

Purwanto
Fakultas Farmasi UGM



Pengujian Aktivitas terkait Mikroba



MACAM-MACAM METODE UJI ANTIMIKROBA

- METODE DIFUSI
 1. Metode disc diffusion (tes kirby-bauer)
 2. E-test
 3. Ditch-plate technique
 4. Cup-plate technique
 5. Gradient-plate technique
- METODE DILUSI
 1. Dilusi cair
 2. Dilusi padat

1. METODE DIFUSI DISK (KIRBY-BAUER)

- Bertujuan untuk menentukan aktivitas antibiotik atau agen antimikroba
- Disc (piringan) yang berisi obat, diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri, sehingga obat akan berdifusi ke dalam media agar tersebut
- Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme (zona hambatan)



PRINSIP KERJA DIFUSI DISK (KIRBY-BAUER)

- Media yang cocok dengan jenis bakteri yang akan dijadikan obyek uji disiapkan
 - Bakteri ditanam di media, bisa dengan cara :
 1. STREAK PLATE (bakteri dioleskan diatas permukaan media)
 2. POUR PLATE (bakteri dicampurkan dengan media)
 - lebih kuantitatif jumlah bakterinya
- Banyaknya bakteri yang ditanam harus distandarkan dengan pendekatan dari "kekeruhan"nya → standar Mc Farland

Pembuatan suspensi bakteri uji



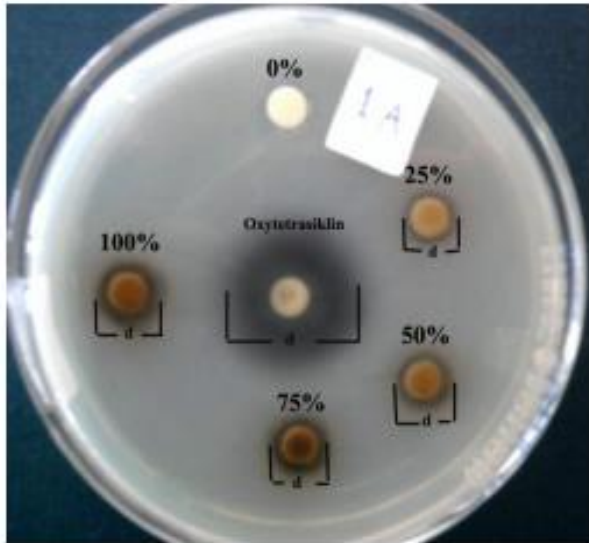
- Suspensi bakteri uji (*Staphylococcus aureus*) yg telah dibiakkan dalam 5 mL media Nutrient Broth selama semalam (12-16 jam)
- disamakan kekeruhannya dengan *Mc.Farland* 0,5.
- Apabila suspensi bakteri lebih keruh, maka diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% steril dan dihomogenkan.

Skala McFarland

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

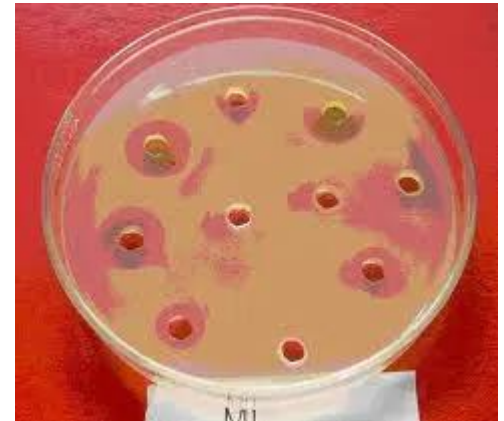
Panjang gelombang 600 nm

METODE DIFUSI DISK (KIRBY-BAUER)



- Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme (zona hambatan)
- Zona diukur dalam diameter (jarak dari ujung ke ujung melewati titik tengah disk), termasuk diameter disk nya

Atau dibuat sumuran



Video METODE DIFUSI DISK (KIRBY-BAUER)



- <https://youtu.be/sx1uDYSfINA>

Copy – Paste Link Youtube untuk melihat video

2. METODE DILUSI

METODE DILUSI : yaitu dengan mencampurkan AGEN ANTIMIKROBA (sampel uji) dengan MEDIA nya (sehingga dapat dibuat berbagai konsentrasi)

ada dua macam, tergantung medianya padat/cair

- DILUSI PADAT
- DILUSI CAIR

METODE DILUSI : DILUSI CAIR

- Media yang digunakan cair (dalam tabung atau microplate)
- Dibuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair lalu ditambahkan dengan mikroba uji.
- Larutan uji pada kadar terkecil yang terlihat jernih → ditetapkan sebagai KHM (MIC)
- Lalu dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan sampel uji dan mikroba). Yang tetap jernih ditetapkan sebagai KBM (MBC)

METODE DILUSI : DILUSI CAIR

Dengan Metode Dilusi → Dapat dihitung :

- KHM (Kadar Hambat Minimum) / MIC (Minimum Inhibitory Concentration)
- KBM (Kadar Bunuh Minimum) / MBC (Minimum Bactericidal Concentration)

Pada metode Difusi tidak sampai dapat mengetahui KHM dan KBM

https://www.youtube.com/watch?v=nxcU9_XyXsE



Penentuan KHM & KBM

Media Cair

+ seri pengenceran senyawa uji
+ mikroba Uji

900 μ L media NB

+ 100 μ L suspensi bakteri

+ 1000 μ L larutan uji ; kontrol akuades steril



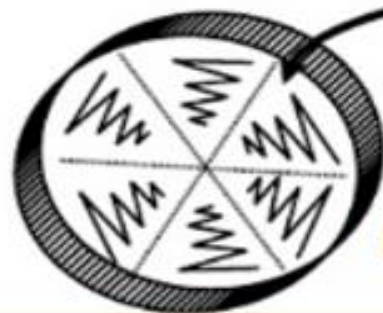
Makin encer

Inkubasi ada suhu
37°C selama 16-20 jam
dg digojok 120rpm
atau digojok pelan
sesering mungkin.



+ Jernih (pengenceran tertinggi : KHM)

- Kekeruhan



Inkubasi
37°C, 16-20 jam

Pengenceran tertinggi yang tetap steril : KBM

Contoh : Data Hasil Pengamatan



Label	Konsentrasi Amoksisilin (mg/mL)	KHM		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3
A	12,5	-	-	-
B	6,25	-	-	-
C	3,125	-	-	-
D	1,56	+	+	+
E	0,78	+	+	+

Jernih diberi tanda (-)

Keruh diberi tanda : (+)

Berapa KHM dan KBM Amoksisilin ?



METODE DILUSI : DILUSI PADAT

- Media yang digunakan padat (pakai petri-petri)
- Agen antimikroba (sampel uji) dilarutkan pada medianya
- Mikroba uji ditanam secara streak plate
- Keuntungannya : Satu media bisa dipakai untuk beberapa mikroba uji.

Uji aktivitas Antifungi



- Media berbeda dg uji antibakteri
- Media yg umum digunakan: Sabouraud Dextrose Liquid/Solid, Czapek Dox.
- Uji serupa dg uji antibakteri, yaitu spora fungi / miselium fungi dilarutkan pada larutan uji, selanjutnya pada interval waktu tertentu disubkultur pada media yang sesuai. Setelah diinkubasi, pertumbuhan fungi diamati.



UJI BIOAUTOGRAFI

UJI BIOAUTOGRAFI

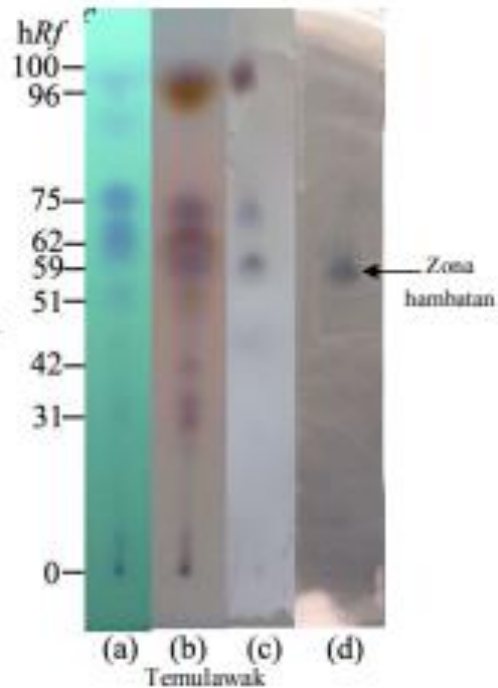
- Metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, dan antivirus.
- Keuntungan : dapat untuk mengetahui senyawa mana yang poten sbg antimikroba dan dapat segera diisolasi
- Kerugian : tidak dapat untuk menentukan KHM dan KBM
- Ada dua macam : Bioautografi langsung dan Overlay



Bioautografi langsung

- Dengan menyemprot plat KLT dengan suspensi mikroba, atau
- dengan menyentuhkan plat KLT pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroba, diinkubasi.
- Letak senyawa aktif tampak sebagai area jernih dengan latar belakang keruh

Bioautografi langsung



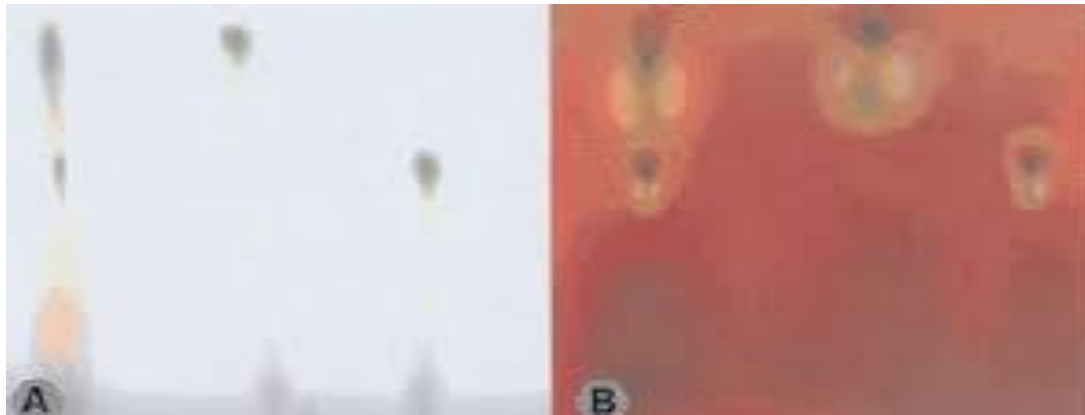
Aktivitas Antibakteri Minyak atsiri temulawak thp *S.mutans* (Irianto, 2010)

Sampel	hRf	Perubahan Warna			Diameter hambatan (mm)	Kemungkinan senyawa
		UV254nm	Anisaldehyda asam sulfat	FeCl ₃		
Temulawak	31	√	Biru	-	-	Terpenoid
	42	-	Cokelat	-	-	Terpenoid
	51	√	Kuning	-	-	Tidak diketahui
	59	-	Biru	Ungu	4,0	<i>Xanthorrhizol</i>
	62	√	Merah	-	-	Terpenoid
	75	√	Biru	Biru	-	Terpenoid/Fenolik
	96	√	Kuning	Ungu	-	Fenolik

Keterangan : √ = terjadi pemataman ; EPMS = etil *p*-metoksi sinamat
 Fase diam = silika gel F₂₅₄ ; fase gerak = toluena : etil asetat (93:7%^{v/v})

Bioautografi overlay

- Dengan menuangkan media agar yang telah dicampur dengan mikroba uji di atas permukaan plate KLT, ditunggu padat, diinkubasi. Area hambatan dilihat dengan menyemprot Tetrazolium klorida (tampak sebagai area jernih dengan latarbelakang ungu)





**PEMANFAATAN MIKROORGANISME
SEBAGAI INDIKATOR UJI
PADA PEMERIKSAAN KUALITAS BAHAN PANGAN**



PENGUJIAN KUALITAS PANGAN

- Plate Count (Hitungan Cawan/Pemeriksaan Angka Kuman)
- Uji untuk menampakkan adanya bakteri choliform (MPN)
- Teknik saringan membran



UJI MPN CHOLIFORM (MOST PROBABLE NUMBER)



PENGUJIAN KUALITAS PANGAN : MPN

Uji untuk mendeteksi bakteri Choliform

Choliform: bakteri golongan Coli, yang ditandai dengan kemampuan bakteri itu memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas pada media BGLB (Brilliant green Lactose Broth) pada inkubasi 37°C 48 jam. Contoh : Genus Klebsiella, Enterobacter, Eschericia

E Coli: *Eschericia Coli* = salah satu grup Choliform, Bakteri Gram Negatif batang yang memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas, memproduksi indol

MPN CHOLIFORM

Terdiri atas 3 langkah berurutan :

- Uji Pendugaan (*presumptive test*)
- Uji Penetapan (*confirmed test*)
- Uji Lengkap (*completed test*)

MPN CHOLIFORM

Uji Pendugaan (*presumptive test*)

Media : tabung LB (lactose Broth)

1. 5 tabung LB : 10 ml sampel

2. 5 tabung LB : 1 ml sampel

3. 5 tabung LB : 0,1 ml sampel

→ Inkubasi 48 jam suhu 37°C

→ Adanya gas → fermentasi laktosa → dugaan adanya E Coli.

MPN CHOLIFORM

Uji Pendugaan (*presumptive test*)

→ Jumlah bakteri : Lihat tabel

Positif gas → 1:0:0 → jumlah per 100 ml : 2

Positif gas → 2:3:0 → jumlah per 100 ml : 12, dst

Tapi fermentasi laktosa mungkin juga karena bakteri yang lain →
perlu uji penetapan apakah benar E Coli atau bukan

TABEL MPN

TABEL MPN 333 MENURUT FORMULA THOMAS

Jumlah TB. (+) Gas pd penanaman			Index MPN per 100 ml	Jumlah TB. (+) Gas pd			Index MPN Per 100 ml
3X10 ml	3X1 ml	3 X 0,1 ml		3 X 10 ml	3X1ml	3 X 0,1 ml	
0	0	0	0	2	0	0	10
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	19
0	0	3	9	2	0	3	24
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	20
0	1	2	9	2	1	2	25
0	1	3	12	2	1	3	30
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	26



UJI ALT (ANGKA LEMPENG TOTAL)



ANGKA KUMAN / ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT)

- Bertujuan untuk menetapkan cemaran bakteri yang terdapat dalam sediaan makanan, minuman, kosmetika, obat atau obat tradisional.
- Berguna untuk mengetahui berapa banyak bakteri (dari semua tipe) dalam sampel
- Uji angka lempeng total dapat dilakukan dengan dua teknik yaitu teknik cawan tuang (*pour plate*) dan teknik sebaran (*spread plate*).



ANGKA KUMAN / ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT)

- Pada prinsipnya dilakukan pengenceran terhadap sediaan yang diperiksa kemudian dilakukan penanaman pada media lempeng agar.
- Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lempeng agar dihitung setelah inkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.
- Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30-300. Angka lempeng total dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengencer.

ANGKA KUMAN / ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT)

Plate nomer	Pengenceran	Jumlah koloni	Angka kuman/ gram - ml
1.	1 X	465	
2.	10 X	271	2700
3.	100 X	39	3800
4.	1000 X	8	
kontrol		1	

$$\begin{aligned} &= \frac{(271-1) \times 10 + (39-1) \times 100}{2} = \frac{2700 + 3800}{2} \\ &= 3250/\text{gram-ml.} \end{aligned}$$



Selamat belajar