

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antimikroba menjadi permasalahan besar di dunia kesehatan. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 2019) tercatat resistensi terhadap senyawa antimikroba seperti ciprofloxacin yang sering digunakan sebagai antimikroba terhadap penyakit saluran kemih mengalami peningkatan mulai dari 8,4% sampai dengan 92,9% di 33 negara di dunia. Di Indonesia tercatat dari data WHO tahun 2014 bahwa setidaknya ada 2.049.442 kasus kesakitan karena resistensi antibiotik dan 23.000 diantaranya meninggal dunia. Peningkatan resistensi antimikroba tertinggi di Indonesia terjadi pada masa pandemi covid-19 per tahun 2019, tercatat pada data *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) yang mencakup data 20 rumah sakit yang tersebar di beberapa pulau menyatakan persentase resistensi antimikroba pada beberapa bakteri penghasil *extended –spectrum beta-lactamases* (ESBL) seperti *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia* mengalami peningkatan sekitar 26% hingga 56% khususnya pada antimikroba jenis karbapenem, fluoroquinolone, dan sefalofporin generasi ketiga.

Faktor utama peningkatan resistensi antimikroba didasarkan atas ketidakpatuhan pasien dalam penggunaan antibiotik jangka panjang dan jangka pendek khususnya pada pasien dengan penyakit kronis seperti TBC dan HIV. Selain itu faktor lain yaitu penggunaan antimikroba pada beberapa penyakit umum yang tidak berdasarkan resep dokter. Menurut riset kesehatan dasar nasional di Indonesia menunjukkan bahwa sekitar 10% masyarakat menyimpan antibiotik di rumah mereka, dan 86,1% memperoleh antibiotik tersebut tanpa resep dokter (Siahaan *et al.*, 2022). Penggunaan antimikroba yang tidak tepat inilah menciptakan lingkungan yang mendukung mikroorganisme untuk membangun resistensi, sehingga memicu munculnya mikroorganisme resistensi terhadap senyawa antimikroba.

Upaya pencarian antimikroba masih terus dilakukan dalam upaya mengatasi *multidrug* resistensi. Peningkatan resistensi bakteri setiap tahun membuat khasiat antimikroba mulai dipertanyakan, hal inilah yang mendorong para peneliti mengeksplorasi lebih banyak sumber alam untuk mendapatkan senyawa antimikroba potensial lainnya. Salah satu jenis antimikroba yang terus dikembangkan yaitu antimikroba dari bahan alam yang diekstrak dari senyawa hasil metabolisme sekunder yang bersifat toksik terhadap mikroorganisme patogen.



berasal dari bahan aktif pada beberapa sumber alam seperti di laut dan juga mikroorganisme diyakini menjadi sumber yang dikembangkan karena tidak adanya efek samping dalam jangka panjang. Pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber yang dikembangkan. Beberapa jenis antimikroba yang berasal dari seperti marfomisin, laboforin, martiapeptida, marfuraquinosin, juga penicillin sudah banyak digunakan di dunia kesehatan

sebagai antimikroba potensial (Tortorella *et al.*, 2018 dalam Danquah *et al.*, 2022). Penggunaan mikroorganisme khususnya bakteri sebagai sumber antimikroba harus bersifat aman bagi inangnya. Salah satu kelompok bakteri yang banyak dimanfaatkan sebagai antimikroba potensial berasal dari kelompok bakteri asam laktat yang tergolong dalam bakteri probiotik (bakteri flora normal saluran pencernaan).

Beberapa keunggulan probiotik yang digunakan sebagai agen antimikroba ada 4 diantaranya yaitu tahan terhadap asam dan garam empedu, mampu tumbuh baik secara invitro, memiliki stabilitas serta viabilitas yang tinggi saat dalam pengiriman dan pengemasan sebelum dikonsumsi, mampu menghasilkan antimikroba sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enteric dan tentunya bersifat aman jika dikonsumsi oleh manusia (Ayivi *et al.*, 2020 ; (George-Okafor *et al.*, 2020) Kemampuan bakteri asam laktat sebagai agen antimikroba berasal dari hasil metabolit berupa asam lemak rantai pendek seperti asam laktat, asam asetat, propionate, asam butirat, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin (Chandra *et al.*, 2022; Rao *et al.*, 2023)

Jenis bakteriosin yang dihasilkan *Leuconostoc mesenteroides* masuk dalam kandidat bakteriosin IIa yang memiliki ukuran kecil (<10 Da), tidak tahan terhadap panas, tidak mengandung lathionine serta tidak memiliki aktivitas pasca modifikasi contohnya Pediocin PA-1, Lactococcin A dan B, Leucocin A, Sakacins A dan P, Curvacin A, dan Bavaricin MN.

Leuconostoc mesenteroides mudah rusak pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (ekstrem) salah satunya pengaruh pH. Bakteri asam laktat akan mati ketika berada dalam lingkungan terlalu asam dan juga terlalu basah, hal ini sejalan dengan penelitian (Meilina *et al.*, 2022) yang menyatakan pH optimal pertumbuhan bakteri asam laktat berada di rentang pH 3,2-9,6. Selain itu suhu juga memiliki peran penting dalam pertumbuhan bakteri asam laktat. Suhu yang terlalu rendah menyebabkan bakteri berada dalam fase dorman, sedangkan suhu yang terlalu tinggi menyebabkan sel mengalami percepatan kerja enzim metabolisme dan juga bisa mengalami denaturasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Wahyuni, (2023) yang menyatakan suhu optimal dalam pertumbuhan BAL berada di rentang 5-45°C karena tergolong bakteri mesofilik.

1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas senyawa antimikroba *Leuconostoc mesenteroides* yang dienkapsulasi dengan maltodekstrin dan kitosan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di bulan Februari 2024 sampai Mei 2025 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, dan Laboratorium Penelitian & Pengembangan Sains (LPPS) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Evaporasi dan Ekstraksi bakteri dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Serta *Freeze Drying* dan Uji *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) di Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Ujung Pandang, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya, gelas kimia, cawan petri, *erlenmeyer*, tabung reaksi kecil, corong pisah, batang pengaduk, ose bulat, tabung *sentrifuge*, rak tabung, sendok tanduk, bunsen, plat tetes, cuvet, suntikan/*syringe*, mikropipet, encas, timbangan analitik, oven, *freeze drying*, *laminar air flow* (LAF), lemari es, *waterbath*, *sentrifuge*, spektrofotometer UV-Vis, autoklaf, *rotary evaporator*, *shaker*, oven, instrument *Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS), dan inkubator.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya isolat bakteri *Leuconostoc mesenteroides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypii*, media MRS (*de Man-Rogosa-Sharpe*) agar dan broth, media Nutrient Agar dan Broth, maltodekstrin, kitosan, susu skim, asam asetat 1%, CaCO_3 , etil asetat, *ciprofloxacin*, *ketokenazole*, *blank disk*, akuades, alkohol, *aluminium foil*, label, *handscoon*, *blue tip*, penggaris, tissue, masker, kamera, dan alat tulis.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Media

a. Sterilisasi alat dengan panas membara

Sterilisasi dikhususkan untuk alat-alat yang terbuat dari besi. Proses sterilisasi dilakukan melalui pemanasan alat menggunakan api Bunsen sampai tampak membara.

b. Sterilisasi dengan panas kering



digunakan untuk alat-alat gelas. Proses sterilisasi ini dilakukan alat secara panas kering (udara kering) dengan menggunakan 121°C selama 2 jam.

c. Sterilisasi dengan panas basah

digunakan untuk alat-alat yang tidak tahan panas dan media. dilakukan dengan menggunakan metode panas basah (uap air

panas bertekanan) di alat autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2 Pembuatan Medium Pertumbuhan

2.3.2.1 Media MRSA (de Man Rogosa Sharpe Agar)

Sebanyak 6,2 g media MRSA dan CaCO_3 1% dilarutkan kedalam 100 mL akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu , larutan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil pada bagian mulut Erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.2 Media MRSB (de Man Rogosa Sharpe Broth)

Sebanyak 5,2 g media MRSB dilarutkan kedalam 100 mL akuades. selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam erlemeyer dan ditutup menggunakan erlenmeyer kemudian ditutup kembali menggunakan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.3 Media NA (Nutrient Agar)

Sebanyak 2 g media NA dilarutkan kedalam 100 mL akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam erlemeyer dan ditutup menggunakan erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.4 Media NB (Nutrient Broth)

Sebanyak 1,3 g media NA dilarutkan kedalam 100 mL akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam erlemeyer dan ditutup menggunakan erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3.2 Pengamatan Kurva Pertumbuhan

Sebanyak 3 ml prakultur bakteri *Leuconostoc meseteroides* diinokulasikan ke media MRSB dalam ukuran 150 mL menggunakan spoit. Kemudian dishaker pada interval 2 jam dilakukan pemeriksaan pada alat spektrofotometer yang gelombang 580 nm untuk menghitung laju pertumbuhan dengan menghitung nilai OD (*Optical density*). Pengamatan dilakukan sebanyak 5 mL kultur kemudian dipindahkan ke tabung reaksi untuk di transmittan kultur yang dibandingkan dengan blanko steril.



Pengamatan dilakukan selama 1x24 jam sampai data yang diperoleh menunjukkan kultur bakteri sudah berada difase menuju kematian (T0-T12).

2.3.4.2 Pembuatan Bahan Penyalut Maltodekstrin dan Kitosan

Sebanyak 65 gram maltodekstrin dan 3 gram kitosan. Selanjutnya dibuat larutan penyalut perbandingan maltodekstrin dan kitosan dengan perbandingan sebagai berikut :

Kode Perlakuan	Maltodekstrin (%)	Kitosan (%)
P1	20	0
P2	20	1
P3	15	1
P4	10	1

Dalam pembuatan penyalut perlakuan 2,3,4 dengan penambahan kitosan dan larutan ditambahkan 1% asam asetat 25% atau sekitar 4 ml dalam 96 mL akuades untuk mempermudah pelarutan kitosan dalam akuades serta dibantu dengan pemanasan sedang menggunakan hotplate, kemudian setelah larut baru ditambahkan kombinasi maltodekstrin maltodekstrin dan susu skim sebanyak 2 gram untuk protein tambahan kemudian dihomogenkan kembali. Terakhir dilakukan pasteurisasi bahan penyalut selama 5 menit di *waterbath* pada suhu 100°C.

2.3.7 Identifikasi Senyawa Antibakteri

2.3.7.1 Penyiapan Isolat *Leuconostoc mesenteroides* Hasil Enkapsulasi

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* hasil enkapsulasi yang menghasilkan diameter hambat paling besar dari beberapa perlakuan, ditimbang sebanyak 1 gram dan diencerkan kedalam 9 ml akuades steril, kemudian sebanyak 1 ml diinokulasikan ke media MRSB 50 ml kembali dan dishaker selama 24 jam, kemudian setelah keruh diinokulasikan kembali 5 ml ke media MRSB 500 ml, dan shaker kembali selama lebih dari 14 jam, setelah itu dipindahkan ke tabung sentrifugasi, dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Terakhir Supernatan dipindahkan ke erlenmeyer untuk dilakukan fraksinasi. .

2.3.7.3 Uji Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Sebanyak 3 µl sampel diinjeksikan ke alat GC-MS, Waktu diatur selama 60 menit dengan suhu injektor 260 °C, detektor 250 °C, dan kolom 325 °C. Gas pembawa yaitu gas helium sebagai pembawa aliran konstan 1 mL/menit. Proses akan alat GC-MS menghasilkan beberapa senyawa bioaktif tidak kromatogram sebagai identifikasi hasil kromatografi gas massa (MS) dilihat dari spektrum massa dengan masing masing senyawa bioaktif (Rosdiana *et al.*, 2023)



2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian diolah secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk gambar, grafik dan tabel. Analisis deskriptif dilakukan dengan melihat diameter zona hambatan dari hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *E.coli*, *S.aureus*, dan *S.thypi*. dan juga mengidentifikasi senyawa antibakteri dari hasil GC-MS ekstrak bakteri *Leuconostoc mesenteroides* menggunakan pelarut etil asetat.

