



MIKROBIOLOGI

TIM PENULIS :

apt. Monica Suryani, M.Farm
apt. Devina Chandra, S.Farm., M.Farm
apt. Cut Masyithah Thaib, M.Si
Elna Ceria Zebua
Beniqco

MIKROBIOLOGI

apt. Monica Suryani, M.Farm
apt. Devina Chandra, S.Farm., M.Farm
apt. Cut Masyithah Thaib, M.Si
Elna Ceria Zebua
Beniqco



GETPRESS INDONESIA

MIKROBIOLOGI

Penulis : apt. Monica Suryani, M.Farm
apt. Devina Chandra, S.Farm., M.Farm
apt. Cut Masyithah Thaib, M.Si
Elna Ceria Zebua
Beniqco

ISBN : 978-623-125-730-7

Editor : Dr. Oktavianis, M.Biomed.

Desain Sampul dan Tata Letak : Tri Putri Wahyuni, S.Pd.

PENERBIT GET PRESS INDONESIA

Anggota IKAPI No. 033/SBA/2022

Jl. Palarik RT 01 RW 06 Kelurahan Air Pacah
Kecamatan Koto Tangah Padang Sumatera Barat

website: www.getpress.co.id
email: adm.getpress@gmail.com

Cetakan pertama, Maret 2025

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk
dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa yang telah memberikan semua rahmat dan karunia-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan penyusunan buku referensi Mikrobiologi ini. Buku referensi ini disusun untuk membantu masyarakat umum dan mahasiswa dalam mengenal dan menambah pengetahuan mengenai Mikrobiologi. Dalam buku referensi ini disertakan daftar pustaka yang dapat diacu, dengan harapan jika pembaca memerlukan bahasan yang lebih luas dapat merujuk pada pustaka rujukan tersebut. Oleh karena itu, penyusunan buku ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan rasa terima kasih sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang telah membantu hingga selesainya penyusunan buku ini. Semoga amal baik yang telah diberikan mendapat balasan yang setimpal. Amiin.

Sebagai manusia biasa, kami tidak akan luput dari kekurangan dan kesalahan selama menyusun buku ini, baik isi maupun penggunaan bahasa, kelengkapan dalam mencantumkan daftar pustaka maupun sistematika penyajiannya. Oleh karena itu, kami mengharapkan kritik dan saran membangun dari semua pihak untuk penyempurnaan di masa yang akan datang.

Akhirnya kami berharap semoga buku sederhana ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan kita bersama.

Medan, Maret 2025

Penulis

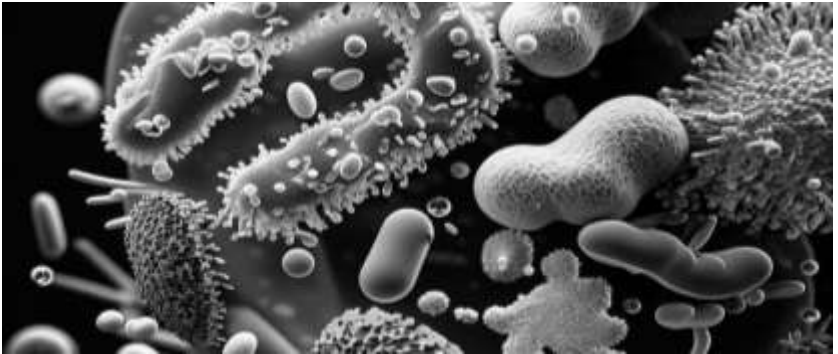
DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
BAB I METODE UJI EFEKTIVITAS VITAMIN.....	1
1.1 Definisi Vitamin	1
1.2 Metode Uji Efektivitas Vitamin	5
1.3 Faktor yang Mempengaruhi Uji Efektivitas Vitamin.....	14
1.4 Pengujian Efektivitas pada Vitamin.....	16
1.5 Penelitian Terkait Pengujian Efektivitas Vitamin	24
DAFTAR PUSTAKA.....	28
BAB II METODE UJI KOEFISIEN FENOL.....	29
2.1 Pengertian Fenol	30
2.2 Fungsi Fenol	30
2.3 Definisi Koefisien Fenol	30
2.4 Prosedur Uji Koefisien Fenol	32
2.5 Metode Uji Koefisien Fenol.....	34
DAFTAR PUSTAKA.....	40
BAB III METODE UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIMIKROBA	41
3.1 Metode Uji Aktivitas Senyawa Antimikroba.....	42
3.2 Uji Difusi.....	44
3.3 Uji Disolusi	56
3.4 Uji Bioautografi	63
DAFTAR PUSTAKA.....	74
BAB IV METODE AKTIVASI PENGAWETAN	75
4.1 Pengertian Pengawet.....	75
4.2 Bahan Pengawet	76

4.3 Teknik Pengawetan Kimiawi.....	80
4.4 Tujuan dan Fungsi Pengawet	80
4.5 Uji Efektivitas Pengawet.....	80
DAFTAR PUSTAKA	92
BAB V METODE UJI POTENSI ANTIBIOTIKA	93
5.1 Pengertian Antibiotik	93
5.2 Penetapan antibiotik secara mikrobiologi	94
5.3 Pengertian uji potensi antibiotik	97
DAFTAR PUSTAKA	106

FARMAKOLOGI :

Dasar-Dasar Ilmu Tanaman Obat dan Pengolahannya



BAB I

METODE UJI EFEKTIVITAS VITAMIN

1.1 Definisi Vitamin

A. Pengertian vitamin

Vitamin adalah senyawa organik esensial yang diperlukan tubuh dalam jumlah kecil untuk menjalankan fungsi metabolisme, pertumbuhan, dan perkembangan. Karena tubuh tidak dapat memproduksi vitamin dalam jumlah cukup, vitamin harus diperoleh melalui makanan atau suplemen (Thamher, 2002)¹.

B. Klasifikasi vitamin

Vitamin dikategorikan menjadi 2 kelompok utama yaitu:

¹ Thamher. (2002). *Vitamins and Minerals: A Comprehensive Guide*. Wiley-Blackwell

1. Vitamin Larut Lemak

Vitamin ini diserap bersama lemak dan disimpan di jaringan tubuh (terutama hati dan lemak). Berikut adalah termasuk vitamin larut lemak:

- Vitamin A (Retinol): Vitamin ini berfungsi mendukung penglihatan, imunitas, pertumbuhan, dan Kesehatan kulit. Vitamin ini bisa didapat dari hati, wortel, bayam, dan susu.
- Vitamin D (Kalsiferol): Vitamin ini berfungsi mengatur metabolisme kalsium dan fosfor untuk Kesehatan tulang. Vitamin ini bisa didapat dari sinar matahari, minyak ikan, telur, susu yang diperkaya.
- Vitamin E (Tokoferol): Vitamin ini berfungsi sebagai antioksidan yang melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Vitamin ini bisa didapat dari minyak nabati, kacang-kacangan, dan biji-bijian.
- Vitamin K (Filoquinon): Vitamin ini berfungsi membantu pembekuan darah dan menjaga kesehatan tulang. Vitamin ini bisa didapat dari sayuran hijau, hati dan telur.

2. Vitamin Larut Air

Vitamin ini tidak disimpan dalam tubuh sehingga harus dikonsumsi secara teratur. Berikut adalah yang termasuk vitamin larut air:

- Vitamin B Kompleks: Vitamin ini berfungsi mendukung metabolisme energi, fungsi saraf, dan pembentukan darah. Berikut macam-macam vitamin b kompleks, antara lain:

- Vitamin B1 (Tiamin): berfungsi untuk metabolisme karbohidrat.
- Vitamin B2 (Riboflavin): berfungsi mendukung metabolisme energi dan antioksidan.
- Vitamin B3 (Niasin): berfungsi mendukung metabolisme energi dan kesehatan kulit.
- Vitamin B5 (Asam Pantotenat): berfungsi sintesis koenzim A.
- Vitamin B6 (Piridoksin): berfungsi sintesis neurotransmitter dan hemoglobin.
- Vitamin B7 (Biotin): berfungsi sebagai metabolisme lemak dan protein.
- Vitamin B9 (Asam Folat): berfungsi sebagai pembentukan DNA dan sel darah merah.
- Vitamin B12 (kobalamin): berfungsi sebagai saraf dan produksi sel darah merah.
- Vitamin ini bisa didapat dari gandum utuh, daging, susu, telur dan sayuran hijau.
- Vitamin C (Asam Askorbat): Vitamin ini berfungsi sebagai antioksidan mendukung sistem imun dan sintesis kolagen. Vitamin ini bisa didapat dari jeruk, stroberi, kiwi, paprika, brokoli.

C. Fungsi Utama Vitamin

a. Sebagai katalis dalam proses metabolisme

Vitamin sering bertindak sebagai koenzim yang membantu enzim dalam reaksi metabolisme, seperti pemecahan karbohidrat, lemak, dan protein menjadi energi.

b. Menjaga fungsi tubuh

Seperti vitamin D yang membantu penyerapan kalsium untuk kesehatan tulang dan vitamin A yang menjaga fungsi penglihatan dan imunitas.

c. Perlindungan sel

Seperti vitamin E yang melindungi membran sel dari kerusakan oksidatif.

d. Pembentukan komponen penting

Seperti vitamin B9 dan vitamin B12 yang penting dalam sintesis DNA dan pembentukan sel darah merah.

e. Pencegahan penyakit

Kekurangan vitamin tertentu dapat menyebabkan penyakit seperti skorbut (vitamin C), rakitis (vitamin D), atau anemia (vitamin B12).

f. Kebutuhan Vitamin Harian

Kebutuhan vitamin bervariasi berdasarkan usia, jenis kelamin, aktivitas, dan kondisi Kesehatan. Berikut adalah contoh kebutuhan harian beberapa vitamin:

- Vitamin A: 700-900 mcg
- Vitamin C: 65-90 mg
- Vitamin D: 600-800 IU
- Vitamin E: 15 mg
- Vitamin K: 90-120 mcg

D. Defisiensi dan Toksisitas Vitamin

1. Defisiensi Vitamin

Kekurangan vitamin dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan, yaitu:

- Vitamin A : Gangguan penglihatan malam, xeroftalmia.
- Vitamin B1 : Beri-beri
- Vitamin C : Skorbut (gusi berdarah, kelelahan)
- Vitamin D : Rakitis pada anak-anak, osteomalasia pada orang dewasa.
- Vitamin K : Gangguan pembekuan darah

2. Toksisitas Vitamin

Kelebihan vitamin, terutama vitamin larut lemak dapat menimbulkan efek toksik, yaitu :

- Vitamin A: kerusakan hati, penglihatan kabur
- Vitamin D: Hiperkalsemia, kerusakan ginjal
- Vitamin E: Risiko pendarahan

1.2 Metode Uji Efektivitas Vitamin

Efektivitas vitamin perlu diuji untuk memastikan manfaat dan keamanan yang ditawarkan sesuai dengan klaim yang dibuat oleh produsen. Uji efektivitas vitamin bertujuan untuk mengevaluasi sejauh mana vitamin tersebut memberikan dampak yang positif pada kesehatan manusia atau hewan (Campbell, 2004)¹. Berikut adalah pembahasan mengenai metode-metode dalam uji efektivitas vitamin:

1. Uji Pra-Klinis

Uji ini dilakukan sebelum produk diuji pada manusia dan biasanya dilakukan menggunakan hewan laboratorium atau sel. Adapun metode nya yaitu:

A. Metode *In Vitro*

Metode ini dilakukan di laboratorium menggunakan sistem sel atau jaringan yang diisolasi dari organisme hidup. Tujuannya adalah untuk memahami mekanisme kerja vitamin pada Tingkat molekuler atau seluler sebelum diuji pada organisme utuh. Jenis uji Metode *In Vitro*:

1. Uji Pelarutan (*Dissolution Test*)

- Mengukur pelepasan vitamin dari sediaan farmasi ke dalam larutan.
- Biasanya digunakan untuk tablet atau kapsul vitamin.

2. Uji Stabilitas

Menilai ketahanan vitamin terhadap faktor lingkungan seperti panas, cahaya, pH dan oksigen. Contoh: Penggunaan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) untuk menentukan kandungan vitamin setelah penyimpanan.

3. Uji Enzimatis

Mengukur interaksi vitamin dengan enzim tertentu untuk melihat aktivitas biologisnya.

4. Kultur sel (*Cell Culture Assay*)

Menggunakan sel untuk menilai aktivitas vitamin pada Tingkat molekuler.

Contoh: Menilai efek vitamin C pada produksi kolagen dalam fibroblas.

5. Langkah-langkah uji Metode *In Vitro*:

- a. Sel atau jaringan tertentu dikultur dalam media nutrisi.
- b. Vitamin yang akan diuji ditambahkan ke media tersebut.
- c. Parameter biologis diukur, seperti perubahan ekspresi gen, aktivitas enzim, atau produksi metabolit.

- Keunggulan Metode *In Vitro*

- Relatif cepat dan murah.
- Memberikan informasi awal tentang mekanisme kerja vitamin.
- Mengurangi kebutuhan penggunaan hewan uji.

- Kelemahan Metode *In Vitro*

Hasil tidak selalu mencerminkan efek didalam tubuh manusia karena tidak melibatkan interaksi antar sistem tubuh.

B. Metode *In Vivo*

Metode ini menggunakan organisme hidup, seperti hewan laboratorium untuk mengevaluasi efek vitamin secara sistemik. Metode ini memberikan gambaran yang lebih akurat tentang bagaimana vitamin bekerja di dalam tubuh. Jenis-jenis metode *in vivo*:

1. Uji antikarsinogenesis

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh senyawa terhadap perkembangan tumor pada hewan uji.

2. Uji toksisitas

Uji ini dilakukan untuk mengevaluasi efek samping obat, seperti kerusakan genetik, pertumbuhan sel kanker, dan kecacatan pada janin.

3. Uji farmakokinetik

Uji ini dilakukan untuk mempelajari nasib obat dalam tubuh, seperti absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi obat.

- Langkah-langkah Metode *In Vivo*:
 - Hewan percobaan diberi vitamin melalui berbagai rute pemberian seperti oral, injeksi, dll.
 - Parameter biologis seperti kadar nutrisi darah, aktivitas enzim, atau fungsi organ diamati.
 - Hasil dibandingkan dengan kelompok kontrol (tanpa pemberian vitamin).
- Keunggulan Metode *In Vivo*
 - Mencerminkan proses metabolisme dan distribusi vitamin dalam tubuh.
 - Dapat digunakan untuk mempelajari efek jangka Panjang.
- Kelemahan Metode *In Vivo*
 - Hasil pada hewan tidak selalu dapat diterapkan langsung pada manusia.
 - Memerlukan waktu dan biaya lebih tinggi.

4. Uji Klinis

Metode ini dilakukan langsung pada manusia dan dianggap sebagai standar emas dalam uji efektivitas vitamin. Tujuannya adalah untuk mengukur efek vitamin terhadap kesehatan manusia dalam kondisi yang terkendali. Uji klinis biasanya dibagi menjadi 3 fase, yaitu:

a. Fase I

Menguji keamanan vitamin pada sejumlah kecil subjek sehat untuk menentukan dosis yang aman.

b. Fase II

Mengevaluasi efektivitas vitamin pada sekelompok subjek yang lebih besar. Penelitian ini sering kali membandingkan efek vitamin dengan plasebo.

c. Fase III

Mengonfirmasi efektivitas vitamin pada populasi yang lebih luas dengan desain penelitian yang lebih kompleks, seperti *double-blind* dan randomisasi.

Ada beberapa jenis uji klinis, antara lain:

a. *Randomized Controlled Trial (RCT)*

Subjek dibagi secara acak menjadi kelompok perlakuan (yang menerima vitamin) dan kelompok kontrol (yang menerima plasebo atau tidak menerima perlakuan).

b. *Double-Blind Study*

Baik subjek maupun peneliti tidak mengetahui siapa yang menerima vitamin atau placebo, untuk menghindari bias.

c. *Cross-Over Study*

Subjek menjalani perlakuan dan kontrol secara bergantian, sehingga hasil lebih valid karena membandingkan efek pada individu yang sama.

Keunggulan dan Kelemahan dari uji klinis, yaitu:

- Keunggulan
 - Memberikan bukti kuat tentang efektivitas vitamin.
 - Memastikan hasil dapat diterapkan langsung pada manusia.
- Kelemahan
 - Memerlukan waktu, biaya, dan sumber daya yang besar.
 - Risiko efek samping harus dikelola dengan hati-hati.

C. Metode Epidemiologi

Metode ini melibatkan pengamatan pada populasi dalam skala besar untuk mengevaluasi hubungan antara konsumsi vitamin dan status Kesehatan. Adapun jenis-jenis penelitian epidemiologi, yaitu:

1. Studi Kohort : Mengikuti sekelompok individu dari waktu ke waktu untuk melihat efek konsumsi vitamin terhadap kesehatan mereka.
 2. Studi Kasus-Kontrol : Membandingkan individu yang memiliki penyakit tertentu (kasus) dengan individu sehat (kontrol) untuk mengevaluasi peran vitamin.
 3. Studi *Cross-Sectional* : Mengukur konsumsi vitamin dan status Kesehatan pada satu titik waktu untuk melihat korelasi.
- Keunggulan metode epidemiologi
 - Cocok untuk penelitian jangka Panjang.
 - Melibatkan populasi besar, sehingga hasil lebih representatif.
 - Kelemahan metode epidemiologi
 - Tidak dapat menunjukkan hubungan sebab-akibat secara langsung.
 - Rentan terhadap bias data dan faktor pembaur (*confounding factors*).

2. Uji *Biomarker*

Metode ini menggunakan indikator biologis (*biomarker*) untuk mengukur efek vitamin secara langsung atau tidak langsung. *Biomarker* adalah parameter yang dapat diukur secara objektif untuk menunjukkan kondisi biologis. Contoh *biomarker* adalah :

- a. Antioksidan: Mengukur kemampuan vitamin (seperti vitamin C atau E) untuk menangkal radikal bebas.
 - b. Kadar Nutrisi Darah: Mengukur konsentrasi vitamin dalam darah untuk menentukan bioavailabilitas.
 - c. *Biomarker* Genetik: Melihat ekspresi gen tertentu yang dipengaruhi oleh vitamin.
- Keunggulan Uji *Biomarker*
 - Memberikan data kuantitatif yang spesifik
 - Dapat digunakan untuk menilai efek jangka panjang.
 - Kelemahan Uji *Biomarker*
 - Membutuhkan peralatan laboratorium yang canggih.
 - Tidak selalu mencerminkan efek klinis keseluruhan.

D. Metode Metabolomik dan Proteomik

Metode ini menggunakan teknologi tinggi untuk menganalisis perubahan metabolit atau protein dalam tubuh setelah konsumsi vitamin.

- Metabolomik adalah mengukur perubahan kecil dalam metabolit tubuh untuk mengevaluasi bagaimana vitamin memengaruhi metabolisme.
- Proteomik adalah menganalisis protein untuk melihat efek vitamin pada fungsi seluler.

Keunggulan dan kelemahan metode ini adalah:

- Keunggulan
 - Memberikan data mendalam tentang mekanisme kerja vitamin.
 - Dapat mengidentifikasi efek yang tidak terdeteksi oleh metode lain.
- Kelemahan
 - Sangat kompleks dan mahal.
 - Membutuhkan keahlian tinggi dalam analisis data.

3. Uji Longitudinal

Uji ini melibatkan pengamatan efek vitamin dalam jangka panjang untuk mengevaluasi dampaknya terhadap Kesehatan dan pencegahan penyakit kronis.

- Keunggulan uji longitudinal:
 - Memastikan keamanan dan efektivitas vitamin dalam penggunaan jangka panjang.
 - Mengidentifikasi efek samping yang mungkin muncul setelah penggunaan vitamin secara terus-menerus.
- Kelemahan uji longitudinal
 - Membutuhkan waktu bertahun-tahun untuk menyelesaikan studi.
 - Memerlukan dukungan logistik dan pembiayaan yang besar.

1.3 Faktor yang Mempengaruhi Uji Efektivitas Vitamin

Jenis vitamin yang diuji

- Sifat kimia dan biologis vitamin (larut dalam air seperti vitamin C atau larut dalam lemak seperti vitamin D) memengaruhi cara uji dilakukan.
- Stabilitas vitamin terhadap panas, cahaya, dan oksidasi selama proses pengujian.

Formulasi dan bentuk sediaan

- Bentuk vitamin (tablet, kapsul, cair, atau bubuk) memengaruhi pelepasan dan penyerapan.
- Penggunaan eksipien atau bahan tambahan yang dapat meningkatkan atau menghambat ketersediaan hayati (bioavailabilitas) vitamin.
- Metode uji yang digunakan pada saat pengujian efektivitas vitamin.

Dosis vitamin

- Dosis vitamin yang diberikan dalam uji harus sesuai dengan kebutuhan atau batas toleransi untuk menilai efektivitas tanpa menimbulkan toksisitas.
- Pengaruh overdosis atau defisiensi vitamin pada subjek uji.

Ketersediaan Hayati (Bioavailabilitas)

- Seberapa banyak vitamin yang benar-benar diserap dan digunakan oleh tubuh.
- Dipengaruhi oleh faktor pencernaan, interaksi dengan makanan, atau enzim.

Subjek uji

- Kondisi fisiologis: usia, jenis kelamin, berat badan, dan kondisi kesehatan.
- Variasi genetik yang memengaruhi metabolisme vitamin.
- Interaksi dengan obat atau suplemen lain.

Lingkungan dan proses penyimpanan

- Suhu, kelembapan, dan paparan cahaya selama penyimpanan sampel vitamin dapat memengaruhi potensi vitamin.
- Proses penyiapan sampel sebelum uji (misalnya pengenceran atau pemanasan).

Durasi Pengujian

- Efek vitamin sering kali membutuhkan waktu tertentu untuk dapat terdeteksi, tergantung pada jenis vitamin dan respons tubuh.

Standar dan Parameter Evaluasi

- Standar yang digunakan untuk menentukan efektivitas (misalnya *RDA-Recommended dietary allowance*).
- Parameter yang dievaluasi, seperti tingkat penyerapan, kadar dalam darah, atau perubahan *biomarker* tertentu.

1.4 Pengujian Efektivitas pada Vitamin

Pengujian efektivitas vitamin dilakukan melalui serangkaian langkah yang dirancang untuk mengevaluasi keamanan, manfaat biologis dan bioavailabilitas vitamin pada Tingkat molekuler, seluler, hingga organisme (Hosseini et.al 2019)¹. Berikut adalah pengujian untuk vitamin:

1. Pengujian Efektivitas Vitamin A

a. Persiapan uji

- Identifikasi bentuk vitamin A yang akan di uji (retinol, retinil ester atau karotenoid).
- Tentukan populasi target atau sistem uji model *in vitro* (sel retina atau jaringan) atau *in vivo* (hewan atau manusia)

b. Tahap uji *in vitro*

- Kultur sel retina: Kultur sel retina diberikan vitamin A untuk menilai regenerasi rhodopsin, pigmen visual.
- Uji Antioksidan: Sel dipaparkan pada stress oksidatif (misalnya, hidrogen peroksida), dan efek perlindungan vitamin A terhadap kerusakan lipid atau DNA diamati.

c. Tahap uji *in vivo* (model hewan)

- Hewan model (tikus defisiensi vitamin A) diberikan suplementasi vitamin A.
- Parameter yang diukur:
 - Perbaikan fungsi visual menggunakan *electroretinography*.

- Kadar retinol plasma untuk mengukur bioavailabilitas.

d. Tahap uji klinis (Manusia)

- Rekrut pasien dengan defisiensi vitamin A (Xeroftalmia, gangguan penglihatan).
- Protokol:
 - berikan dosis vitamin A sesuai standar.
 - pantau kadar retinol plasma dan perbaikan kondisi mata.
 - Analisis *biomarker*:
 - ✓ Kadar retinol serum.
 - ✓ Pengukuran rhodopsin visual.

2. Pengujian Efektivitas Vitamin B Kompleks

a. Persiapan uji

- Pilih vitamin B spesifik yang akan diuji (misalnya B1 untuk fungsi saraf, B9/B12 untuk pembentukan darah).
- Tentukan populasi target berdasarkan kebutuhan klinis (misalnya pasien anemia untuk B12).

b. Tahap uji *in vitro*

- Uji aktivitas enzim
 - Gunakan enzim yang bergantung pada vitamin B (seperti tiamin pirofosfat untuk B1 atau NAD untuk B3).

- Ukur aktivitas enzim sebelum dan setelah pemberian vitamin.
- Kultur Sel
 - Kultur sel diuji untuk metabolisme energi dengan suplementasi vitamin B.
- c. Tahap uji *in vivo* (model hewan)
 - Hewan dengan defisiensi vitamin b diberi diet yang mengandung vitamin B.
 - Parameter yang diukur:
 - Perbaikan fungsi metabolisme glukosa(untuk B1)
 - Kadar hemoglobin dan produksi sel darah merah (untuk B9/B12).
- d. Tahap uji klinis (manusia)
 - Rekrut subjek dengan defisiensi vitamin B.
 - Protokol:
 - Berikan dosis harian vitamin B sesuai standar.
 - Pantau perbaikan gejala klinis seperti neuropati atau anemia.
 - Analisis *biomarker* :
 - Homosistein (B9/B12)
 - Asam metilmalonat(MMA) untuk B12.

3. Pengujian Efektivitas Vitamin C

a. Persiapan uji

- Tentukan bentuk vitamin C yang akan diuji : asam askorbat murni, *derivative* (sodium askorbat) atau dalam bentuk suplemen kompleks.
- Sesuaikan dosis dengan standar kebutuhan harian atau dosis terapi untuk menghindari toksisitas.

b. Tahap uji *in vitro*

- Uji aktivitas antioksidan

Gunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) atau FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) untuk mengukur kapasitas vitamin C dalam menangkap radikal bebas.

- Uji sintesis kolagen

Tambahkan vitamin C ke kultur sel fibroblas dan ukur peningkatan ekspresi gen yang terkait dengan produksi kolagen menggunakan metode RT-PCR atau *Western blot*.

- Uji perlindungan seluler

Paparkan sel pada stress oksidatif (hidrogen peroksida), lalu ukur tingkat kerusakan DNA, lipid, atau protein dengan suplementasi vitamin C.

c. Tahap uji *in vivo* (model hewan)

- Gunakan hewan seperti marmot yang memiliki kebutuhan vitamin C esensial. Hewan diberi diet rendah vitamin untuk menyebabkan defisiensi.
- Parameter yang diukur:
 - Penyembuhan luka kulit
 - Penurunan tingkat stress oksidatif (*malondialdehyde*/MDA)
 - Peningkatan kadar antioksidan endogen (glutathione peroksidase).

d. Tahap uji klinis (manusia)

- Rekrut pasien dengan kondisi defisiensi vitamin C atau yang memerlukan manfaat terapeutik (misalnya penyembuhan luka atau pemulihan dari flu).
- Protokol:
 - Berikan dosis vitamin C yang sesuai.
 - Pantau kadar asam askorbat dalam plasma atau urin.
- Analisis *biomarker*
 - Kadar asam askorbat dalam tubuh.

4. Pengujian Efektivitas Vitamin D

a. Persiapan uji

- Gunakan bentuk vitamin D yang relevan (D2 atau D3)

- Tentukan target : kesehatan tulang atau metabolisme kalsium.
- b. Tahap uji *in vitro*
 - Kultur sel dengan reseptor vitamin D (VDR) untuk menilai aktivasi gen target.
 - Kultur osteoblas untuk mengukur peran vitamin D dalam mineralisasi tulang.
- c. Tahap uji *in vivo* (model hewan)
 - Hewan dengan defisiensi vitamin D diuji dengan pemberian vitamin D melalui diet atau injeksi.
 - Parameter yang diukur :
 - Massa tulang menggunakan DXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*).
 - Kadar kalsium, fosfor dan metabolit aktif vitamin D (25(OH)D) Dalam plasma.
- d. Tahap uji klinis (Manusia)
 - Rekrut subjek dengan osteoporosis atau rakitis.
 - Protokol.
 - Berikan suplementasi vitamin D
 - Pantau perubahan densitas mineral tulang dan kadar 25(OH)D plasma.
 - Analisis *biomarker*:
 - Kadar PTH (hormon paratiroid) dan fosfat serum.

5. Pengujian Efektivitas Vitamin E

a. Persiapan uji

- Identifikasi bentuk vitamin E (tokoferol atau tokotrienol)
- Tentukan fokus uji: antioksidan atau kesehatan kardiovaskular.

b. Tahap uji *in vitro*

- Uji antioksidan
 - Kultur sel dipaparkan pada agen oksidatif seperti radikal bebas.
 - Efek vitamin E diukur dengan pengurangan Tingkat peroksidasi lipid (MDA).

- Uji stabilitas membran

Vitamin E diuji pada membran sel untuk mengukur perlindungan terhadap kerusakan

c. Tahap uji *in vivo* (model hewan)

- Hewan model diberikan vitamin E dan dipaparkan pada agen stress oksidatif.
- Parameter yang diukur:
 - Penurunan *biomarker* stress oksidatif (MDA atau *isoprostane*).
 - Perbaikan kerusakan jaringan.

d. Tahap uji klinis (manusia)

- Rekrut pasien dengan risiko stress oksidatif tinggi (misalnya penderita penyakit jantung)

- Protokol:
 - Suplementasi vitamin E selama beberapa minggu.
 - Pantau *biomarker* antioksidan seperti *isoprostane plasma*.

6. Pengujian Efektivitas Vitamin K

a. Persiapan uji

- Tentukan bentuk vitamin K (filloquinon atau menakinon)
- Pilih target : pembekuan darah atau Kesehatan tulang.

b. Tahap uji *in vitro*

- Kultur sel hati untuk mengukur aktivitas protein pembekuan darah yang tergantung vitamin K (seperti prothrombin).
- Kultur osteokalsin, protein tulang yang bergantung pada vitamin K.

c. Tahap uji *in vivo* (model manusia)

- Hewan dengan defisiensi vitamin K diberi suplementasi vitamin K.

- Parameter yang diukur:
 - Waktu protombin untuk mengukur kemampuan pembekuan darah.
 - Kadar osteokalsin terkarboksilasi untuk kesehatan tulang.
- d. Tahap uji klinis (manusia)
 - Rekrut subjek dengan gangguan pembekuan darah atau osteoporosis.
 - Protokol:
 - Suplementasi vitamin K sesuai kebutuhan.
 - Pantau perubahan pada waktu prothrombin dan densitas mineral tulang.

1.5 Penelitian Terkait Pengujian Efektivitas Vitamin

Berikut adalah penelitian yang terkait dengan uji efektivitas vitamin berbasis referensi umum dari kajian-kajian ilmiah yang sering dilakukan mengenai vitamin :

1. Vitamin A

- Penelitian: Pengaruh suplementasi vitamin A terhadap kejadian xerophthalmia pada anak-anak usia balita.
- Sumber: Artikel dalam *American Journal of Clinical Nutrition : Vitamin A supplementation an childhood mortality in developing countries.*
- Metode: Uji klinis terkontrol. Kelompok intervensi diberi suplementasi vitamin A dosis tinggi setiap 6 bulan, sementara kelompok kontrol diberi plasebo.

- Hasil penelitian: Kelompok yang menerima vitamin A menunjukkan penurunan signifikan dalam kejadian xeroptalmia dan peningkatan status gizi.

2. Vitamin B (B1, B6, B12)

- Penelitian: Efektivitas kombinasi vitamin B1, B6, dan B12 dalam mengurangi nyeri neuropati diabetik.
- Sumber:
 - Penelitian yang dipublikasikan di *Journal of Diabetes and Its Complications* atau *Diabetes care*.
 - *High-dose B-complex vitamins in diabetic peripheral neuropathy (Hosseini et al., 2019)*.
- Metode: Studi *Double-blind, randomized controlled trial* (RCT). Pasien neuropati diabetik diberi kombinasi vitamin B1, B6, B12 atau placebo selama 12 minggu.
- Hasil penelitian: Pasien yang menerima vitamin B menunjukkan pengurangan nyeri secara signifikan dibandingkan kelompok plasebo.

3. Vitamin C

- Penelitian: Efek suplementasi vitamin C terhadap durasi dan keparahan flu biasa.
- Sumber:
 - *Cochrane Database of Systematic Reviews: "Vitamin C for preventing and treating the common cold" (Hemila, H. et al.)*.
 - *Journal of Clinical Nutrition: "The role of vitamin C in reducing the severity and duration of colds."*

- Metode: Studi kohort prospektif. Kelompok pertama diberi vitamin C harian (1000 mg), sedangkan kelompok kedua tidak.
- Hasil penelitian: Kelompok suplementasi vitamin C menunjukkan durasi flu lebih pendek (1-2 hari lebih cepat sembuh) dan gejala lebih ringan.

4. Vitamin D

- Penelitian: Pengaruh suplementasi vitamin D terhadap kepadatan mineral tulang pada lansia.
- Sumber:
 - Penelitian di *The New England Journal of Medicine* atau *Journal of Bone and Mineral Research*.
 - *Vitamin D supplementation in elderly populations: A randomized trial*.
- Metode: Uji klinis dengan dua kelompok. Kelompok intervensi diberi vitamin D3 1000 IU/hari selama 1 tahun, sedangkan kelompok kontrol tidak.
- Hasil penelitian: Suplementasi vitamin D secara signifikan meningkatkan kepadatan mineral tulang pada kelompok intervensi dibandingkan dengan kelompok kontrol.

5. Vitamin E

- Penelitian: Efek vitamin E terhadap stress oksidatif pada pasien diabetes tipe 2.
- Sumber:
 - Artikel dari *Free Radical Biology and Medicine* atau *Journal of Clinical Nutrition*.

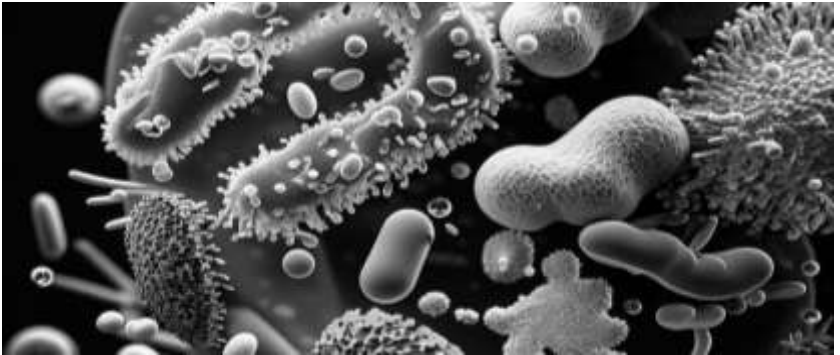
- *Effects of vitamin E on oxidative stress in type 2 diabetes mellitus (Evans et al, 2002).*
- Metode: Studi eksperimental. Kelompok perlakuan diberi 400 IU vitamin E/hari selama 8 minggu, kelompok kontrol diberi plasebo.
- Hasil penelitian: Tingkat stress oksidatif pada kelompok yang menerima vitamin E menurun secara signifikan.

6. Vitamin K

- Penelitian: Efektivitas vitamin K2 dalam meningkatkan kesehatan tulang pada wanita pascamonopause.
- Sumber: *Nutrients Journal: Vitamin K2 supplementation and bone density in postmenopausal women.*
- Metode: *Randomized controlled trial.* Wanita pascamonopause menerima Vitamin K2 selama 6 bulan, sementara kelompok kontrol tidak.
- Hasil penelitian: Vitamin K2 meningkatkan kepadatan tulang dan menurunkan risiko fraktur dibandingkan dengan kelompok kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC International. (2019). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 21st ed. AOAC International.
- Association of Vitamin and Mineral Bioavailability. (2010). Bioavailability of Vitamins and Minerals: Methods for Assessment. CRC Press.
- Thamher. (2002). Vitamins and Minerals: A Comprehensive Guide. Wiley-Blackwell.
- Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 9(11), 1211.
- Campbell. (2004). Dietary Supplement Fact Sheets. [Specific fact sheets on individual vitamins can be cited here, depending on the article's focus. Access via NIH website.]
- Zempleni, J., & Rucker, R. B. (Eds.). (2010). Handbook of Vitamins. CRC Press.
- Hosseini, M., et al. (2019). High-dose B-complex vitamins in diabetic peripheral neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Diabetes and its Complications*, 33(11), 1070-1076.



BAB II

METODE UJI KOEFISIEN FENOL

Antibakteri merujuk pada zat yang mampu mengganggu proses pertumbuhan serta metabolisme bakteri, sehingga zat ini efektif dalam menghambat perkembangan atau bahkan memusnahkan bakteri sepenuhnya (Pelczar dan Chan, 2005)¹. Contoh penerapannya meliputi penggunaan antiseptik dan disinfektan. Antiseptik sendiri merupakan senyawa yang berfungsi untuk mencegah pertumbuhan atau membunuh bakteri. Sementara itu, disinfektan adalah bahan kimia yang mampu membunuh sel vegetatif bakteri, meskipun efektivitasnya terhadap spora bakteri belum tentu terjamin (Isadiartuti dan Retno, 2005)². Umumnya, disinfektan diaplikasikan pada benda mati dan tidak digunakan pada jaringan hidup (Thamher, 2002)¹.

² Isadiartuti dan Retno. 2005. Penentuan Dosis Sterilisasi Membran Selulosa

2.1 Pengertian Fenol

Koefisien fenol dihitung dengan membandingkan pengenceran tertinggi dari disinfektan atau senyawa kimia yang diuji, yang mampu membunuh mikroorganisme dalam waktu 10 menit tetapi tidak dalam 5 menit, dengan pengenceran tertinggi fenol yang menghasilkan efek serupa. Jika koefisien fenol bernilai kurang dari atau sama dengan 1, hal ini mengindikasikan bahwa efektivitas senyawa uji setara atau sedikit lebih rendah dibandingkan fenol. Sebaliknya, koefisien fenol yang lebih besar dari 1 menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki efektivitas lebih tinggi dibandingkan fenol dalam kondisi yang sama. Sebagai contoh, koefisien fenol sebesar 5 berarti senyawa uji memiliki efektivitas lima kali lebih besar daripada fenol.

2.2 Fungsi Fenol

Fenol memiliki peranan penting dalam produksi berbagai obat, termasuk sebagai komponen dalam pembuatan aspirin dan herbisida. Namun, fenol dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan luka bakar kimia pada kulit yang tidak terlindungi. Selain itu, fenol juga pernah digunakan sebagai metode eksekusi mati, terutama selama era Nazi dan Perang Dunia II, di mana ribuan orang menjadi korban di kamp-kamp konsentrasi seperti Auschwitz-Birkenau. Prosedur ini melibatkan penyuntikan fenol ke dalam vena di lengan atau jantung, yang dapat menyebabkan kematian secara instan (Aditya, 2009)¹.

2.3 Definisi Koefisien Fenol

Dalam evaluasi potensi antiseptik, fenol, yang telah lama digunakan karena sifat germisidanya yang kuat, berperan sebagai standar pembanding. Koefisien fenol, yang

mencerminkan perbandingan aktivitas germisidal suatu senyawa antiseptik terhadap fenol, sangat dipengaruhi oleh konsentrasi dan durasi paparan. Oleh karena itu, interpretasi koefisien fenol (di atas atau di bawah 1) harus mempertimbangkan faktor-faktor ini untuk mencerminkan efektivitas relatif suatu bahan antimikroba dibandingkan dengan fenol (Campbell, 2004)¹.

Sebagai tolok ukur dalam mengukur efektivitas antimikroba, fenol menghasilkan koefisien yang memungkinkan perbandingan langsung dengan senyawa lain. Koefisien fenol mencerminkan aktivitas relatif suatu bahan antimikroba dibandingkan dengan fenol dalam kondisi pengujian yang sama. Nilai di bawah 1 mengindikasikan bahwa bahan tersebut kurang ampuh daripada fenol, sementara nilai di atas 1 menunjukkan efikasi yang lebih besar (Anonim, 2011)³.

Untuk menentukan efektivitas relatif suatu disinfektan, uji koefisien fenol dilakukan dengan membandingkan kemampuan disinfektan tersebut dengan fenol dalam membunuh mikroorganisme. Prosedur ini melibatkan penentuan pengenceran tertinggi fenol dan disinfektan uji yang mampu membasmi *Salmonella typhosa* atau *Staphylococcus aureus* dalam 10 menit, tetapi tidak dalam 5 menit, pada kondisi pengujian yang identik (Rismana, 2008)³.

³ Anonim. 2011. Petunjuk Praktikum Semester III. Yogyakarta: EGC

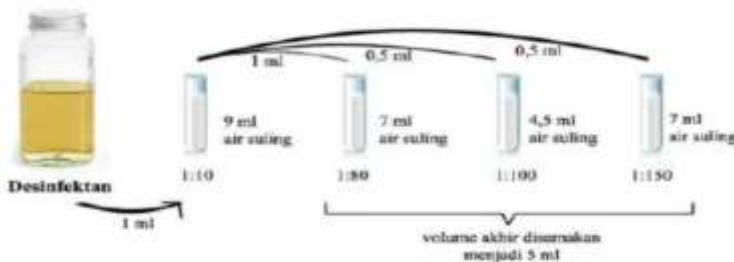
2.4 Prosedur Uji Koefisien Fenol

Mikroorganisme yang digunakan sebagai subjek dalam pengujian ini adalah *Staphylococcus aureus*.

Berikut adalah bahan-bahan yang diperlukan:

1. Biakan *Staphylococcus aureus*
2. Fenol
3. Aquadestillata lisol (79% etil alcohol)
4. Pipet steril berukuran 5 mL dan 1 mL
5. Tabung TSB (*Trypticase Soy Broth*)

>> Cara Kerja :



>> Hari Pertama:

1. Siapkan larutan fenol dengan mengencerkan dalam Aquadestillata steril hingga mencapai pengenceran 1 : 80, 1 : 90, 1 : 100, dan 1 : 110.
2. Ambil 5 mL dari setiap larutan pengenceran tersebut dan masukkan ke dalam tabung reaksi. Pastikan untuk memberi label pada setiap tabung sesuai dengan pengencerannya.

3. Inokulasi setiap larutan dengan menambahkan 0.5 mL kaldu biakan organisme penguji *S. aureus* yang telah dibiakkan selama 24 jam.
4. Desinfektan lisol diolah menjadi serangkaian pengenceran dalam aquadestilata steril (1:150 hingga 1:500) untuk mengevaluasi efektivitasnya pada berbagai konsentrasi. Setiap pengenceran (5 mL) ditempatkan dalam tabung reaksi yang sesuai, dan kemudian diinokulasi dengan 0.5 mL kultur *S. aureus* (24 jam). Setelah inokulasi, tabung-tabung tersebut diinkubasi pada 20°C untuk memulai proses pengujian.
5. Setelah interval waktu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit, ambil satu mata ose dari setiap tabung pengenceran dan pindahkan ke dalam TSB steril. Selanjutnya Kocok tabung yang telah berisi kultur tersebut dengan baik. Inkubasikan kaldu tersebut selama 24-48 jam dengan suhu 35°C. Prosedur pemindahan satu mata ose ini berlaku untuk tabung yang mengandung fenol maupun desinfektan.

>> Hari Kedua :

1. Kocok setiap tabung dengan seksama, kemudian identifikasi tabung pengenceran yang menunjukkan pertumbuhan mikroorganisme (+) dan yang tidak menunjukkan pertumbuhan (-). Sajikan hasil pengamatan dalam bentuk tabel.
2. Hitung nilai koefisien fenol berdasarkan data yang diperoleh.

2.5 Metode Uji Koefisien Fenol

1) Uji koefisien Fenol Metode Broth (Metode Tabung)

>> **Prinsip** : Membandingkan daya bunuh desinfektan dengan daya bunuh dari baku fenol terhadap bakteri uji yang sama pada kondisi yang sama dalam masa kontak 5, 10, 15 menit.

Media dan pengencer :

1. Nutrien Broth
2. Air steril
3. Bakteri uji
4. *Salmonella typhi*

Alat :

1. Tabung reaksi ukuran 25 x 150 mm dan 20 x 150 mm
2. Sengkalit platina diameter 4 mm
3. Pencatat waktu atau stopwatch
4. Rak tabung

>> **Prosedur**

Pembuatan media:

Dibuat media Nutrient Broth (NB) dengan komposisi per liter yang terdiri dari:

Peptone	10 g
Beef Extract	5 g
NaCl	5 g

pH akhir 6,8 dimasukkan dalam tabung 20 x 150 mm, masing – masing 10 ml, sterilisasi 121, 1 atm selama 15 menit.

Bakteri Uji

Untuk memastikan virulensi dan aktivitas yang optimal, *Salmonella typhi* diisolasi pada agar miring Nutrient Agar (NA) dan diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam. Kultur dari NA kemudian ditransfer ke dalam Nutrient Broth (NB) dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 24 jam. Kultur NB yang digunakan dalam pengujian telah mengalami peremajaan serial sebanyak empat kali berturut-turut, dengan batasan maksimal 30 siklus peremajaan. Sebelum digunakan dalam pengujian, suspensi bakteri divorteks dan dibiarkan mengendap selama 5 menit

Larutan baku fenol 5 %

Larutan baku fenol 5 % b/v disiapkan terlebih dahulu, kemudian diencerkan dengan rasio 1:80, 1:90, dan 1:100 dalam tabung steril berukuran 25 x 150 mm. Setiap tabung diisi dengan volume larutan sebanyak 5 mL. Pastikan bahwa larutan baku fenol 5% yang digunakan telah distandarisasi sebelumnya.

Larutan Desinfektan

Larutan desinfektan disiapkan dalam air steril dengan konsentrasi pengenceran yang disesuaikan sesuai petunjuk pada label, sehingga dapat mencapai efektivitas dalam membunuh bakteri uji selama waktu kontak antara 5 hingga 15 menit. Contoh pengenceran yang dapat digunakan adalah 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, dan 1:400. Pengenceran ini dibuat dalam tabung reaksi steril berukuran 25 x 150 mm, dengan volume masing-masing larutan desinfektan sebanyak 5 mL per tabung.

Prosedur

Semua tabung pengenceran baku dan desinfektan disusun dalam satu deret rak tabung. Di belakang setiap tabung pengenceran, disiapkan tiga tabung media Nutrient Broth (NB). Dengan demikian, untuk 10 tabung pengenceran (terdiri dari 3 tabung pengencer baku fenol dan 7 tabung pengenceran desinfektan), diperlukan total 30 tabung media NB. Semua tabung, baik pengenceran maupun NB, yang berjumlah 40 tabung, ditempatkan dalam wadah es pada suhu 20°C, dan suhu ini dipertahankan selama proses pengujian. Kultur bakteri uji dikocok dan diletakkan dalam wadah es, dibiarkan selama 15 menit sebelum digunakan.

Ke dalam setiap tabung pengenceran, ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri uji menggunakan pipet ukur steril. Ketika suspensi bakteri pertama kali dimasukkan ke dalam tabung pertama, waktu dicatat sebagai nol menit. Proses inokulasi suspensi bakteri kemudian dilanjutkan ke tabung pengenceran kedua dengan interval waktu 30 detik setelah inokulasi pertama. Prosedur ini diulang untuk semua tabung pengenceran hingga kesepuluh, yang dapat diselesaikan dalam waktu total 4,5 menit.

Untuk memastikan distribusi bakteri yang merata, suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam tabung dengan pipet yang diturunkan secara hati-hati mendekati permukaan cairan, tanpa menyentuh dinding tabung. Lima menit setelah penambahan suspensi bakteri, inokulasi dilakukan dengan mengambil satu sengkeli dari masing-masing pengenceran dan menanamkannya ke dalam tabung NB deret pertama, dengan interval 30 detik antar inokulasi untuk menjaga konsistensi.

Untuk memastikan homogenitas suspensi dan teknik aseptik yang optimal, larutan dikocok secara menyeluruh sebelum setiap pengambilan sampel untuk inokulasi, dengan tabung dipertahankan pada sudut 60°. Sebelum digunakan, sengkeliit disterilisasi dengan pemijaran, dan mulut tabung diflame untuk mencegah kontaminasi. Sepuluh menit setelah pengisian tabung pengenceran pertama dengan bakteri uji, inokulasi serial dilakukan secara berurutan ke dalam tabung media NB ke-11 hingga ke-20. Lima belas menit kemudian, proses dilanjutkan dengan inokulasi tabung NB ke-21 hingga ke-30. Selanjutnya, seluruh tabung media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Setelah periode inkubasi selesai, dilakukan observasi untuk menentukan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri di setiap tabung. Pada hari ketiga inkubasi, dilakukan uji kemurnian terhadap bakteri yang digunakan untuk memastikan tidak adanya kontaminasi pada kultur bakteri uji.

Perhitungan

Koefisien fenol merupakan perbandingan antara pengenceran tertinggi disinfektan yang mampu membunuh bakteri uji dalam waktu 10 menit, tetapi tidak efektif dalam waktu 5 menit, dengan pengenceran tertinggi fenol yang memiliki kemampuan serupa.

$$\text{Koefisien Fenol} = \frac{\text{Pengenceran tertinggi zat kimia uji yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam waktu 5 menit}}{\text{Pengenceran tertinggi larutan fenol yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam 5 menit}}$$

Pengamatan Hasil

- a. Apabila hasil perkalian koefisien fenol dengan faktor 20 menghasilkan nilai yang lebih rendah daripada pengenceran yang tercantum pada label, maka pengenceran disinfektan dianggap tidak memenuhi standar.
- b. Jika setelah dikoreksi dengan faktor pengenceran 20 yang tertera pada label, hasil koefisien yang diperoleh tetap tidak memenuhi standar efektivitas, maka dapat disimpulkan bahwa pengenceran disinfektan tersebut tidak layak digunakan.

2) Uji Koefisien Fenol Metode Lempeng

> Prinsip dasar pengujian ini adalah menentukan efektivitas relatif suatu disinfektan atau pestisida dalam membasmi hama, dibandingkan dengan efektivitas fenol sebagai standar acuan

Media dan Pereaksi

- a. Nutrien Agar (NA)
 - b. Baku Fenol
- Bakteri Uji : Biakan murni *Salmonella typhi*

Peralatan Khusus :

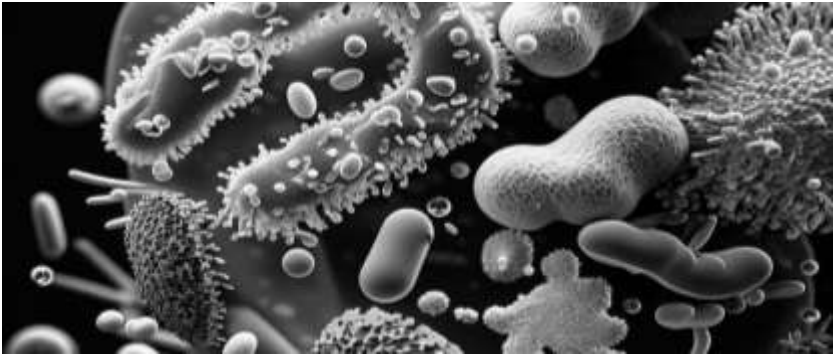
- a. Tabung kimia
 - b. Cawan Petri
 - c. Jarum ose/ dawai platina
 - d. Inkubator
- Prosedur :
 - a. Siapkan pengenceran dari larutan 5% dengan rasio 1:300, 1:325, 1:350, 1:375, dan 1:400, masing-

masing sebanyak 5 mL, menggunakan air suling sebagai pelarut.

- b. Buat pengenceran dari larutan 5% standar menjadi 1:90 dan 1:100, dengan volume masing-masing 5 mL.
- c. Tabung-tabung yang berisi sampel, fenol, dan kultur *Salmonella typhi* (untuk tes kultur) diletakkan dalam inkubator pada suhu antara 35 hingga 37°C selama 24 jam.
- e. Setiap 30 detik, tambahkan ½ mL "tes kultur" ke dalam masing-masing tabung.
- f. Kocok tabung dengan kuat untuk memastikan penyebaran bakteri yang merata.
- g. Setelah 5 menit, gunakan jarum ose untuk menginokulasi kultur ke dalam Nutrient Agar (NA) yang terdapat dalam cawan petri.
- h. Lima menit setelah inokulasi pertama, ambil sampel lagi dan inokulasikan ke dalam NA untuk pengamatan pada interval waktu 10 menit, kemudian lakukan pengamatan lagi setelah tambahan waktu 5 menit untuk interval 15 menit.
- i. Inkubasi cawan petri dalam inkubator pada suhu 37°C selama 84 jam dan amati hasil pertumbuhan bakteri pada interval waktu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Isadiartuti dan Retno. 2005. Penentuan Dosis Sterilisasi Membran Selulosa Mikroba Dengan Iradiasi Bekas Elektron Berdasarkan ISO 11137. Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop Dan Radiasi. ISSN 1907-0322. Vol 5. No 2. Jakarta. Diakses pada tanggal 13 Mei 2017 pukul 08.47 WIB
- Campbell, D. 2004. Dasar - Dasar Mikrobiologi. Djambatan: Jakarta.
- Thamher. 2002. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium Mikrobiologi. Gramedia: Jakarta.
- Anonim. 2011. Petunjuk Praktikum Semester III. Yogyakarta: EGC.
- Pelczar dan Chan (2005). Dasar-Dasar Mikrobiologi Cetakan Pertama. Jakarta: Universitas Indonesia (UI-Press).
- Raudah, dkk, 2017. Efektivitas Sterilisasi Metode Panas Kering Pada Alat Medis Ruang Perawatan Luka Rumah Sakit Dr. H soemamo sosroatmodjo Kuda Kapuas. Banjar Baru: Jurnal Kesehatan Lingkungan. Vol 14. No. 1:425-430.
- Aditya. 2009. Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan Dan Penelitian Edisi Ke Enam. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta
- Rismana. 2008. Pengantar Mikrobiologi Umum. Bandung: Angkasa.



BAB III

METODE UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIMIKROBA

Mikroorganisme, termasuk bakteri, jamur, virus, dan parasit, merupakan agen infeksius yang dapat memicu berbagai penyakit pada manusia, hewan, dan tumbuhan, menjadikan infeksi sebagai isu kesehatan yang signifikan. Bakteri, sebagai salah satu penyebab utama infeksi, mengembangkan mekanisme pertahanan diri melalui pembentukan biofilm – lapisan lender yang berperan sebagai mediator utama dalam 80% kasus infeksi (Nagy et al., 2018)¹. Keberadaan bakteri yang merata di lingkungan sekitar kita memfasilitasi kontaminasi makanan dan sediaan farmasi selama proses produksi dan pengemasan. Kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dalam kondisi ekstrem (Gonelimali et al., 2018)¹ menegaskan perlunya uji aktivitas antibakteri yang ketat pada produk makanan, minuman, dan farmasi untuk menjamin keamanan dan kualitasnya.

3.1 Metode Uji Aktivitas Senyawa Antimikroba

Antimikroba adalah zat kimia atau senyawa, baik alami, semi-sintetik, maupun sintetik, yang digunakan untuk melawan mikroorganisme patogen. Senyawa ini bekerja dengan berbagai mekanisme, seperti:

- Kerusakan dinding sel terjadi sebagai akibat dari gangguan terhadap proses pembentukan dinding sel, baik dengan menghambat sintesis komponen-komponennya, atau dengan merusak struktur yang sudah terbentuk.
- Penghambatan Kerja Enzim: Akan menyebabkan aktivitas seluler tidak berjalan normal
- Mikroorganisme dapat dirusak dengan menyebabkan denaturasi protein dan asam nukleat, yang mengakibatkan kerusakan ireversibel pada sel.
- Perubahan permeabilitas membran sitoplasma dapat mengganggu homeostasis seluler, menghambat transpor nutrisi dan ekskresi limbah, yang pada akhirnya menghambat pertumbuhan sel.
- Agen antimikroba dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan menargetkan sintesis asam nukleat (DNA dan RNA), yang mengakibatkan gangguan replikasi, transkripsi, dan translasi, serta kerusakan seluler yang signifikan.

Antimikroba dapat diklasifikasikan berdasarkan targetnya:

- Antibakteri: Efektif melawan bakteri.
- Antijamur: Dirancang untuk melawan infeksi jamur.

- Antivirus: Digunakan untuk melawan infeksi virus.
- Antiparasit: Efektif melawan parasit seperti protozoa atau cacing.

Awalnya, antimikroba ditemukan dari bahan alami, seperti penisilin yang diisolasi dari *Penicillium notatum*. Selanjutnya, teknologi sintesis dan semi-sintesis memungkinkan pengembangan senyawa antimikroba dengan potensi yang lebih besar dan spektrum aktivitas yang lebih luas. Saat ini, fokus penelitian tidak hanya pada senyawa sintetis, tetapi juga pada bahan alam seperti ekstrak tanaman dan metabolit sekunder dari mikroorganisme. Namun, munculnya resistensi mikroba terhadap antimikroba telah menjadi tantangan global. Resistensi ini terjadi ketika mikroorganisme mampu bertahan hidup meskipun telah terpapar dosis antimikroba yang biasanya efektif. Resistensi ini mendorong kebutuhan untuk menemukan senyawa baru dan mengembangkan metode uji yang lebih efektif.

Sebelum suatu senyawa digunakan sebagai antimikroba, efektivitasnya harus dievaluasi melalui berbagai metode pengujian. Uji ini bertujuan untuk menentukan kemampuan senyawa dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme. Informasi ini penting untuk:

- Mendukung Pengembangan Obat Baru: Pengujian aktivitas antimikroba membantu mengidentifikasi senyawa potensial yang dapat dikembangkan menjadi obat.
- Mengatasi Resistensi Mikroba: Uji ini membantu mengevaluasi efektivitas senyawa baru terhadap

mikroorganisme yang telah resisten terhadap obat-obatan yang ada.

- Mengoptimalkan Penggunaan Klinis: Data uji memberikan panduan untuk menentukan dosis dan cara penggunaan senyawa antimikroba.

Uji aktivitas antimikroba secara umum dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu metode difusi, metode dilusi dan metode bioautografi.

3.2 Uji Difusi

Metode difusi adalah mengukur kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan cara menyebar (difusi) melalui media agar. Aktivitas senyawa antimikroba ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat (area bening) di sekitar sumber senyawa tersebut. Dan terbagi menjadi 5 jenis utama yang sering digunakan :

a. *Disk diffusion* (difusi cakram)

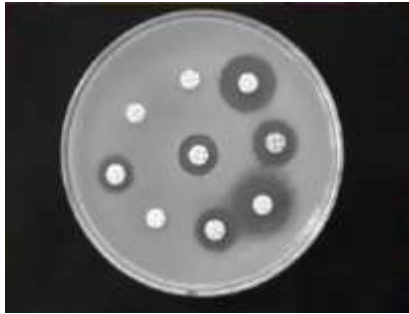
Metode ini tidak membutuhkan dispersi yang homogen dari zat uji didalam media berair. Zat uji diserapkan pada cakram kertas saring atau ditempatkan pada media dan zat uji dibiarkan melakukan kontak dengan kultur mikroba uji (Rios et al., 1988)⁴. Uji ini didasarkan pada difusi senyawa antimikroba dari cakram kertas ke medium agar yang mengandung mikroorganisme uji. Jika senyawa tersebut efektif, akan terbentuk zona hambat berupa area bening di sekitar

⁴ Rios et al., (1988). "Uji Mikrobiologi". Journal of Pharmacy. Vol.12 No.2, Hal : 31-36

cakram karena pertumbuhan mikroorganisme terhambat.

Prosedur Uji

- Persiapan Medium: Siapkan medium agar sesuai standar dan tuangkan ke dalam cawan Petri steril. Biarkan hingga mengeras.
- Persiapan Inokulum: Suspensikan mikroorganisme dalam larutan buffer steril hingga kekeruhannya setara dengan standar McFarland 0,5.
- Inokulasi Medium: Sebarkan inokulum mikroorganisme secara merata di atas permukaan medium menggunakan *cotton swab* steril.
- Penempatan Cakram Kertas: Ambil cakram kertas steril dengan pinset dan rendam dalam larutan antimikroba uji. Letakkan cakram di atas medium yang telah diinokulasi, dengan jarak yang cukup antar cakram.
- Inkubasi: Inkubasi cawan Petri dalam inkubator pada suhu 35-37°C selama 16-24 jam.
- Pengamatan dan Pengukuran: Amati zona hambat di sekitar cakram. Ukur diameter zona hambat menggunakan penggaris atau kaliper. Zona hambat menunjukkan aktivitas antimikroba. Semakin besar diameternya, semakin kuat aktivitas antimikroba.



Dapat kita lihat gambar disamping menunjukkan metode Difusi dengan menggunakan kertas cakram, zona bening di sekitar kertas cakram pada uji difusi cakram menunjukkan area di mana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik yang terdapat pada cakram tersebut. Ukuran zona bening ini berbanding lurus dengan efektivitas antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin besar zona bening, semakin efektif antibiotik tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Ketiadaan zona bening menunjukkan bahwa bakteri tersebut resisten terhadap antibiotik yang diuji.

Keuntungan dari metode ini adalah Sederhana dan cepat: Mudah dilakukan di laboratorium dengan peralatan minimal. Efisiensi biaya: Relatif murah dibandingkan metode lain seperti uji mikrodilusi. Banyak aplikasi: Dapat digunakan untuk berbagai jenis mikroorganisme. Dan **kelemahan** dari metode ini adalah Kuantitatif terbatas: Hanya memberikan gambaran semi-kuantitatif, tidak menentukan konsentrasi minimum penghambatan (MIC). Dan juga tidak bisa digunakan untuk semua jenis mikroba misalnya mikroba dengan pertumbuhan lambat ataupun anaerob obligat. Uji ini distandarisasi pada

suhu inkubasi 37°C, sehingga resistensi antimikroba tertentu yang seharusnya terdeteksi pada suhu 37°C menjadi tidak terdeteksi (Barry dan Thornsberry, 1991).

Metode ini sering digunakan dalam penelitian antimikroba, pengujian obat baru, atau evaluasi bahan alami yang berpotensi sebagai antibakteri.

b. Well diffusion (difusi Sumuran)

Metode sumuran adalah teknik untuk menguji aktivitas antimikroba dengan cara membuat lubang (sumur) pada medium agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Larutan antimikroba kemudian ditambahkan ke dalam sumur, dan difusi senyawa antimikroba ke dalam agar akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme jika senyawa tersebut efektif.

Prosedur Uji

- Persiapan Medium Agar: Siapkan medium agar dan tuangkan ke dalam cawan Petri steril, lalu biarkan mengeras.
- Persiapan Inokulum: Suspensikan mikroorganisme dalam buffer steril hingga kekeruhannya sesuai standar McFarland 0,5.
- Inokulasi Medium: Sebarkan inokulum mikroorganisme secara merata di atas medium agar menggunakan *cotton swab* steril.
- Pembuatan Sumur: Gunakan bor steril untuk membuat lubang (sumur) pada medium agar. Biasanya diameter sumuran sekitar 6-8 mm.

- Penambahan Larutan Antimikroba: Tambahkan larutan antimikroba yang akan diuji ke dalam setiap sumur menggunakan pipet steril. Volume biasanya 50-100 μL per sumur.
- Inkubasi: Inkubasi cawan Petri pada suhu 35-37°C selama 16-24 jam.
- Pengamatan dan Pengukuran: Amati zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur.



Dapat kita lihat gambar disamping menunjukkan metode difusi sumuran, zona bening di sekitar lubang tersebut menunjukkan area di mana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik yang terdapat dalam lubang tersebut.

Metode sumuran memiliki beberapa **keuntungan** dan kerugian yang perlu dipertimbangkan. Keuntungannya meliputi kesederhanaan dan efisiensi biaya, karena metode ini tidak memerlukan peralatan yang kompleks. Selain itu, metode ini efektif untuk menguji aktivitas antibakteri atau antijamur dari suatu senyawa, karena memungkinkan difusi bahan uji ke media agar sehingga zona hambat dapat diukur dengan

jelas. Namun, metode sumuran juga memiliki beberapa **kelemahan**, seperti sensitivitas terhadap ketebalan media agar, volume bahan uji yang tidak konsisten, dan kemungkinan hasil yang dipengaruhi oleh difusi yang tidak merata. Selain itu, metode ini kurang cocok untuk senyawa yang memiliki kelarutan rendah, karena zat aktif mungkin tidak terdifusi dengan baik ke dalam media agar. Oleh karena itu, penting untuk memastikan bahwa metode ini digunakan dalam kondisi yang terkendali agar hasilnya dapat diandalkan.

c. *Cylinder diffusion (Difusi Silinder)*

Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Silinder adalah metode untuk menguji aktivitas antimikroba menggunakan silinder logam atau tabung kecil sebagai wadah larutan antimikroba pada permukaan medium agar. Berikut adalah penjelasan lengkap tentang metode ini, Metode ini didasarkan pada difusi senyawa antimikroba dari silinder yang ditempatkan di atas medium agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Jika senyawa tersebut memiliki aktivitas antimikroba, akan terbentuk zona hambat di sekitar silinder.

Prosedur Uji

- Persiapan Medium Agar: Siapkan medium agar dan tuangkan ke dalam cawan Petri steril hingga mengeras.
- Persiapan Inokulum Mikroorganisme: Suspensikan mikroorganisme dalam larutan buffer steril hingga mencapai kekeruhan sesuai standar McFarland 0,5.

- Inokulasi Medium: Sebarkan inokulum mikroorganisme secara merata di atas medium agar menggunakan *cotton swab* steril.
- Penempatan Silinder: Letakkan silinder logam atau plastik steril di atas medium agar yang telah diinokulasi.
- Penambahan Larutan Antimikroba: Tambahkan larutan antimikroba ke dalam silinder dengan volume tertentu (biasanya 50-200 μL).
- Inkubasi: Inkubasi cawan Petri pada suhu 35-37°C selama 16-24 jam.
- Pengamatan dan Pengukuran ; Amati zona hambat yang terbentuk di sekitar silinder.ukur diameter zona hambat menggunakan penggaris atau kaliper.



Dapat kita lihat gambar disamping menunjukkan metode difusi silinder, zona bening di sekitar lubang yang dibentuk dengan tabung kecil tadi menunjukkan area di mana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik yang telah dipipet pada lubang tersebut.

Metode difusi silinder memiliki beberapa **kelebihan**, antara lain presisi yang tinggi dalam pengendalian volume larutan antimikroba, sehingga hasilnya lebih konsisten dibandingkan metode difusi cakram. Selain itu, metode ini cocok untuk menguji larutan antimikroba cair dan memberikan zona hambat yang lebih seragam karena silinder menciptakan area difusi yang terkontrol. Namun, metode ini juga memiliki **kekurangan**, seperti keterbatasannya pada senyawa yang dapat berdifusi dengan baik di medium agar, serta memerlukan alat khusus berupa silinder steril dengan ukuran tertentu. Selain itu, metode ini bersifat semi-kuantitatif karena tidak memberikan nilai konsentrasi minimum penghambatan (MIC) secara langsung, sehingga kurang efektif untuk analisis mendalam mengenai potensi antimikroba.

d. *Metode Difusi E-test (Epsilometer test)*

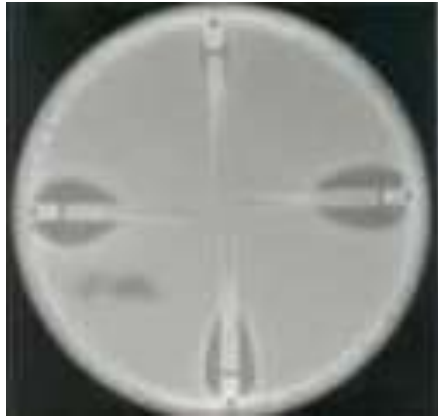
Metode ini sering digunakan dalam uji aktivitas antibiotik, antiseptik, atau ekstrak alami yang memiliki potensi antimikroba. Dibandingkan dengan metode difusi cakram, metode silinder memberikan kontrol yang lebih baik terhadap volume senyawa yang diuji.

difusi E-test (*Epsilometer test*) adalah teknik kuantitatif untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Metode ini menggabungkan prinsip difusi antibiotik pada medium padat (seperti metode disk difusi) dengan kemampuan memberikan nilai konsentrasi penghambatan minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC). E-test menggunakan strip plastik khusus yang dilapisi gradasi konsentrasi antibiotik secara linier pada satu sisi. Saat strip diletakkan di atas agar yang telah diinokulasi dengan

bakteri, antibiotik akan berdifusi ke medium. Konsentrasi antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri dapat diamati di sekitar strip, membentuk zona inhibisi berbentuk elips.

Prosedur Kerja

- **Persiapan Media dan Kultur Bakteri:** Gunakan media agar seperti Mueller-Hinton agar. Siapkan suspensi bakteri dengan kepadatan yang disesuaikan (biasanya setara dengan standar McFarland 0.5, sekitar 1.5×10^8 CFU/mL).
- **Inokulasi Media Agar:** Sebarkan suspensi bakteri secara merata di permukaan agar menggunakan kapas steril
- **Penempatan Strip E-test:** Letakkan strip E-test di atas media agar dengan menggunakan pinset steril. Pastikan strip menempel sempurna pada permukaan agar. Strip diletakkan dengan orientasi konsentrasi yang lebih tinggi menghadap ke atas.
- **Inkubasi:** Inkubasi piring pada suhu 35–37°C selama 16–20 jam, tergantung pada jenis bakteri yang diuji.
- **Pembacaan Hasil:** Setelah inkubasi, zona inhibisi berbentuk elips akan terbentuk di sekitar strip. Baca nilai MIC pada titik di mana tepi zona inhibisi elips memotong skala konsentrasi pada strip.



Setelah inkubasi, antibiotik dalam strip akan menyebar ke sekitar agar. Di sekitar strip, akan terbentuk zona hambatan, yaitu area di mana mikroorganisme tidak dapat tumbuh. Ini karena antibiotik di area tersebut cukup kuat untuk menghambat pertumbuhannya. Membaca MIC (Minimum Inhibitory Concentration) adalah konsentrasi antibiotik terendah yang bisa menghentikan pertumbuhan mikroorganisme. MIC dibaca dengan melihat di mana zona hambatan berhenti dan menyentuh strip. Titik di mana zona hambatan menyentuh strip menunjukkan konsentrasi antibiotik terendah yang cukup efektif untuk menghambat pertumbuhan mikroba.

Metode difusi E-strip (E-test) dan metode difusi gradien memiliki **kelebihan** dan kekurangan masing-masing. E-test memberikan keakuratan tinggi dalam penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) karena menggunakan strip dengan konsentrasi antibiotik yang terukur secara linier, memudahkan pembacaan hasil yang kuantitatif. Metode ini juga cukup praktis dan dapat digunakan untuk berbagai jenis

mikroorganisme, termasuk yang sulit seperti bakteri anaerob dan jamur. Selain itu, E-test menghasilkan hasil dalam waktu singkat dan tidak memerlukan alat canggih selain strip dan media agar. Namun, E-test memiliki **kelemahan** berupa biaya yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode difusi disk dan keterbatasan dalam menguji konsentrasi yang lebih tinggi atau lebih rendah dari rentang yang tersedia di strip. Pembacaan hasil juga bisa subyektif, terutama jika zona inhibisi tidak jelas, dan metode ini kurang efektif untuk mikroorganisme yang memiliki waktu pertumbuhan yang sangat lama.

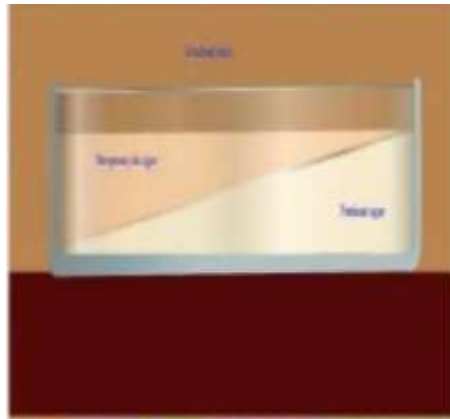
e. *Gradient Diffusion Method (Metode Difusi Gradien)*

Metode difusi gradien adalah teknik yang digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba dengan memanfaatkan perbedaan konsentrasi senyawa antimikroba dalam satu area. Dalam metode ini, senyawa antimikroba dibiarkan berdifusi ke dalam media agar dari sumber konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah, membentuk gradien konsentrasi yang berbeda di sekitar titik aplikasi.

Prosedur Kerja

- **Persiapan Media:** Gunakan media seperti Mueller-Hinton agar atau media lain sesuai mikroorganisme yang diuji. Medium dituangkan hingga rata dan dibiarkan mengeras.
- **Inokulasi mikroorganisme** secara merata pada permukaan agar.

- Posisikan cawan petri secara miring sekitar 30-45 derajat untuk menciptakan gradien konsentrasi senyawa.
- Teteskan senyawa antimikroba pada salah satu sisi agar dan biarkan berdifusi ke seluruh permukaan.
- Inkubasi pada suhu yang sesuai (35-37°C) selama 18-24 jam.6. Amati dan ukur zona hambatan yang terbentuk untuk menilai efektivitas senyawa pada berbagai konsentrasi.



Seperti gambar disamping. Agar dengan antibiotik ditempatkan dengan cara miring sehingga menciptakan gradien konsentrasi antibiotik di dalam media. Bakteri diuji pada area dengan konsentrasi antibiotik yang bervariasi, dari tinggi ke rendah. Kita bisa melihat di mana bakteri masih bisa tumbuh (area konsentrasi rendah) dan di mana mereka tidak bisa tumbuh (area konsentrasi tinggi), dan dapat Menentukan MIC (Konsentrasi Minimum yang Menghambat): MIC adalah konsentrasi antibiotik terendah yang bisa menghentikan pertumbuhan bakteri. Dengan gradien, kita dapat

melihat batas pertumbuhan bakteri pada media dan menentukan MIC langsung dari satu lempeng.

Metode difusi gradien memiliki **keuntungan** fleksibilitas dalam penggunaan berbagai perangkat, seperti strip atau disk yang menghasilkan gradien konsentrasi antibiotik. Ini memungkinkan pengujian sensitivitas pada berbagai konsentrasi dalam satu percobaan. Metode ini juga cukup akurat dalam memberikan hasil MIC kuantitatif, namun seperti E-test, sering kali memerlukan media standar seperti Mueller-Hinton agar agar dapat memberikan hasil optimal. Salah satu kekurangannya adalah biaya yang bisa lebih tinggi dibandingkan metode lainnya, serta potensi kesulitan dalam pembacaan zona inhibisi atau gradien yang kurang jelas, tergantung pada metode dan alat yang digunakan. Selain itu, meskipun metode ini fleksibel, tidak semua mikroorganisme dengan waktu pertumbuhan lambat cocok diuji dengan metode ini.

3.3 Uji Disolusi

Uji dilusi mengandalkan dispersi homogen dari zat uji dalam media berair (Rios et al., 1988) untuk memastikan kontak yang optimal dengan mikroorganisme target. Keunggulan utama metode ini terletak pada kemampuannya untuk mengidentifikasi pola resistensi spesifik yang mungkin terlewatkan oleh teknik difusi. Menurut Sham dan Washington II (1991), metode ini dapat digunakan untuk menetapkan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dari suatu senyawa aktif. Wahyuono (1991) menggunakan metode dilusi agar dengan media *trypticase Soy Agar* (TSA) untuk mendeteksi aktivitas antiinfeksi senyawa aktif dari

Artemisia pacifica Nutt, dan untuk membantu disperse zat uji digunakan dimetilsulfoksida (DMSO) 2%. Atau dengan kata lain Metode dilusi adalah salah satu teknik untuk menguji aktivitas antimikroba dengan menentukan konsentrasi minimal antimikroba yang masih efektif menghambat (MIC) atau membunuh (MBC) mikroorganisme. Prosedur ini dilakukan dengan mencampurkan antimikroba dalam berbagai konsentrasi dengan medium pertumbuhan mikroorganisme. Ada dua jenis metode dilusi.

a. Dilusi Cair (*Broth Dilution*)

Metode dilusi cair (*broth dilution*) digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) dan, jika diperlukan, Konsentrasi Bunuh Minimum (MBC) dari suatu antimikroba. Teknik ini melibatkan pencampuran antimikroba dalam berbagai konsentrasi ke dalam media cair, kemudian mengamati kemampuan antimikroba untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme. Dan tujuannya untuk menentukan konsentrasi efektif terendah dari antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (MIC).

Prosedur Metode Dilusi Cair

1. Persiapan Alat dan Bahan

- Media cair: Biasanya Mueller-Hinton Broth (MHB) atau media lain yang sesuai untuk mikroorganisme uji.
- Suspensi mikroorganisme: Disiapkan dalam larutan salin steril dan distandarkan menggunakan 0,5 McFarland (setara dengan $\sim 1-2 \times 10^8$ CFU/mL).

- Antimikroba uji: Larutkan senyawa antimikroba dalam pelarut steril (seperti air destilasi atau DMSO) hingga konsentrasi stok tertentu.
 - Tabung reaksi atau pelat mikro 96 sumur.
2. Pembuatan Seri Pengenceran Antimikroba
- Siapkan tabung atau sumur mikro dengan media cair (misalnya 1 mL per tabung)
 - Lakukan pengenceran seri antimikroba dalam media cair:
Contoh: 100 μ L larutan antimikroba stok ditambahkan ke tabung pertama (media), lalu dipipet 100 μ L dari tabung pertama ke tabung kedua, dan seterusnya.
Ini menghasilkan konsentrasi berurutan seperti: 64 μ g/mL, 32 μ g/mL, 16 μ g/mL, dst.
 - Tabung terakhir digunakan sebagai kontrol pertumbuhan (tanpa antimikroba).
3. Inokulasi Mikroorganisme
- Tambahkan 100 μ L suspensi mikroorganisme ke setiap tabung/sumur (sehingga konsentrasi akhir bakteri biasanya $\sim 10^5$ – 10^6 CFU/mL).
 - Total volume campuran dalam tabung disesuaikan (biasanya 1–2 mL).
4. Inkubasi
- Inkubasi tabung pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam dalam kondisi aerobik atau sesuai kebutuhan mikroorganisme.
 - Pengamatan dan Penentuan MIC
 - Setelah inkubasi, amati tabung atau sumur untuk kekeruhan:

Jernih: Tidak ada pertumbuhan mikroorganisme
→ Aktivitas antimikroba efektif.

Keruh : Pertumbuhan mikroorganisme →
Antimikroba tidak efektif pada konsentrasi

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)
adalah konsentrasi antimikroba terendah yang
menghasilkan larutan jernih (tidak ada
pertumbuhan mikroba).

5. Langkah Tambahan untuk Penentuan MBC

- Ambil sampel dari tabung/sumur yang jernih (tidak ada pertumbuhan) dan subkultur ke media agar tanpa antimikroba.
- Inkubasi pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam.
- Hitung jumlah koloni:
Jika tidak ada koloni tumbuh → Konsentrasi tersebut adalah **MBC (Minimum Bactericidal Concentration)**.



Metode dilusi cair memiliki beberapa **keunggulan**. Teknik ini menghasilkan data kuantitatif yang akurat, seperti Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (MBC), sehingga sangat berguna dalam evaluasi efektivitas antimikroba. Selain itu, metode ini dapat digunakan untuk berbagai jenis mikroorganisme, baik aerobik maupun anaerobik, dan menjadi standar untuk pengujian senyawa antimikroba baru. Namun, metode ini juga memiliki **kekurangan**. Prosesnya memerlukan waktu lebih lama dan bahan yang lebih banyak dibandingkan metode lain, seperti difusi cakram. Selain itu, risiko kontaminasi lebih tinggi karena melibatkan banyak tahapan, dan metode ini kurang cocok untuk senyawa antimikroba yang larutannya tidak stabil.

A. *Agar Dilution* (Metode Dilusi Agar)

Metode dilusi agar digunakan untuk menentukan aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme dengan mencampurkan senyawa antimikroba ke dalam media padat atau Dalam metode agar, kita mencampurkan zat antimikroba pada medium agar dan menambahkannya ke dalam piring petri, lalu diinokulasi dengan mikroba.

Teknik ini sering digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) dan cocok untuk menguji senyawa yang stabil pada suhu tinggi (karena pemanasan selama pembuatan agar). Tujuannya untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) dari antimikroba terhadap mikroorganisme. Dan juga memastikan aktivitas senyawa antimikroba pada media padat.

Prosedur Metode Dilusi Agar

1. Persiapan Alat dan Bahan

- Media agar: Biasanya Mueller-Hinton Agar (MHA) atau media lain yang sesuai untuk mikroorganisme uji.
- Antimikroba: Larutan antimikroba disiapkan dalam berbagai konsentrasi.
- Suspensi mikroorganisme: Disiapkan sesuai standar (biasanya 0,5 McFarland, setara $\sim 1-2 \times 10^8$ CFU/mL).
- Cawan petri steril.

2. Pembuatan Media Agar dengan Antimikroba

- Siapkan larutan media agar steril (suhu sekitar 45–50°C agar tidak menggumpal).
- Tambahkan larutan antimikroba ke media agar untuk menghasilkan berbagai konsentrasi (misalnya, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, dst.).
- Tuang media agar ke cawan petri steril dan biarkan hingga membeku.

3. Inokulasi Mikroorganisme

- Mikroorganisme diinokulasikan secara titik atau garis pada permukaan media agar menggunakan jarum ose steril atau mikropipet.
- Pastikan inokulum dalam jumlah kecil dan merata untuk hasil yang akurat.

4. Inkubasi

- Inkubasi cawan petri pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam atau sesuai kebutuhan mikroorganisme.

5. Pengamatan

Amati pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan media:

- **Tidak ada pertumbuhan:** Antimikroba efektif pada konsentrasi tersebut.
- **Ada pertumbuhan:** Antimikroba tidak efektif.

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah konsentrasi antimikroba terendah pada media agar yang tidak menunjukkan pertumbuhan mikroorganisme.



Metode dilusi agar memiliki beberapa **keunggulan**, salah satunya adalah cocok untuk menguji antimikroba yang stabil pada suhu tinggi. Selain itu, teknik ini memungkinkan pengamatan langsung terhadap pertumbuhan mikroorganisme di media padat, yang lebih mudah dibandingkan metode cair dalam beberapa kasus. Namun, metode ini juga memiliki **kekurangan**. Prosesnya memerlukan lebih banyak waktu dan bahan dibandingkan metode lainnya. Selain itu, tidak cocok untuk menguji antimikroba yang tidak stabil terhadap panas, karena media agar harus dicairkan pada suhu tinggi.

3.4 Uji Bioautografi

Metode ini dianggap sebagai salah satu cara paling efektif untuk mendeteksi senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba. Hal ini disebabkan oleh kemampuannya untuk mengidentifikasi lokasi bercak senyawa aktif, meskipun berada dalam campuran kompleks. Dengan demikian, isolasi senyawa aktif dapat dilakukan melalui bioautografi lapis tipis dari ekstrak tertentu yang ditempatkan pada permukaan agar mikrobiologi yang telah diinokulasi dengan

mikroba target. Selama periode inkubasi yang diperlukan, lempeng tetap bersentuhan dengan media uji untuk memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme.

Dalam prosedur ini, sampel dipisahkan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis), kemudian lempeng KLT dikeringkan dari sisa larutan pengembang sebelum dilakukan uji biologi di permukaannya. Setelah inkubasi, zona hambatan akan terlihat pada nilai R_f (retardation factor) dari senyawa aktif tersebut (Wright, 1998)¹. Dengan kata lain, uji bioautografi merupakan kombinasi antara teknik kromatografi lapis tipis dan pengujian aktivitas mikroba. Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antimikroba dalam campuran kompleks, seperti ekstrak tumbuhan, mikroorganisme, atau senyawa sintetis.

1. Bioautografi Kontak Langsung

Bioautografi kontak langsung adalah salah satu metode bioautografi yang digunakan untuk mendeteksi aktivitas antimikroba langsung pada lempeng kromatografi lapis tipis (TLC). Dalam metode ini, mikroorganisme bersentuhan langsung dengan senyawa yang dipisahkan pada lempeng TLC, sehingga aktivitas antimikroba dapat diidentifikasi berdasarkan zona hambatan pertumbuhan mikroorganisme. Prinsip Kerjanya Senyawa yang telah dipisahkan menggunakan kromatografi TLC akan diuji aktivitas antimikrobanya dengan menempatkan mikroorganisme langsung di permukaan lempeng. Jika senyawa tersebut memiliki aktivitas antimikroba, mikroorganisme tidak akan tumbuh di sekitar area senyawa, menghasilkan zona hambat yang terlihat jelas.

Prosedur Bioautografi Kontak Langsung

1. Persiapan Lempeng TLC:

- Ekstrak atau campuran senyawa diaplikasikan pada lempeng TLC menggunakan mikropipet atau alat spotting.
- Pisahkan senyawa pada lempeng TLC menggunakan fase gerak yang sesuai.
- Keringkan lempeng di udara

2. Inokulasi Mikroorganisme:

- Siapkan suspensi mikroorganisme (misalnya bakteri atau jamur) dengan konsentrasi standar (0,5 McFarland).
- Semprotkan suspensi mikroorganisme secara merata pada permukaan lempeng TLC menggunakan *sprayer* steril.

3. Inkubasi:

- Inkubasi lempeng pada suhu yang sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme (biasanya 35–37°C untuk bakteri aerobik) selama 18–24 jam.
- Letakkan lempeng dalam kondisi lembap (misalnya, dalam cawan petri dengan tisu basah) untuk mencegah pengeringan.

4. Deteksi Zona Hambat:

- Setelah inkubasi, tambahkan pewarna indikator seperti MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) atau tetrazolium lainnya.

- Mikroorganisme hidup akan menghasilkan warna karena aktivitas metabolisme, sedangkan area tanpa pertumbuhan akan tetap tidak berwarna atau jernih.

5. Analisis:

- Zona hambat menunjukkan lokasi senyawa aktif pada lempeng.
- Bandingkan dengan standar atau kontrol untuk identifikasi senyawa.

Bioautografi kontak langsung memiliki sejumlah **keunggulan** yang membuatnya menjadi metode yang sering digunakan dalam skrining senyawa antimikroba. Metode ini efisien karena uji dilakukan langsung pada lempeng TLC, sehingga tidak memerlukan transfer senyawa ke media lain. Selain itu, teknik ini memungkinkan identifikasi senyawa aktif secara spesifik berdasarkan pola kromatografi, dan zona hambat dapat divisualisasikan dengan cepat menggunakan pewarna indikator seperti MTT atau tetrazolium. Namun, metode ini juga memiliki beberapa **kekurangan**. Senyawa yang mudah larut atau menguap dapat berpindah dari lempeng selama proses inokulasi, yang dapat memengaruhi hasil. Sensitivitas metode juga tergantung pada distribusi mikroorganisme di lempeng TLC, sehingga diperlukan optimasi yang baik untuk mendapatkan hasil yang akurat. Selain itu, pemilihan fase gerak harus sesuai untuk memastikan senyawa terpisah dengan baik sebelum pengujian.

2. Bioautografi Gelatif

Bioautografi gelatif adalah metode bioautografi yang menggunakan media agar yang mengandung mikroorganisme sebagai lapisan pelindung pada lempeng kromatografi lapis tipis (TLC). Teknik ini memungkinkan

deteksi aktivitas antimikroba berdasarkan zona hambat yang terbentuk pada lapisan agar setelah kontak dengan senyawa aktif di lempeng TLC. Metode ini mendeteksi aktivitas antimikroba dengan menginkubasi lempeng TLC yang telah dilapisi agar cair berisi mikroorganisme. Senyawa antimikroba pada lempeng akan berdifusi ke agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme di sekitarnya, membentuk zona hambat sebagai indikator aktivitas.

Prosedur Bioautografi Gelatif

1. Preparasi Lempeng TLC

- Aplikasikan ekstrak atau campuran senyawa ke lempeng TLC
- Pisahkan senyawa dengan fase gerak yang sesuai melalui kromatografi.
- Keringkan lempeng hingga tidak ada sisa pelarut.

2. Persiapan Media Agar

- Lelehkan media agar steril, seperti Nutrient Agar (untuk bakteri) atau Sabouraud Dextrose Agar (untuk jamur).
- Tambahkan suspensi mikroorganisme (misalnya 0,5 McFarland) ke dalam agar cair yang telah didinginkan hingga 45–50°C.

3. Pelapisan Media Agar ke Lempeng TLC

- Tuangkan agar cair yang telah dicampur mikroorganisme secara perlahan ke permukaan lempeng TLC
- Biarkan agar mengeras pada suhu ruang.

4. Inkubasi

- Inkubasi lempeng TLC yang dilapisi agar pada suhu optimal untuk pertumbuhan mikroorganisme (misalnya 35–37°C untuk bakteri aerobik) selama 18–24 jam.

5. Deteksi Zona Hambat

- Setelah inkubasi, zona hambat muncul di area lempeng TLC yang mengandung senyawa aktif antimikroba.
- Pewarna indikator seperti MTT atau tetrazolium dapat digunakan untuk memperjelas hasil, di mana area tanpa pertumbuhan tetap jernih.

Bioautografi gelatif memiliki **keunggulan** dalam memastikan distribusi mikroorganisme yang merata pada lempeng TLC karena penggunaan agar cair yang melapisi seluruh permukaan lempeng. Hal ini memungkinkan deteksi zona hambat yang jelas, sehingga aktivitas antimikroba lebih mudah diamati. Metode ini juga fleksibel, karena dapat digunakan untuk berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri atau jamur. Namun, bioautografi gelatif memiliki beberapa **kekurangan**, terutama untuk senyawa yang mudah larut atau terdistribusi ulang dalam agar cair, yang dapat memengaruhi akurasi hasil. Selain itu, metode ini tidak cocok untuk senyawa yang tidak tahan terhadap suhu tinggi, karena agar cair harus tetap dalam kondisi leleh pada suhu sekitar 45–50°C sebelum digunakan. Prosedur yang lebih kompleks dibandingkan metode bioautografi lainnya juga menjadi tantangan dalam aplikasinya.

C. Bioautografi Ekstraksi

Bioautografi ekstraksi adalah metode bioautografi yang melibatkan pemindahan senyawa aktif dari lempeng kromatografi lapis tipis (TLC) untuk diuji aktivitas antimikrobanya secara terpisah. Metode ini berguna untuk mendeteksi aktivitas antimikroba senyawa tertentu tanpa pengaruh dari senyawa lain atau matriks lempeng TLC. Adapun prinsip kerjanya yaitu: Setelah senyawa dipisahkan pada lempeng TLC, senyawa yang diduga aktif diekstraksi menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstrak ini kemudian diuji aktivitasnya menggunakan metode lain, seperti uji dilusi cair atau difusi agar. Dengan cara ini, aktivitas antimikroba.

Prosedur Bioautografi Ekstraksi

1. Preparasi Lempeng TLC

- Campuran senyawa diaplikasikan pada lempeng TLC.
- Lakukan pemisahan senyawa dengan fase gerak yang sesuai, kemudian keringkan lempeng.

2. Identifikasi Area Senyawa

- Gunakan deteksi visual (UV atau pereaksi kimia) untuk mengidentifikasi lokasi senyawa pada lempeng.
- Tandai area senyawa yang diduga aktif.

3. Ekstraksi Senyawa

- Gores bagian lempeng TLC yang mengandung senyawa tersebut.

- Rendam serpihan lempeng dalam pelarut organik (misalnya metanol atau etil asetat) untuk melarutkan senyawa.
- Filtrasi untuk memisahkan larutan senyawa dari matriks lempeng.

4. Uji Aktivitas Antimikroba

- Larutan senyawa yang diekstraksi diuji aktivitasnya menggunakan metode lain, seperti metode dilusi cair atau difusi agar. Senyawa spesifik dapat dianalisis lebih lanjut.

Metode bioautografi ekstraksi memiliki **keunggulan** utama dalam hal spesifisitas, karena senyawa aktif diuji secara terpisah, sehingga hasilnya tidak terpengaruh oleh senyawa lain atau matriks lempeng TLC. Metode ini juga fleksibel, karena larutan hasil ekstraksi dapat diuji lebih lanjut menggunakan berbagai metode, seperti dilusi cair atau difusi agar. Selain itu, bioautografi ekstraksi cocok untuk senyawa yang tidak stabil di lempeng TLC, seperti yang bereaksi dengan pereaksi kimia. Namun, metode ini memiliki beberapa **kekurangan**, termasuk prosedur yang lebih kompleks dan memakan waktu dibandingkan metode bioautografi lainnya. Proses ekstraksi juga berisiko menyebabkan kehilangan senyawa, terutama jika konsentrasinya kecil atau pelarut yang digunakan kurang optimal. Hal ini menjadikan metode ini lebih rumit dalam aplikasinya dibandingkan dengan metode bioautografi langsung.

Berikut adalah beberapa larutan senyawa antimikroba yang sering digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba, baik dalam uji dilusi cair, difusi agar, atau bioautografi:

1. Antibiotik Sintetik dan Semi-Sintetik

- Amoksisilin: Antibiotik golongan penisilin yang digunakan untuk menguji bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*.
- Eritromisin: Antibiotik golongan makrolida yang sering diuji terhadap *S. aureus* dan bakteri lain.
- Tetrasiklin: Spektrum luas, digunakan untuk menguji berbagai jenis bakteri.
- Kloramfenikol: Digunakan untuk uji terhadap bakteri gram positif dan negatif.
- Ciprofloksasin: Antibiotik golongan fluoroquinolone, efektif terhadap *S. aureus* dan bakteri lain.
- Vancomycin: Terutama digunakan untuk menguji strain *S. aureus* yang resistan terhadap methicillin (MRSA).

2. Antiseptik dan Disinfektan

- Klorheksidin: Digunakan dalam pembersihan luka dan skrining aktivitas terhadap berbagai mikroorganisme, termasuk *S. aureus*.
- Povidon iodine (Betadine): Digunakan sebagai antiseptik dalam pengujian aktivitas terhadap mikroba.
- Hidrogen Peroksida: Diuji terhadap berbagai bakteri, termasuk *S. aureus*, dalam pengujian aktivitas antiseptik.
- Alkohol (etanol atau isopropanol): Sering digunakan dalam uji aktivitas terhadap *S. aureus* karena

kemampuannya membunuh bakteri dengan denaturasi protein.

3. Ekstrak Tumbuhan dan Senyawa Alami

- Ekstrak Daun Sirih: Digunakan dalam uji aktivitas antimikroba karena kandungan senyawa aktif seperti flavonoid dan tanin.
- Ekstrak Kunyit: Dikenal memiliki sifat antimikroba yang diuji pada bakteri termasuk *S. aureus*.
- Minyak Esensial *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*): Dikenal efektif terhadap *S. aureus* dan banyak bakteri gram positif.
- Ekstrak Daun Jambu Biji: Diuji untuk aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.

4. Senyawa Kimia Antimikroba Lainnya

- Triclosan: Digunakan dalam produk kebersihan dan diuji untuk aktivitas terhadap *S. aureus*.
- Benzoin Peroksida: Diuji untuk aktivitas terhadap bakteri yang menyebabkan jerawat, termasuk *S. aureus*.
- Asam Salisilat: Diuji dalam pengobatan topikal dan produk perawatan kulit.

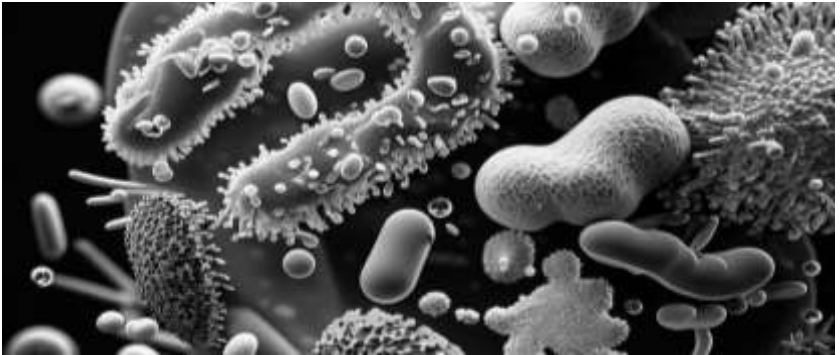
5. Metal Ions dan Nanopartikel

- Ion Perak (Ag^+): Diuji dalam bentuk larutan perak koloid atau nanopartikel perak untuk aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus*.

- Nanopartikel Tempa (CuO, ZnO): Diuji untuk aktivitas terhadap *S. aureus* karena sifat antibakterinya yang kuat.

DAFTAR PUSTAKA

- Nagy et al. (2018). "Aktivitas Antimikroba Kombinasi Senyawa Fenolik terhadap Bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif". *Majalah Ilmiah Kedokteran*, 25(3), 233-240.
- Gonelimali et al. (2018). "Tumbuhan Senyawa Penghambat Bakteri" (232 hlm : 15.5 x 23 cm) JL.Gelatik No 24 Kota Gorontalo : Ideas Publishing.
- Rios et al. (1988). "Uji Mikrobiologi" . *Journal of Pharmacy*. Vol.12 No.2, Hal : 31-36.
- Wright (1998). " Mikrobiologi Farmasi " (202 hlm : 15 x 23 cm) Pustaka Baru / Cv Pustaka Mahardika.



BAB IV

METODE AKTIVASI PENGAWETAN

4.1 Pengertian Pengawet

Pengawet adalah zat antimikroba yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme dalam berbagai produk, seperti obat-obatan, makanan, minuman, dan kosmetik. Pengawet dapat dibagi menjadi dua jenis utama, yaitu pengawet sintetis dan pengawet alami. Salah satu contoh pengawet sintetis yang umum digunakan dalam formulasi obat adalah paraben, seperti metil paraben dan propil paraben. Metil paraben lebih dikenal dengan nama dagang "nipagin," sedangkan propil paraben dikenal sebagai "nipasol." Kedua senyawa ini termasuk dalam golongan senyawa fenolik yang memiliki sifat stabil di udara, namun sensitif terhadap paparan cahaya. Selain itu, nipagin dan nipasol tahan terhadap suhu panas maupun dingin, termasuk uap sterilisasi, tetapi stabilitasnya menurun pada pH tinggi akibat proses hidrolisis. Di sisi lain, pengawet alami juga banyak digunakan dan berasal dari bahan-bahan

tradisional seperti gula, garam, kluwak, kayu manis, gambir, cuka, hingga bawang putih. Bahan-bahan ini tidak hanya efektif dalam mengawetkan produk tetapi juga sering dianggap lebih aman untuk digunakan.

4.2 Bahan Pengawet

Adapun beberapa bahan pengawet yaitu :

A. Bahan Pengawet Antimikroba

Pengawet antimikroba berperan penting dalam mencegah kerusakan produk akibat aktivitas bakteri. Metode pengawetan ini merupakan yang tertua dan paling tradisional, contohnya adalah pengasinan atau penggunaan madu yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan memodifikasi tingkat pH. Asam laktat adalah salah satu pengawet antimikroba yang paling sering digunakan, dan daftar pengawet antimikroba lainnya umumnya disajikan dalam bentuk tabel. Selain itu, nitrat dan nitrit juga memiliki sifat antimikroba. Mekanisme kerja senyawa-senyawa kimia ini bervariasi, mulai dari menghambat pertumbuhan bakteri secara umum hingga menargetkan enzim-enzim spesifik.

B. Antioksidan

Proses oksidasi dapat menyebabkan kerusakan pada banyak jenis makanan, terutama yang kaya lemak. Lemak cenderung cepat tengik ketika terpapar oksigen. Untuk mencegah atau memperlambat proses oksidasi ini, antioksidan digunakan. Beberapa zat aditif antioksidan yang paling umum adalah asam askorbat (vitamin C) dan askorbat. Oleh karena itu, antioksidan

sering ditambahkan ke dalam produk seperti minyak, keju, dan keripik untuk menjaga kualitasnya.

C. Macam-Macam Teknik Pengawetan

1. Teknik Pengawetan Fisika

Teknik pengawetan fisika adalah teknik yang menggunakan intervensi secara fisik. Yang tergolong ke dalam pengawetan fisika Yaitu:

1. Pendinginan dan Pembekuan

Pendinginan merupakan metode pengawetan yang dilakukan dengan menyimpan makanan pada suhu di atas titik beku, yaitu antara -2°C hingga 10°C . Secara umum, teknik ini dapat memperpanjang masa simpan makanan selama beberapa hari hingga minggu, tergantung pada jenis makanan yang diawetkan.

2. Pemanasan

Selain metode pendinginan dan pembekuan, teknik pemanasan juga berperan penting dalam pengawetan dan pengolahan makanan. Berdasarkan suhu yang digunakan, teknik pemanasan dalam pengawetan makanan dapat dibedakan menjadi tiga jenis: *blanching*, pasteurisasi, dan sterilisasi. Dalam industri pangan, ketiga teknik ini seringkali diterapkan secara bersamaan untuk saling melengkapi dalam setiap tahapan pengolahan. Meskipun demikian, teknik pemanasan juga dapat dilakukan secara terpisah, baik dalam skala industri rumah tangga, metode konvensional, maupun dalam kegiatan sehari-hari di rumah.

3. Pengeringan

Teknik pengawetan pengeringan dapat ditemukan dengan mudah dalam kehidupan sehari-hari. Contoh teknik pengeringan adalah pembuatan ikan asin, penjemuran kerupuk dan lain-lain. Teknik pengeringan dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti pengeringan dengan memanfaatkan sinar matahari dan pengeringan dengan simulasi panas di bawah suhu terkendali di ruangan khusus yang disebut dengan dehidrasi.

4. Pengemasan

Pengemasan juga termasuk salah satu Teknik dari pengawetan makanan

5. Pengalengan

Pengalengan adalah metode pengolahan makanan yang menggunakan suhu sterilisasi tinggi, berkisar antara 110°C hingga 120°C, dengan tujuan utama mencegah pembusukan. Proses ini melibatkan pengemasan makanan dalam wadah kaleng yang tertutup rapat secara hermetis, sehingga terlindungi dari kontaminasi mikroba, udara, air, dan benda asing lainnya. Olahan ikan adalah salah satu contoh makanan yang umum diawetkan melalui teknik pengalengan ini.

6. Fermentasi

Berbeda dengan metode pengawetan lainnya yang berfokus pada penghambatan atau penghancuran mikroba, fermentasi memiliki

tujuan yang berlawanan. Proses ini memanfaatkan mikroba tertentu untuk menghasilkan asam atau komponen lain yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba merugikan. Oleh karena itu, fermentasi biasanya dilakukan dalam kondisi anaerobik, tanpa kehadiran oksigen. Fermentasi juga dapat diartikan sebagai proses di mana mikroorganisme memecah bahan organik untuk menghasilkan komponen yang diinginkan. Beberapa manfaat dari fermentasi meliputi perbaikan tekstur dan peningkatan kualitas produk. Selain itu, teknik ini umumnya tidak memerlukan biaya yang tinggi.

2. Teknik pengawetan biologi

Pengawetan biologis adalah teknik yang memanfaatkan mikroorganisme untuk memperpanjang umur simpan makanan. Teknik ini mencakup tiga jenis utama, yaitu fermentasi bakteri, peragian (menggunakan ragi atau jamur), dan fermentasi enzim. Contoh fermentasi bakteri dapat ditemukan dalam produksi produk olahan susu seperti keju dan yogurt. Sementara itu, peragian dengan menggunakan jamur umumnya diterapkan dalam pembuatan makanan tradisional seperti tapai dan tempe. Selain itu, fermentasi biji kakao yang melibatkan bakteri dan jamur merupakan teknik penting dalam pengolahan coklat.

4.3 Teknik Pengawetan Kimiawi

Teknik pengawetan kimiawi adalah dengan cara menambahkan beberapa zat kimiawi, contohnya gula, garam, dan zat sintetis. Yang termasuk teknik pengawetan kimiawi, antara lain pengasinan dan pengawetan. Sedangkan bahan sintetis yang biasa ditambahkan untuk pengawetan kimiawi antara lain asam benzoat, asam propionat, asam sorbat, kalium benzoat, dan kalsium sorbat.

4.4 Tujuan dan Fungsi Pengawet

Tujuan dari penggunaan pengawet adalah untuk menunjukkan efektivitas antimikroba yang ditambahkan ke dalam sediaan dosis ganda yang menggunakan air sebagai bahan dasar atau pembawa, yang dicantumkan pada label produk. Contohnya termasuk produk parenteral, serta tetes untuk mata, telinga, dan hidung.

Adapun fungsi pengawetan dalam suatu produk yaitu:

1. Memperpanjang masa simpan yaitu untuk menghambat pembusukan atau perubahan fisik dan kimia pada produk.
2. Mencegah kontaminasi mikroba yaitu melindungi produk dari pertumbuhan bakteri, jamur, atau ragi.
3. Menjaga kualitas produk: Mempertahankan rasa, aroma, warna, atau tekstur produk.

4.5 Uji Efektivitas Pengawet

Pengujian efektivitas bahan pengawet dilakukan untuk menentukan jenis dan jumlah yang tepat untuk digunakan dalam sediaan uji. Bahan pengawet adalah aditif yang umum

digunakan dalam produk obat, makanan, kosmetik, dan bahan alami, dengan tujuan memperpanjang masa simpan tanpa menutupi kekurangan dari sediaan tersebut (Yuliarti 2007)¹. Pengawet yang digunakan dapat berasal dari sumber alami atau sintesis/kimia. Contoh pengawet alami termasuk kunyit, jahe, dan laja, sedangkan pengawet sintetis meliputi senyawa seperti benzoat, sorbat, nipagin, dan banyak lagi.

Pemilihan pengawet sangat dipengaruhi oleh karakteristik fisik dan kimia sediaan yang akan diawetkan, serta tujuan spesifik penggunaan pengawet tersebut. Akibatnya, jenis dan konsentrasi pengawet yang digunakan dapat bervariasi secara signifikan. Sebagai contoh, penggunaan benzoat dalam minuman ringan dibatasi hingga maksimum 500 mg/kg. Semua ketentuan ini diatur oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melalui Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 722/Menkes/Per/88 yang telah mengalami revisi pada tahun 2001.

Konsentrasi pengawet yang diizinkan dalam peraturan pangan dirancang untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme kontaminan, bukan untuk memamatkannya. Oleh karena itu, sangat penting untuk menjaga populasi mikroba awal dalam bahan pangan yang akan diawetkan serendah mungkin melalui praktik penanganan dan pengolahan yang higienis. Jumlah bahan pengawet yang ditambahkan akan mengawetkan bahan pangan dengan muatan mikroba yang normal untuk suatu jangka waktu tertentu, tetapi akan kurang efektif jika dicampurkan ke dalam bahan-bahan pangan membusuk dan terkontaminasi secara berlebihan.

1. Syarat Pengujian Efektivitas Pengawet

Tujuan dari pengujian ini adalah untuk menilai efektivitas pengawet antimikroba yang ditambahkan. Jenis pengawet antimikroba tersebut harus dicantumkan pada label produk. Prosedur dan kriteria penerimaan yang terdapat dalam lampiran ini hanya berlaku untuk produk yang berada dalam kemasan asli dan tersegel, serta didistribusikan oleh produsen. Pengujian antimikroba tidak dilakukan pada kemasan itu sendiri, namun perlu diambil langkah-langkah pencegahan untuk memastikan bahwa bahan kemasan yang digunakan tidak bereaksi dengan pengawet.

2. Mikroba Uji

Gunakan kultur mikroba berikut: *Candida albicans* (ATCC No. 10231), *Aspergillus niger* (ATCC No. 16404), *Escherichia coli* (ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027), dan *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538).

MIKROBA UJI



Candida albicans

ATCC No. 10231

Candida albicans :
mikroorganisme fungi
golongan ragi (yeast)

Hidup sebagai
mikroorganisme komensal
dalam tubuh manusia

Dapat bersifat oportunistik
menyebabkan infeksi oral
dan infeksi vagina pada
manusia

MIKROBA UJI

Aspergillus niger adalah
fungi berfilamen

Bila sejumlah spora terhirup
masuk ke paru-paru, dapat
menyebabkan penyakit paru-
paru aspergillosis

Penyebab otomycosis



Aspergillus niger

ATCC No. 16404

MIKROBA UJI



Escherichia coli

ATCC No 8739

Bakteri yang hidup dalam usus mamalia

bakteri aerob dan facultative anaerobic, non-spore-forming, Gram-negative, rod-shaped. Fermentasi laktose dan menghasilkan gas dalam waktu 48 jam pada 35 °C (95 °F)

Penyebab infeksi saluran kemih, dan diare

MIKROBA UJI



Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram-negative, aerob, rod-shaped dan bergerak unipolar



Pseudomonas aeruginosa

ATCC No 9027

P. aeruginosa biasanya menginfeksi saluran pernapasan, saluran kemih, luka bakar, dan luka lainnya



A. Media Pertumbuhan dalam Uji Efektivitas Pengawet

1. Soybean-Casein Digest Agar [SCDA]

SCDA adalah media nutrisi umum yang digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif. Media ini sering digunakan dalam pengujian farmasi dan industri untuk memeriksa kontaminasi mikrobiologi. Media ini harus memiliki pH $7,3 \pm 0,2$ setelah sterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama waktu tertentu.

2. Sabouraud Dextrose Agar [SDA]

SDA adalah media selektif yang dirancang khusus untuk menumbuhkan fungi, seperti jamur dan ragi. Media ini sering digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis untuk mendeteksi infeksi fungi atau memantau kontaminasi fungi pada produk

farmasi. Memiliki pH asam ($5,6 \pm 0,2$) untuk menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga lebih selektif terhadap fungi.

3. Penyiapan Galur Uji

Gunakan suspensi mikroba standar, atau suspensi yang disiapkan melalui teknik pemeliharaan kultur dari lot benih, memastikan bahwa mikroba viabel untuk inokulasi tidak mengalami lebih dari lima kali transfer dari kultur induk. Kembangkan masing-masing mikroba uji, baik bakteri maupun jamur, secara terpisah sesuai petunjuk pada Tabel. Mikroba yang umum digunakan meliputi: *Candida albicans* (ATCC No. 10231), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC No. 16404), *Escherichia coli* (ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027), dan *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538).

B. Fertilasi Media

Media yang digunakan dalam prosedur ini harus memiliki kemampuan untuk mendukung pertumbuhan mikroba dengan baik. Setiap batch media siap pakai, serta setiap batch media yang dibuat dari media kering atau diracik sendiri berdasarkan komposisi tertentu, wajib menjalani pengujian kualitas. Pada media padat, jumlah koloni yang tumbuh harus mencapai setidaknya 50% dari nilai inokulum yang telah distandardisasi. Untuk inokulum segar yang baru disiapkan, laju pertumbuhan mikroba harus sebanding dengan laju pertumbuhan yang dihasilkan pada batch media yang telah diuji sebelumnya dan dinyatakan lolos.

C. Persiapan Mikroba Uji

Suspensi mikroba yang akan digunakan untuk inokulasi sebaiknya disiapkan sehingga mencapai konsentrasi sekitar 1×10^8 koloni per mL. Suspensi bakteri dan ragi harus digunakan dalam waktu 2 jam setelah persiapan, atau dapat disimpan hingga 24 jam pada suhu antara 2°C dan 8°C . Sementara itu, suspensi spora yang stabil dapat disiapkan dan disimpan pada suhu yang sama selama maksimal 7 hari. [Catatan: Perkiraan kadar inokula dapat dilakukan melalui pengukuran turbidimetri untuk mikroba uji, yang kemudian dapat dikonfirmasi dengan menghitung jumlah koloni pada angka lempeng.]

D. Metode Lempeng

1. Diambil 1 ml (30-300 koloni)
2. Dimasukkan dalam 2 cawan petri steril
3. Tambahkan 15-20 ml media SCDA bersuhu $45 - 50^\circ\text{C}$
4. Inkubasi 48-72 jam, kmdn amati adanya pertumbuhan koloni
5. Tetapkan CFU/ml dr setiap suspensi, gunakan untuk menentukan banyaknya inokula yang akan digunakan pada pengujian

E. Prosedur

- Siapkan Siapkan pengenceran 10^{-1} dengan cara menambahkan 1 mL dari sediaan cair ke dalam 9 mL larutan salin LP atau pengencer penetral lainnya. Setelah itu, lanjutkan dengan membuat pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} .
- Tambahkan sejumlah mikroba uji ke setiap pengenceran, aduk hingga merata, lalu masukkan

volume yang sesuai ke dalam lempeng media. Pastikan jumlah koloni yang tumbuh tidak melebihi 250 koloni per lempeng untuk bakteri dan ragi (dalam rentang 25 hingga 250 koloni), atau kurang dari 80 koloni per lempeng untuk *Aspergillus brasiliensis* (dalam rentang 8 hingga 80 koloni).

- Sebaiknya setiap lempeng diuji minimal dalam duplo, karena peningkatan jumlah replikasi dapat membantu mengurangi variabilitas dalam estimasi jumlah koloni.
- Dalam prosedur ini, sebagai kontrol positif, inokulum harus ditambahkan ke dalam salin. Pindahkan volume salin LP yang sama tanpa inokulum ke lempeng agar. Perkiraan pemulihan pertumbuhan koloni dari suspensi kontrol positif ini seharusnya mencapai setidaknya 50% dari rata-rata.
- Jika tidak tersedia penetral atau metode yang sesuai, dan jika kesesuaian metode memerlukan tingkat pengenceran yang signifikan, maka dapat digunakan inokulum dengan kepadatan lebih tinggi (misalnya 10^7 - 10^8), sehingga pengukuran reduksi sebesar 3 log dapat dilakukan.

F. Kategori Sediaan

Untuk keperluan pengujian, sediaan dibagi menjadi empat kategori. Kriteria efektivitas antimikroba pada sediaan bergantung pada metode pemberiannya. Formulasi yang mengandung pengawet diharapkan dapat memenuhi standar efikasi minimum, baik untuk kemasan dosis ganda maupun dosis tunggal.

Kategori	Uraian Sediaan
1	Injeksi, sediaan parenteral lain termasuk emulsi, sediaan tetes telinga, sediaan tetes hidung steril dan sediaan tetes mata yang dibuat dengan dasar atau pembawa air.
2	Sediaan topikal yang dibuat dengan dasar atau pembawa air, sediaan tetes hidung non-steril dan emulsi, termasuk sediaan yang dioleskan pada membran mukosa
3	sediaan oral selain antasida dibuat dengan dasar atau pembawa air
4	Antasida yg dibuat dengan pembawa air

Prosedur Uji Efektivitas

- Pengujian dapat dilakukan pada masing-masing dari lima wadah asli, asalkan volume sediaan di setiap wadah mencukupi dan wadah tersebut dapat ditusuk secara aseptik (menggunakan jarum dan alat suntik melalui tutup karet elastomerik). Alternatifnya, pengujian dapat dilakukan pada lima wadah bakteriologi bertutup steril dengan ukuran yang memadai untuk menampung volume sediaan yang akan dipindahkan.
- Setiap wadah diinokulasi dengan satu inokulum baku yang telah disiapkan dan dicampur secara homogen. Volume suspensi inokulum yang digunakan berkisar antara 0,5% hingga 1,0% dari total volume sediaan, untuk meminimalkan potensi pengaruh pada karakteristik sediaan. Kadar mikroba uji yang ditambahkan ke dalam sediaan (Kategori 1, 2, atau 3) harus mencapai konsentrasi akhir antara 1×10^5 dan 1×10^6 koloni per mL setelah inokulasi. Untuk

sediaan Kategori 4 (antasida), kadar akhir setelah inokulasi harus berada dalam rentang 1×10^3 hingga 1×10^4 koloni per mL.

- Konsentrasi awal mikroba viabel dalam setiap sediaan uji diperkirakan berdasarkan konsentrasi mikroba dalam inokulum baku, yang ditentukan menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT). Wadah yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu $22,5^\circ \pm 2,5^\circ \text{C}$. Sampel diambil dari setiap wadah pada interval waktu yang sesuai, sebagaimana tercantum dalam Tabel 3. Setiap perubahan yang terjadi selama interval tersebut diamati dan dicatat. Jumlah koloni dalam setiap sediaan uji ditentukan menggunakan prosedur ALT untuk interval waktu yang ditentukan, sesuai dengan lampiran Uji Batas Mikroba <51>. Angka Lempeng Total dihitung dengan menggunakan replikasi lempeng minimal, serta dengan mengambil rata-rata jumlah koloni sebelum menentukan jumlah koloni per mL. Jika menggunakan penyaring membran, lakukan duplikasi penyaringan membran untuk setiap perkiraan.
- Dengan menggunakan hasil perhitungan jumlah koloni per mL dari pengujian awal, hitung perubahan nilai koloni per mL dalam skala log₁₀ untuk setiap mikroba pada setiap interval pengujian. Perubahan ini dinyatakan sebagai log reduksi, yang merupakan selisih antara nilai log₁₀ koloni per mL pada konsentrasi awal dalam suspensi dan log₁₀ koloni per mL yang masih hidup pada saat pengukuran dilakukan.

Hasil Penafsiran Suatu pengawet dinyatakan efektif apabila:

- Pada saat hari ke -14 maka, jumlah bakteri viabel menurun hingga tidak melebihi 0,1% dari jumlah awal.
- Jumlah kapang dan juga ragi viabel pada hari ke -14 juga berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal.
- Selama sisa periode pengujian yang berlangsung selama 28 hari, jumlah setiap mikroba uji tetap stabil atau berada di bawah angka yang disebutkan sebelumnya.

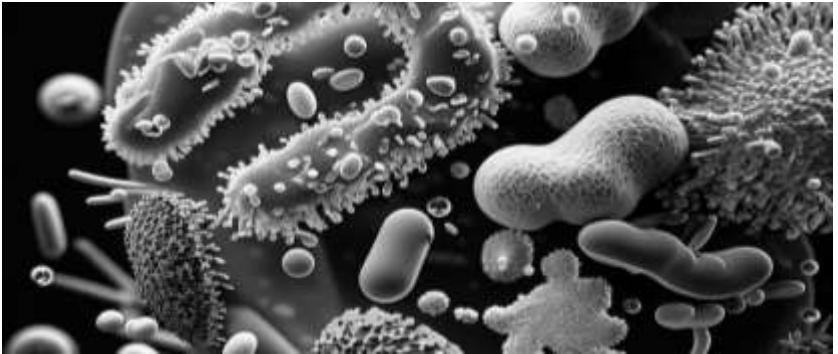
Kriteria Efektivitas Antimikroba

Kriteria untuk memenuhi persyaratan efektivitas antimikroba dianggap terpenuhi jika syarat yang tercantum dalam Tabel 3 dipatuhi (lihat Hasil Uji pada Ketentuan Umum): Tidak ada peningkatan yang melebihi 0,5 log₁₀ unit dibandingkan dengan nilai log mikroba awal.

Tabel 3. Kriteria untuk Mikroba Uji	
Untuk Sediaan Kategori 1	
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 1,0 log reduksi dari jumlah hitungan awal pada hari ke-7, tidak kurang dari 3,0 log reduksi dari hitungan awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat sampai dengan hari ke-28.
Kapang dan khamir	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-7, 14 dan 28.
Untuk Sediaan Kategori 2	
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 2,0 log reduksi dari jumlah hitungan awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat pada hari ke-14 sampai hari ke-28.
Kapang dan khamir	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-14 dan 28.
Untuk Sediaan Kategori 3	
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 1,0 log reduksi dari jumlah hitungan awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat pada hari ke-14 sampai hari ke-28.
Kapang dan khamir	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-14 dan 28.
Untuk Sediaan Kategori 4	
Bakteri, kapang dan khamir	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal pada hari ke-14 dan 28.

DAFTAR PUSTAKA

- Indonesia Kementerian Kesehatan RI. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. 2013. Farmakope Indonesia Edisi V jilid 1 dan jilid 2. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI
- Muvvadia, S. (n.d.). UJI EFEKTIVITAS PENGAWET ANTIMIKROBA.pptx. Scribd.
<https://id.scribd.com/presentation/323443624/UJI-EFEKTIVITAS-PENGAWET-ANTIMIKROBA-pptx>
- Pratiwi, Sylvia., T., 2008, Mikrobiologi Farmasi, Jakarta, Erlangga.
- Universitas Bakrie. (n.d.). Kenalan dengan 6 teknik pengawetan makanan. Diakses pada 11 Desember 2024, dari <https://bakrie.ac.id/articles/785-kenalan-dengan-6-teknik-pengawetan-makanan.html>
- Yuliarti, N. 2007. Awas Bahaya Di Balik Lezatnya Makanan. Yogyakarta: ANDI Yogyakarta.



BAB V

METODE UJI POTENSI ANTIBIOTIKA

5.1 Pengertian Antibiotik

Antibiotik, atau *antibiotics*, adalah kelas obat yang dirancang khusus untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh bakteri, baik pada manusia maupun hewan. Obat ini pertama kali ditemukan oleh Alexander Fleming pada tahun 1928, menandai sebuah revolusi dalam dunia Kesehatan. Istilah "antibiotik" sendiri berasal dari bahasa Yunani, yaitu "anti" (melawan) dan "bios" (kehidupan), yang secara harfiah berarti melawan kehidupan bakteri. Selain mengobati infeksi, antibiotik juga dapat digunakan untuk mencegah infeksi bakteri, yang dikenal sebagai profilaksis (CLSI 2024)¹.

Antibiotik merupakan jenis obat yang efektif dalam mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan dapat digunakan sebagai pencegahan dalam situasi tertentu. Dalam penggunaannya, sangat penting untuk mengikuti anjuran dokter, karena penggunaan yang tidak tepat dapat

menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik tersebut (EUCAST, 2004)⁵.

Fungsi antibiotik adalah jenis obat yang diresepkan oleh dokter guna melawan bakteri. Cara kerja antibiotik dilakukan dengan dua cara, yaitu menghentikan pertumbuhan dan membunuh bakteri. Seseorang membutuhkan antibiotik adalah ketika imunitas tidak kuat lagi untuk menghancurkan bakteri.

Ketika bakteri berkembang biak dan menghasilkan masalah kesehatan, pada dasarnya kekebalan tubuh sudah mulai bekerja. Tetapi, ketika komponen sistem imun dalam tubuh sudah tidak kuat lagi dalam menghancurkan bakteri, maka pada saat inilah tepatnya tubuh memerlukan antibiotik.

Antibiotik sendiri terbagi menjadi beberapa jenis yang cara kerjanya berbeda, tergantung dari jenisnya, mulai dari amoksisilin, sefalosporin, dan lain-lain. Jenis obat ini juga tersedia dalam beberapa bentuk, di antaranya yaitu, pil, kapsul, krim, losion, semprotan.

5.2 Penetapan antibiotik secara mikrobiologi

Potensi suatu antibiotik dapat dievaluasi melalui efek penghambatannya terhadap pertumbuhan mikroba dalam kondisi yang terkontrol. Terkadang, penurunan aktivitas antimikroba tidak dapat dideteksi dengan metode kimia. Sebagai alternatif, metode mikrobiologi dapat digunakan sebagai metode analisis standar untuk mengevaluasi potensi antibiotik (USP 2024)¹.

⁵ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2024). Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines

Penetapan antibiotik secara mikrobiologi merupakan metode untuk mengukur aktivitas antibiotik berdasarkan kemampuannya menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Prosedur ini penting untuk memastikan potensi dan kualitas antibiotik yang digunakan dalam terapi klinis. Metode mikrobiologi sering digunakan karena akurat dalam menilai aktivitas biologis suatu antibiotik.

1. Prinsip Penetapan Antibiotik

Prinsip utama penetapan antibiotik secara mikrobiologi adalah penghambatan pertumbuhan mikroorganisme uji oleh antibiotik yang diuji. Aktivitas ini dinilai berdasarkan:

- Zona hambat pertumbuhan (metode difusi).
- Konsentrasi antibiotik yang dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme (MIC/MBC pada metode dilusi).

2. Metode Penetapan

Metode penetapan antibiotik secara mikrobiologi terbagi menjadi dua kategori utama:

a. Metode Difusi

- *Disk Diffusion Assay* (Uji Cakram): Antibiotik diaplikasikan pada cakram kertas yang diletakkan di media agar yang diinokulasi mikroorganisme uji. Diameter zona hambat diukur untuk menilai aktivitas antibiotik.
- *Cylinder Plate Assay* (Metode Silinder): Silinder kecil ditempatkan di media agar yang diinokulasi

mikroorganisme, dan antibiotik ditambahkan ke dalam silinder. Zona hambat di sekitar silinder diukur.

b. Metode Dilusi

- Dilusi Cair: Seri konsentrasi antibiotik dibuat dalam media cair, lalu mikroorganisme diinokulasi. Konsentrasi antibiotik yang paling rendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*).
- Dilusi Padat: Antibiotik dicampurkan langsung ke media agar, dan mikroorganisme diinokulasi di permukaannya untuk menentukan MIC.

3. Mikroorganisme Uji

Mikroorganisme uji dipilih berdasarkan spektrum aktivitas antibiotik. Mikroorganisme yang umum digunakan:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus subtilis*
- *Candida albicans* (untuk antibiotik antijamur)

4. Parameter yang Dianalisis

- Zona Hambat: Pengukuran diameter zona jernih pada metode difusi.

- MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*): Konsentrasi terendah antibiotik yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme.
- MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*): Konsentrasi terendah antibiotik yang membunuh mikroorganisme.

5. Aplikasi Penetapan Antibiotik

- Penilaian kualitas produk antibiotik.
- Penentuan dosis terapeutik.
- Monitoring resistensi antibiotik pada mikroorganisme.

5.3 Pengertian uji potensi antibiotik

Uji potensi antibiotik adalah teknik untuk mengukur efek antibiotik terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji. Uji ini dilakukan untuk menentukan bioaktivitas atau potensi antibiotik, serta untuk membantu profesional kesehatan memilih pengobatan yang tepat untuk infeksi bakteri. Uji potensi antibiotik merupakan pengujian untuk menentukan aktivitas biologis antibiotik berdasarkan kemampuan menghambat atau membunuh mikroorganisme uji. Uji ini bertujuan memastikan kualitas, stabilitas, dan kesesuaian potensi antibiotik dengan standar farmakope (Higo et al, 2011)¹.

A. Tujuan uji potensi antibiotik

- a. Menjamin kualitas dan mutu antibiotik yang digunakan untuk pengobatan

- b. Mengevaluasi efektivitas antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri
- c. Menentukan kerentanan bakteri terhadap antibiotik tertentu
- d. Membantu para profesional dalam kesehatan untuk memilih dan memberikan pengobatan yang paling sesuai untuk infeksi bakteri

Uji potensi antibiotik dilakukan dengan metode yang meliputi penggunaan lempeng silinder, *petri dish*, dan pencadangan untuk mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri. Hasil uji akan diolah untuk menentukan potensi antibiotika melalui analisis regresi linier.

B. Prinsip uji potensi antibiotik

Uji potensi antibiotik adalah proses mengevaluasi efektivitas antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri. Prinsip-prinsip uji potensi antibiotik sebagai berikut :

- Penggunaan mikroorganisme
Uji potensi antibiotik menggunakan mikroorganisme untuk menentukan potensi antimikroba dari antibiotik.
- Pembiakan bakteri
Uji potensi antibiotik melibatkan pembiakan strain bakteri di hadapan berbagai antibiotik.
- Pengamatan zona hambat
Uji potensi antibiotik mengamati adanya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri.

- Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan diameter zona hambat bakteri dengan diameter zona hambat antibiotik.

Uji potensi antibiotik penting untuk menentukan kerentanan bakteri terhadap antibiotik tertentu. Uji ini juga membantu penyedia layanan dalam menyesuaikan pengobatan antibiotik yang terjamin sesuai dengan kebutuhan masing-masing pasien.

C. Metode uji potensi antibiotik

Sebagai standar untuk mengatasi keraguan tentang kemungkinan hilangnya aktivitas (potensi) antibiotik terhadap efek daya hambatnya pada mikroba. Metode umum yang digunakan sebagai berikut :

Metode lempang slinder :

- *Dics diffusion.*

Bakteri disebar pada agar, cakram antibiotik diletakkan, dan zona bening diukur untuk menentukan sensitivitas bakteri.

- *E-test.*

Metode E-Test menggunakan strip antimikroba pada agar bakteri. Titik hambatan menunjukkan KHM untuk menentukan sensitivitas bakteri

- *Ditch-plate technique.*

Metode ditch-plate membuat parit berisi antimikroba agar; zona hambat diukur untuk menilai efektivitasnya.

- *Cup-plate technique.*

Dilakukan pembuatan sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan

pada tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji.

- *Gradient-plate technique.*

Media agar dicampur antimikroba, diinkubasi, lalu mikroba uji digores dan dihitung panjang pertumbuhannya.

- Dilusi Cair

Dilusi cair Menggunakan beberapa tabung yang berisi media dan antibiotik yang diencerkan, diinkubasi, dan diamati kekeruhannya untuk menentukan minimum inhibitory concentration (MIC).

D. Alat dan bahan metode uji potensi antibiotik

1. Metode lempeng

- Cawan Petri yang terbuat dari kaca atau plastik sekali pakai (dengan ukuran 20x100 mm atau ukuran lain yang sesuai) dilengkapi dengan penutup.
- Silinder yang terbuat dari stainless steel atau porselen; dengan diameter luar $8 \pm 0,1$ mm, diameter dalam $6 \pm 0,1$ mm, dan tinggi $10 \pm 0,1$ mm.
- Larutan baku: Larutkan sejumlah baku pembanding yang sesuai dengan antibiotik yang akan diuji.
- Larutan sampel: Tentukan estimasi potensi per berat atau volume sampel. Pada hari pengujian, siapkan larutan persediaan serta larutan sampel yang telah diencerkan untuk setiap antibiotik, menggunakan pengencer akhir yang sama seperti pada larutan baku pembanding.

- Inokula: Suspensikan mikroba uji dari biakan segar pada agar miring atau biakan lain ke dalam 3 mL salin LP steril.

2. Metode tabung

Alat :

Tabung reaksi kaca atau plastik ukuran 16 x 125 mm atau 18 x 150 mm.

- 1 liter air, Natrium Hidroksida 1 N atau Asam Hidroklorida 1 N. Dapar, air murni, Salin LP, dan Formaldehida P dicampur dengan perbandingan 1:3.
- Larutan Baku: Larutkan sejumlah baku pembanding antibiotik yang sesuai, atau gunakan seluruh isi satu vial jika diperlukan, dalam pelarut yang sesuai.
- Larutan Sampel: Tentukan estimasi potensi berdasarkan berat atau volume sampel.
- Inokula: Suspensikan mikroba uji dari biakan segar pada agar miring atau dalam 3 mL salin LP steril.

E. Cara kerja metode uji potensi antibiotik

1. Cara kerja metode lempeng

Pengendalian Suhu :

- Gunakan peralatan yang telah terverifikasi dan memenuhi standar.
- Lakukan kalibrasi untuk memastikan rentang suhu yang akurat.

- Larutan Baku: Larutkan sejumlah baku pembanding yang sesuai dengan jenis antibiotik yang diuji.
- Encerkan hingga mencapai dosis yang ditentukan, kemudian simpan pada suhu antara 2-8 derajat Celsius.
- Simpan pengenceran dalam larutan persediaan, dengan minimal lima larutan untuk pengujian, menggunakan dosis bertahap dengan perbandingan umumnya 1:1,25.
- Gunakan pengenceran akhir yang dinyatakan setengah dan urutan.

Larutan Sampel :

- Siapkan larutan sediaan dan pengenceran larutan sampel setiap antibiotik dengan pengenceran akhir
- Encerkan larutan sediaan sampel dengan pengenceran akhir untuk dapat dosis.

Inokulasi :

- Suspensikan mikroba uji dari biakan segar yang terdapat pada agar miring atau biakan lainnya ke dalam 3 mL salin LP steril.
- Sebarkan suspensi tersebut secara merata di permukaan lapisan dari dua atau lebih lempeng.
- Inkubasi lempeng pada waktu dan suhu yang ditentukan, atau hingga pertumbuhan mikroba terlihat dengan jelas.

- Panen mikroba uji dari permukaan lempeng agar setelah proses inkubasi selesai.
- Encerkan sejumlah suspensi sediaan dengan salin LP steril, kemudian ukur transmitansi pada panjang gelombang 580 nm menggunakan spektrometer UV-Vis.
- Tentukan proporsi suspensi sediaan yang ditambahkan ke dalam media inokuler yang menghasilkan zona hambat.
- Jika transmitansi pengenceran melebihi 25%, normalkan dengan meningkatkan perbandingan mikroba uji.

2. Cara kerja metode lampung

Larutan baku :

- Larutkan sejumlah baku pembanding antibiotik yang sesuai, atau gunakan seluruh isi vial jika diperlukan, ke dalam pelarut yang sesuai.
- Encerkan larutan tersebut hingga mencapai dosis yang diinginkan.
- Simpan larutan pada suhu 2-8°C dan gunakan dalam jangka waktu yang telah ditentukan.
- Pada hari pengujian, siapkan lima atau lebih larutan uji dari larutan persediaan dengan peningkatan dosis secara berturut-turut, umumnya dalam perbandingan 1:1,25.
- Gunakan pengencer akhir yang sesuai untuk mendapatkan dosis tengah baku (S3).

Larutan sampel :

- Tentukan Tentukan estimasi potensi per unit berat atau volume dari sampel yang diuji.
- Pada hari pengujian, siapkan larutan persediaan dan larutan uji dengan menggunakan pengencer akhir yang sama seperti pada larutan baku pembanding.
- Encerkan larutan persediaan sampel dengan pengencer akhir untuk mencapai dosis yang setara dengan dosis tengah dari larutan baku.
- Suspensikan mikroba uji dari kultur segar dalam posisi miring atau dalam 3 mL salin LP steril.
- Gunakan butiran kaca untuk mempermudah proses pembuatan suspensi.
- *Enterococcus hirae* (ATCC 10541) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144) dikultur dalam media cair, bukan pada media agar.
- Sebarkan suspensi tersebut secara merata ke permukaan dua atau lebih lempeng agar, atau ke permukaan media agar dalam botol Roux, sehingga seluruh permukaan tertutup, dengan total volume 250 mL media.
- Inkubasi lempeng selama waktu dan suhu yang telah ditentukan, atau hingga pertumbuhan mikroba terlihat dengan jelas.
- Setelah proses inkubasi selesai, panen mikroba uji dari kultur lempeng agar atau botol Roux dengan volume sekitar 50 mL.

- Gunakan salin LP steril bersama batang kaca bengkok steril atau butiran kaca steril untuk membantu proses pemanenan.
- Pipet suspensi ke dalam wadah kaca steril dan sebut sebagai suspensi persediaan.
- Selama verifikasi metode, tentukan jumlah suspensi persediaan yang akan digunakan sebagai inokulum, dimulai dengan volume yang direkomendasikan.
- Siapkan juga larutan tambahan untuk uji pertumbuhan dan inkubasi pada suhu tertentu.
- Setelah inkubasi selesai, tabung yang berisi larutan baku dosis tengah seharusnya menunjukkan nilai serapan yang terukur. Tentukan durasi inkubasi dengan mengamati pertumbuhan berdasarkan dosis tengah larutan baku (S3).

DAFTAR PUSTAKA

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2024). Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines.
- Farmakope Indonesia. (2020). Edisi VI. Jakarta: BPOM.
- United States Pharmacopeia (USP). (2024). Antibiotics Microbial Assay. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.
- Hugo, W. B., & Russell, A. D. (2011). Pharmaceutical Microbiology. 8th Edition. Oxford: Blackwell Publishing.
- Cheesbrough, M. (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (2005). Microbiology: Concepts and Applications. New York: McGraw-Hill.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020). Microbiology. 10th Edition. New York: McGraw-Hill.
- Farmakope Indonesia. (2020). Edisi VI. Jakarta: BPOM.
- United States Pharmacopeia (USP). (2024). Antibiotics - Microbial Assay. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

- Hugo, W. B., & Russell, A. D. (2011). *Pharmaceutical Microbiology*. 8th Edition. Oxford: Blackwell Publishing.
- Cheesbrough, M. (2006). *District Laboratory Practice in Tropical Countries*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020). *Microbiology*. 10th Edition. New York: McGraw-Hill.

SINOPSIS BUKU

Mikrobiologi membahas secara mendalam tentang mikroorganisme, mencakup bakteri, virus, jamur, dan protozoa, serta peranannya dalam berbagai aspek kehidupan. Buku ini diawali dengan metode-metode uji yang akurat dan presisi, menghasilkan hasil uji yang bermutu dan siap pakai. Dilengkapi dengan cara pengerjaan yang mudah dipahami, serta alat dan bahan yang mudah ditemui.