pada sekitar hari ke-20, kerusakan membran umumnya belum sedominan darah yang mendekati hari ke-30, sehingga respons eritrosit terhadap hemolisin masih lebih stabil. Kondisi ini dapat menjelaskan perbedaan kejernihan zona hemolisis pada media yang menggunakan darah dengan waktu simpan berbeda.

Patel dan Naik (2021) menjelaskan bahwa penyimpanan darah dalam waktu lama dapat menyebabkan *storage lesion* pada eritrosit berupa penurunan integritas membran dan meningkatnya kerapuhan sel. Kondisi tersebut dapat memicu hemolisis spontan dan menurunkan kemampuan eritrosit bereaksi terhadap agen hemolitik sehingga memengaruhi kejernihan zona hemolisis pada media agar darah.

6. Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Koloni dan Zona Hemolisis

Pertumbuhan Koloni dan Zona Hemolisis pada media agar darah dipengaruhi oleh sejumlah faktor lingkungan, kondisi biologis bakteri, dan komposisi media yang digunakan. Ketiga aspek tersebut berperan dalam menentukan kemampuan bakteri untuk terus

berkembang, menghasilkan enzim hemolisin, dan melakukan interaksi dengan eritrosit yang terdapat pada media.

a. Suhu inkubasi

Tille (2017) menyatakan bahwa suhu 35–37°C merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan koloni dan pembentukan hemolisis. Suhu di luar rentang tersebut dapat menurunkan pertumbuhan bakteri dan aktivitas hemolisin.

b. pH media

pH netral pada kisaran 7,0–7,4 berperan penting dalam menjaga stabilitas membran eritrosit serta aktivitas hemolisin, sehingga pembentukan zona hemolisis pada media agar darah dapat terlihat optimal. Penyimpangan pH dari rentang tersebut dapat memengaruhi integritas eritrosit dan menurunkan kejelasan zona hemolisis yang terbentuk (Murray dkk., 2020).

c. Kualitas dan jenis darah dalam media

Miguel dkk. (2024) menyatakan bahwa darah yang mengalami kerusakan atau lama penyimpanan cenderung menghasilkan zona hemolisis kurang tajam karena eritrosit lebih rentan terhadap hemolisin atau sudah mengalami lisis spontan.

d. Ketersediaan nutrisi dalam media

Pratiwi dan Nurhayati (2021) serta Sutandi dkk. (2020) menyatakan bahwa komposisi *Blood Agar Base* (BAB) yang stabil

menjaga integritas eritrosit dan mempermudah pengamatan koloni dan zona hemolisis.

e. Lama inkubasi

Koloni dan zona hemolisis pada media agar darah umumnya mulai tampak jelas setelah inkubasi selama 24–48 jam. Namun, inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan difusi hemoglobin dan produk hemolisis secara berlebihan, sehingga batas zona hemolisis menjadi kurang tegas dan menyulitkan proses penilaian (Carroll dkk., 2019).

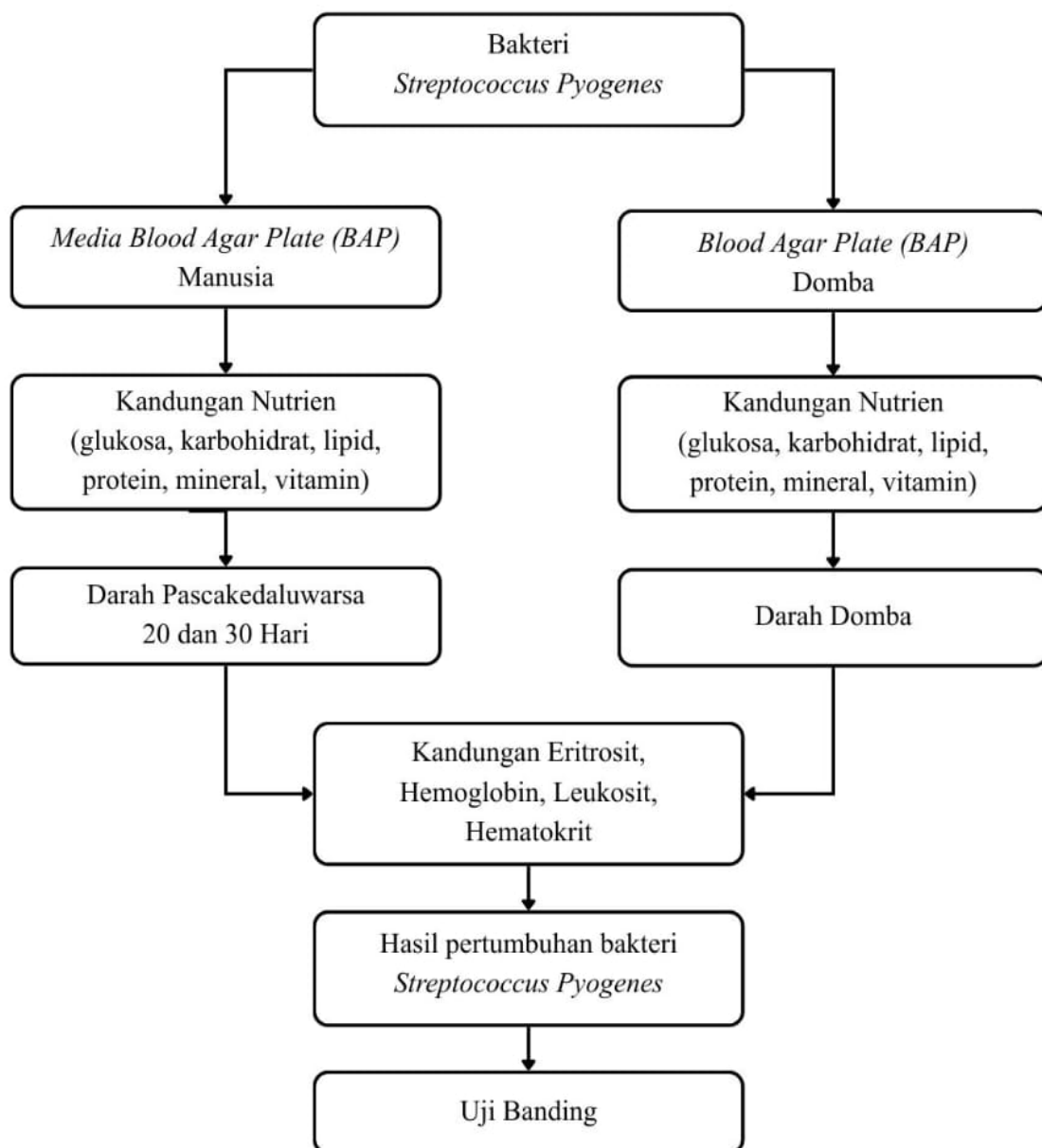
f. Inokulum bakteri

Jumlah sel bakteri yang diinokulasikan ke dalam media memengaruhi pertumbuhan koloni dan kejelasan zona hemolisis. Inokulum yang terlalu sedikit dapat menghasilkan koloni kecil dan hemolisis kurang jelas, sedangkan inokulum yang terlalu banyak dapat menyebabkan koloni menyatu sehingga pengamatan zona hemolisis menjadi kurang optimal (Krihariyani dkk., 2016).

g. Integritas membran eritrosit

Eritrosit yang disimpan dalam waktu lama dapat mengalami *storage lesion*, seperti peningkatan kekakuan membran dan hemolisis spontan (Laurén dkk., 2023). Perubahan tersebut menyebabkan respons eritrosit terhadap enzim hemolitik menurun sehingga zona hemolisis yang terbentuk menjadi kurang jelas.

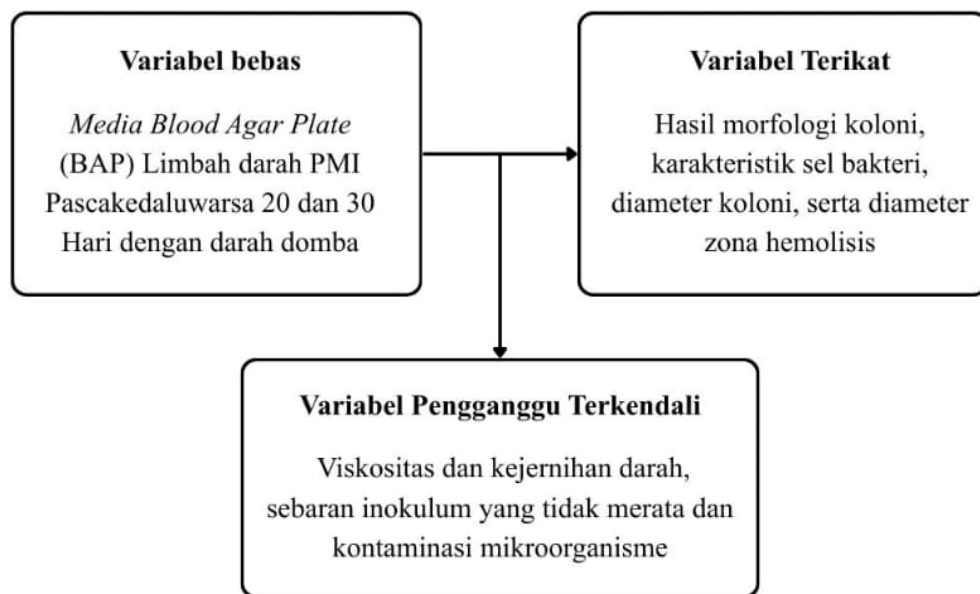
B. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel

Media *Blood Agar Plate* (BAP) limbah darah PMI pascakedaluwarsa 20 dan 30 Hubungan antar variabel pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 4 di bawah ini :



Gambar 4. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Terdapat perbedaan efektivitas media *Blood Agar Plate* (BAP) yang dibuat dari limbah darah PMI pascakedaluwarsa 20 dan 30 hari dibandingkan dengan media *Blood Agar Plate* (BAP) yang menggunakan darah domba dalam menumbuhkan bakteri *Streptococcus pyogenes*.