

## TINJAUAN ARTIKEL : UJI MIKROBIOLOGI

## ARTICLE REVIEW : MICROBIOLOGICAL TEST

**Ahsana Nurul<sup>1</sup>, Iwan Setiawan<sup>1\*</sup>, Delia Yusa<sup>1</sup>, Dhea Trisna<sup>1</sup>, Nur Halisa<sup>1</sup>, Odilia Putri<sup>1</sup>, Oktavia Ekawati<sup>1</sup>, Yuliana Umi<sup>1</sup>, Ze Fanya<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi S-1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional

Email Korespondensi: \*[iwan.setiawan02@gmail.com](mailto:iwan.setiawan02@gmail.com)

Riwayat Artikel: **Submit** 19-07-2023, **Diterima** 20-09-2023, **Terbit** 15-10-2023

---

### Abstrak

Mikroorganisme seperti bakteri adalah salah satu penyebab penyakit yang banyak diderita oleh pasien. Bakteri dapat dengan mudah menjangkau makanan atau sediaan farmasi selama proses produksimaka penting dilakukan pengujian antibakteri pada suatu produk untuk menjamin keamanan dan mutu produk. Aktivitas suatu antibakteri dapat diamati dengan beberapa metode seperti difusi, dilusi dan *broth microdilution*. Tujuan dari *review* artikel ini untuk memberikan informasi mengenai uji mikrobiologi yang dapat digunakan untuk melakukan menguji aktivitas antibakteri. Metode yang digunakan yaitu studi pencarian literatur jurnal internasional secara online dengan menggunakan situs pencarian online seperti *Google scholar*, *Pubmed* dan *Scopus*. Berbagai penelitian yang ditemukan, diketahui bahwa uji aktivitas antibakteri terdiri atas tiga macam. Pertama metode difusi yang terdiri atas difusi cakram dan sumuran. Tujuan metode difusi yaitu untuk mengetahui sensitivitas dan resistensi suatu bakteri terhadap antibiotik. Kedua metode dilusi yang terdiri atas dilusi agar solid dan dilusi cair. Tujuan metode dilusi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Ketiga *broth* mikrodilusi yang juga efektif digunakan untuk menentukan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Dalam uji aktivitas antibakteri akan muncul zona hambat bakteri yang akan diukur sebagai hasil. Ukuran diameter zona hambat akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi antibiotik.

**Kata kunci:** Antibakteri; Difusi; Dilusi; *broth mikrodilution*

### Abstract

*Microorganisms such as bacteria are one of the causes of disease that many patients suffer. Bacteria can easily reach food or pharmaceutical preparations during the production process, so it is important to carry out antibacterial testing on a product to ensure product safety and quality. The activity of an antibacterial can be observed by several methods such as diffusion, dilution and broth microdilution. The purpose of this article review is to provide information regarding microbiological tests that can be used to test antibacterial activity. The method used is an online search for international journal literature using online search sites such as Google scholar, Pubmed and Scopus. Various studies have found, it is known that the antibacterial activity test consists of three types. The first diffusion method consisting of a diffusion disc and wells. The purpose of the diffusion method is to determine the sensitivity and resistance of a bacterium to antibiotics. The two dilution methods consist of solid dilution and liquid dilution. The purpose of the dilution method is to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Killing Concentration (MBC). The effective microdilution of the three broths was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Kill Concentration (MBC). In the antibacterial activity test a bacterial*

*inhibition zone will appear which will be measured according to the results. The size of the diameter of the inhibition zone will increase with increasing concentration of antibiotics.*

**Keywords:** Antibacterial; Diffusion; Dilution; Broth Microdilution

## Pendahuluan

Infeksi merupakan salah satu masalah serius dalam bidang kesehatan. Penyebab infeksi adalah bakteri. Pertahanan diri bakteri dibuat dengan membentuk lapisan lender yang disebut lapisan *biofilm*. Sebanyak 80% kejadian infeksi disebabkan adanya *biofilm* bakteri yang dianggap sebagai mediator utama penyebab penyakit (Nagy *et al.*, 2018). Bakteri ada secara alami dan berada di sekitar lingkungan kita, oleh karena itu bakteri dapat dengan mudah menjangkau makanan yang kita konsumsi atau sediaan farmasi yang kita gunakan selama proses produksi dan pengemasannya. Bakteri dapat bertahan hidup di bawah pengaruh kondisi yang buruk ataupun ekstrim (Gonelimali *et al.*, 2018). Dengan demikian perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri pada suatu produk baik makanan, minuman, maupun sediaan farmasi untuk menjamin keamanan dan mutu produk.

Aktivitas suatu antibakteri dapat diamati dengan beberapa metode yaitu difusi, dilusi dan *broth* mikrodilusi. Metode difusi terdiri dari difusi cakram dan difusi sumuran. Metode dilusi terdiri dari dilusi agar solid dan dilusi cair. Tujuan metode difusi secara umum untuk mengetahui sensitivitas suatu bakteri terhadap antibiotik. Sedangkan metode dilusi secara umum memiliki tujuan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Balouiri *et al.*, 2016).

Penulisan *review* artikel ini memiliki tujuan untuk memberikan informasi mengenai uji mikrobiologi yang dapat digunakan untuk melakukan pengujian aktivitas antibakteri untuk mendukung keperluan suatu penelitian.

## Metode Penelitian

Dalam penyusunan *review* artikel ini menggunakan teknik studi pencarian literatur jurnal internasional secara online dengan menggunakan situs pencarian online seperti *Google scholar*, *Pubmed* dan *Scopus*. Menggunakan publikasi jurnal internasional.

## Hasil dan Pembahasan

### *Difusi Cakram*

Difusi cakram adalah prosedur yang ditetapkan, akurat, dan terstandarisasi, yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan laboratorium diagnostik. EUCAST dan CLSI merekomendasikan waktu inkubasi 16–18 jam untuk sebagian besar spesies/kombinasi obat Metode difusi cakram dari *Kirby Bauer* telah dibakukan dan merupakan alternatif yang layak untuk metode *broth*. (Hombach *et al.* 2018).

Prinsip uji difusi cakram yaitu dengan mengoleskan inokulum bakteri kira-kira  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL ke permukaan lempeng agar Mueller-Hinton dengan diameter 150 mm. Disiapkan 12 *disk* antibiotik dengan konsentrasi tetap dan ditempatkan pada permukaan agar yang telah diinokulasikan bakteri uji. Media dalam petri diinkubasi kurang lebih selama 16-24 jam pada suhu 35°-37°C sebelum penentuan hasil. Kemudian zona hambat yang terbentuk disekitar cakram antibiotik diukur. Ukuran zona hambat berhubungan dengan kerentanan laju difusi obat melalui media agar dan isolat. Diameter zona hambat masing-masing antibiotik diinterpretasikan menggunakan kriteria yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dan *National Commite for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) (Jorgensen & Ferraro 2009). Hasil uji difusi cakram bersifat "kualitatif", yaitu kategori kerentanan (rentan, menengah, atau resisten) berasal dari uji KHM. Namun, beberapa sistem pembaca zona yang tersedia secara komersial mengklaim dapat menghitung perkiraan KHM dengan beberapa organisme dan antibiotik dengan membandingkan ukuran zona hambat dengan kurva standar dari spesies organisme dan algoritma suatu obat (Jorgensen and Ferraro 2009).

Difusi cakram memiliki banyak kelebihan, seperti ekonomis, fleksibel dan memungkinkan pertumbuhan organisme yang

visibel. Manfaat lain adalah memungkinkan melakukan pengujian *direct susceptibility* (DST)(Coorevits, et.al., 2015). Kelemahan dari difusi cakram adalah perlu membayar biaya tenaga kerja karena dilakukan pengukuran dan dokumentasi data secara manual, serta memberikan hasil yang bervariasi (Hombach, et.al., 2013)

### ***Difusi Sumuran***

Salah satu metode yang banyak digunakan adalah metode difusi sumuran. Metode ini untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba yang biasanya terdapat pada tanaman. Prinsip Metode sumuran yaitu permukaan pelat agar diinokulasi dengan inokulum mikroba. Kemudian, dibuat lubang dengan diameter 6-8 mm secara aseptis menggunakan alat sumuran. Lubang sumuran dibuat sesuai dengan tujuan penelitian. Lubang sumuran tersebut ditujukan untuk larutan uji, larutan kontrol positif, dan larutan kontrol negatif. Sebanyak 20-100  $\mu$ L larutan uji dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam lubang sumuran. Kemudian plat agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam atau dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Setelah itu diameter zona hambat diamati dan diukur. Agen antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan mikroba yang diuji (Balouiri et al., 2016). Metode difusi sumuran umumnya digunakan untuk penentuan KHM dalam media padat. Difusi antibiotik ke media agarosa mengarah pada penghambatan bakteri dengan menghasilkan zona bening di sekitar petri. Diameter zona bening akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi antibiotik.

Metode difusi sumuran bersifat kualitatif, yang mana berarti tidak mengukur jumlah senyawa yang terdifusi dalam media agar. Metode Difusi sumuran memiliki kelebihan yaitu sederhana dalam pelaksanaannya, ekonomis, lebih sensitif dan lebih nyaman daripada varian disk untuk pengujian kationik senyawa. Metode difusi sumuran lebih baik dari metode difusi cakram karena sampel yang dimasukan pada lubang sumuran akan mengalami proses osmosis sehingga menyebabkan metode ini lebih efektif dalam menghambat bakteri. Metode difusi sumuran memiliki kelemahan yaitu perlu uji kualitatif, tingkat reproduktifitas yang

buruk dan sisa agar yang mengganggu pengujian (Bubonja-Sonje M *et al.*, 2020)

### ***Dilusi Cair / Serial Dilusi***

Metode serial dilusi sering digunakan di rumah sakit, fasilitas kesehatan masyarakat, virologi, imunologi, mikrobiologi, industri farmasi, dan *food protection* untuk mendeteksi mikroorganisme yang dapat tumbuh pada media bakteriologis dan berkembang menjadi koloni (Zaini, 2021). Tujuan dari metode serial dilusi adalah untuk memperkirakan konsentrasi suatu organisme, bakteri atau virus dari sampel yang tidak diketahui dengan cara menghitung jumlah koloni yang dibiakan yang kemudian akan diukur (Zaini, 2021) dan untuk memperkecil jumlah bakteri yang terbentuk dalam larutan suspensi. Perkiraan jumlah mikroba dipengaruhi oleh tingkat pengenceran. Sampel yang digunakan yaitu perbandingan 1 : 9 untuk hasil pengenceran pertama serta selanjutnya, sehingga pengenceran selanjutnya mengandung sebanyak 1/10 sel.

Prinsip metode dilusi cair adalah adanya pengenceran terhadap sampel uji sehingga menghasilkan beberapa konsentrasi pengenceran. Setelah itu konsentrasi masing-masing sampel uji akan ditambahkan dalam suspensi bakteri pada media. Metode serial dilusi memiliki kelebihan yaitu kontak antara sampel uji dengan bakteri menjadi lebih tinggi karena permukaan media yang luas, bakteri dapat diuji dengan menggunakan satu titik metode ini lebih ekonomis dan pelaksanaannya mudah. Sedangkan untuk kelemahannya yaitu dengan adanya series pengenceran mengakibatkan konsentrasi sampel uji yang didapatkan akan terbatas pada konsentrasi tertentu saja sehingga kemungkinan pada konsentrasi rendah dapat menciptakan daya hambat. Selain itu juga memiliki resiko tinggi terjadinya kesalahan pada saat pendistribusian sampel yang mengakibatkan hasil yang kurang akurat. (Hasil *et al.*, 2022),

### ***Dilusi Agar Solid***

Metode dilusi padat merupakan prosedur yang dilakukan pada media agar yang telah berisi inokulasi bakteri dan antimikroba. Hasil ini dianggap sebagai yang biasa digunakan untuk penentuan KHM untuk kombinasi bakteri/antimikroba uji. Uji

kerentanan antibakteri dan antijamur lebih sesuai menggunakan teknik dilusi agar. Metode pengenceran agar lebih disukai daripada dilusi cair untuk penentuan KHM. Organisme yang rentan seperti golongan *anaerob* dan spesies *Helicobacter* sering menggunakan metode pengenceran difusi agar sebagai metode standar. Metode ini juga telah digunakan untuk kombinasi obat-obat antijamur terhadap *Candida sp*, *Aspergillus*, *Fusarium*, dan *dermatofita* (Wiegand *et. al.*, 2008).

Metode dilusi agar memiliki prinsip kerja dengan menggunakan pengenceran tabung untuk uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang ditunjukkan dengan tumbuhnya koloni bakteri. Metode dilusi agar memiliki kelebihan yaitu efisien dalam penggunaan media, *replicator* inokulum yang diproduksi secara komersial tersedia dan dapat mentransfer antara 32 dan 60 inokula bakteri yang berbeda ke setiap lempeng agar dan memiliki potensi untuk meningkatkan identifikasi titik akhir KHM dan memperluas rentang konsentrasi antibiotik. Sedangkan kelemahannya yaitu sulitnya memastikan suhu agar dan bakteri kemungkinan tidak memberikan hambatan secara maksimal bila agar tidak bersuhu 45-50°C, titik akhir tidak selalu mudah dibaca dan kemurnian inokulum juga tidak mudah diverifikasi dan jika tidak diotomatisasi, metode ini sangat melelahkan dan membutuhkan sumber daya ekonomi dan teknis yang besar (Wiegand *et. al.*, 2008).

### **Broth Microdilusi**

*Broth Microdilution* (BMD) merupakan referensi metode yang dapat digunakan untuk menguji kelompok bakteri anaerob. Umumnya terdapat dua kit BMD yaitu *MICRONAUT-S Anaerobes MIC test* dan *Thermo Scientific Sensititre Anaerob MIC Plate*. Kedua kit ini dapat digunakan untuk memvalidasi bakteri kelompok *Bacteroides* spp (Baquer *et al.*, 2021). Uji antimikroba untuk menentukan nilai KHM secara *Broth Microdilution* (BMD) dilakukan dengan menggunakan 2 instrumen. Pada instrumen pertama yang menggunakan kit *MICRONAUT-S Anaerobes MIC test* dilakukan dengan memasukkan 13 antibiotik kedalam kit. Kemudian setiap isolat, diencerkan dalam tabung *broth MICRONAUT Wilkins-Chalgrenm* yang telah direduksi sebelumnya. Dibandingkan kekeruhannya menggunakan

standar suspensi Mc Farland 0,5. Lalu diambil 100 µL dari pengenceran dan diinokulasikan ke dalam masing-masing sumur. Pengujian antimikroba pada instrumen kedua menggunakan kit *Thermo Scientific Sensititre Anaerob MIC Plate*, dilakukan dengan memasukkan 14 antibiotik kedalam plate. Diencerkan masing-masing bakteri kedalam *Brucella* yang telah direduksi dalam Broth agar. Sejumlah 100 µL dipipet dari pengenceran dan diinokulasikan ke dalam masing-masing sumur (Baquer *et. al.*, 2021)

*Broth Microdilution* memiliki kelebihan antara lain pemeriksaan hasil yang akurat, instrumen lebih sederhana, hemat waktu, dan memiliki sensitifitas dan kepekaan yang lebih tinggi dibanding metode dilusi agar dan difusi cakram (Rennie *et. al.*, 2012). Walaupun *Broth Microdilution* (BMD) memiliki kelebihan yang akurat dalam pemeriksaan hasil KHM nya, namun BMD juga memiliki kekurangan yaitu tidak dapat digunakan sebagai kontrol kualitas dalam penentuan KHM terhadap bakteri *E.coli* (Matuschek *et al.*, 2018).

### **Simpulan**

Uji Aktivitas antibakteri terdiri atas 3 metode yaitu metode difusi, dilusi dan broth mikrodilusi. Metode difusi terdiri atas difusi cakram dan sumuran yang biasa digunakan untuk menguji sensitivitas mikroba terhadap suatu antibiotik. Sedangkan metode dilusi terdiri atas dilusi cair dan agar solid yang biasa digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Broth mikrodilusi yang juga efektif digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Untuk penggunaan setiap metode uji didasarkan dan disesuaikan dengan kebutuhan penelitian yang akan dilakukan

### **Daftar Pustaka**

Baquer, F., Ali Sawan, A., Auzou, M., Grillon, A., Jaulhac, B., Join-Lambert, O., & Boyer, P. H. (2021). Broth Microdilution and Gradient Diffusion Strips vs. Reference Agar Dilution Method: First Evaluation for Clostridiales Species Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antibiotics*, 10(8), 975.

- Bubonja-Šonje M, Knezević S, Abram M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 300-311.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38, 369-380.
- Coorevits, L., J. Boelens, and G. Claeys. 2015. 'Direct Susceptibility Testing by Disk Diffusion on Clinical Samples: A Rapid and Accurate Tool for Antibiotic Stewardship'. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34(6):1207–12. doi: 10.1007/s10096-015-2349-2.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), 343-349.
- Ginovyan, M., Petrosyan, M., & Trchounian, A. (2017). Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-9.
- Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. R. (2018). *Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms*. 9(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Guideline 2.1. — Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. 'LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING.' OIE Terrestrial Manual 2012, Guideline 2.1, Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing, [Http://www.Oie.Int/Enour-Scientific-Expertise/Reference-Laboratories/List-of-Laboratories/](http://www.oie.int/Enour-Scientific-Expertise/Reference-Laboratories/List-of-Laboratories/), n.d.
- Hasil, B., Ulkus, P., Sari, R., Apridamayanti, P., & Pratiwi, L. (2022). Efektivitas SNEDDS Kombinasi Fraksi Etil Asetat Daun Cengkokodok (Melasthoma). 7(2), 105–113.
- Hombach, Michael, Marion Jetter, Nicolas Blöchliger, Natalia Kolesnik-Goldmann, Peter M. Keller, and Erik C. Böttger. 2018. 'Rapid Disc Diffusion Antibiotic Susceptibility Testing for *Pseudomonas Aeruginosa*, *Acinetobacter Baumannii* and *Enterococcus Spp.*' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(2):385–91. doi: 10.1093/jac/dkx404.
- Hombach, Michael, Reinhard Zbinden, and Erik C. Böttger. 2013. 'Standardisation of Disk Diffusion Results for Antibiotic Susceptibility Testing Using the Sirscan Automated Zone Reader'. *BMC Microbiology* 13(1):225. doi: 10.1186/1471-2180-13-225.
- Jorgensen, James H., and Mary Jane Ferraro. 2009. 'Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices'. *Clinical Infectious Diseases* 49(11):1749–55. doi: 10.1086/647952.
- King, T., Dykes, G., & Kristianti, R. (2008). Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, 91(6), 1423-1429.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of

- diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.
- Nagy, E., Boyanova, L. and Justesen, U.S. (2018) 'How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories', *Clinical Microbiology and Infection*, 24(11), pp. 1139–1148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008>.
- Bubonja-Šonje, M., Knežević, S., & Abram, M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 71(4), 300-311.
- Matuschek, E., Ahman, J., Webster, C., & Kahlmeter, G. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin—evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(8), 865-870.
- Rennie, R. P., Turnbull, L., Brosnikoff, C., & Cloke, J. (2012). First comprehensive evaluation of the MIC evaluator device compared to Etest and CLSI broth microdilution for MIC testing of aerobic Gram-positive and Gram-negative bacterial species. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1147-1152.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175.
- Zaini, W. S. (2021). *Antibacterial Effectiveness of Morinda Citrifolia L . Extract on Salmonella Typhi Bacteria Using Serial Dilution Method with 15 - 60 Minutes Contact Time*. 13(4), 839–843.