

Pengendalian pertumbuhan mikrobial



DISKUSI

1. Sebutkan Faktor yg berpengaruh pd aktivitas antimikrobia
2. Jelaskan Pengendalian dengan agensia fisik
 - a) Penggunaan suhu tinggi
 - b) Penggunaan suhu rendah
 - c) Radiasi
 - d) Filtrasi
 - e) Desikasi
3. Jelaskan Pengendalian mikrobial dengan agensia kimia

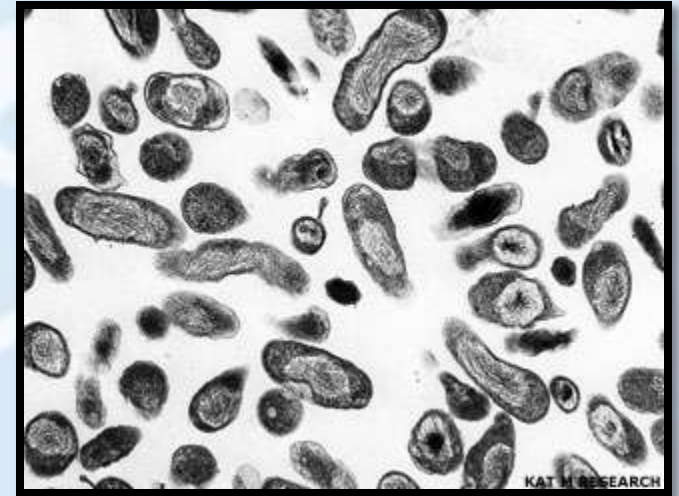
Topik Bahasan

1. Dasar pengendalian
2. Pengendalian dg agensia fisikawi
3. Pengendalian dg agensia kimiawi



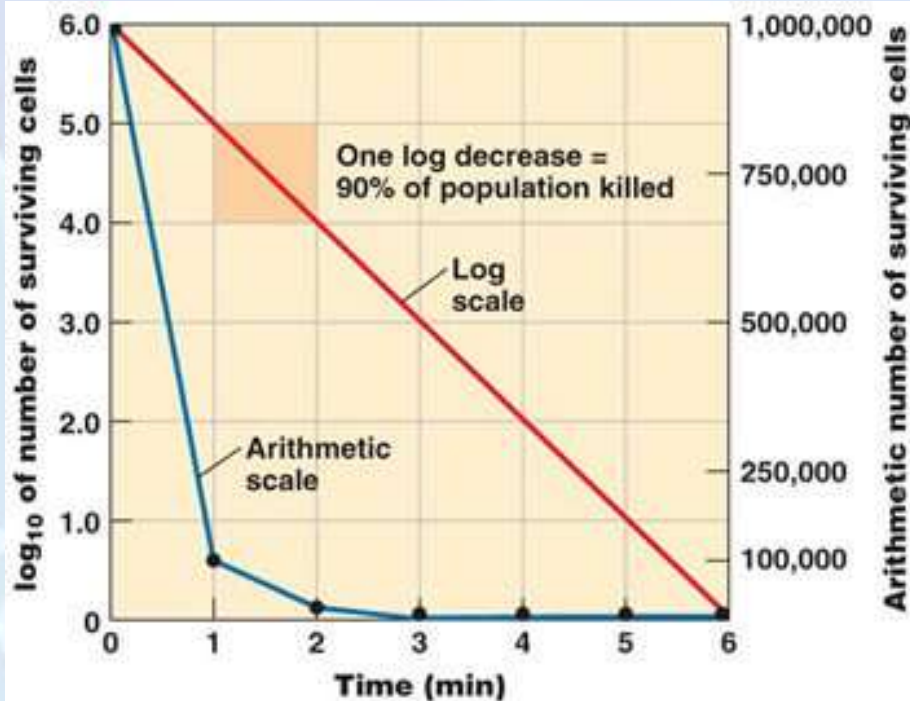
Dasar pengendalian

- Mematikan mikrobia :
 - Mati total → disebut **STERILISASI**
 - Metoda dengan :
 - Panas
 - Radiasi
 - Bahan kimia
 - Filtrasi
- Menghambat pertumbuhan mikrobia :
 - Bahan antimikrobia (= Bahan kimia)
 - Bahan **MIKROBIOSIDAL** : membunuh mikrobia.
 - Bahan **MIKROBIOSTATIK** : menghambat pertumbuhan

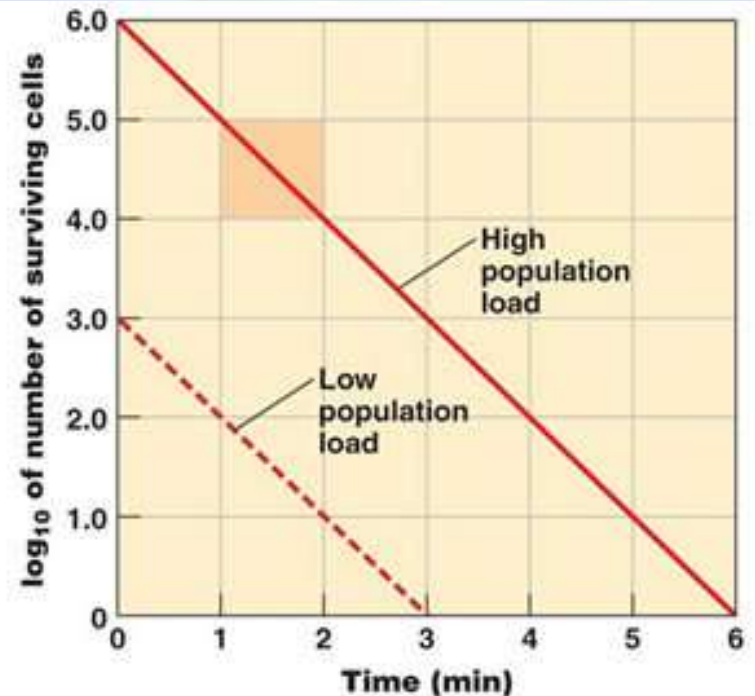


Kematian mikrobial

- Mikrobia tak langsung mati setelah kontak dg agensia antimikrobia
- Kematian terjadi dg kecepatan konstan
- Pola kematian=exponential death



(a) The data are plotted logarithmically (red line) and arithmetically (blue line). This graph has been constructed so that the log and arithmetic scales coincide at two points: at 1 cell and 1 million cells. In this example, the cells are dying at a constant rate of 90% each minute. Note that the attempt to plot the population arithmetically is not practical; at 3 minutes the population of 1000 cells would be only a hundredth of the graphed distance between 100,000 and the baseline. Logarithmic numbers are needed to graph this properly, although at the cost of our easy perception of the situation.



(b) The effect of high or low initial load of microbes. If the rate of killing is the same, it will take longer to kill all members of a larger population than a smaller one. This is true for both heat and chemical treatments.

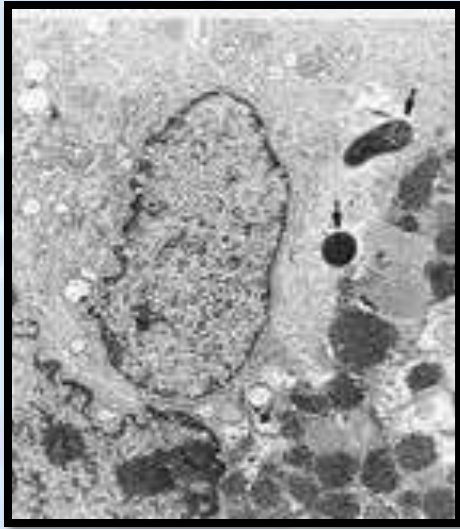
Key Concept

It is necessary to use logarithmic numbers to graph bacterial populations effectively. Logarithmic death curves can demonstrate, for instance, the effects of initial population size on the time necessary to achieve sterilization.

Faktor yg berpengaruh pd aktivitas antimikrobia

- Jumlah populasi mikrobial
- Intensitas dan konsentrasi antimikrobia
- Waktu kontak
- Suhu kontak
- Karakteristik material yg terkandung
- Karakteristik mikrobial

Salah satu cara kerja agen antimikrobia



- Merusak membran sel / dinding sel.
- Membran sitoplasma menjaga integritas komponen seluler yg terkandung, mengendalikan aliran senyawa dari dan kedalam sel, menjaga enzim yg terlibat dalam metabolisme sel

Pengendalian dengan agensia fisik

1. Penggunaan suhu tinggi
2. Penggunaan suhu rendah
3. Radiasi
4. Filtrasi
5. Desikasi

Penggunaan suhu tinggi

1. Pemanasan basah

Menyebabkan denaturasi & koagulasi protein penting. Misal enzim

2. Pemanasan kering

Menyebabkan oksidasi komponen organik sel

Pemanasan basah

- Berupa uap (steam), air mendidih, atau air yg dipanaskan sd suhu subboiling
- Penggunaan steam bertekanan → paling banyak digunakan
- Kelebihan:
 - ✓ Akan memberikan suhu lebih tinggi dibanding air mendidih
 - ✓ Pemanasannya cepat
 - ✓ Penetrasinya lebih besar
- Misal: autoclave

autoclave



- Tekanan 15 lb/in², suhu 121 °C
- Waktu bergantung sifat bahan
- Bahan kental/ padat → waktu penetrasi lebih lama drpd cair
- Air mendidih (100 °C)
 - membunuh sel vegetatif,
 - endospora bakteri bertahan suhu 100 °C > 1 jam → tak bisa untuk sterilisasi





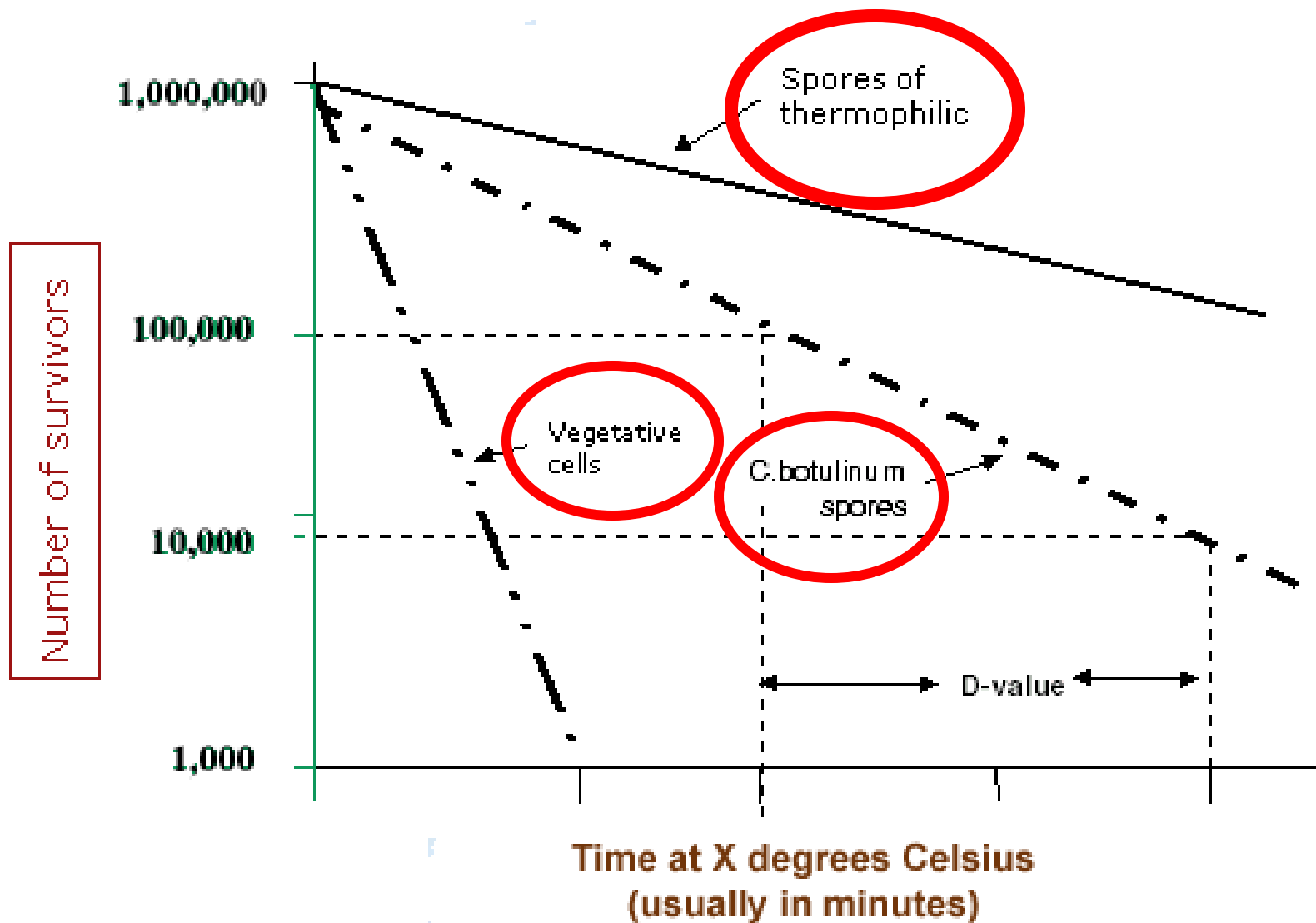
- Suhu sterilisasi (\uparrow) \rightarrow kerusakan makanan (rasa, gizi, kenampakan, dll). Misal: susu
- Susu \rightarrow pasteurisasi \rightarrow pemanasan lambat pd suhu lebih rendah \rightarrow merusak mikrobia kontaminan \rightarrow sel vegetatif mati
- Cara pasteurisasi:
- Batch 62,8 °C, 30min
- Mengalirkan bahan lewat heat exchanger 71,7 °C, 15sec, didinginkan cepat

Pemanasan kering

- Dg udara panas, suhu tinggi,
- Tidak seefektif pemanasan basah
- Butuh suhu lebih tinggi & waktu lebih lama
- Dipakai: sterilisasi alat gelas dlm oven (2 h, 160-180 °C)
- Sedangkan dg autoclave hanya butuh 15min, 121 °C
- Destruksi mikrobial → pembakaran (incineration). Misal: memijarkan ose pd api bunsen

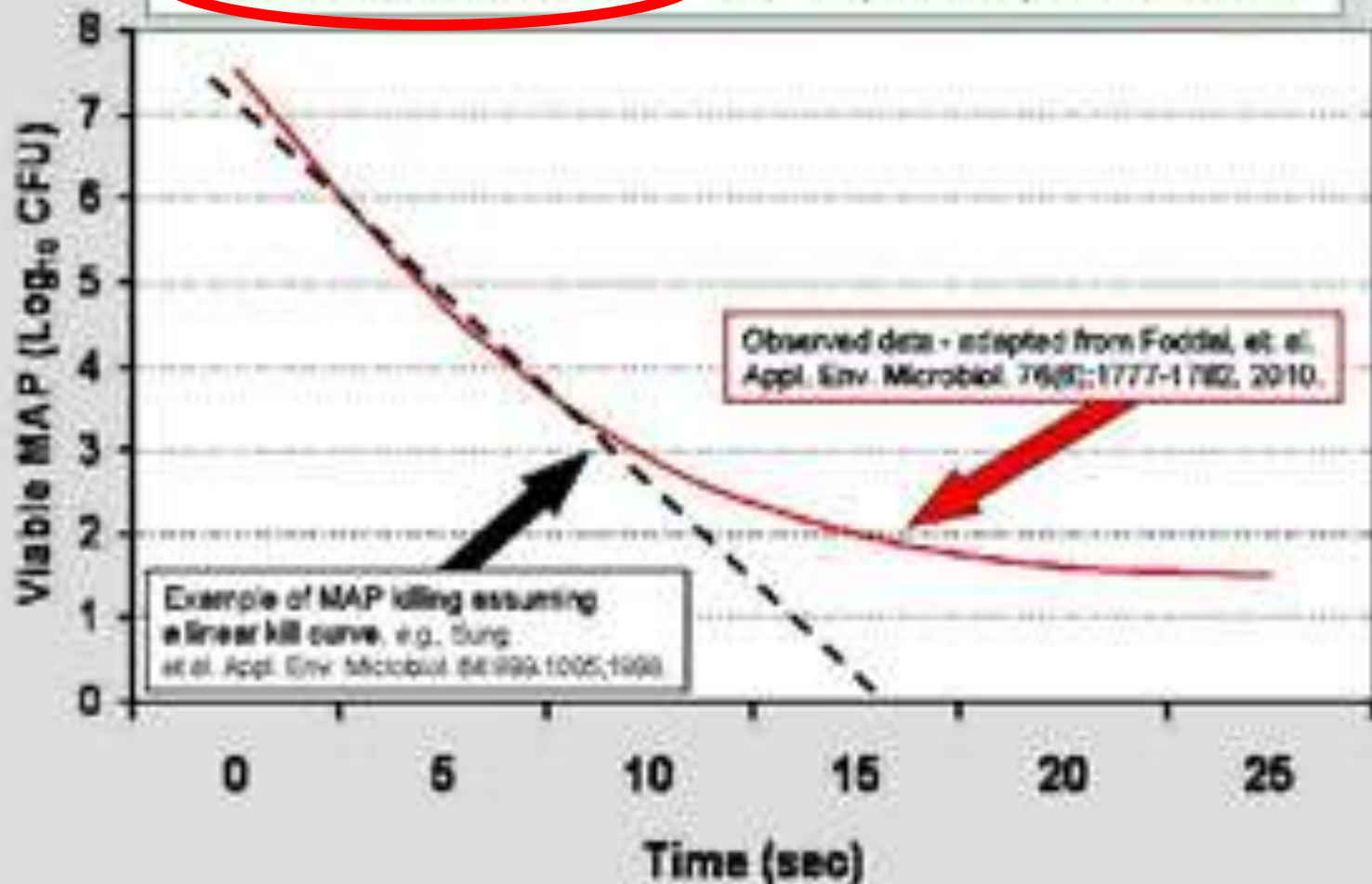


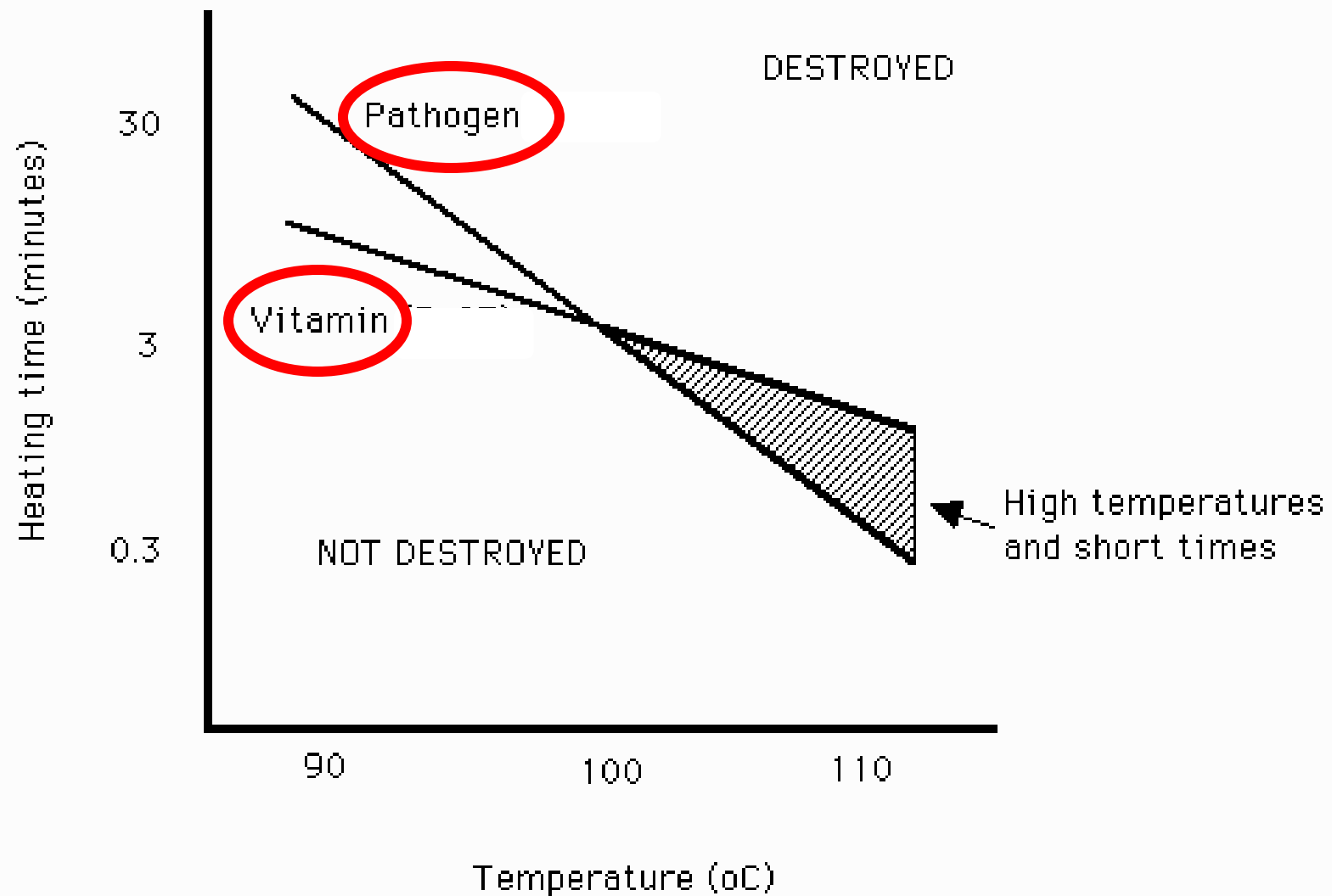
Thermal Death Rate Curves



MAP Thermal Killing Curve

HTST Pasteurization: 161°F (71.7°C) for 15 sec

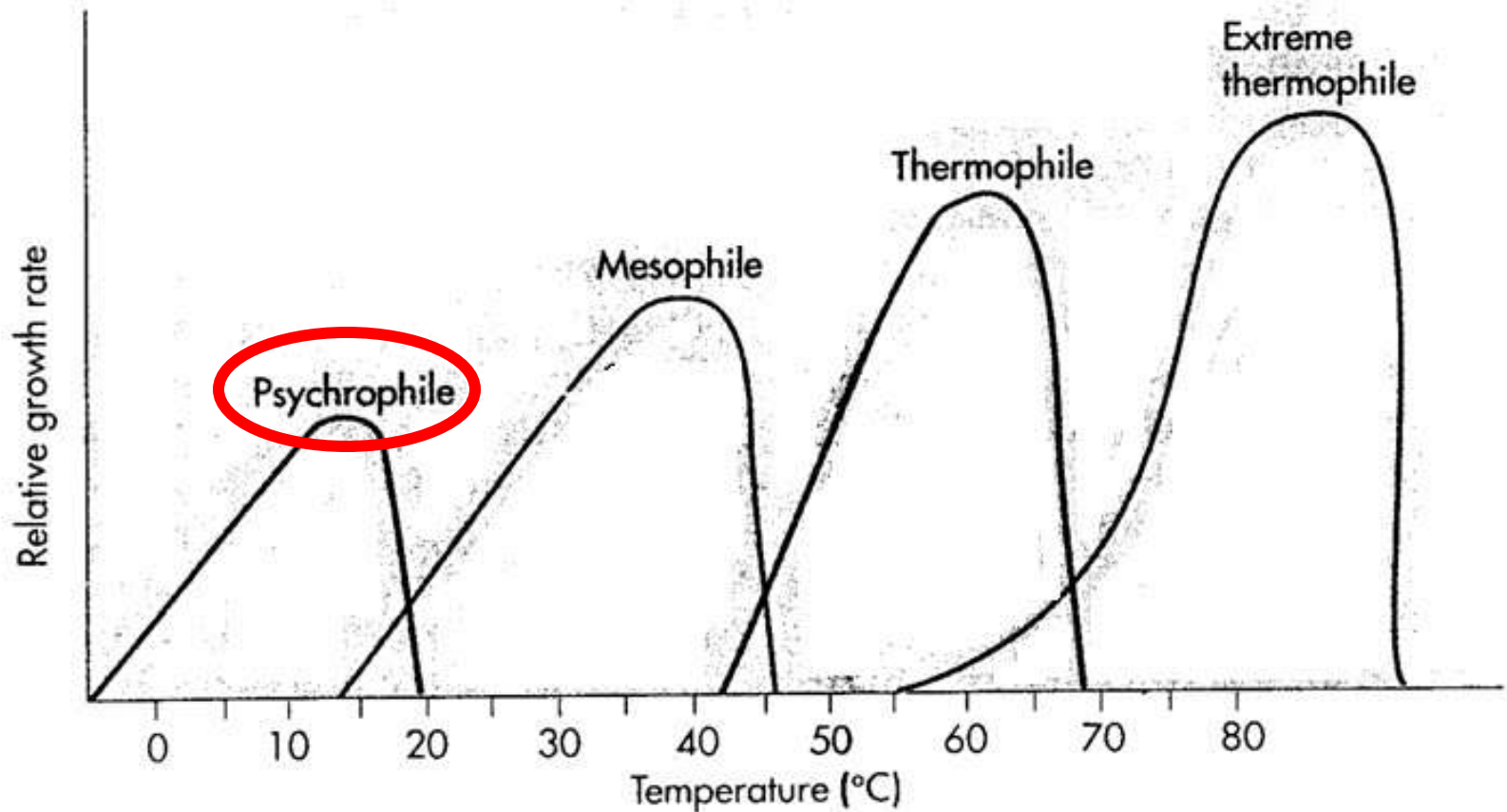




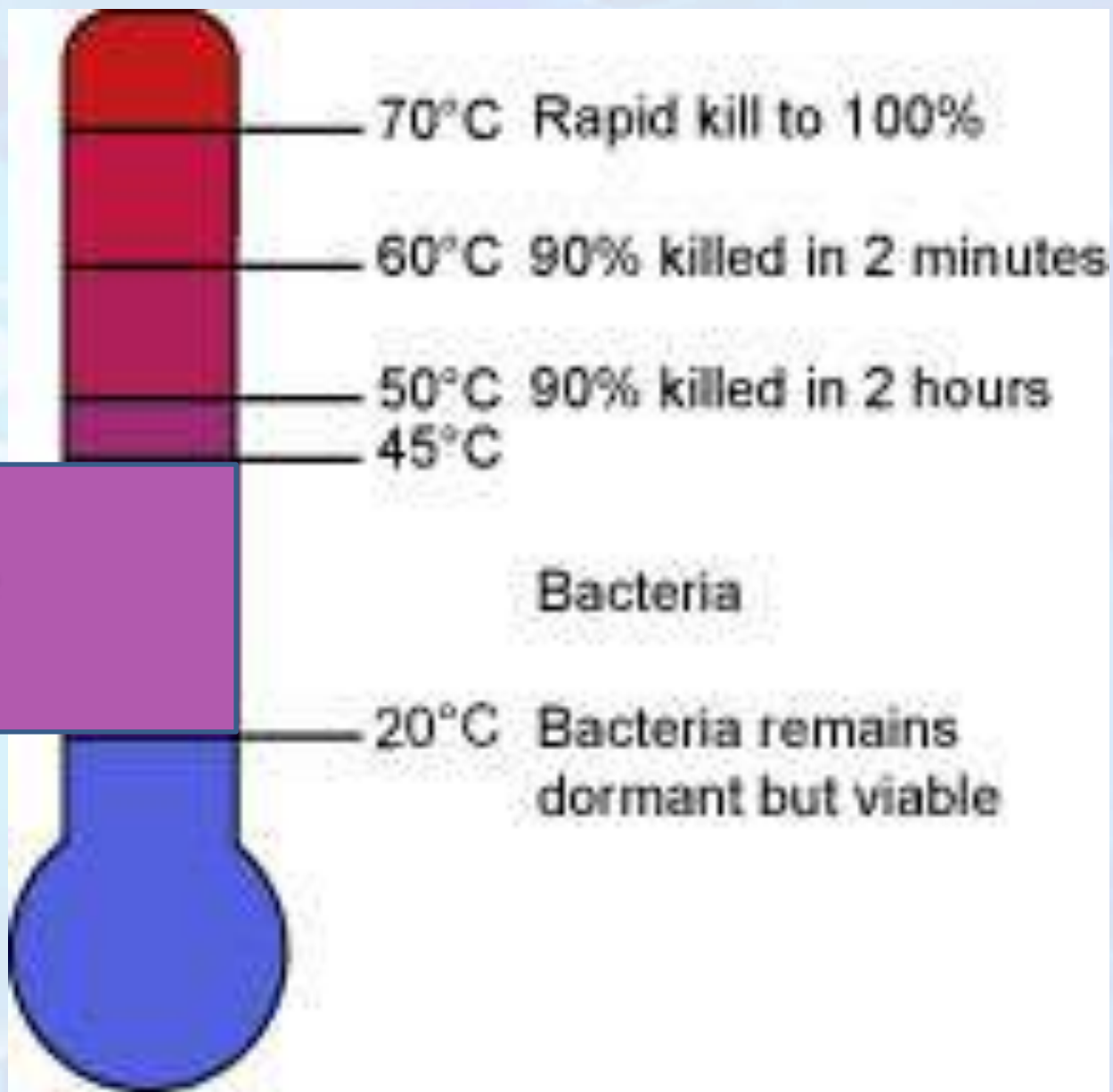
Penggunaan suhu rendah



- Pembekuan → mengawetkan makanan → menghentikan pertumbuhan mikrobial
- Suhu subzero tak membunuh mo. → digunakan untuk mengawetkan mo. → menyimpan kultur
- Kultur → dibekukan -70°C atau dlm tangki nitrogen cair -196°C



<https://aguskrisnoblog.wordpress.com/2011/12/30/upaya-mempertahankan-viabilitas-mikroorganisme-akibat-pengaruh-lingkungan/>



Danger Zone

Bacteria

Bacterial Growth Rate

Temperature & Growth for Human Pathogens

Optimum temperature for growth varies from 20-45°C

Minimum temperature for growth

Maximum temperature for growth

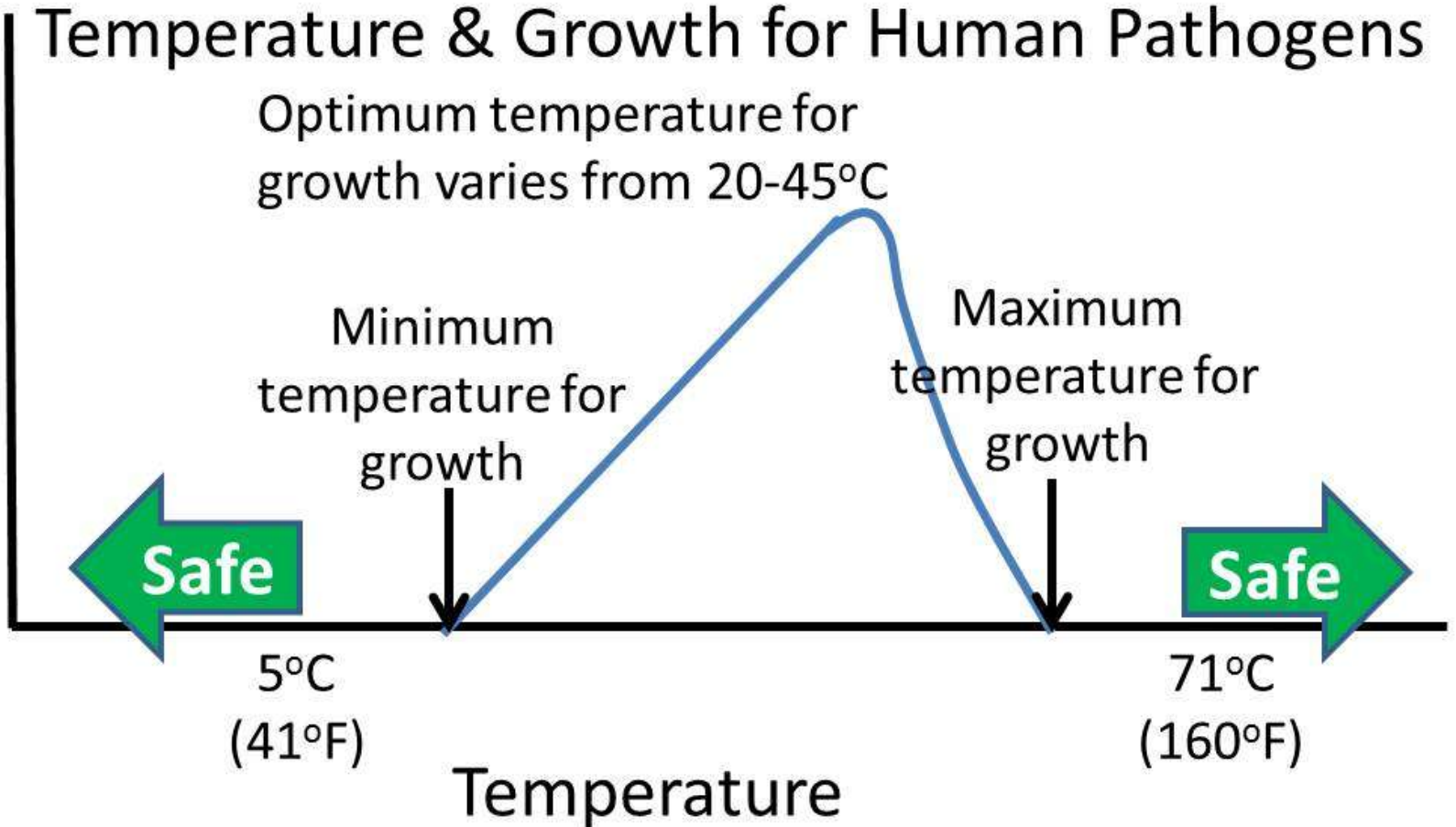
Safe

5°C
(41°F)

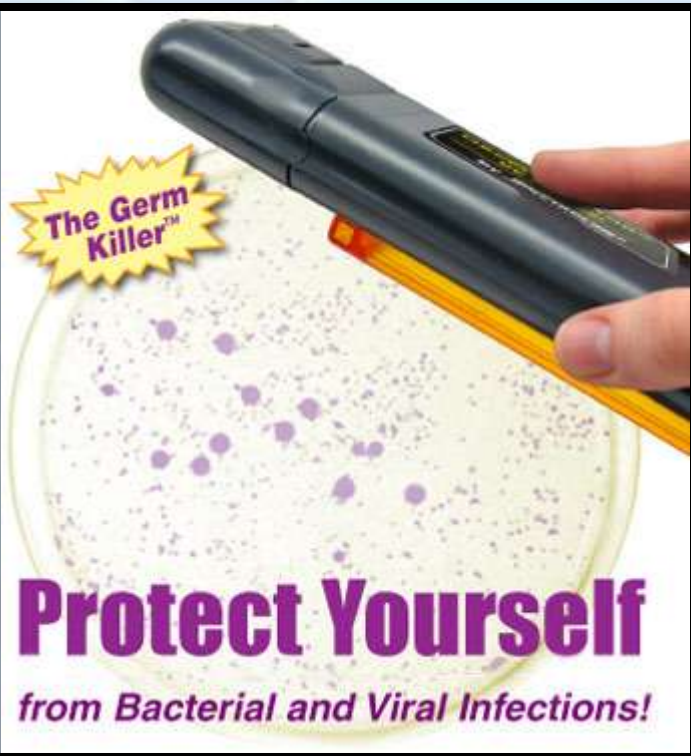
Temperature

Safe

71°C
(160°F)

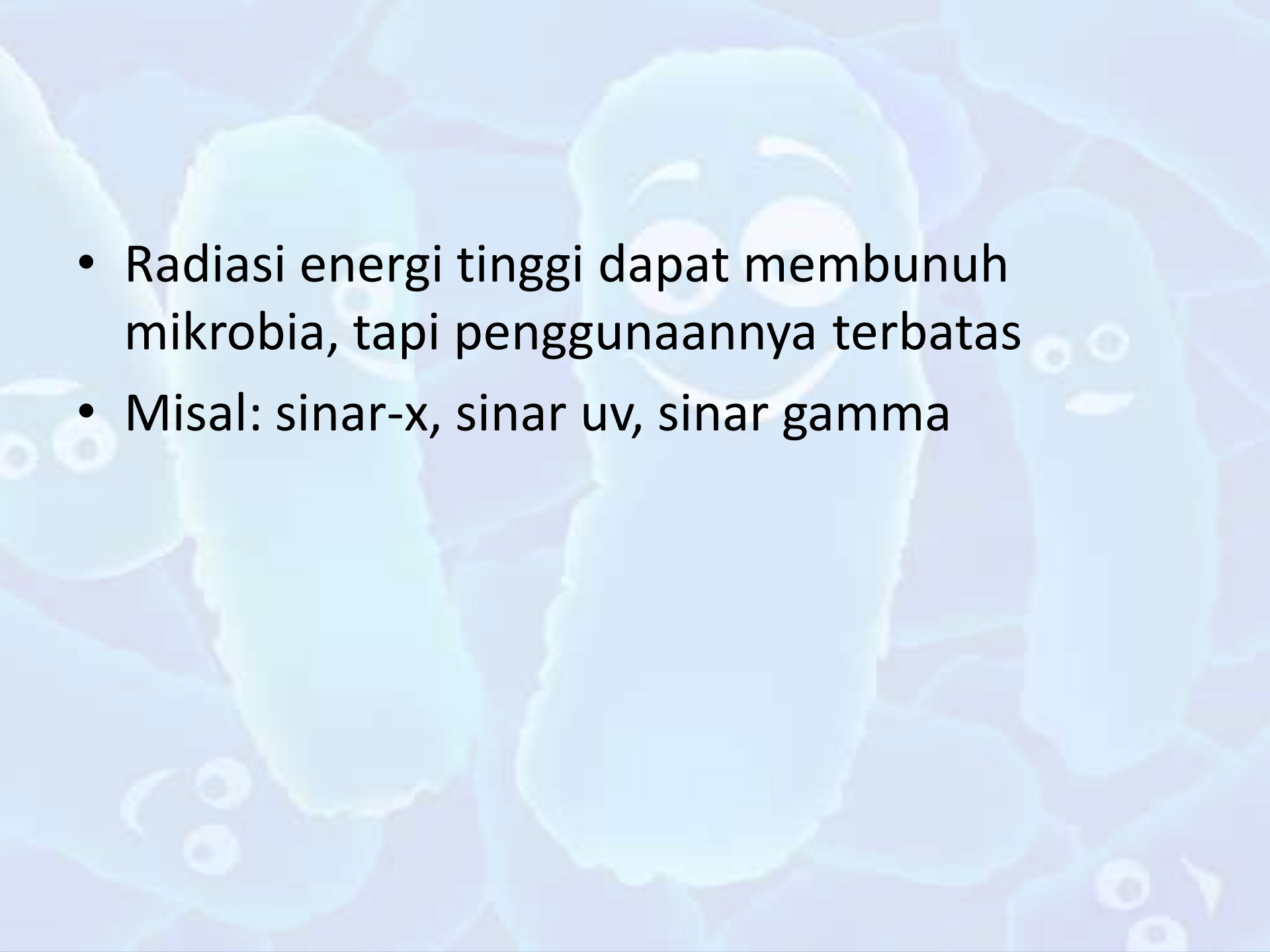


RADIASI

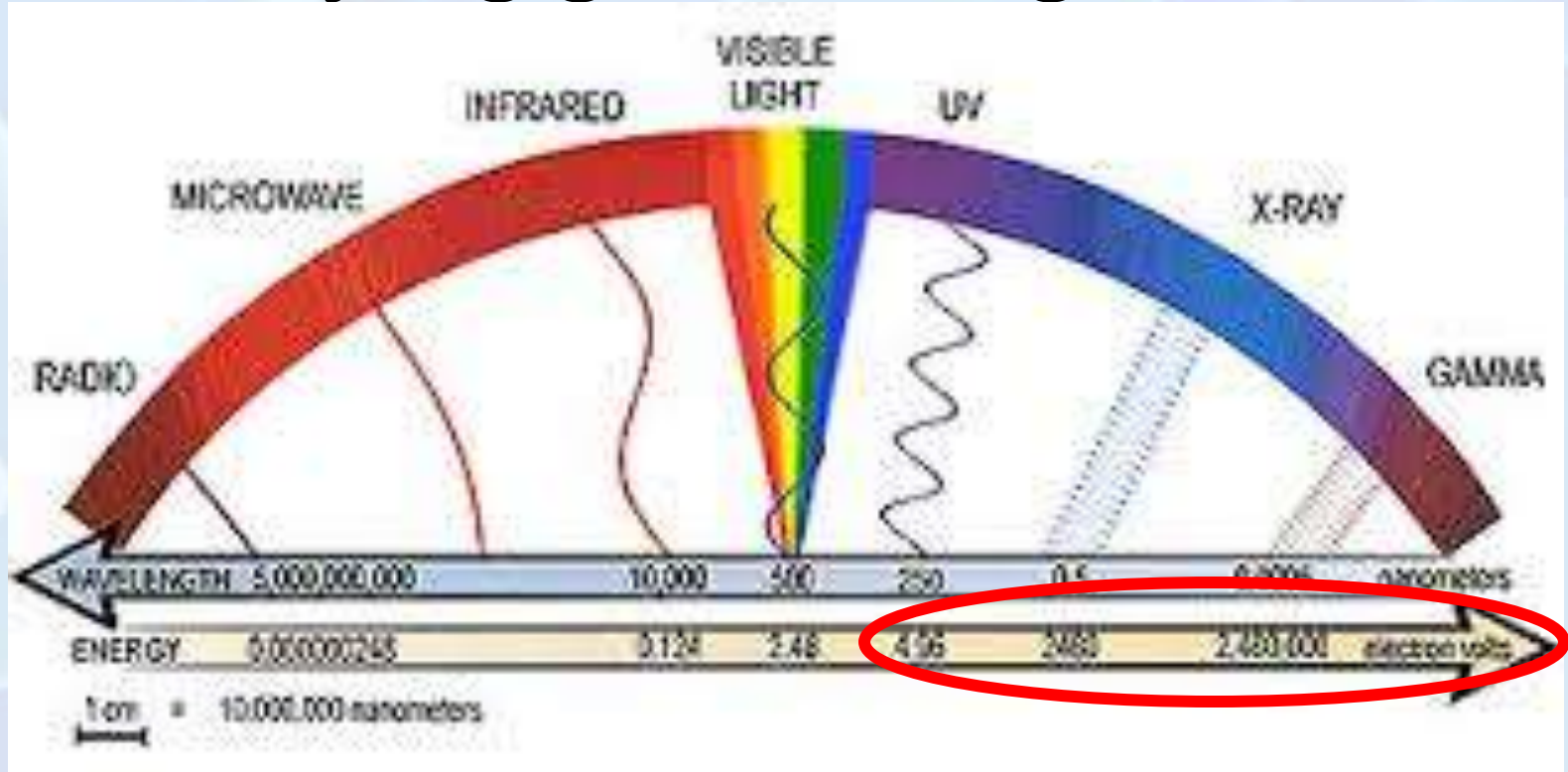


- Radiasi :
 - Menyebabkan kematian pada organisme yang hidup.
 - Merupakan cara sterilisasi dan untuk mengontrol mikroba pada bermacam-macam bahan.
- Macam radiasi :
 - RADIASI PENGION → $\lambda = < 10 \text{ nm}$
 - sinar X
 - sinar cosmic
 - sinar gamma
- RADIASI NON-IONIK → $\lambda = > 10 \text{ nm}$ (radiasi elektromagnetik)
 - Ultraviolet → dapat mematikan
 - Visibel → sumber energi untuk mikroba yang melakukan fotosintesa
 - infrared



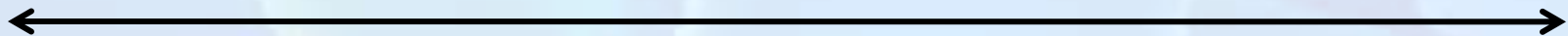
- 
- Radiasi energi tinggi dapat membunuh mikrobia, tapi penggunaannya terbatas
 - Misal: sinar-x, sinar uv, sinar gamma

Panjang gelombang radiasi



Radiasi peng-ion

Radiasi elektromagnetik



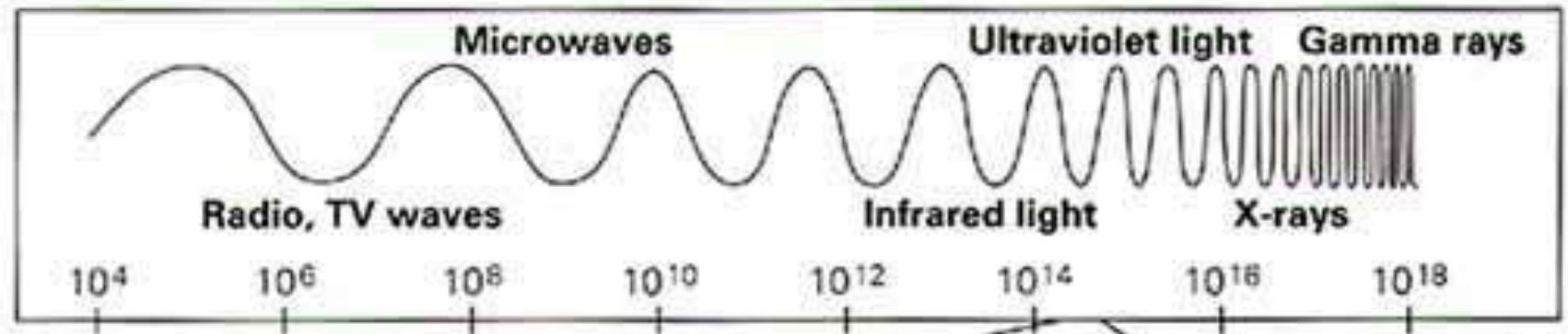
Sinar X

Gelombang elektromagnetik

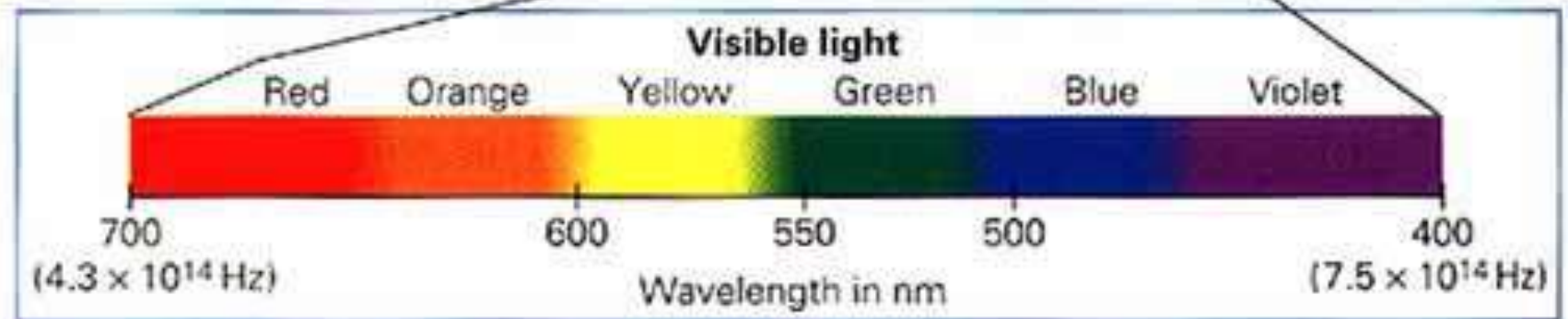
Sinar cosmic
Sinar gamma

Gelombang radar
Gelombang TV
Gelombang radio

λ 10^{-6} 10^{-4} 10^{-2} 10^{-1} 10^0 10^2 10^4 10^6 10^8 10^{10} nm



Frequency in Hz



RADIASI ULTRAVIOLET

- $\lambda = 260 \text{ nm}$ → diserap oleh asam nukleat (DNA, RNA)
 - basa purin
 - basa pirimidin
 - $\lambda = 280 \text{ nm}$ → diserap oleh protein
 - asam amino aromatik : triptopan, penil-alanin, tirosin.
- mematikan mikrobia
- **Pengaruh UV 260 nm pada DNA :**
 - Terjadi induksi 'timin dimer' pada DNA (2 Timin yang berdekatan saling berikatan dengan ikatan kovalen) → Tidak dapat terjadi REPLIKASI DNA

Perbaikan kerusakan DNA oleh sinar UV

- **Foto reaktivasi :**
Oleh enzim yang bekerja jika diaktifasi oleh sinar biru (visibel)
 - **Reaktivasi gelap (dark reactivation)**
 - Oleh enzim yang dapat menghidrolisa ikatan fosfodiester pada daerah yang rusak.
 - Oleh enzim yang dapat mengkatalisa insersi nukleotida baru yang komplemen dengan benang yang tidak rusak.
- ➔ Dosis radiasi UV akan menyebabkan kematian jika kerusakan yang ditimbulkannya lebih banyak dibanding yang dapat diperbaiki.

RADIASI PENG-ION

- Tidak membunuh mikrobia secara langsung dengan mempengaruhi senyawa penyusun sel.
- Membentuk radikal bebas → Radikal Hidroksil
 - Radikal bebas bereaksi dengan makromolekul yang sensitif dalam sel.
 - Bereaksi dengan semua senyawa penyusun sel.

DNA + OH. → mati ← (kopi gen hanya ada satu)
Protein + OH. → tidak mati ← (kopi protein banyak).

Perbaikan : → dengan dark reactivation

- **Sensitivitas bakteri terhadap radiasi peng-ion : → Bervariasi tergantung macam mikrobia, misalnya :**
 - *Deinococcus radiodurans* → sangat resisten.
 - *Micrococcus* → resisten
 - *Streptococcus* → resisten
 - *Pseudomonas* → sensitif
- **Perbedaan radiasi peng-ion dan UV :**
 - radiasi peng-ion dapat menembus bahan / penetrasi misal produk dalam kemasan
 - radiasi UV hanya bekerja pada permukaan yang terkena sinar

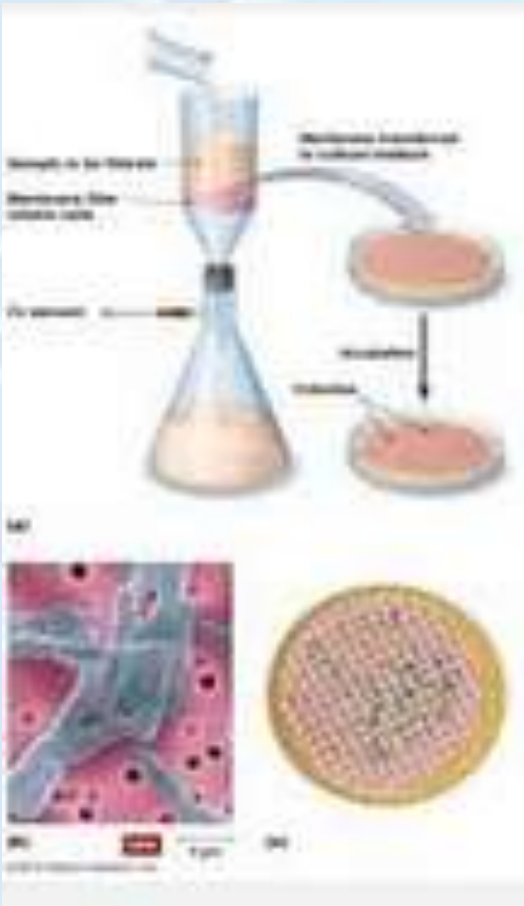
- **Sumber radiasi peng-ion :**
 - sinar X
 - radioisotop Co_{60} ➔ sudah komersial
 - energi atom

- **Aplikasi :**

Untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas dan bahan-bahan lain

➔ obat-obatan, makanan, dll.

Filtrasi



- Proses secara fisik untuk mengendalikan jumlah mo.
- Filter digunakan di lab & industri → mensterilkan material yg tak dapat dg autoclave
- Misal: vitamin dan protein yg rusak oleh panas
- Cairan → disterilkan dg filter membran
- Mo. Dapat dihilang dr udara dg filter High Efficiency Particulate Air (HEPA)

Desikasi



- Menghentikan aktivitas metabolik
- Diikuti penurunan total sel yg hidup
- Misal: liofilisasi pengawetan kultur koleksi
- Liofilisasi → mo. Dikeringkan cepat pd suhu beku kondisi vakum → mo. Tetap hidup selama beberapa tahun

Pengendalian dengan agensia kimia

- Karakteristik agensia antimikrobia
- Desinfektan dan antiseptik
- Evaluasi potensi antimikrobia desinfektan dan antiseptik



Macam Bahan Antimikrobia



1. **Sterilan** : bahan kimia untuk sterilisasi
2. **Disinfektan** : bahan kimia yang membunuh sel vegetatif penyebab penyakit (tidak harus membunuh spora)
3. **Germisida** : hampir sama dengan disinfektan, hanya tidak harus mikrobia yang menyebabkan penyakit.
4. **Antiseptik** : bahan kimia yang digunakan untuk permukaan tubuh guna mencegah mikrobia berkembang biak.
5. **Sanitizer** : bahan kimia yang membunuh 99,9 % mikrobia yang mengkontaminasi suatu area (untuk benda tidak hidup, misal peralatan).

Karakteristik agensia antimikrobia

- Ideal: efektif pd berbagai kondisi
- Fakta: tak ada senyawa yg ideal
- **Hal yg perlu diperhatikan memilih agensia antimikrobia:**
 1. Aktivitas antimikrobia
 2. Kelarutan
 3. Stabilitas
 4. Toksisitas pd manusia&hewan
 5. Homogenitas
 6. Inaktivasi oleh komponen organik
 7. Aktivitas pd suhu kamar
 8. Kemampuan penetrasi
 9. Keamanan bahan
 10. Kemampuan menghilangkan bau
 11. Kemampuan sebagai detergen
 12. Ketersediaan dan harga

Desinfektan & Antiseptik

- Phenol
- Alcohol
- Halogen iodine
- Halogen chlorine
- Logam berat
- Detergen

phenol

- Pertama→antiseptik
- Sbg senyawa standar membandingkan dg senyawa lain
- Phenol 5%→cepat membunuh sel vegetatif mo.
- Phenol→toxic, berbau tidak enak→tak banyak lagi digunakan
- Digantikan senyawa yg kurang toxic pd jaringan & lebih efektif melawan mo.
- Misal: o-phenylphenol, heksakloropen, 4-ethylphenol, dll
- Bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal bergantung konsentrasi

Alkohol (etanol)

- 70-90% efektif membunuh sel vegetatif, tapi tidak bunuh endospora
- Kemampuan bakterisidal alkohol meningkat dg semakin panjang rantai karbon
- Tapi yg rantai C lebih panjang → kurang larut air → jarang digunakan sbg desinfektan (propil dan isopropil alkohol)
- Etanol 70% & isopropil alkohol 90% → antiseptik kulit & desinfektan termometer oral

BAHAN ANTISEPTIK

Bahan	Penggunaan	Reaksi
<ul style="list-style-type: none">• Alkohol 70-90 %	Kulit, termometer	Denaturasi pelarut lipida & protein
<ul style="list-style-type: none">• Larutan iodin• Bis- phenol (hexachlorophene)	Kulit Sabun, lotions, deodorant	Iodinasi sisa tirosin merusak membran sel
<ul style="list-style-type: none">• Hidrogen peroksida 3%• Detergen kation	Kulit Sabun, lotions	Oksidasi Bereaksi dengan fosfolipida pada membran
<ul style="list-style-type: none">• Merkuri organik	Kulit	berikatan dengan Gugus SH pada Protein

BAHAN DISINFEKTAN

Bahan	Penggunaan	Reaksi
Merkuri diklorida	Meja, lantai	Berikatan dengan gugus SH
Cu-sulfat	Algisida pada kolam renang, sumber air	Presipitasi protein
Gas klorin	pemurnian sumber air	Oksidasi
Senyawa klorin	Peralatan industri makanan	Oksidasi
Senyawa phenol	Permukaan	Denaturasi protein
Detergen kation	Peralatan kedokteran, industri makanan	Bereaksi dengan fosfolipida
Etilen oksida (gas)	bahan lab. yang tidak tahan panas, misal plastik	Alkilasi

PENGUKURAN POTENSI ANTIMIKROBIA

- Tube dilution technique
- Agar plate technique
- Phenol coefficient technique

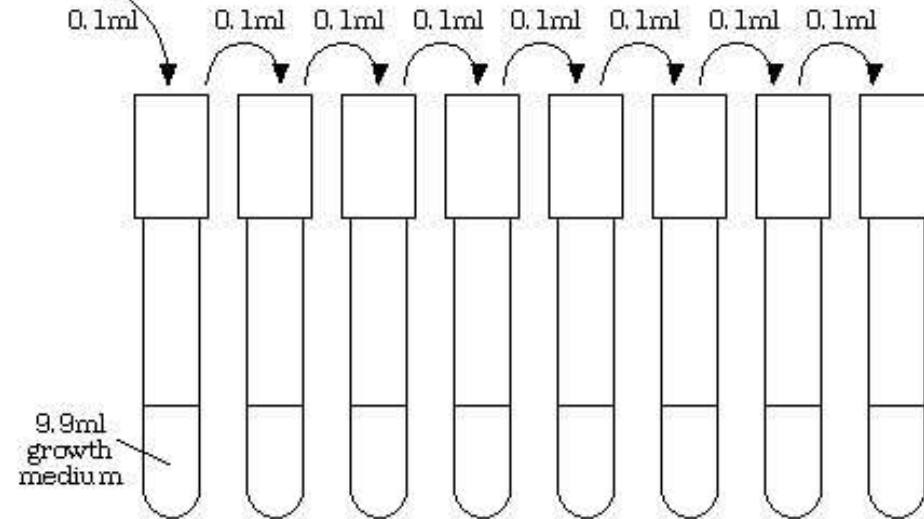
Tube dilution technique

- Agensia kimia dibuat beberapa seri pengenceran dlm tabung reaksi
- Tambahkan suspensi mo. yg akan diuji
- Pd interval waktu tertentu di ambil 1 ose, ditanam dlm NB, inkubasi 24-48 jam
- Uji pertumbuhan dg melihat kekeruhan
- Tak ada pertumbuhan → NB jernih → agen antimo. membunuh mo.

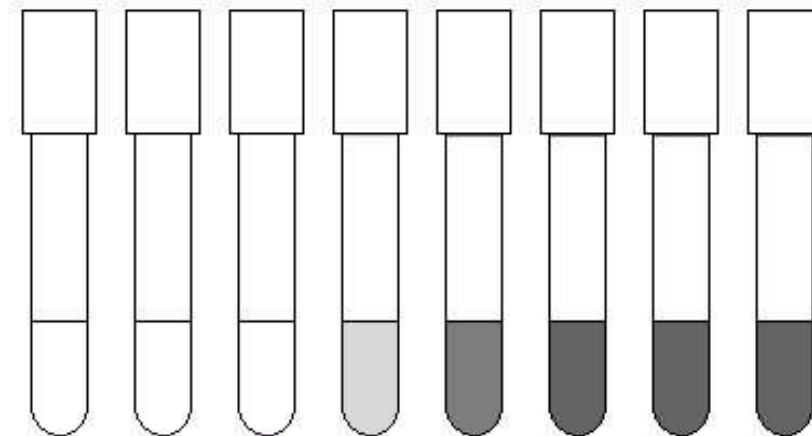
Determination of the MIC: Tube Dilution Assay

Antimicrobial Agent
(known concentration)

Serial Dilutions



Tubes are inoculated and incubated.

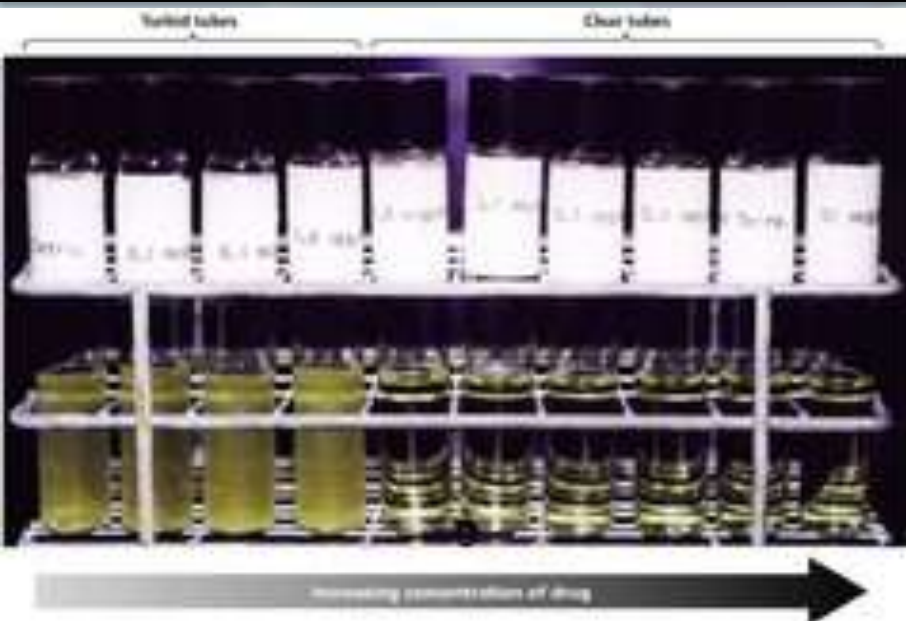
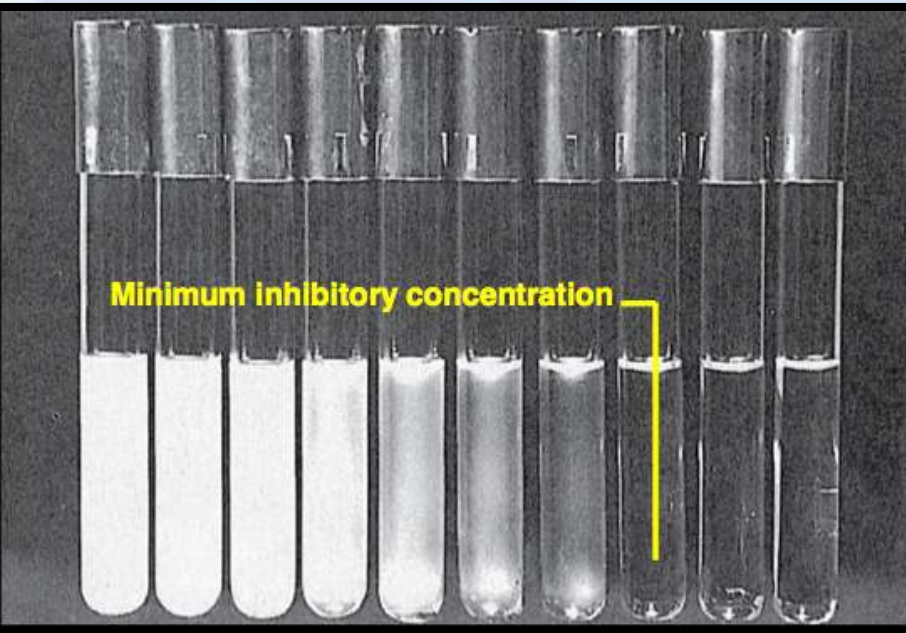


Growth occurs in those tubes with antibiotic concentrations below the MIC.

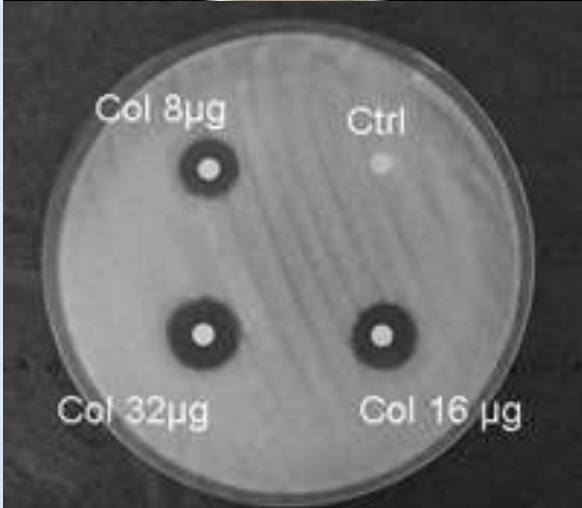
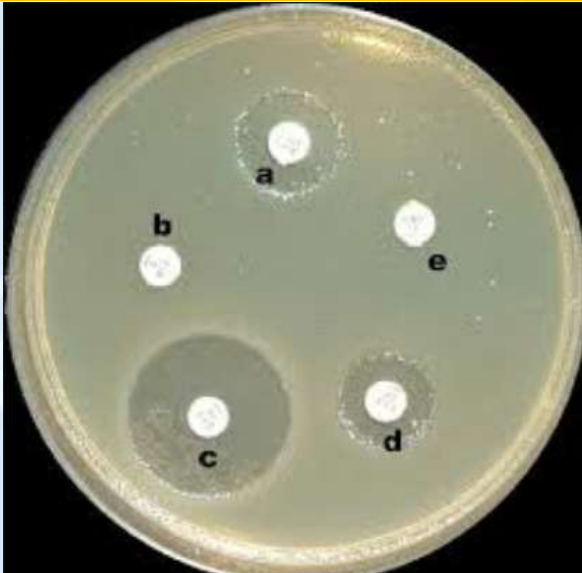
MIC

(Minimum Inhibitory Concentration)

The lowest concentration of antimicrobial agent needed to inhibit growth.



Agar plate technique



- NA dlm petri diinokulasi dg mo. Yg diuji
- Agensia antimo. (AM)
Diletakkan ditengan petri
- Bila AM cair, dlm medium agar ditempatkan absorben paper disk
- Inkubasi 24-48 jam
- Dilihat zona penghambatan disekitar AM

Phenol coefficient technique

- Membandingkan kemampuan membunuh mo. Antara desinfektan yg diuji dg phenol
- Koefisien fenol= daya bunuh desinfektan dibanding fenol
- Cara ini digunakan ekstensif untuk menguji desinfektan dg *Salmonella typhi* atau *Staphylococcus aureus*

PENGUKURAN POTENSI ANTIMIKROBIA

Teknik koefisien Phenol

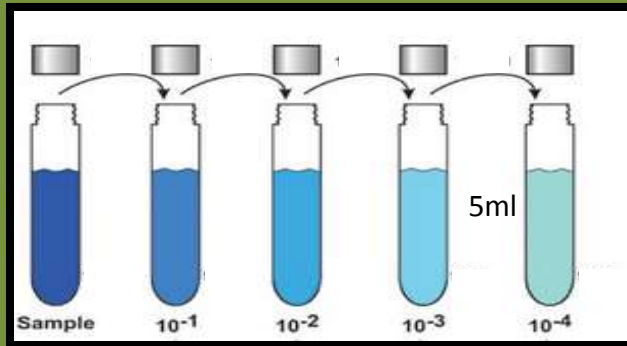
(Phenol coefficient technique) → Metoda AOAC & FDA

➔ Kemampuan membunuh dari bahan antimikrobia dibandingkan dengan phenol.

Metoda :

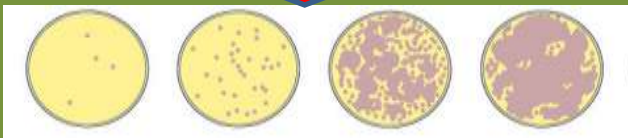
- Buat seri pengenceran konsentrasi bahan antimikrobia dan juga phenol (masing-masing 5 ml).**
- Tambahkan 0,5 ml suspensi test-mikrobia (indikator) (umur 24 jam).**
- Pada interval : 5, 10, dan 15 menit diambil 1 ose dan ditumbuhkan pada medium pertumbuhan.**
- Inkubasi 1-2 hari. Amati pertumbuhan (tumbuh atau tidak).**

Serial konsentrasi antimikrobia X



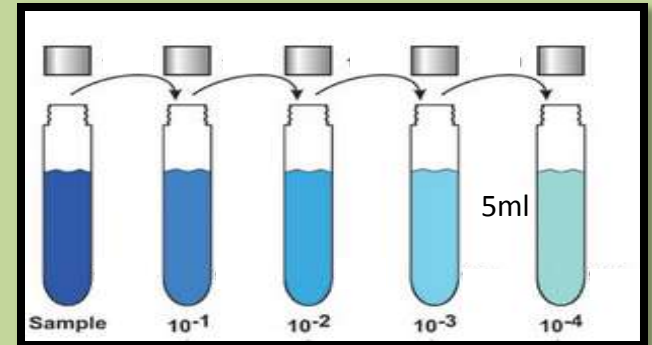
+ 0,5 ml mikrobia indikator

Ambil 1 ose, tanam



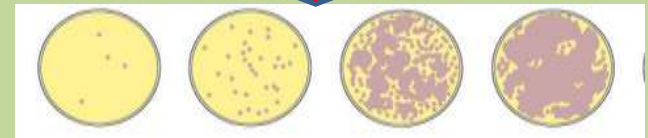
Tumbuh atau tidak ?

Serial konsentrasi Phenol



+ 0,5 ml mikrobia indikator

Ambil 1 ose, tanam



Tumbuh atau tidak ?


$$\text{KOEFSISIEN PHENOL} = A/B$$

A : Pengenceran tertinggi yang dapat membunuh test-mikrobia pada waktu 10 menit (5 menit masih tumbuh), untuk bahan antimikrobia yang dites.

B : sama dengan A untuk phenol

Dilution		Subculture tubes		
		5 min.	10min	15min
Disinfectant (D)	1:50	0	0	0
	1:100	+	0	0
	1:150	+	+	0
	1:200	+	+	+
Phenol	1:50	0	0	0
	1:60	+	0	0
	1:70	+	+	0
	1:80	+	+	+
Phenol-coefficient of D	$\frac{100:1.66}{60}$	-	-	-

Contoh : Disinfektan X dengan test-mikrobia : *Salmonella typhi*.

	Pengenceran	Pertumbuhan		
		5'	10'	15'
Disinfektan X	1 : 100	-	-	-
	1 : 125	+	-	-
	1 : 150	+	-	-
	1 : 175	+	+	-
	1 : 200	+	+	+
Phenol	1 : 80	-	-	-
	1 : 90	+	-	-
	1 : 100	+	+	+

→ Koef. Phenol disinfektan X = $150/90 = 1,6$

KOEFISIEN PHENOL BEBERAPA BAHAN ANTIMIKROBIA

ANTIMIKROBIA : *Salmonella typhi* *Staph. aureus*

Alkohol :

• Metanol	0,026	0,030
• Etanol	0,040	0,039
• n-Propanol	0,102	0,082
• Isopropanol	0,064	0,054
• n-Butanol	0,273	0,220

Senyawa Phenol :

• Phenol	1,0	1,0
• o-Cresol	2,3	2,3
• m-Cresol	2,3	2,3
• p-Cresol	2,3	2,3
• 4-Etilphenol	6,3	6,3
• 2,4-Dimetilphenol	5,0	4,4

Phenol coefficients for various disinfectants

Chemical agent	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Phenol	1.0	1.0
Chloramine	133.0	100.0
Cresols	2.3	2.3
Ethyl alcohol	6.3	6.3
Formalin	0.3	0.7
Hydrogen peroxide	—	0.001
Lysol	5.0	3.2
Mercury chloride	100.0	143.0
Tincture of iodine	6.3	5.8

