

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Bakteri *Streptococcus mutans*

a. Klasifikasi

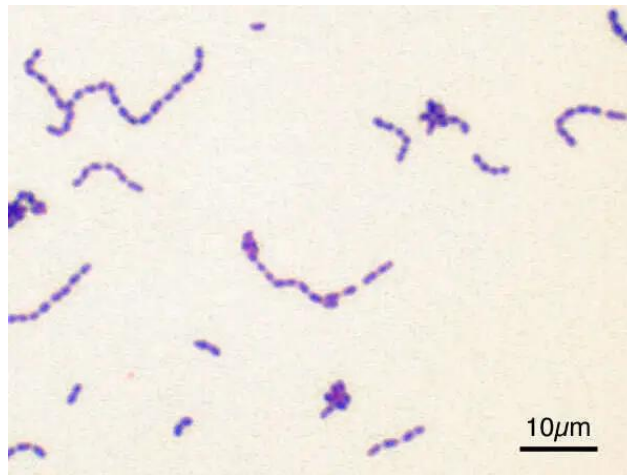
Menurut Soedarto (2015), klasifikasi *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Spesies	: <i>Streptococcus mutans</i>

b. Morfologi dan Karakteristik Umum

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus yang umumnya tersusun dalam rantai pendek sesuai karakteristik genus *Streptococcus*. Pada pewarnaan Gram, bakteri ini tampak berwarna ungu akibat kemampuan dinding sel yang kaya peptidoglikan mempertahankan zat warna kristal violet. Secara mikroskopis, *Streptococcus mutans* terlihat berbentuk bulat dengan susunan sel berantai pendek maupun berpasangan.

Bentuk dan sifat Gram tersebut menjadi salah satu ciri penting dalam proses identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi (Soedarto, 2015).



Gambar 1. Pengamatan Mikroskopis *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Pewarnaan Gram, Pembesaran 1.000×
Sumber : Encyclopedia MDPI, 2024.

Pada media Blood Agar Plate (BAP), *Streptococcus mutans* membentuk koloni berukuran kecil, berbentuk bulat, permukaan halus, dan berwarna putih keabu-abuan. Koloni bakteri ini terkadang tampak sedikit lengket akibat produksi polisakarida ekstraseluler dari metabolisme sukrosa. Karakteristik koloni tersebut membantu proses pengamatan dan identifikasi awal bakteri pada media kultur, terutama dalam pemeriksaan mikrobiologi oral (Brooks dkk., 2013).

Streptococcus mutans termasuk dalam kelompok viridans streptococci yang umumnya menunjukkan hemolisis alfa lemah atau bahkan tidak menunjukkan zona hemolisis yang jelas pada media agar darah. Oleh karena itu, koloni bakteri ini sering tampak bersifat

gamma hemolitik pada media *Blood Agar Plate*. Karakteristik hemolisis tersebut menjadi salah satu pembeda *Streptococcus mutans* dengan kelompok streptokokus lain yang memiliki pola hemolisis lebih jelas, seperti beta hemolitik (Brooks dkk., 2013).

c. Patogenitas

Streptococcus mutans merupakan bakteri yang biasanya hidup secara alami di dalam mulut, tetapi dapat menyebabkan masalah ketika jumlahnya meningkat atau keadaan mulut mendukung pertumbuhannya. Bakteri ini mampu menempel kuat pada permukaan gigi dan membentuk lapisan lengket yang disebut plak, sehingga memudahkan bakteri lain ikut berkumpul. Plak yang mengandung *Streptococcus mutans* kemudian menghasilkan asam yang perlahan merusak lapisan luar gigi yang keras, sehingga lama-kelamaan dapat menyebabkan gigi berlubang. Karena mekanisme ini, *Streptococcus mutans* digolongkan sebagai bakteri yang dapat memicu penyakit meskipun berasal dari lingkungan normal mulut (Soedarto, 2015).

Streptococcus mutans termasuk kelompok *viridans streptococci* yang menunjukkan sifat virulen melalui kemampuan membentuk biofilm dan menghasilkan asam. Bakteri ini memanfaatkan sukrosa untuk membentuk polisakarida ekstraseluler, sehingga dapat menempel kuat dan menyusun plak gigi yang stabil. Lingkungan asam hasil metabolisme bakteri kemudian mempercepat kerusakan

dan memulai proses karies. Dengan mekanisme tersebut, *Streptococcus mutans* menjadi penyebab utama karies meskipun tidak menimbulkan infeksi sistemik berat seperti streptokokus beta-hemolitik (Brooks dkk. 2013).

2. Pembiakan dan Pertumbuhan *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus yang termasuk kelompok bakteri fakultatif anaerob. Bakteri ini dapat tumbuh baik pada kondisi dengan maupun tanpa oksigen, namun pertumbuhannya lebih optimal pada lingkungan dengan kadar oksigen rendah dan suhu inkubasi sekitar 35–37°C. *Streptococcus mutans* membutuhkan nutrisi seperti karbohidrat, nitrogen, vitamin, mineral, dan asam amino untuk mendukung metabolisme dan pembelahan sel. Dalam pemeriksaan mikrobiologi, bakteri ini dapat dibiakkan menggunakan media kultur yang mengandung nutrisi lengkap, seperti *Brain Heart Infusion* (BHI) maupun *Blood Agar Plate* (BAP), untuk mengamati pertumbuhan koloni dan karakteristik hemolisisnya (Cappuccino & Sherman, 2014).

Pertumbuhan *Streptococcus mutans* berlangsung melalui proses pembelahan biner, yaitu satu sel membelah menjadi dua sel anak yang identik. Apabila kondisi lingkungan mendukung, jumlah bakteri akan meningkat secara cepat mengikuti pola pertumbuhan eksponensial. Keberhasilan pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti pH media, suhu, ketersediaan nutrisi, waktu inkubasi, serta

kondisi atmosfer inkubasi. *Streptococcus mutans* diketahui tumbuh optimal pada pH sekitar 6,5–7,0, meskipun bakteri ini memiliki kemampuan bertahan pada kondisi asam akibat sifat asidogenik dan asidurik yang dimilikinya (Samaranayake, 2018).

Pada media Blood Agar Plate, koloni *Streptococcus mutans* umumnya tampak kecil, bulat, berwarna putih keabu-abuan, dan dapat menunjukkan pola hemolisis alfa. Selama proses inkubasi, bakteri akan mengalami beberapa fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase logaritmik, fase stasioner, dan fase kematian. Fase logaritmik merupakan fase pertumbuhan paling aktif karena sel bakteri membelah dengan cepat dan aktivitas metabolisme berada pada tingkat tertinggi. Sebaliknya, pada fase stasioner dan fase kematian, pertumbuhan mulai menurun akibat berkurangnya nutrisi dan meningkatnya hasil metabolisme dalam media kultur (Cappuccino & Sherman, 2014).

3. Kebutuhan Nutrisi dan Faktor Pertumbuhan *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram-positif, anaerob fakultatif, dan tergolong bakteri *fastidious* sehingga memerlukan media kaya (*enriched medium*) untuk pertumbuhan optimalnya (Krzyściak dkk., 2014). Salah satu media yang umum digunakan adalah *Blood Agar Plate* (BAP), yang berfungsi sebagai media diperkaya sekaligus media diferensial karena mampu mendukung pertumbuhan bakteri *fastidious* dan membedakan bakteri berdasarkan pola hemolisisnya (Cappuccino dan Sherman, 2014). Kebutuhan nutrisi *Streptococcus mutans* serta

hubungannya dengan komponen media BAP darah domba dan darah donor PRC kedaluwarsa adalah sebagai berikut:

a. Karbon dan Sumber Energi

- (1) Kebutuhan *Streptococcus mutans* : memerlukan karbohidrat organik sebagai donor elektron untuk menghasilkan energi (ATP) melalui jalur fermentasi glikolisis (Abranches dkk., 2018).
- (2) Pemenuhan oleh Media : terpenuhi secara melimpah pada PRC kedaluwarsa oleh sisa glukosa ekstraseluler dari larutan antikoagulan/aditif kantong darah seperti CPDA-1 (*Citrate Phosphate Dextrose Adenine*), yang menjadi substrat utama bagi metabolisme asidogenik bakteri (Harmening, 2018; Lemos dkk., 2019).

b. Sumber Nitrogen

- (1) Kebutuhan *Streptococcus mutans* : memerlukan nitrogen organik siap pakai (peptida/asam amino) untuk sintesis protein struktural dan enzim (Abranches *et al.*, 2018).
- (2) Pemenuhan oleh Media : pada PRC kedaluwarsa, terjadi fenomena *storage lesion* berupa hemolisis spontan (pecahnya eritrosit) yang melepaskan hemoglobin dan asam amino bebas ke luar sel. Hal ini memudahkan *S. mutans* menyerap nitrogen secara langsung tanpa konsumsi energi ekstra untuk merusak sel darah yang utuh (Krzyściak dkk., 2014; Yoshida dkk., 2019).

c. Unsur Logam

(1) Kebutuhan *Streptococcus mutans* : membutuhkan ion logam seperti Besi (Fe^{2+} / Fe^{3+}) dan Kalium (K^+) sebagai kofaktor aktivasi enzim metabolisme serta regulator tekanan osmotik (Lemos dkk., 2019).

(2) Pemenuhan oleh Media : berbeda dengan darah domba segar yang zat besinya terikat kuat dalam hemoglobin, lisisnya eritrosit pada PRC kedaluwarsa melepaskan ion besi bebas (*free iron*) dan ion kalium (K^+) ekstraseluler dalam konsentrasi tinggi yang langsung menstimulasi bioenergetik bakteri (Lemos dkk., 2019; Yoshida dkk., 2019).

d. Unsur Non-Logam dan Faktor Pertumbuhan

(1) Kebutuhan *Streptococcus mutans* : memerlukan sulfur (sintesis asam amino sistein/metionin), fosfor (pembentukan DNA/RNA), dan vitamin eksogen (biotin, asam folat, riboflavin) sebagai koenzim (Krzyściak dkk., 2014; Abranches dkk., 2018).

(2) Pemenuhan oleh Media : kebutuhan sulfur dan vitamin disuplai oleh komponen serum darah serta degradasi eritrosit. Fosfor dipenuhi oleh garam fosfat pada *agar base* serta larutan buffer fosfat di dalam antikoagulan kantong darah (Harmening, 2018).

e. Faktor Fisik Lingkungan dan Konsistensi Media

Streptococcus mutans tumbuh optimal pada media padat (agar) dengan suhu mesofilik (35°C – 37°C), pH netral (6,5–7,5), dan

lingkungan kapnofilik (CO₂ 5–10%) yang menyerupai kondisi rongga mulut (Krzyściak dkk., 2014; Lemos dkk., 2019). Pemanfaatan darah PRC kedaluwarsa secara biokimiawi mampu menyuplai seluruh parameter fisik dan nutrisi tersebut, meskipun pelepasan hemoglobin bebas akibat hemolisis awal berpotensi memengaruhi tingkat kejernihan warna dasar media BAP (Erkmen, 2021; Yoshida dkk., 2019).

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

a. Pengertian dan Klasifikasi Media BAP

Media agar darah (*Blood Agar Plate* / BAP) merupakan media kultur padat yang berfungsi ganda sebagai media diperkaya (*enriched medium*) sekaligus media diferensial (*differential medium*) (Djannatun dkk., 2018). Berdasarkan fungsinya, media diperkaya dibuat dengan menambahkan komponen bernutrisi tinggi, seperti darah atau serum, untuk mendukung pertumbuhan bakteri *fastidious* yang memiliki kebutuhan nutrisi khusus (Cappuccino dan Sherman, 2014). Media ini sangat efektif untuk mendukung pembentukan koloni dan identifikasi bakteri genus *Streptococcus*, termasuk *Streptococcus mutans* (Juariah dkk., 2019).

Secara teknis, BAP dibuat dengan mencampur darah segar sebanyak 5–10% ke dalam media dasar agar (seperti *Tryptic Soy Agar*) untuk menyediakan faktor pertumbuhan esensial (Djannatun dkk., 2018). Komponen eritrosit dan hemoglobin di dalamnya berfungsi sebagai

sumber nutrisi utama (Juariah dkk., 2019) sekaligus sebagai indikator biologis untuk mengamati aktivitas hemolisis bakteri (Djannatun dkk., 2018). Melalui media BAP, ciri koloni seperti bentuk, warna, serta kejernihan zona hemolisis di sekitar koloni dapat diamati secara jelas untuk membantu diagnosis infeksi (Kriharyani dkk., 2016). Berdasarkan fungsi tersebut, penelitian ini membandingkan penggunaan darah donor manusia pascakedaluwarsa dan darah domba 5% pada media agar darah untuk menilai kelayakan darah manusia tersebut sebagai media alternatif (Juariah dkk., 2019).

b. Komposisi Media Agar Darah

Media agar darah pada prinsipnya tersusun atas dua komponen utama, yaitu media dasar dan darah sebagai bahan tambahan (Maulana dan Wijayanti, 2023). Media dasar yang umum digunakan adalah *Blood Agar Base*, yang mengandung protein dan peptida sebagai sumber nutrisi utama, sedikit karbohidrat dan lipid dari ekstrak daging, serta mineral pengatur keseimbangan osmotik dan vitamin alami (Maulana dan Wijayanti, 2023). Komponen terbesar adalah agar yang murni berperan sebagai bahan pematat agar media membentuk struktur padat yang mendukung pertumbuhan bakteri (Maulana dan Wijayanti, 2023). Rincian proporsi komponen dalam media dasar ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi *Blood Agar Base*

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

Dalam proses pembuatannya, penambahan darah dilakukan pada suhu sekitar 45–50 °C untuk mencegah terjadinya kerusakan atau lisis prematur eritrosit sebelum media memadat (Djannatun dkk., 2018). Darah domba merupakan jenis darah yang paling sering digunakan karena mampu menghasilkan pola hemolisis yang stabil, jelas, dan mudah diamati, namun darah manusia juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan alternatif jika ketersediaan darah hewan di laboratorium terbatas (Djannatun dkk., 2018).

Keberhasilan kultur dan kejelasan hasil pada BAP sangat dipengaruhi oleh parameter mutu media (Novita dan Febrianti, 2019). Faktor pertama adalah pH media, di mana nilai yang direkomendasikan berada pada kisaran netral mendekati fisiologis (pH 7,0–7,4) agar tidak menghambat aktivitas enzim maupun metabolisme bakteri (Novita dan Febrianti, 2019). Faktor kedua adalah kondisi fisik darah; penggunaan darah yang sudah lama

disimpan atau telah mengalami kerusakan struktur eritrosit dapat mengubah komponen nutrisi di dalamnya serta memengaruhi kejernihan pola hemolisis yang terbentuk setelah inokulasi bakteri (Novita dan Febrianti, 2019). Oleh karena itu, pemilihan darah yang tepat dan penyesuaian pH media merupakan langkah penting untuk memastikan mutu media agar darah (Novita dan Febrianti, 2019).

5. Prinsip Hemolisis (α , β , γ)

Fungsi utama dari media BAP di laboratorium mikrobiologi klinis adalah untuk menilai serta membedakan aktivitas hemolitik bakteri yang diproduksi oleh sekresi enzim hemolisin ekstraseluler, yang menjadi parameter penting untuk membedakan berbagai spesies di dalam genus *Streptococcus*. Berdasarkan karakteristik zona degradasi eritrosit yang terbentuk di sekeliling koloni, aktivitas hemolisis diklasifikasikan ke dalam tiga jenis prinsip utama::

- 1) Hemolisis gamma (γ) : kondisi di mana strain bakteri sama sekali tidak memproduksi enzim hemolisin, sehingga tidak terjadi kerusakan struktural sel darah merah maupun perubahan visual warna pada media di sekitar pertumbuhan koloni. *Streptococcus mutans* secara spesifik diklasifikasikan ke dalam kelompok mikroorganisme yang umumnya hanya menunjukkan reaksi aktivitas hemolisis alfa lemah atau justru sering tampak

bersifat gamma-hemolitik (non-hemolitik) pada cawan media agar darah (Cappuccino dan Sherman, 2014).

- 2) Hemolisis alfa (α) : proses pelisisan sel darah merah yang berjalan tidak sempurna, di mana terjadi reduksi kimiawi komponen hemoglobin menjadi methemoglobin yang ditandai secara visual oleh munculnya zona berwarna semu kehijauan di sekeliling koloni bakteri (Cappuccino dan Sherman, 2014).
- 3) Hemolisis beta (β) : proses pelisisan sel darah merah secara sempurna di sekitar koloni, menghasilkan pembentukan zona jernih atau bening yang transparan pada media akibat pengaruh toksin streptolisin O dan streptolisin S (Cappuccino dan Sherman, 2014).

Dharmawangsa (2019) menjelaskan bahwa kejelasan zona hemolisis pada media agar darah sangat dipengaruhi oleh jenis serta kualitas darah yang digunakan. Pada darah manusia yang telah melewati masa simpan, meskipun masih mampu menunjukkan reaksi hemolitik, kejernihan zona hemolisis yang terbentuk cenderung lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan darah domba segar. Kondisi tersebut berkaitan dengan terjadinya *storage lesion* pada eritrosit selama penyimpanan, yang ditandai oleh penurunan integritas membran sel dan perubahan sifat biokimia eritrosit. Perubahan ini menyebabkan eritrosit menjadi kurang sensitif terhadap aktivitas

enzim hemolisin bakteri, sehingga memengaruhi ketajaman dan kejelasan pola hemolisis yang dihasilkan pada media agar darah.

6. Darah Domba

Darah domba merupakan darah hewan yang digunakan sebagai media standar (*gold standard*) dalam pembuatan agar darah di laboratorium mikrobiologi karena kemampuannya yang optimal dalam mendukung pertumbuhan dan identifikasi bakteri, khususnya *Streptococcus* sp. Karakteristik fisik dan kimia darah domba memungkinkan terbentuknya pola hemolisis yang jelas dan konsisten pada media agar darah, sehingga memudahkan proses identifikasi bakteri patogen secara akurat (Juariah dkk., 2019). Badawi dan Al-Hadithy (2018) melaporkan bahwa darah domba memiliki kadar hemoglobin yang relatif tinggi serta ukuran eritrosit yang seragam, sehingga mampu menghasilkan media dengan pewarnaan homogen dan zona hemolisis yang jelas. Karakteristik tersebut menjadikan darah domba sangat sesuai untuk mendeteksi aktivitas hemolitik bakteri, seperti *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*.

Keunggulan darah domba didukung oleh ukuran eritrosit yang relatif lebih kecil, membran eritrosit yang lebih tipis, serta kandungan inhibitor yang lebih rendah dibandingkan darah manusia, sehingga tidak menghambat pertumbuhan bakteri dan memungkinkan terjadinya hemolisis secara efektif (Oktari dkk., 2019; Juariah dkk., 2019). Selain itu, darah domba tidak mengandung antibodi terhadap antigen manusia,

sehingga risiko terjadinya reaksi silang yang dapat mengaburkan zona hemolisis lebih rendah (Fitriani dan Kusuma, 2020). Eritrosit domba juga lebih stabil terhadap perubahan suhu dan tekanan selama proses pembuatan media, sehingga meminimalkan terjadinya hemolisis spontan (Fitriani dan Kusuma, 2020).

Dalam praktiknya, darah domba defibrinasi ditambahkan sebanyak 5% ke dalam media seperti *Blood Agar Plate* (BAP) untuk mengamati pertumbuhan koloni dan zona hemolisis (β), sehingga darah domba sering digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian mikrobiologi (Oktari dkk., 2019; Juariah dkk., 2019).

7. Produk Darah Donor PRC (*Packed Red Cells*)

Dalam praktik transfusi modern, darah yang diperoleh dari pendonor tidak lagi diberikan dalam bentuk darah utuh (*whole blood*), melainkan dipisahkan melalui teknik laboratorium seperti sentrifugasi menjadi komponen-komponen yang lebih spesifik agar dapat dimanfaatkan secara efisien sesuai kebutuhan klinis pasien (Basu dan Kulkarni, 2014). Salah satu produk komponen darah donor yang dihasilkan dari proses pemisahan plasma tersebut adalah paket sel darah merah atau *Packed Red Cells* (PRC) (Basu dan Kulkarni, 2014).

Produk PRC ini mengandung konsentrasi sel darah merah yang sangat tinggi dengan jumlah retensi sisa plasma yang minimal, sehingga umumnya digunakan untuk meningkatkan kapasitas pengangkutan oksigen pada pasien anemia atau perdarahan akut tanpa risiko kelebihan

volume cairan (Basu dan Kulkarni, 2014). Karena didominasi oleh sel darah merah yang kaya akan hemoglobin dan diselimuti sedikit cairan plasma bernutrisi, komponen PRC ini secara teoritis memiliki kesamaan struktur biologis dasar dengan sel darah hewan utuh yang umum dipakai di laboratorium (Tille, 2017).

8. Darah Donor PRC (*Packed Red Cells*) Kedaluwarsa

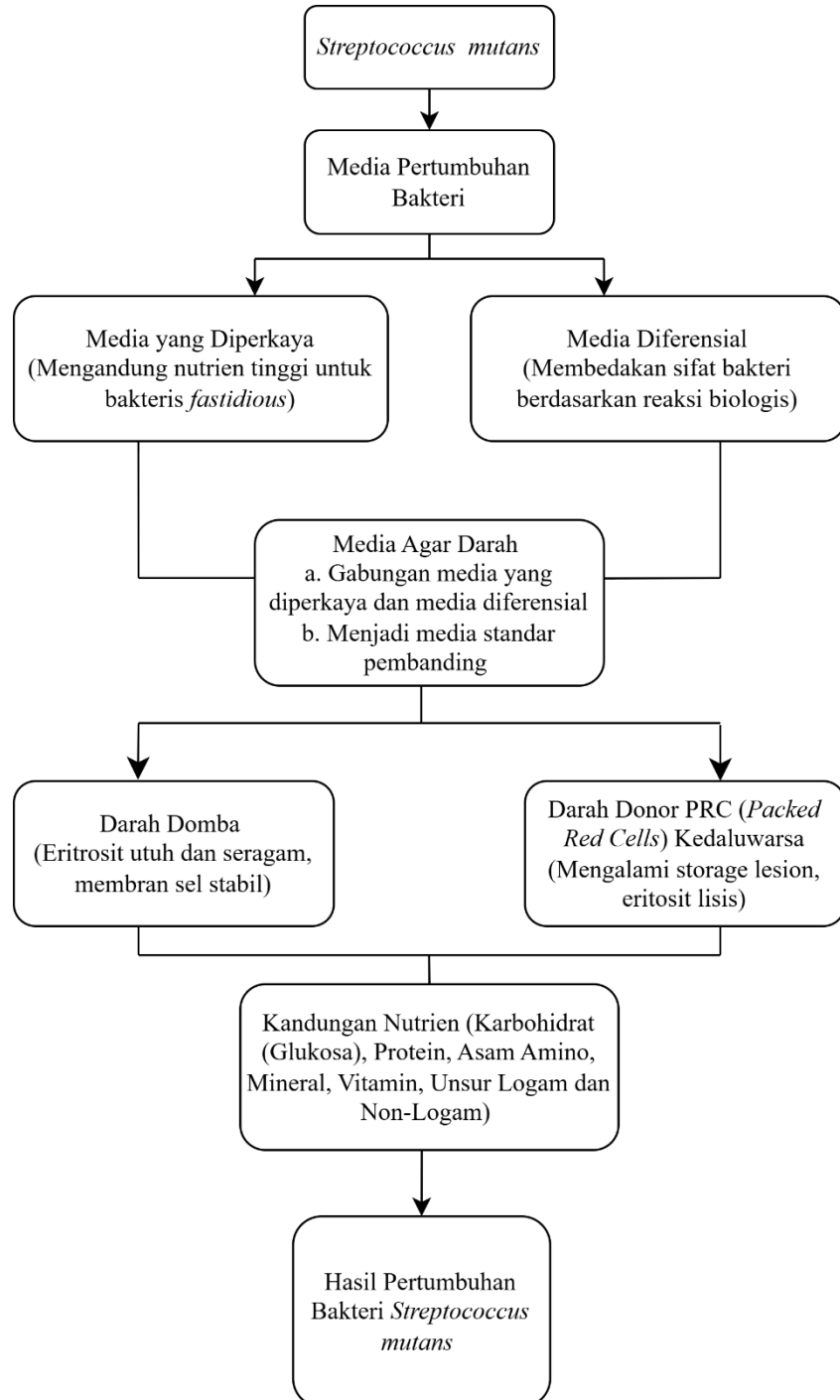
Ketika unit kantong darah PRC di bank darah telah melewati batas waktu masa simpan transfusi medis, produk tersebut diklasifikasikan sebagai darah pascakedaluwarsa dan tidak dapat diberikan kepada pasien (Basu dan Kulkarni, 2014; Niyomdech, 2016). Namun demikian, secara biologis darah manusia pascakedaluwarsa ini masih menyimpan elemen eritrosit, struktur hemoglobin, dan sisa protein plasma yang melimpah, sehingga berpotensi dialihkan sebagai alternatif pengganti darah domba dalam pembuatan BAP ketika pasokan darah hewan terbatas (Tille, 2017).

Kajian di bidang bank darah menunjukkan bahwa faktor biologis donor seperti usia, jenis kelamin, dan faktor genetik dapat memengaruhi laju terjadinya *storage lesion* eritrosit serta tingkat keparahan hemolisis selama masa penyimpanan, yang berpotensi memicu variasi kualitas antar unit kantong darah pascakedaluwarsa (McCullagh dkk., 2020). Pengaruh golongan darah ABO sendiri lebih banyak dikaji dalam konteks kompatibilitas transfusi pasien dan belum menjadi variabel

utama yang memengaruhi formulasi media agar (McCullagh dkk., 2020; Niyomdech, 2016).

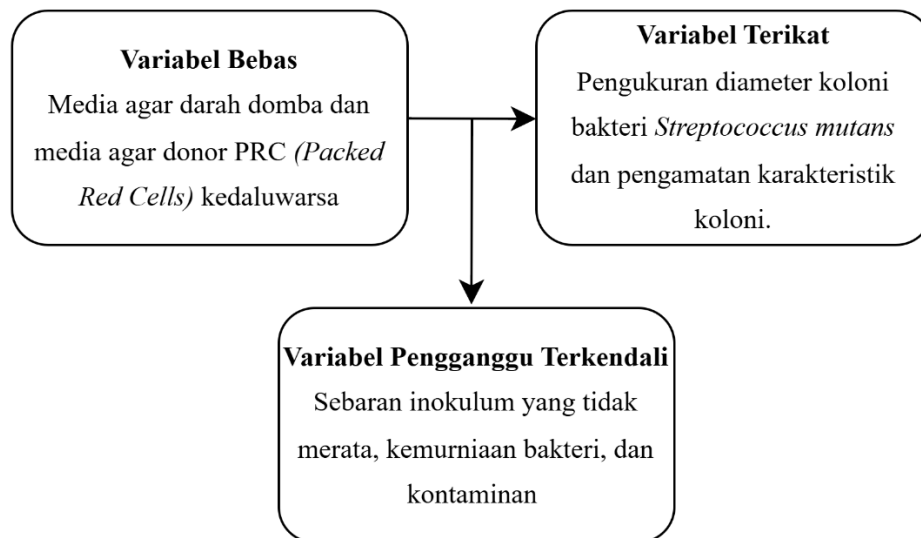
Meskipun disimpan lama hingga kedaluwarsa, riset laboratorium membuktikan bahwa media BAP yang diramu dari darah manusia pascakedaluwarsa tetap mampu menunjang pertumbuhan mikroorganisme dan menampilkan zona hemolisis yang cukup jelas (Djannatun dkk., 2018). Hal ini menandakan struktur eritrosit di dalamnya masih cukup stabil untuk kepentingan analisis kultur dasar, sekaligus memberikan efisiensi ekonomis bagi laboratorium dan mendukung prinsip etika pengurangan (*reduction*) penggunaan darah hewan uji (Djannatun dkk., 2018).

B. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 3. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

1. Tidak ada perbedaan diameter koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media agar darah donor PRC (*Packed Red Cells*) kedaluwarsa dan media agar darah domba.
2. Tidak ada perbedaan karakteristik koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media agar darah donor PRC (*Packed Red Cells*) kedaluwarsa dan media agar darah domba.