

Formalin Effectiveness Test With Various Concentration of *Clostridium perfringens* Growth Inhibition

Evaluation Study of Preserving Bodies Method

Jelita Numa Nadiya^{1,*}, Zaenuri Syamsu Hidayat², IDSAP Peramiarti³

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Jenderal Soedirman

² Department of Forensic and legal Medicine Faculty of Medicine, University of Jenderal Soedirman

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Jenderal Soedirman

*)Corresponding author : E-mail: jelita.009@gmail.com

ABSTRAK

Kematian adalah berhentinya sistem fungsi jantung atau sirkulasi, sistem pernafasan, dan telah terjadi kematian batang otak. Sesaat setelah terjadi kematian akan terjadi proses pembusukan. Bakteri utama yang berperan dalam proses pembusukan adalah bakteri *Clostridium perfringens*. Proses pembusukan terkadang perlu dihambat dengan pengawetan jenazah. Pengawetan jenazah adalah tindakan medis berupa pemberian bahan kimia tertentu seperti formalin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan formalin dalam menghambat pertumbuhan *C.perfringens* serta menentukan konsentrasi formalin efektif. Jenis penelitian ini adalah *true* eksperimental dengan pendekatan *post-test only with control group design*. Penelitian menguji efek formalin dalam menghambat pertumbuhan *C.perfringens*. Konsentrasi formalin yang diberikan sebesar 2%,4%,6%,8%, dan 10% dalam medium cair *Nutrient Broth*. Dilakukan inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, lalu penanaman di medium agar cawan dengan metode *spread plate* untuk mengetahui pertumbuhan bakteri. Bakteri yang tumbuh kemudian dihitung dengan *colony counter* dan dilakukan perhitungan presentase penghambatan. Konsentrasi formalin efektif dilihat berdasarkan *Minimum Inhibitory Concentration 50 (MIC₅₀)* dan data yang diperoleh diuji menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi formalin 6% memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 52% sehingga dapat dikatakan

ABSTRACT

Death is the cessation of function of the circulatory system and respiratory system, or brain stem death has occurred. Decomposition is natural process that occur shortly after death. The main bacteria involved in the decomposition process is *Clostridium perfringens*. The process of decomposition sometimes need to be inhibited by the preservation bodies. Preserving the corpse is a medical procedure for the provision of certain chemicals such as formalin. This study was conducted to determine the ability of formalin in inhibiting the growth of *C.perfringens* and the effective concentration of formalin. This was an experimental study with *post test only and control group design*. The research examined the effects of formalin that inhibit the growth of *C.perfringens*. The concentration of formalin was given at 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% in liquid medium *Nutrient Broth*. *C.perfringens* were incubated for 24 hours at 37°C, then planted in agar plate with *spread plate method* to determine the growth of bacteria. Bacterial growth was calculated by colony counter then the percentage inhibition was determined. The effective concentration of formalin was determined by *Minimum Inhibitory Concentration 50 (MIC₅₀)* and the data obtained were analyzed using parametric tests *One Way Anova*. The results of this study indicated that the concentration of formalin 6% has the ability to inhibit 52% of bacterial growth. Thus formalin 6% could be regarded as the effective concentration. *One-Way Anova test*

sebagai konsentrasi efektif, serta setelah diuji menggunakan uji parametrik *One-Way Anova* didapatkan hasil signifikan yaitu $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah formalin sebagai larutan pengawetan jenazah terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Clostridium perfringens* dengan konsentrasi efektif yaitu 6%.

Kata Kunci : Pembusukan, *Clostridium perfringens*, Formalin, Antibakterial, Desinfektan

showed the value $p = 0.000$ ($p < 0.05$). In conclusion, formalin as a corpse preservation solution were able to inhibit the growth of bacteria C. Perfringens with effective concentration of 6%.

Keywords : Decomposition, *Clostridium perfringens*, Formalin, antibacterial, disinfectant

PENDAHULUAN

Kematian adalah berhentinya sistem fungsi jantung atau sirkulasi, sistem pernafasan, dan telah terjadi kematian batang otak (UU Nomor 39 tahun 2009). Sesaat setelah terjadi kematian maka terjadi perubahan pada tubuh yaitu turunya suhu tubuh dibandingkan suhu lingkungan (*algor mortis*), kekakuan pada otot (*rigor mortis*), dan perubahan warna kulit (*livor mortis*), kemudian terjadi proses pembusukan (Dahlan, 2007; Parkinson, 2009).

Proses pembusukan diawali dengan proses autolisis yang menyebabkan terciptanya kondisi lingkungan anaerobik, lebih asam serta tersedianya nutrisi sebagai hasil lisisnya sel sehingga terjadi peningkatan laju pertumbuhan mikroflora normal tubuh. Populasi flora normal terbanyak terdapat pada sistem pencernaan yaitu $\pm 10^{14}$ CFU/mL. Pada sistem pencernaan, flora normal yang berperan utama pada proses pembusukan adalah bakteri anaerob (96-99%) dengan bakteri utama adalah *Clostridium perfringens* (60%) (Saraswati et al., 2008).

Pembusukan jenazah terkadang perlu dihambat seperti pada pembuatan preparat anatomi dalam ilmu kedokteran, penyelidikan hukum, atau transportasi jenazah dari satu tempat ke tempat lain. Dalam upaya transportasi jenazah, syarat utama yang diperlukan adalah sudah dilakukannya pengawetan jenazah dengan formalin (Susanti, 2015). Pengawetan jenazah merupakan suatu tindakan medis berupa pemberian bahan kimia

tertentu pada jenazah untuk menghambat proses pembusukan serta menjaga penampilan luar jenazah (Mosby, 2008).

Bahan kimia yang digunakan dalam pengawetan jenazah salah satunya adalah formalin. Formalin merupakan larutan tidak berwarna yang didalamnya terkandung 30-50% formaldehid dan 10-20% metanol dalam air. Formalin sebagai antimikrobia, menginaktivasi bakteri dengan cara merusak asam amino, DNA, mendenaturasi protein dinding bakteri (Maillard, 2002). Selain itu, formalin juga mampu melakukan penetrasi pada bagian dalam spora bakteri, oleh karena itu laju pertumbuhan bakteri dapat dihambat dan proses pembusukan tidak terjadi (McDonnal et al., 1999).

METODE

Penelitian ini adalah jenis penelitian *true experimental* dengan pendekatan *post test-only with control group design*. Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap pada berbagai konsentrasi formalin dan kontrol.

Sampel penelitian adalah isolat bakteri *C. perfringens* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. yang kemudian ditumbuhkan kembali pada media selektif *Cooked Meat*, dan dilakukan peremajaan pada media *Nutrient Broth* dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Untuk mengetahui efek penghambatan pertumbuhan bakteri *C. perfringens* maka digunakan metode dilusi cair yang diberi larutan formalin dengan konsentrasi berbeda pada tiap tabung reaksi. Terdapat enam tabung reaksi yang berisi media *Nutrient Broth*, salah satunya sebagai kontrol kemudian 5 tabung sisanya diberi berbagai konsentrasi formalin dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% kemudian setiap tabung diberikan suspensi bakteri masing-masing sebanyak 1 ml. Setelah dilakukan metode dilusi, dilakukan penanaman pada agar cawan yang berisi media selektif *Cooked Meat* dengan metode *spread plate*. Diinkubasi dalam *anaerobic jar* dengan ditambahkan *generating gas kit* selama 24 jam dengan suhu 37°C. Dilakukan perhitungan koloni pada cawan dengan metode *Total Plate Count (TPC)* kemudian dilanjutkan dengan menghitung persentase penghambatan *C. perfringens*. Analisis univariat dilakukan dengan penyusunan statistik deskriptif terhadap variabel-variabel yang diukur. Hasil analisis dicantumkan dalam bentuk rerata dan simpang baku karena data terdistribusi normal (Dahlan, 2009).

Analisis bivariat menggunakan metode parametrik uji *one way ANOVA* karena varians data yang homogen dan distribusi data yang normal. Perbedaan antar variabel dinyatakan bermakna apabila $p < 0,05$. Semua uji statistik dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95%. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

HASIL

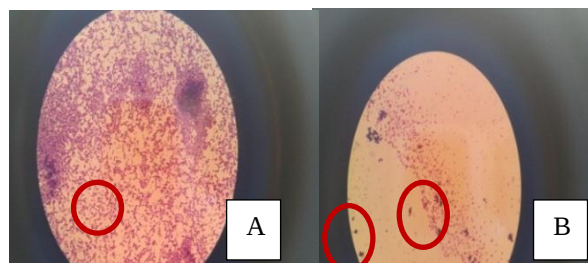
Penelitian ini menggunakan isolat *C. perfringens* yang telah dilakukan peremajaan isolat dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan identifikasi makroskopis berupa morfologi koloni serta identifikasi mikroskopis berupa pewarnaan gram dan pewarnaan spora.



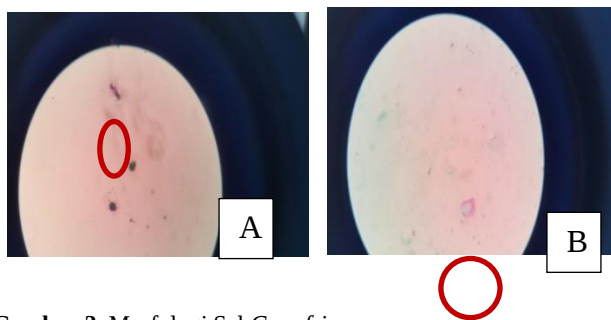
Gambar 1. Gambaran Makroskopis Koloni *C. perfringens*
(A)Kelompok Kontrol
(B) Kelompok Perlakuan Konsentrasi 2%.

Hasil identifikasi makroskopis menunjukkan koloni bakteri *C. perfringens* di media agar CMM menunjukkan morfologi koloni berbentuk bulat, ukuran sedang-besar, berbau busuk, dengan tepi utuh, terdapat elevasi, permukaan halus mengkilap dan berwarna putih-keabuan

Hasil Identifikasi mikroskopis berupa pewarnaan gram didapatkan morfologi sel gram positif (berwarna ungu), berbentuk batang dan bergerombol (Gambar 1.2). Kemudian hasil pewarnaan spora dengan *malachite green*, didapatkan sel berbentuk basil dengan warna hijau pada bagian subterminal dan dikelilingi warna merah samar pada tepinya atau sel vegetatif.

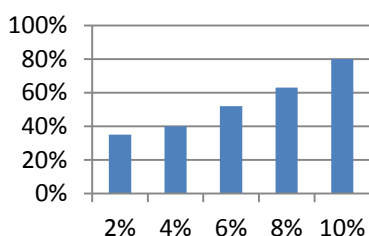


Gambar 2. Morfologi Sel *C. perfringens*
(A) Kelompok Kontrol
(B) Kelompok Perlakuan Konsentrasi 2%.
Keterangan: lingkaran merah (sel-sel bakteri bergerombol)



Gambar 3. Morfologi Sel *C. perfringens*
(A)Kelompok Kontrol
(B) Kelompok Perlakuan Konsentrasi 6 %.
Keterangan: lingkaran merah (endospora)

Pengujian daya hambat formalin terhadap pertumbuhan *C.perfringens* dilakukan dengan metode dilusi. Didapatkan hasil konsentrasi 2% mampu menghambat pertumbuhan sebesar 35%, konsentrasi 4% mampu menghambat sebesar 40%. Pada konsentrasi 6% sudah mampu menghambat pertumbuhan sebesar 52% ($>50\%$), kemudian konsentrasi 8% memiliki kemampuan menghambat sebesar 63%. Penghambatan tertinggi terjadi pada konsentrasi 10% yaitu sebesar 80%. Persentase daya hambat formalin dapat dilihat dari grafik 4.1.



Grafik 1.1 Persentase Penghambatan Formalin

Data yang diperoleh kemudian diuji menggunakan analisis statistik berupa *One Way Anova*, dengan hasil $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat diartikan bahwa formalin secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *C. perfringens*. Selanjutnya dilakukan uji *post-hoc tuckey* untuk mengetahui perbedaan daya hambat antar perlakuan, dan didapatkan hasil terdapat perbedaan daya hambat yang bermakna pada konsentrasi 2%, 4%, dan 6% dibandingkan konsentrasi 8% dan 10%.

PEMBAHASAN

Potensi penghambatan pertumbuhan *C.perfringens* dinilai dari aktivitas formalin yang ditunjukkan oleh penurunan jumlah pertumbuhan koloni bakteri. Penelitian ini menggunakan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC_{50}) sebagai acuan untuk menentukan keefektifan formalin yaitu konsentrasi terendah dari formalin yang sudah mampu menghambat $>50\%$ bakteri (Andrews,2001).

Pada penelitian ini pemberian formalin dengan konsentrasi 6% sudah mampu menghambat pertumbuhan sebesar 52% ($\geq 50\%$) atau dapat diartikan sebagai konsentrasi yang efektif. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Nagggar *et al.* (2001) tentang pengujian aktivitas antimikrobal dengan beberapa desinfektan termasuk formalin dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *e.colli* (gram negatif). Nagggar *et al.* (2001) menyebutkan bahwa pemberian formalin dengan konsentrasi 6% selama 6 jam mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif sebesar 100%. Sehingga dapat diartikan bahwa formalin mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif melainkan juga gram negatif.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Ahmed dan Sutohy pada tahun 2003 tentang efek berbagai macam desinfektan terhadap beberapa bakteri patogen seperti *C. perfringens* yang diinkubasi selama 2x24 jam menyebutkan formalin pada konsentrasi 5% bahkan sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *C. perfringens* sebesar 100%.

Kemampuan formalin dalam menghambat pertumbuhan *C.perfringens* karena formalin merupakan agen sporosidal dan juga biosidal. Formalin sebagai agen sporosidal, dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Ortenzio *et al.* tahun (1972) menyebutkan bahwa larutan formaldehid (formalin) merupakan agen sporosidal pada bakteri *C.perfringens*, *C. tetani*, dan *B. anthracis*.

Formalin sebagai agen biosidal menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak sitoplasma bakteri sehingga menghambat aktivitas enzim sitoplasma serta aktivitas biomolekul penting bakteri (DNA dan RNA) sehingga aktivitas metabolisme bakteri terhambat. Formalin juga berfungsi sebagai agen alkali akan bereaksi dengan protein amino, sulfidril, dan hidroksil. Alkali disini merupakan salah satu faktor eksogen penyebab terjandinya *cross-linked* pada DNA bakteri yang akan menghambat sintesis DNA bakteri dan bakteri akan mati (Denyer,1996).

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara in vitro dengan sampel isolat bakteri dari laboratorium, tidak langsung dilakukan penelitian pada jenazah jadi belum tentu bisa langsung diterapkan pada jenazah.

KESIMPULAN

Formalin sebagai larutan yang digunakan dalam proses pengawetan jenazah terbukti secara klinis maupun statistik mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Clostridium perfringens* dengan konsentrasi efektif sesuai MIC₅₀ yaitu 6%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ahmed, M Mustofa; S.A. Sotohy. 2003. In-Vitro Study of Some Selected Disinfectants On Some Pathogens Of Hygienic Significance In Veterinary Practice, 6 (1) : 13-25
2. Andrews, Jennifer. M. 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 : 5-16.
3. Asaka,Takashi; Hisao Kikugawa. 2007. Influence of Preservation in Two Kinds of Formaldehyde Solutions on the Fracture Characteristics of Bovine Femoral Compact Bones. *Materials Transactions*, 2 (1): 16-20
4. Denyer, S.P. 1996. Mechanism of Action Antibacterial Biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96: 227-245.
5. Maillard,J Y.2002. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium*, 92: 16S-27S
6. McDonnell, Gerald; Rusell, A Denver.1999. American Society for Microbiology : *Antiseptic and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance*, 12 (1): 147-179.
7. Naggar El,Mustafa Y.M; M.A. Akeila; H.A. Turk; A.A El-Ebabdy; M.Z. Sahaly. 2001. Evaluation of in vitro antibacterial activity of some disinfectants on *Escherichiacoli* serotypes. *J.Gen. Appl. Microbial*, 47 : 63-73.
8. Ortenzio,L.F;L.S Stuart; J.L Friedl. 1972.The Resistance of bacterial spores to constant boiling hydrochloric acid. *JournalAssoc.Off.Agric.Chem*,36: 480-484
9. Parkinson,Rachel. 2009. *Bacterial Communities Associated with Human Decomposition*. Victoria : University of Wellington.
10. Popova, T.P,B.D Baykov, V.K. Kirov. 2013. Tensting The Effect of Different Concentrations of Formalin for Decontamination of Cattle Manure. *Bulgarian Jurnal of Agricultular Science*, 19 (6): 1283-1286
11. Saraswat, PK; Nirwan,PS;Saraswat, Shilpi;Mathur,Praveen.2008. *Journal Indian Acad Forensic Medical*: Biodegradation of Dead Bodies Including Human Cadavers and Their Safe Disposal with Reference to Mortuary Practice. Vol: 30;4(273-280).
12. Susanti, R. 2015. Transportasi Jenazah dan Aspek Medikolegal. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4 (2): 20-25.