

UJI SENSITIVITAS MIKROBA TERHADAP ANTIBIOTIK DENGAN METODE SUMURAN

Faiq Pradila¹, Alief Putriana Rahman²

¹Mahasiswa D3 Farmasi, Universitas Islam Madura, Indonesia

²Universitas Islam Madura, Indonesia

Penulis Koresponden, e-mail: faiqfaradila479@gmail.com. 081779844545

Keywords	Abstract
antibiotic sensitivity, well diffusion, inhibition zone, amoxicillin, kanamycin	Antibiotics are chemical compounds used to inhibit or kill the growth of pathogenic microorganisms, especially bacteria. This study aimed to assess microbial sensitivity to amoxicillin and kanamycin using the well diffusion method. The research was conducted experimentally in a laboratory with a quantitative approach. Microbes were inoculated on nutrient agar media and treated with amoxicillin, kanamycin, and sterile aquades as control. After 24 hours of incubation at 37°C, inhibition zones were measured. Results showed that kanamycin produced the largest inhibition zone (33.2 mm), followed by amoxicillin (20.2–23.3 mm). The control aquades unexpectedly showed a 33.7 mm zone, likely due to contamination or technical error. It is concluded that kanamycin has higher antibacterial activity than amoxicillin. The well diffusion method is effective for testing antibiotic sensitivity, but strict aseptic technique and experimental controls are essential.

Kata Kunci	Abstrak
sensitivitas antibiotik, difusi sumuran, zona hambat, amoxicillin, kanamycin	Antibiotik merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme patogen, khususnya bakteri. Penelitian ini bertujuan menguji sensitivitas mikroba terhadap antibiotik amoxicillin dan kanamycin menggunakan metode difusi sumuran. Penelitian dilakukan secara eksperimental di laboratorium dengan pendekatan kuantitatif. Mikroba diinokulasikan ke dalam media nutrient agar, lalu diberikan perlakuan amoxicillin, kanamycin, serta aquades steril sebagai kontrol. Setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C, diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk. Hasil menunjukkan bahwa kanamycin menghasilkan zona hambat terbesar (33,2 mm), diikuti amoxicillin (20,2–23,3 mm). Zona hambat pada kontrol aquades (33,7 mm) diduga akibat kontaminasi atau kesalahan teknis. Simpulan dari penelitian ini adalah kanamycin memiliki aktivitas antibakteri lebih tinggi dibandingkan amoxicillin. Metode sumuran efektif digunakan untuk uji sensitivitas antibiotik, namun kontrol eksperimen dan prosedur aseptik harus diperhatikan ketat untuk menghindari hasil keliru.

PENDAHULUAN

Latar Belakang Masalah

Antibiotik merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme patogen, khususnya bakteri. Sejak ditemukan, antibiotik telah menjadi pilar penting dalam dunia kedokteran, farmasi, serta industri pangan dan peternakan. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak rasional dan tidak terkontrol telah menyebabkan timbulnya resistensi antimikroba, yaitu kondisi ketika mikroorganisme menjadi kebal terhadap efek antibiotik. Menurut WHO, resistensi antibiotik kini menjadi salah satu masalah kesehatan global yang mendesak untuk ditangani (Hanidah *et al.*, 2023).

Dalam konteks ini, uji sensitivitas mikroba terhadap antibiotik menjadi salah satu pendekatan laboratorium yang sangat penting untuk menilai efektivitas suatu antibiotik terhadap bakteri tertentu. Dengan uji ini, dapat ditentukan antibiotik mana yang masih efektif dan mana yang sudah tidak lagi memberikan efek hambat, sehingga penggunaannya bisa lebih selektif dan tepat sasaran.

Metode yang umum digunakan dalam uji sensitivitas antibiotik adalah metode difusi, yang terdiri dari metode cakram (disc diffusion) dan metode sumuran (well diffusion). Metode cakram sudah banyak digunakan di laboratorium klinik, namun metode sumuran dinilai lebih fleksibel karena memungkinkan penggunaan senyawa antibakteri dalam bentuk larutan cair dengan konsentrasi tertentu.

Penelitian yang dilakukan oleh Nurhayati *et al.* (2020) menunjukkan bahwa metode sumuran dapat menghasilkan zona hambat yang lebih luas dibandingkan metode cakram, sehingga lebih sensitif dalam mendeteksi aktivitas antibakteri. Sementara itu, studi oleh Rahmah, Ramdhani, & Hidayani (2024) juga mengungkapkan bahwa metode sumuran lebih optimal dalam mengukur variasi efektivitas antibiotik terhadap *Escherichia coli*. Penelitian Cui *et al.* (2021) bahkan menggunakan modifikasi metode sumuran untuk menguji efek sinergis minyak atsiri dengan antibiotik terhadap bakteri, dengan hasil yang menunjukkan peningkatan zona hambat secara signifikan.

Berbeda dari penelitian sebelumnya yang berfokus pada perbandingan metode atau pengujian antibiotik dalam bentuk cakram standar, penelitian ini menitikberatkan pada pengukuran sensitivitas mikroba terhadap dua jenis antibiotik yang umum digunakan, yaitu **amoxicillin** dan **kanamycin**, menggunakan metode **sumuran standar laboratorium**. Selain itu, penelitian ini juga mengamati secara rinci **pengaruh ukuran lubang sumur** dan **anomali zona hambat** yang terjadi pada kontrol (aquades), yang jarang dibahas dalam studi-studi sebelumnya.

Rumusan Permasalahan

Berdasarkan uraian latar belakang dan kajian pustaka di atas, permasalahan dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

- Bagaimana sensitivitas mikroba terhadap antibiotik amoxicillin dan kanamycin yang diuji menggunakan metode sumuran?
- Seberapa besar zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing antibiotik dan kontrol (aquades)?
- Apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam diameter zona hambat yang dihasilkan dari tiap antibiotik?

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- Mengetahui efektivitas antibiotik amoxicillin dan kanamycin terhadap mikroba uji menggunakan metode sumuran.
- Mengukur dan membandingkan zona hambat dari masing-masing antibiotik dan kontrol.
- Menjelaskan kemungkinan faktor yang memengaruhi variasi zona hambat, termasuk ukuran lubang sumur.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan kuantitatif deskriptif. Penelitian dilakukan untuk menguji sensitivitas mikroba terhadap dua jenis antibiotik, yaitu **amoxicillin** dan **kanamycin**, menggunakan metode **difusi sumuran (well diffusion method)**.

Metode ini dipilih karena memungkinkan pengujian berbagai bentuk antibiotik dalam larutan serta memberikan visualisasi zona hambat secara langsung melalui media agar.

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Madura, menggunakan fasilitas seperti Laminar Air Flow (LAF), inkubator, autoklaf, serta alat-alat mikrobiologi lainnya. Waktu pelaksanaan penelitian adalah selama satu minggu pada bulan Juni 2025, termasuk persiapan media, inokulasi mikroba, inkubasi, serta pengamatan hasil.

Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- Lampu spiritus
- Pelubang gabus
- Mikro pipet
- Yellow tape dan blue tape
- Erlenmeyer
- Cawan petri steril
- Autoklaf
- Hot plate
- Gelas ukur
- Neraca analitik
- Laminar Air Flow (LAF)

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi:

- Media **nutrient agar** (NA) untuk pertumbuhan mikroba
- Jenis mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* yang diperoleh dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Madura. Pemilihan spesies ini didasarkan pada prevalensinya sebagai bakteri patogen penyebab infeksi saluran pencernaan serta sering digunakan dalam uji sensitivitas antibiotik
- Antibiotik **amoxicillin** dan **kanamycin** sebagai perlakuan

- **Aquades steril** sebagai kontrol negatif
- Alkohol 70% untuk sterilisasi alat

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media nutrient agar disiapkan dengan menimbang komposisi yang sesuai, lalu dilarutkan dalam aquades dan dipanaskan menggunakan hot plate hingga homogen. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media dibiarkan hingga hangat, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik di dalam LAF (Cui et al., 2021).

2. Inokulasi Mikroba

Mikroba uji diinokulasikan secara merata ke seluruh permukaan media NA menggunakan kapas steril atau spreader steril (Rahmah et al., 2024). Proses ini dilakukan dengan teknik aseptik dalam LAF untuk menghindari kontaminasi. Media yang telah diinokulasi kemudian siap diberi perlakuan antibiotik.

3. Pembuatan Sumuran

Lubang sumur dibuat pada media menggunakan pelubang gabus steril dengan diameter ± 6 mm. Pada beberapa titik, seperti kontrol aquades dan perlakuan tertentu, lubang dibuat dengan ukuran yang bervariasi sesuai hasil pengamatan aktual (contoh: 0,2 mm, 0,5 mm, 0,4 mm) (Nurhayati et al., 2020).

4. Pemberian Antibiotik

Antibiotik amoxicillin dan kanamycin dimasukkan ke dalam sumur pada konsentrasi tertentu menggunakan mikro pipet (Nurhamidin et al., 2021). Sebagai kontrol negatif, sumur lain diisi dengan aquades steril. Volume larutan antibiotik yang ditetaskan diseragamkan (misalnya 50 μ L) untuk menjaga konsistensi hasil.

5. Inkubasi

Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu **37°C selama 24 jam** di dalam inkubator. Suhu dan durasi inkubasi ini mengikuti prosedur standar dalam uji antibakteri (Hanidah *et al.*, 2023; Martsiningsih *et al.*, 2023).

Pengamatan dan Pengukuran

Setelah masa inkubasi selesai, diamati zona bening (zona hambat) di sekitar sumur yang menandakan aktivitas antibakteri. Diameter zona hambat diukur menggunakan

penggaris atau jangka sorong digital dan dicatat dalam satuan milimeter (mm). Zona hambat yang terbentuk mencerminkan efektivitas antibiotik terhadap mikroba yang diuji.

Data hasil pengamatan yang diperoleh dari cawan petri adalah sebagai berikut:

- **Amoxicillin:**
 - Zona hambat 1: 22,2 mm (sumuran 6 mm)
 - Zona hambat 2: 23,3 mm (sumuran 6 mm)
 - Zona hambat 3: 20,2 mm (sumuran 0,4 mm)
- **Kanamycin:**
 - Zona hambat: 33,2 mm (sumuran 0,5 mm)
- **Aquades (kontrol):**
 - Zona hambat: 33,7 mm (sumuran 0,2 mm)

Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif kuantitatif dengan membandingkan rata-rata diameter zona hambat dari masing-masing antibiotik. Hasil tersebut diinterpretasikan untuk menentukan tingkat sensitivitas mikroba terhadap antibiotik. Bila zona hambat luas, maka antibiotik dianggap efektif terhadap mikroba uji. Apabila zona hambat sempit atau tidak terbentuk, maka dapat disimpulkan mikroba resisten terhadap antibiotik tersebut. Adanya **zona hambat signifikan pada kontrol (aquades)** akan dibahas lebih lanjut dalam pembahasan, sebagai kemungkinan adanya kesalahan teknis.

Untuk mengkategorikan efektivitas antibiotik berdasarkan zona hambat, digunakan kriteria klasifikasi sebagai berikut: diameter <10 mm dikategorikan sangat kecil/resisten, 10–15 mm kecil, 16–25 mm sedang, 26–30 mm besar, dan >30 mm sangat besar (modifikasi dari CLSI, 2023).

Tabel 1. Klasifikasi Diameter Zona Hambat Antibiotik

Kategori Efektivitas	Diameter Zona Hambat (mm)	Keterangan
Sangat kecil / Resisten	< 10 mm	Aktivitas antibakteri sangat rendah
Kecil	10–15 mm	Aktivitas antibakteri rendah
Sedang	16–25 mm	Aktivitas antibakteri sedang
Besar	26–30 mm	Aktivitas antibakteri tinggi

Sangat besar	> 30 mm	Aktivitas antibakteri sangat tinggi
--------------	---------	-------------------------------------

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan Zona Hambat Antibiotik

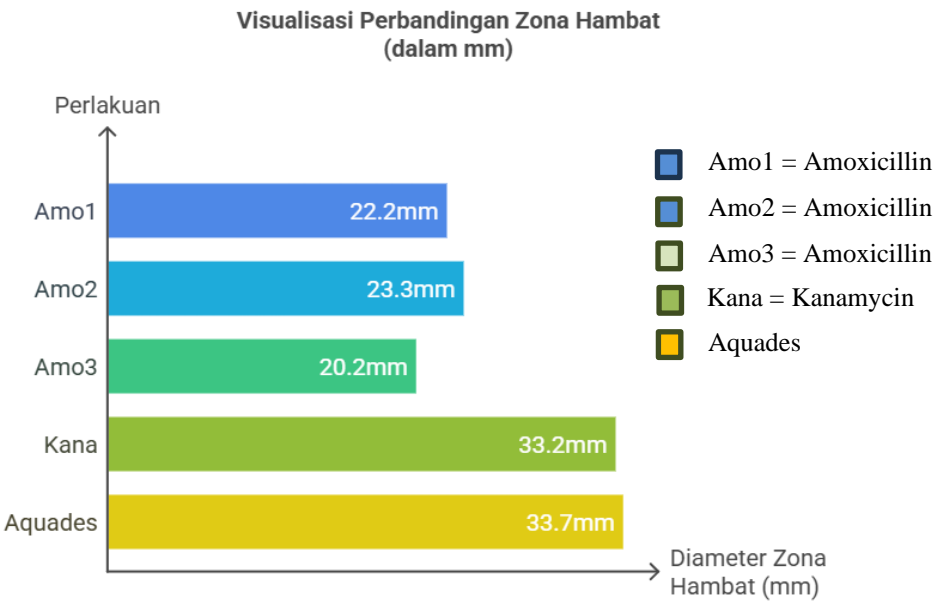
Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas antibiotik **amoxicillin** dan **kanamycin** terhadap mikroba uji menggunakan metode **difusi sumuran**, dengan perbandingan kontrol berupa **aquades steril**.

Setelah proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diperoleh hasil pengamatan terhadap diameter zona hambat (clear zone) di sekitar sumur. Zona hambat yang terbentuk mencerminkan aktivitas antibakteri dari antibiotik yang diuji. Berikut adalah data hasil pengukuran diameter zona hambat:

Tabel 2. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Antibiotik

No	Perlakuan	Ukuran Sumur (mm)	Diameter Zona Hambat (mm)	Keterangan
1	Amoxicillin 1	6	22,2	Zona hambat sedang
2	Amoxicillin 2	6	23,3	Zona hambat sedang
3	Amoxicillin 3	0,4	20,2	Sedikit lebih kecil
4	Kanamycin	0,5	33,2	Zona hambat sangat besar
5	Aquades	0,2	33,7	Anomali (tidak logis)

Diagram 1. Visualisasi Perbandingan Zona Hambat (dalam mm)



Pembahasan

1. Efektivitas Antibiotik Amoxicillin

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa antibiotik **amoxicillin** memberikan efek hambat sedang terhadap mikroba uji, dengan diameter zona hambat berkisar antara **20,2 mm hingga 23,3 mm**. Nilai ini tergolong dalam kategori **sensitif sedang**, sesuai dengan klasifikasi efektivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat menurut **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**.

Perbedaan ukuran sumur (6 mm pada dua sampel dan 0,4 mm pada satu sampel) kemungkinan turut mempengaruhi luas zona hambat yang terbentuk. Semakin besar sumur, konsentrasi antibiotik yang mengalir ke media lebih tinggi, sehingga area hambat juga meningkat (Hanidah *et al.*, 2023; Nurhayati *et al.*, 2020).

Perbedaan efektivitas antara amoxicillin dan kanamycin dapat dijelaskan melalui mekanisme kerjanya. Amoxicillin bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri, sehingga lebih efektif pada bakteri Gram positif. Sebaliknya, kanamycin merupakan antibiotik aminoglikosida yang menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom 30S, dan dikenal memiliki spektrum yang lebih luas, termasuk terhadap bakteri Gram negatif (Rahmah *et al.*, 2024). Hasil penelitian ini sejalan dengan studi Rahmah *et al.* (2024) dan Kurniawan *et al.* (2023) yang menunjukkan bahwa kanamycin menghasilkan zona hambat lebih besar dibandingkan amoxicillin pada *E. coli*

2. Efektivitas Antibiotik Kanamycin

Kanamycin menunjukkan **aktivitas antibakteri yang sangat kuat**, dengan diameter zona hambat sebesar **33,2 mm** meskipun menggunakan ukuran sumur yang kecil (0,5 mm). Hal ini menunjukkan bahwa kanamycin memiliki daya hambat yang tinggi terhadap mikroba uji, bahkan dengan jumlah volume antibiotik yang relatif kecil.

Data ini sejalan dengan penelitian Rahmah *et al.* (2024) yang menyatakan bahwa kanamycin termasuk antibiotik spektrum luas yang sangat efektif terhadap berbagai strain bakteri gram negatif dan positif.

3. Anomali pada Perlakuan Aquades

Yang menarik dari hasil ini adalah bahwa **aquades** (kontrol negatif) menunjukkan zona hambat yang justru lebih luas daripada antibiotik amoxicillin,

yaitu **33,7 mm**. Fenomena ini sangat **tidak wajar**, karena aquades tidak memiliki kandungan antibakteri. Kemungkinan yang dapat menjelaskan anomali ini adalah:

- Terjadinya **kontaminasi silang** dengan antibiotik lain selama proses pipetasi atau inokulasi.
- Kesalahan labeling atau pengisian sumuran, sehingga sumur yang seharusnya diisi aquades justru terisi antibiotik.
- Media atau teknik inkubasi yang tidak steril, sehingga zona bening bukan hasil hambat, melainkan hasil degradasi atau kontaminasi.

Hal ini sejalan dengan peringatan dalam penelitian Cui et al. (2021), bahwa pada metode sumuran, **kontrol eksperimental sangat rentan terhadap kontaminasi**, terutama jika dilakukan di luar LAF atau dengan peralatan kurang steril. Oleh karena itu, kontrol negatif perlu diawasi secara ketat untuk menjamin validitas data.

4. Perbandingan Antar Antibiotik

Jika dibandingkan, **kanamycin menghasilkan zona hambat terbesar**, diikuti oleh **amoxicillin**, dan terakhir (secara kontroversial) adalah aquades. Secara teori, urutan efektivitas ini sangat logis jika aquades dikecualikan sebagai kontrol, karena kanamycin dikenal memiliki mekanisme kerja yang kuat dalam menghambat sintesis protein bakteri.

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Zona Hambat

Beberapa faktor yang dapat memengaruhi luas zona hambat pada metode sumuran antara lain:

- **Konsentrasi antibiotik:** Semakin tinggi konsentrasi, semakin besar zona hambat (Nurhamidin *et al.*, 2021).
- **Ukuran sumur:** Mempengaruhi jumlah larutan antibiotik yang masuk ke media.
- **pH media:** Beberapa antibiotik hanya aktif pada pH tertentu.
- **Jenis dan fase pertumbuhan mikroba:** Mikroba muda (fase log) lebih rentan daripada yang sudah berada pada fase stasioner.
- **Waktu inkubasi:** Waktu yang terlalu lama bisa menyebabkan zona menyempit karena bakteri kembali tumbuh (Martsiningsih *et al.*, 2023).

Bagian hasil berisi temuan penelitian yang didapatkan dari data penelitian dan berkaitan dengan hipotesis. Hasil dan pembahasan juga berisi hasil analisis yang merupakan jawaban dari pertanyaan/permasalahan penelitian. Pada bagian pembahasan menekankan pada hubungan antara interpretasi hasil dengan teori yang digunakan. Panjang bagian hasil dan pembahasan kurang lebih 40-60% dari total panjang artikel. Apabila diperlukan, penjelasan hasil penelitian dan pembahasannya dapat disusun dalam sub-bab yang terpisah.

KESIMPULAN

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, antara lain jumlah sampel uji yang terbatas, variasi ukuran sumuran yang dapat memengaruhi luas zona hambat, serta adanya anomali pada kontrol aquades yang kemungkinan besar disebabkan oleh kontaminasi silang atau kesalahan teknis saat pipetasi. Oleh karena itu, penelitian lanjutan dengan jumlah replikasi lebih banyak dan prosedur aseptik yang lebih ketat sangat disarankan untuk memperkuat validitas hasil

Penelitian ini menunjukkan bahwa **kanamycin memiliki efektivitas antibakteri lebih tinggi** dibandingkan amoxicillin terhadap mikroba uji dengan metode difusi sumuran, ditunjukkan oleh diameter zona hambat yang lebih besar. Selain itu, ditemukan **anomali pada kontrol aquades**, yang mengindikasikan kemungkinan kontaminasi atau kesalahan teknis. Metode sumuran efektif digunakan dalam pengujian sensitivitas antibiotik, namun memerlukan kontrol aseptik yang ketat. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menegaskan bahwa metode difusi sumuran dapat menjadi metode efektif untuk menguji sensitivitas antibiotik, namun perlu penerapan teknik aseptik yang lebih ketat serta pengawasan kontrol negatif agar data yang dihasilkan lebih valid

DAFTAR RUJUKAN

1. Hanidah, U., Nabilla, F. A., Azkadhafina, F., Hidayat, T. A., Putri, N. F., Zahra, P. A., ... & Buulolo, F. (2023). ANTIBIOTICS SENSITIVITY TEST DIFFUSION AND DILUTION METHODS. *Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 38-47.
2. Elzuhria A, N., kaffah, N. S., N, N. R., Hanidah, U., S, A. M., Nabilla, F. A., Azkadhafina, F., Hidayat, T. A., Putri, N. F., Zahra, P. A., Setiawan, T., & Buulolo, F. (2023). ANTIBIOTICS SENSITIVITY TEST DIFFUSION AND DILUTION

- METHODS. *Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 38–47. <https://doi.org/10.33533/jrpps.v2i1.7027>
3. Cui, Z. H., He, H. L., Wu, S. B., Dong, C. L., Lu, S. Y., Shan, T. J., Fang, L. X., Liao, X. P., Liu, Y. H., & Sun, J. (2021). Rapid Screening of Essential Oils as Substances Which Enhance Antibiotic Activity Using a Modified Well Diffusion Method. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(4), 463. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040463>
 4. Rahmah, W. N., Ramdhani, F. H., & Hidayani, A. (2024). Gambaran Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode DISC dan Sumuran: Description of Antibiotic Sensitivity Test Results on *Escherichia coli* Bacteria Using DISC and Well Methods. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 10(2), 344-348.
 5. Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), 41-46.
 6. Nurhamidin, A. P., Fatimawali, F., & Antasionasti, I. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak N-Heksan Biji Buah Langsung (*Lansium Domesticum* Corr) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Klebsiella Pneumoniae*. *Pharmacon*, 10(1), 748-755.
 7. Badria, S. U., Amiriyah, D., Fazrani, Y. A., Rahmadani, A. F., & Faisal, F. (2023). Uji Efektivitas Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga* L.) terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*. *Era Sains: Jurnal Penelitian Sains, Keteknikan dan Informatika*, 1(4), 21-27.
 8. Martsiningsih, A., Suyana, S., Noviani, A., Rahmawati, U., Sujono, S., & Astuti, F. D. (2023). Pengaruh waktu inkubasi terhadap diameter zona hambat antibiotik pada uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumonia*. *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 11(1), 1-8.
 9. Kurniawan, H. M., Zuhdi, N., & Nasution, A. N. (2023, October). Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. In *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Komputer dan Sains* (Vol. 1, No. 1, pp. 712-718).