



# **PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI (KES 220)**

*Smart, Creative and Entrepreneurial*

**PROGRAM STUDI**

# **FARMASI**



**FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN**

**UNIVERSITAS ESA UNGGUL**

**JAKARTA**

**2019**

## **KATA PENGANTAR**

Buku Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi ini disusun untuk menunjang mata kuliah Mikrobiologi Farmasi pada program studi Farmasi UEU.

Diharapkan dengan buku ini, mahasiswa lebih memahami tata cara dan prosedur pelaksanaan praktikum sehingga mahasiswa memiliki kemampuan melakukan dan mengevaluasi hasil praktikum sesuai dengan teori dasar yang telah diberikan. Mudah-mudahan usaha ini dapat membantu tugas mahasiswa dalam menempuh studinya.

Sebagai akhir kata, penyusun mengucapkan terima kasih kepada staf pengajar, karyawan, asisten, dan sejawat lainnya yang telah memberikan saran dan bantuannya hingga tersusunnya Buku Penuntun ini.

### **Penyusun :**

#### **Tim Dosen:**

- Dr. Aprilita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.
- Inherni Marti Abna, S.Si, M.Si
- Dr. Sri Teguh Rahayu, M.Farm., Apt.

## DAFTAR ISI

Daftar Isi .....	ii
Tata Tertib .....	iv
<i>Standart Operating Procedure</i> (SOP) Praktikum Mikrobiologi .....	vi
Panduan Penyusunan Laporan .....	viii
<b>I.</b> Pengenalan Alat .....	1
<b>II.</b> Pembuatan Media.....	8
<b>III.</b> Sterilisasi.....	13
<b>IV.</b> Dasar-Dasar Teknik Mikrobiologi.....	19
A. Teknik Isolasi dan Penanaman Mikroba .....	19
B. Teknik Pemindahan Kultur Mikroba (Kultur Murni) .....	25
<b>V.</b> Uji Potensi Senyawa Antimikroba Secara Difusi .....	28
A. Difusi Sumuran .....	28
B. Difusi Paper Disk .....	31
<b>VI.</b> Uji Cemar Mikrobia.....	33
A. Uji Angka Lempeng Total.....	34
B. Uji Angka Kapang Khamir.....	35
<b>VII.</b> Identifikasi dan Determinasi Bakteri.....	37
A. Pengecatan Gram.....	37
B. Uji Biokimiawi .....	38
C. Determinasi Bakteri .....	43
<b>VIII.</b> Uji Kepekaan Antibiotik : Penentuan KHM Secara Dilusi .....	44
<b>IX.</b> Pengujian Zat Desinfektan.....	48
<b>RESPONSI</b> .....	51
Pustaka Acuan .....	52

Lampiran 1. Prosedur Perhitungan ALT .....	54
Lampiran 2. Prosedur Perhitungan AKK. ....	55
Lampiran 3. Prosedur dan Cara Penentuan MIC dan MBC.....	59



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**



Universitas  
**Esa Unggul**

## TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Mahasiswa peserta praktikum wajib hadir 10 menit sebelum acara praktikum berlangsung. Keterlambatan lebih dari 10 menit tidak diperkenankan mengikuti *pretest*. Praktikan tidak diperkenankan mengikuti praktikum apabila keterlambatan lebih dari 15 menit.
2. Praktikan diharuskan memakai jas praktikum berwarna putih yang bersih (sebelum memasuki laboratorium), *nametag*, alat pelindung berupa sarung tangan (*handscoon*) dan masker (pada saat pengambilan dan penimbangan media, inokulasi mikroba, isolasi mikroba dan perlakuan yang berhubungan dengan mikroba. Pemakaian jas praktikum dan masker juga diwajibkan saat melakukan pengamatan hasil di luar jam praktikum).
3. Setiap praktikan harus mempelajari dan memahami teori dan prosedur kerja sebelum praktek berlangsung. Sebelum praktikum dimulai, praktikan wajib mengumpulkan laporan sementara yang merupakan prasyarat mengikuti acara praktikum pada hari itu. Praktikan yang tidak mengumpulkan laporan sementara, tidak diperbolehkan mengikuti praktikum pada hari itu.
4. Peserta praktikum bekerja secara berkelompok sesuai pengelompokan yang telah ditentukan dan diharapkan proaktif untuk belajar.
5. Setiap kelompok praktikum dibagi menjadi 6 kelompok kecil berdasarkan urutan presensi. Tiap-tiap kelompok kecil bekerja bersama-sama dalam satu meja untuk tiap acara praktikum.
6. Peserta praktikum diharuskan bekerja secara terencana, hati-hati dan teliti. Setelah selesai praktikum, alat-alat maupun bahan yang digunakan harus dikembalikan dalam kondisi bersih dan utuh. Semua praktikan bertanggung jawab terhadap kebersihan dan keamanan ruang praktikum, serta alat-alat yang digunakan.
7. Peserta praktikum yang memecahkan, merusakkan dan atau menghilangkan alat diharuskan melapor ke asisten jaga dan mengganti alat tersebut secepatnya. Peserta praktikum yang merusakkan, memecahkan atau menghilangkan alat diwajibkan menuliskan pada blangko yang telah disediakan di lab di bawah pengawasan asisten koordinator.
8. Peserta praktikum diharuskan menjaga kemurnian bahan-bahan yang dipakai dan menjauhkan segala macam kontaminan yang dapat mengganggu kevalidan hasil praktikum.

9. Bagi Peserta praktikum yang berhalangan hadir karena alasan sakit atau tugas prodi/fakultas/universitas diberi kesempatan untuk mengikuti praktikum golongan lainnya (dengan catatan praktikum golongan lain belum berlangsung). Praktikan terlebih dulu meminta ijin kepada dosen/koordinator praktikum dengan membawa surat keterangan sakit atau surat tugas dari prodi/fakultas/universitas kemudian dosen/koordinator praktikum memberikan surat ijin mengikuti praktikum golongan lain.
10. Setelah selesai pelaksanaan dan pengamatan praktikum, Peserta praktikum wajib membuat Data sementara dalam laporan sementara yang akan dikoreksi oleh dosen/asisten pendamping kelompok yang bersangkutan. Data sementara yang sudah disetujui dosen/asisten bisa langsung dibawa pulang untuk dibuat Laporan Resmi mata acara praktikum pada hari itu. Pengamatan dilakukan sesuai kebutuhan dan waktu yang telah ditentukan.
11. Pengamatan praktikum yang dilakukan di luar jam praktikum harus didampingi oleh dosen/asisten pendamping kelompok yang bersangkutan. Praktikan bisa membuat kesepakatan dengan dosen/asisten pendamping sesuai kebutuhan dan waktu yang diperlukan.
12. Untuk mengikuti praktikum minggu berikutnya diharuskan sudah menyerahkan Laporan Resmi dari acara praktikum minggu sebelumnya. Bila pada saat itu tidak menyerahkan laporan, nilai laporan sama dengan **NOL**.
13. Bila Peserta praktikum berhalangan dan tidak dapat mengikuti acara praktikum yang menyebabkan nilai-nilainya kosong, maka nilai akhir adalah seluruh nilai yang ada dan kemudian dikonversi berdasar standar nilai yang telah ditetapkan.

## SOP PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Setiap praktikan akan selalu berhubungan dengan **mikroba patogen** selama menjalankan Praktikum Mikrobiologi. Untuk mencegah hal-hal yang tidak diinginkan, setiap praktikan **diharuskan** mentaati peraturan yang telah ditetapkan dan menjalankan petunjuk yang diberikan dosen/asisten jaga.

1. Tas dan benda-benda lain yang tidak diperlukan diletakkan pada tempat yang disediakan. Jangan sekali-kali meletakkannya di atas meja laboratorium!
2. Sekalah baik-baik meja laboratorium dengan desinfektan sebelum dan sesudah kegiatan laboratorium.
3. Cucilah tangan anda baik-baik dengan air dan sabun sebelum dan sesudah kegiatan laboratorium. Lakukan hal yang sama bila anda meninggalkan laboratorium untuk ke toilet atau bila anda ke luar dari ruangan laboratorium.
4. Jangan merokok, makan atau minum di ruang laboratorium.
5. Jauhkan tangan anda dari mulut, hidung, mata dan telinga selama anda bekerja di laboratorium.
6. Perlakukan semua organisme yang anda tangani sebagai patogen atau mampu menimbulkan penyakit. Kebanyakan biakan yang disediakan laboratorium tidak berbahaya, tetapi beberapa di antaranya berbahaya.
7. Anda tidak diperkenankan membawa keluar biakan mikroba apa pun dari ruangan mikroba/ruangan laboratorium.
8. Usahakan supaya mikroba yang anda tangani tidak tercecer dan tidak tercampur dengan mikroba lain.
9. Bila biakan yang sedang anda pindahkan tercecer ke lantai atau di meja praktikum, tuangkan desinfektan di atasnya, seka dengan kertas *tissue*/kapas dan buang di tempat yang disediakan untuk bahan-bahan bukan kaca yang terkontaminasi.
10. Bila anda memecahkan tabung berisi mikroba, tuangkan desinfektan ke atasnya, sapukan dan buang di tempat yang disediakan untuk pecahan kaca atau tuangkan spiritus dan kemudian bakar.
11. Bila anda terkontaminasi atau terluka, hubungi dosen/asisten jaga.
12. Buanglah sampah-sampah yang tidak terkontaminasi di tempat yang disediakan.
13. Jarum inokulasi dan ose harus disterilkan dengan cara memijarkan seluruh panjang

kawatnya sebelum dan sesudah setiap penggunaan. Percikan biakan dapat dihindarkan dengan cara memulai pemanasan di dalam kerucut api sebelah dalam yang berwarna lebih biru.

14. Apabila pipet yang sama perlu digunakan lebih dari 1 kali, jangan meletakkannya langsung di atas meja di antara penggunaan, tetapi letakkanlah pada penyangga pipet yang telah tersedia.
15. Api pada pembakar bunsen harus dimatikan pada waktu tidak digunakan.
16. Biakan yang tidak diperlukan lagi serta bahan-bahan bekas pakai yang mempunyai potensi bahaya harus diletakkan dalam tempatnya masing-masing yang disediakan sebagai berikut :
  - a. Cawan petri, labu dan reaksi diletakkan di tempat yang disediakan.
  - b. Pipet harus diletakkan dalam wadah berisi desinfektan
  - c. Kaca obyek dan penutupnya harus diletakkan dalam tempat-tempat khusus yang telah diberi desinfektan. Bakteri yang ada pada kaca obyek belum tentu mati semuanya sekalipun telah difiksasi dengan panas, jadi berhati-hatilah menanganinya.
  - d. Jangan sekali-kali membuang biakan di tempat cuci.
17. Kurangi bercakap-cakap selama praktikum, agar tidak merugikan pekerjaan sendiri atau rekan lain.
18. Setiap pengerjaan praktikum dan pengamatan harus dicatat dengan cermat.
19. Setiap praktikan diwajibkan membersihkan mikroskop dan mengembalikan ke tempat semula setelah digunakan, selain itu praktikan diharuskan untuk membersihkan meja kerja, memeriksa nyala api dan listrik dipadamkan, menutup kran air dan gas, mencuci tangan dengan desinfektan/lysol, kemudian melapor ke asisten/dosen jaga.
20. Cucilah jas laboratorium anda sehingga selalu bersih pada waktu anda datang kembali ke laboratorium pada waktu berikutnya. Gunakanlah sarung tangan dan masker yang selalu baru di setiap praktikum mikrobiologi.



## PANDUAN PENYUSUNAN LAPORAN PRAKTIKUM

1. Masing-masing praktikan diwajibkan membuat dan membawa laporan sementara praktikum yang mencakup : **acara praktikum, tujuan, dan skema kerja**. Laporan sementara ini menjadi syarat praktikan mengikuti praktikum pada hari itu. Data dan hasil pengamatan praktikum juga ditulis dan/atau digambar dalam laporan sementara yang telah disetujui oleh asisten pedamping praktikum.
2. Laporan sementara **ditulis tangan**.
3. Setelah pengamatan hasil, laporan sementara digunakan sebagai acuan pembuatan laporan resmi. Laporan resmi **diketik** pada kertas A4 dengan batas tepi 2 cm (atas, bawah, kanan, dan kiri), yang mencakup:
  - a. Halaman judul, yang berisi acara praktikum dan identitas praktikan (nama dan NIM).
  - b. Halaman isi yang berisi acara dan topik, tujuan praktikum, tinjauan pustaka, alat dan bahan, skema kerja, hasil pengamatan (berupa data yang telah diolah dan foto), pembahasan, kesimpulan, daftar pustaka, jawaban pertanyaan, dan lampiran (fotocopy pustaka yang digunakan).
4. Laporan resmi diketik dan dibuat secara berkelompok (kelompok kecil).
5. *Copy paste* laporan tidak diperbolehkan. Praktikan dikatakan *copy paste* apabila terdapat 2 buah kalimat berurutan yang sama persis. Praktikan yang melakukan *copy paste* akan dipanggil oleh tim asisten dan kemungkinan terburuk nilai laporan bersangkutan sama dengan **NOL**.

### EVALUASI PRAKTIKUM

a. Lima komponen yang dinilai :

- 1). Rata2 Kerja & Diskusi
- 2). Rata2 Pretest/Posttest
- 3). Rata2 Laporan
- 4). Responsi Teori
- 5). ResponsiPrakt

# PERCOBAAN I

## PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM

### A. Tujuan

Tujuan dari pengenalan alat-alat laboratorium ini adalah untuk mengetahui nama alat-alat yang digunakan di dalam laboratorium farmasi dan mengetahui fungsinya serta mengetahui cara penggunaan beberapa alat-alat dalam laboratorium.

### B. Landasan Teori

Pengenalan alat-alat yang akan dipergunakan dalam laboratorium sangat penting guna kelancaran percobaan yang dilaksanakan diantaranya adalah menghindari kecelakaan kerja dan gagalnya percobaan. Alat-alat laboratorium biasanya dapat rusak atau bahkan berbahaya jika tidak sesuai dengan prosedur pemakaian. Oleh karena itu, pemahaman fungsi dan cara kerja peralatan serta bahan harus mutlak dikuasai oleh praktikan sebelum melakukan praktikum di laboratorium kimia.

Pada dasarnya setiap alat memiliki nama yang menunjukkan kegunaan alat tersebut, prinsip kerja atau proses yang berlangsung ketika alat digunakan. Beberapa kegunaan alat dapat dikenali berdasarkan namanya. Penamaan alat-alat yang berfungsi mengukur biasanya diakhiri dengan kata meter seperti thermometer, hygrometer, spektrofotometer, dll. Alat-alat pengukur yang disertai dengan informasi tertulis, biasanya diberi tambahan “graph” seperti thermograph, barograph (Moningka, 2008).

Pengenalan alat-alat ini meliputi macam-macam alat, mengetahui nama-namanya, memahami bentuk, fungsi, serta cara kerja alat-alat tersebut. Setiap alat dirancang atau dibuat dengan bahan-bahan yang berbeda satu sama lain dan mempunyai fungsi yang sangat spesifik. Kebanyakan peralatan untuk percobaan-percobaan di dalam laboratorium terbuat dari gelas. Meskipun peralatan-peralatan tersebut telah siap dipakai, tetapi di dalam pemasangan alat untuk suatu percobaan kadang kala diperlukan sambungan-sambungan dengan gelas atau membuat peralatan khusus sesuai kebutuhan (Imamkhasani, 2000).

## **C. ALAT DAN FUNGSINYA :**

### **1. Autoklaf (Autoclave)**

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam Mikrobiologi melalui penggunaan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi. atau sekitar 1 atm. dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi<sup>2</sup> (15 Psi = 15 pounds per square inch). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121°C.

#### **Cara Penggunaan Autoklaf :**

1. Sebelum melakukan sterilisasi, periksa dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka harus ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
2. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol bertutup, maka tutup harus dikendorkan.
3. Tutup autoklaf dengan pas dan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
4. Nyalakan autoklaf, diatur timer dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C.
5. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15 menit dimulai sejak tekanan mencapai 1 atm.
6. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada penunjuk tekanan menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

### **2. Inkubator (Incubator)**

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroba pada suhu yang terkontrol. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu untuk inkubator produksi Heraeus B5042 misalnya adalah 10-70°C.

### **3. Hot plate stirrer dan Stirrer bar**

Hot plate stirrer dan Stirrer bar (magnetic stirrer) berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (plate) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Pengadukan dengan bantuan batang magnet Hot plate dan magnetic stirrer mampu menghomogenkan sampai sangat lambat sampai 1600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425°C.

### **4. Colony counter**

Alat ini berguna untuk mempermudah perhitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan petri karena adanya kaca pembesar dan lampu. Selain itu alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni sangat banyak. Jumlah koloni pada Cawan Petri dapat ditandai dan dihitung otomatis yang dapat di-reset.

### **5. Mikropipet (Micropipete) dan Tip**

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000  $\mu\text{l}$ . Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (adjustable volume pipette) antara 1  $\mu\text{l}$  sampai 20  $\mu\text{l}$ , atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (fixed volume pipette) misalnya mikropipet 5  $\mu\text{l}$ . dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip.

Cara Penggunaan :

1. Sebelum digunakan Thumb Knop sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
2. Pasang Tip bersih ke ujung mikropipet.
3. Tekan Thumb Knop sampai hambatan pertama / first stop, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
4. Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
5. Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari Thumb Knop maka cairan akan masuk ke tip.
7. Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
8. Tekan Thumb Knop sampai hambatan kedua / second stop atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
6. Jika ingin melepas tip putar Thumb Knob searah jarum jam dan ditekan maka tip akan

terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.

#### **6. Cawan Petri (Petri Dish)**

Cawan Petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.

#### **7. Tabung reaksi (Reaction Tube / Test Tube)**

Di dalam Mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan memelihara mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (deep tube agar) dan agar miring (slants agar). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Kapas dapat dijadikan penutup mulut tabung yang berisi biakan. Untuk alasan efisiensi, media yang ditambahkan berkisar 10-12 ml tiap tabung.

#### **8. Labu Erlenmeyer (Erlenmeyer Flask)**

Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml, dsb.

#### **9. Gelas ukur (Graduated Cylinder)**

Berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu Erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan.

## **10. Mortar dan Pastle**

Mortar dan penumbuk (pastle) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.

## **11. Beaker Glass**

Beaker glass merupakan alat yang memiliki banyak fungsi. Di dalam Mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media media, menampung akuades dll..

## **12. Lampu spiritus /Pembakar Bunsen (Bunsen Burner)**

Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar Bunsen. Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk sterilisasi jarum ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Perubahan Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas atau metanol.

## **13. Jarum ose/Inokulum**

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat chrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (loop) dan disebut ose atau inoculating loop/transfer loop, dan yang berbentuk lurus disebut inoculating needle/Transfer needle. Inoculating loop cocok untuk melakukan streak di permukaan agar, sedangkan inoculating needle cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (stab inoculat)

## **14. Pinset**

Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotik.

## **15. Mikroskop**

Mikroskop adalah alat bantu untuk melihat objek yang berukuran renik atau sangat kecil sehingga objek terlihat lebih besar dan jelas.

## **Cara Menggunakan Mikroskop:**

1. Letakkan meja preparat dalam permukaan yang datar agar memudahkan pengamatan.
2. Atur perbesaran lensa objektif pada fase yang lebih rendah menggunakan revolver.  
Lensa objektif harus diletakkan pada sumbu pengamatan agar berada pada garis yang sama dengan arah masuknya cahaya dan lensa okuler.
3. Jika mikroskop yang Anda gunakan berjenis monokuler maka Anda harus menggunakan lensa okuler dengan satu mata. Begitu pula jika mikroskop yang Anda gunakan adalah binokuler maka Anda dapat melihatnya dengan kedua mata.
4. Nyalakan lampu dan atur cermin sedemikian rupa agar jumlah sinar yang diperlukan dapat terpenuhi untuk melakukan pengamatan preparat.
5. Bukalah diafragma dengan menggunakan tuas dan sesuaikan lubangnya agar sinar yang diterima mata dapat optimal, tidak terlalu redup maupun terang.
6. Pastikan lensa objektif berada cukup jauh dari meja preparat dengan cara mengatur makrometer searah jarum jam.
7. Letakkan preparat yang telah disiapkan pada meja preparat, tepat di bawah lensa objektif. Gunakan penjepit agar preparat tidak bergeser.
8. Naikkan meja preparat mendekati lensa objektif hingga berjarak sekitar 0.5 cm dengan menggunakan makrometer.
9. Lihatlah bayangan benda melalui lensa okuler sambil menaikturunkan meja preparat menggunakan mikrometer agar mendapatkan bayangan objek yang jelas.
10. Lihatlah objek preparat dari arah samping sambil menyesuaikan lensa objektif dengan perbesaran yang lebih tinggi pada kedudukannya.
11. Pastikan lensa objektif tidak bersentuhan dengan preparat karena dapat merusak hasil pengamatan.
12. Fokuskan preparat dengan cara memutar mikrometer ke arah berlawanan jarum jam dengan perlahan.
13. Jika hasil pengamatan belum terlihat jelas maka atur pencahayaan.
14. Putar revolver pada lensa objektif ke keadaan semula yaitu perbesaran paling kecil setelah Anda selesai melakukan pengamatan.
15. Turunkan meja preparat dan naikkan tabung mikroskop.
16. Ambil preparat dari meja preparat

## 16. pH Indikator Universal

Kertas pH ini berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.

## 17. Pipet Filler/Bola Karet

Filler adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan filler merupakan karet yang resisten bahan kimia. Filler memiliki 3 saluran yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (aspirate) berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (suction) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (exhaust) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.





## **PERCOBAAN II PEMBUATAN MEDIA**

### **A. TUJUAN :**

1. Mempelajari cara pembuatan media dan syarat-syarat yang dibutuhkan oleh suatu media untuk pertumbuhan mikroba.

### **B. LANDASAN TEORI**

#### **1. Media pertumbuhan :**

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Dengan media pertumbuhan dapat dilakukan isolat mikroorganisme menjadi kultur murni dan juga memanipulasi komposisi media pertumbuhannya.

Bahan-bahan media pertumbuhan:

1. Air (H<sub>2</sub>O) sebagai pelarut
2. Agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematid media. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C. Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti Agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding Agar.
3. Silica gel, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematid media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.

#### **2. Nutrisi atau zat makanan**

Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P; unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan/trace element. Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikroba. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak,

protein dan asam organik. Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea dan Vitamin-vitamin.

### 3. Bahan tambahan

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya phenol red (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba non- target/kontaminan.

### 4. Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media

**Agar**, agar dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya adalah sebagai pematat (gelling) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus dimasak dan dipanasi, pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.

**Pepton**, peptone adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.

**Beef extract**, beef extract mengandung basa organik terbuat dari otak,limpa, plasenta dan daging sapi.

**Yeast extract**, yeast extract terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alcohol. Yeast extract mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (B complex).

**Karbohidrat**. karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umumnya digunakan dalam amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol, dll.

### 5. Macam-Macam Media Pertumbuhan

#### 1. Medium berdasarkan sifat fisik

- Medium padat, yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat.
- Medium semi solid (setengah padat), yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4%

sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya bakteri yang tumbuh pada media NfB (Nitrogen free Bromthymol Blue) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media, jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. Semisolid juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media Nitrate Broth, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata diseluruh media.

c. Medium cair, yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (Nutrient Broth), LB (Lactose Broth).

## 2. Medium berdasarkan komposisi

a. **Medium sintesis** yaitu media yang komposisi zat kimianya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya Glucose Agar, Mac Conkey Agar.

b. **Medium semi sintesis** yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya PDA (Potato Dextrose Agar) yang mengandung agar, dekstrosa dan ekstrak kentang. Untuk bahan ekstrak kentang, kita tidak dapat mengetahui secara detail tentang komposisi senyawa penyusunnya.

c. **Medium non sintesis** yaitu media yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya Tomato Juice Agar, Brain Heart Infusion Agar, Pancreatic Extract.

## 3. Medium berdasarkan tujuan

a. **Media untuk isolasi**, media ini mengandung semua senyawa esensial untuk pertumbuhan mikroba, misalnya Nutrient Broth, Blood Agar.

Media selektif/penghambat, media yang selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Contohnya Medium Agar Susu Skim (Skim Milk Agar).

b. **Media diperkaya (enrichment)**, media diperkaya adalah media yang mengandung komponen dasar untuk pertumbuhan mikroba dan ditambah komponen kompleks seperti darah, serum, kuning telur. Media diperkaya juga bersifat selektif untuk mikroba tertentu. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media ini tidak hanya

mempunyai kebutuhan nutrisi sederhana untuk berkembang biak, tetapi membutuhkan komponen kompleks, misalnya Blood Tellurite Agar, Bile Agar, Serum Agar, dll. Untuk peremajaan kultur, media umum atau spesifik yang digunakan untuk peremajaan kultur.

c. **Media untuk menentukan kebutuhan nutrisi spesifik.** Media ini digunakan untuk mendiagnosis atau menganalisis metabolisme suatu mikroba. Contohnya adalah Koser's Citrate medium, yang digunakan untuk menguji kemampuan menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon.

d. **Media untuk karakterisasi bakteri.** Media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan spesifik suatu mikroba. Kadang-kadang indikator ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan kimia. Contohnya adalah Nitrate Broth, Lactose Broth, Arginine Agar.

e. **Media Diferensial.** Media ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari campurannya berdasar karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial, misalnya TSIA (Triple Sugar Iron Agar) yang mampu memilih Enterobacteria berdasarkan bentuk, warna, ukuran koloni dan perubahan warna media di sekeliling koloni.

### **C. Prosedur Kerja**

#### **Alat dan bahan:**

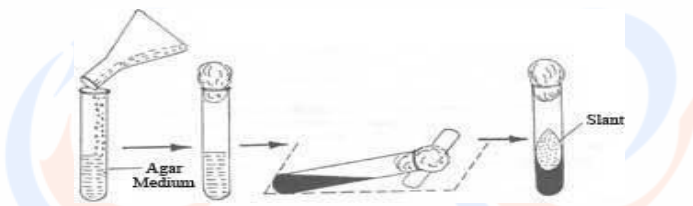
1. Media Nutrien Agar (NA) (Oxoid)
2. Media Nutrien Broth (NB) (Oxoid)
3. Aquades
4. Cawan petri
5. Tabung reaksi
6. Batang pengaduk, pipet volume, erlenmeyer, penangas/elemen pemanas

#### **Cara kerja:**

1. Timbang media NA (Oxoid) dan NB (Oxoid) sesuai prosedur di kemasan. (*Catatan* : Buatlah 50 ml media NA untuk setiap kelompok kecil praktikum dan 50 ml media NB untuk satu golongan praktikum). Penimbangan media dilakukan secara teliti dan cepat, kemudian serbuk media dimasukkan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan aquades dan aduk sampai merata dengan batang pengaduk
3. Panaskan dengan hati-hati menggunakan penangas/elemen pemanas sampai media tercampur homogen (ditunjukkan dengan warna yang kuning jernih). *Perhatian*

:pada saat pemanasan jangan sampai terbentuk buih berlebihan sampai meluap!

4. Sebelum diautoklaf, tuangkan media NA dengan volume tertentu menggunakan pipet volume : 5 ml ke dalam tabung reaksi untuk NA miring, 10 ml ke dalam tabung reaksi untuk NA tegak, 15 ml untuk NA dalam cawan petri untuk **percobaan 4b** (metode isolasi *pour plate*), sisanya untuk NA dalam cawan petri untuk **percobaan 6** (pengenalan mikroba di alam). Tutup tabung reaksi dengan penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat!)
5. Sebelum diautoklaf, tuangkan NB ke dalam tabung reaksi untuk 6 kelompok praktikum dalam 1 golongan. Masing- masing tabung reaksi @ 8 ml. Tutup tabung reaksi dengan kapas atau penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat!)
6. Sterilkan seluruh media dalam tabung reaksi tersebut dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit, tekanan 1 atm 121°C. *Pelajari cara mengoperasikan autoklaf dengan benar!*
7. Setelah diotoklaf : media NA 10 ml dalam tabung reaksi diletakkan tegak pada rak tabung dan biarkan memadat, media NA 5 ml inkubasikan miring dan biarkan memadat. Media sisa NA tuangkan dalam cawan petri dan biarkan memadat (**untuk percobaan 6 : pengenalan mikroba di alam**). Media NA 15 ml dibiarkan sampai suhu 45-50°C (**untuk percobaan 4b : metode isolasi *pour plate***).
8. Media NB dalam tabung reaksi biarkan dingin. Seluruh media NA dan NB ini akan digunakan untuk percobaan selanjutnya.



## **PERCOBAAN III**

### **STERILISASI**

#### **A. TUJUAN**

1. Mengetahui metode sterilisasi
2. Membebaskan alat maupun media dari jasad renik

#### **B. DASAR TEORI**

Persyaratan penting pada percobaan mikrobiologi adalah proses sterilisasi, yaitu tindakan membebaskan alat maupun media dari jasad renik. Semua perlengkapan untuk pembuatan, distribusi, dan penyimpanan media harus disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi.

Bila pada penanaman material dalam media, dimana cawan petri, ose maupun media digunakan tidak steril, maka sangatlah sulit untuk membedakan apakah kuman yang berhasil diisolasi tersebut berasal dari penderita ataukah karena kontaminasi dari alat atau media yang digunakan.

Suatu alat atau bahan dapat dikatakan steril apabila bebas dari mikroba berbentuk vegetative maupun spora.

#### **Cara-cara sterilisasi**

##### **1. Panas kering**

###### **a. Flaming (membakar)**

Digunakan nyala Bunsen untuk sterilisasi ose, sterilisasi mulut tabung percobaan dan wadah lainnya pada waktu inokulasi media.

Pada waktu memanaskan ose, mulailah dari pangkal kawat dan setelah terlihat merah berpijar, secara pelan-pelan pemanasan dilanjutkan ke ujung ose. Hal ini untuk mencegah terloncatnya sisa kuman akibat pemanasan langsung dan terlalu cepat pada mata ose.

###### **b. Oven udara panas (hot air oven)**

Digunakan untuk sterilisasi alat-alat laboratorium dari gelas seperti cawan petri, tabung, pipet. Biasanya sterilisasi dikerjakan pada suhu 175°C selama 1,5 – 2 jam. Sebelum disterilkan, labu dan tabung percobaan harus kering, ditutup dengan kapas, pipet dibungkus dengan kertas atau ditaruh dalam kaleng pipet.

##### **2. Panas Basah**

###### **a. Dengan merebus**

Digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang berupa gunting, pinset, skapel, jarum, spuit injeksi, dan lain-lain dengan cara direbus dalam keadaan mendidih selama 30 – 50 menit.

b. Uap air panas

Terutama untuk mensterilkan media-media yang dapat rusak bila disterilkan dengan autoclave (uap air bertekanan). Sterilisasi dilakukan dengan pemanasan 100°C selama 1 jam. Perlu diingat bahwa dengan cara tersebut spora belum dapat dimatikan.

c. Uap air bertekanan (autoklaf)

Digunakan terutama untuk sterilisasi media yang tahan terhadap panas tinggi. Sterilisasi dikerjakan pada suhu 120°C selama 10 – 30 menit, sesuai kebutuhan (biasanya selama 20 menit).

d. Pasteurisasi

Digunakan untuk sterilisasi susu dan minuman beralkohol. Panas yang digunakan 61,70°C selama 30 menit.

### 3. Filtrasi

Cara ini dipakai untuk sterilisasi cairan yang akan rusak bila disterilkan dengan cara lain (pemanasan). Filtrasi lazim digunakan untuk sterilisasi sera, toksin, preparat antibiotik, enzim, vitamin, zat-zat labil lainnya. Kelemahan metode filtrasi dapat ditembus oleh golongan virus.

#### **Sterilisasi dengan penyaringan (filtrasi)**

Sterilisasi dengan penyaringan dilakukan untuk mensterilisasi cairan yang mudah rusak jika terkena panas atau mudah menguap (volatile). Cairan yang disterilisasi dilewatkan ke suatu saringan (ditekan dengan gaya sentrifugasi atau pompa vakum) yang berpori dengan diameter cukup kecil untuk menyaring bakteri. Virus tidak akan tersaring dengan metode ini.

Sterilisasi dengan penyaringan dapat dilakukan dengan berbagai cara :

- *Non-disposable filtration apparatus*
  - disedot dengan pompa vakum
  - volume 20-1000mL
- *disposable filter cup unit*
  - disedot dengan pompa vakum
  - volume 15-1000mL
- *disposable filtration unit* dengan botol penyimpanan

- disedot dengan pompa vakum
- volume 15 -1000mL
- *syringe filters*
- ditekan seperti jarum suntik
- volume 1-20mL
- *spin filter*

- ditekan dengan gaya sentrifugasi
- volume kurang dari 1mL

#### Cara kerja *non-disposable filtration apparatus*

- Sterilkan saringan (dapat menggunakan saringan Bekerfeld, Chamberland Zeitz), membrane penyaring (kertas saring) dan Erlenmeyer penampung.
- Pasang atau rakit alat-alat tersebut secara aseptis (sesuai gambar), lalu isi corong dengan larutan yang akan disterilkan.
- hubungkan katup Erlenmeyer dengan pompa vakum kemudian hidupkan pompa.
- setelah semua larutan melewati membrane filter dan tertampung di erlenmeyer, maka larutan dapat dipindahkan ke dalam gelas penampung lain yang sudah steril dan tutup dengan kapas atau aluminium foil yang steril.

#### 4. Sterilisasi dengan penyinaran

Digunakan untuk sterilisasi ruang tertentu, misalnya kamar atau ruang inokulasi. Penyinaran selama beberapa jam sebelum digunakan dan lampu dimatikan bila ruang tersebut akan digunakan, misalnya untuk menyiapkan media, inokulasi bakteri, dan sebagainya.

Jenis radiasi :

- Sinar ultra violet
- Sinar X
- Sinar Gamma : untuk material yang tebal
- Sinar Katoda : digunakan setelah pengepakan

#### 5. Desinfeksi dan Antiseptik (Cara Khemis)

Bahan yang sering digunakan :

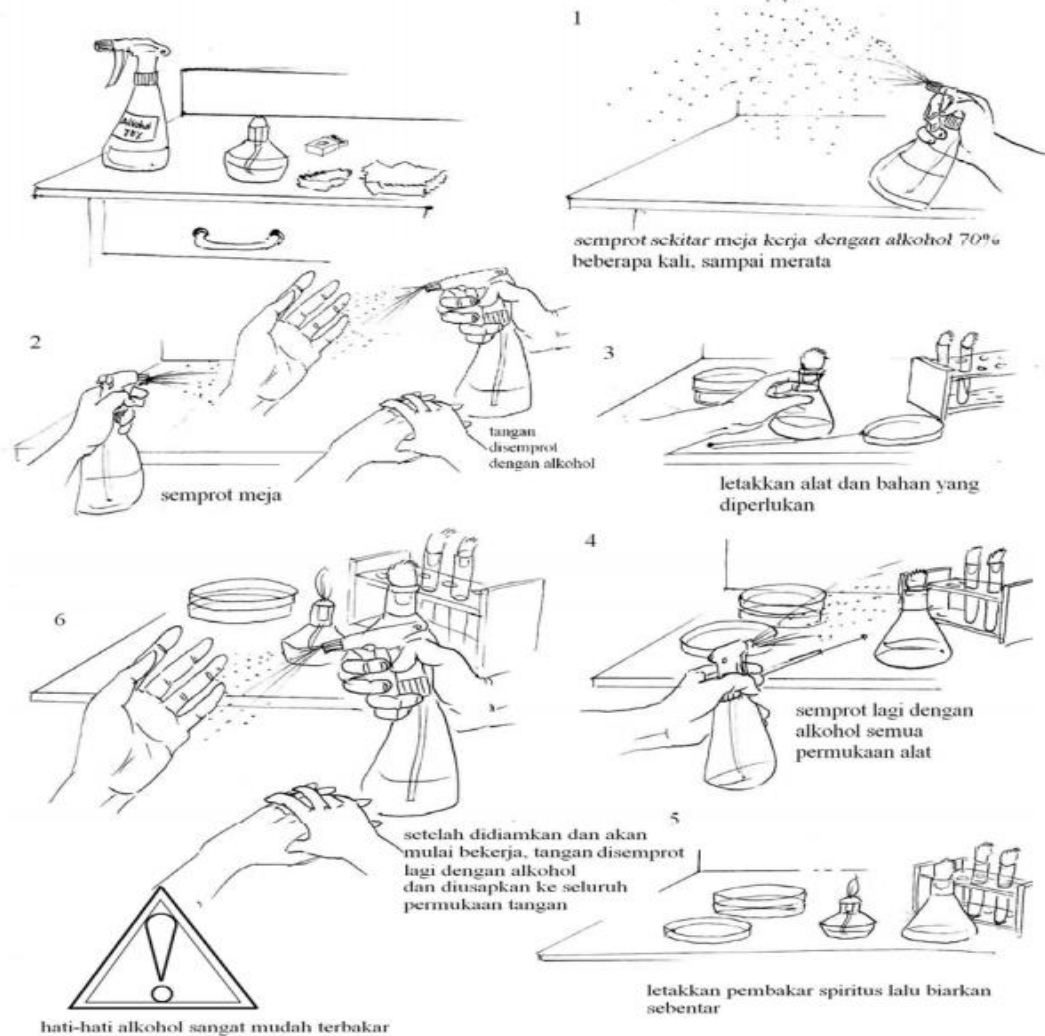
- Fenol
- alkohol 50- 70%
- Formaldehid (formalin)
- Detergen



- Halogen
- Logam berat (merkurokrom)
- Etilen oksid (gas sterilisator) mudah meledak dan toksik

Berbagai prosedur umum kerja dalam mikrobiologi yang membutuhkan teknik aseptik

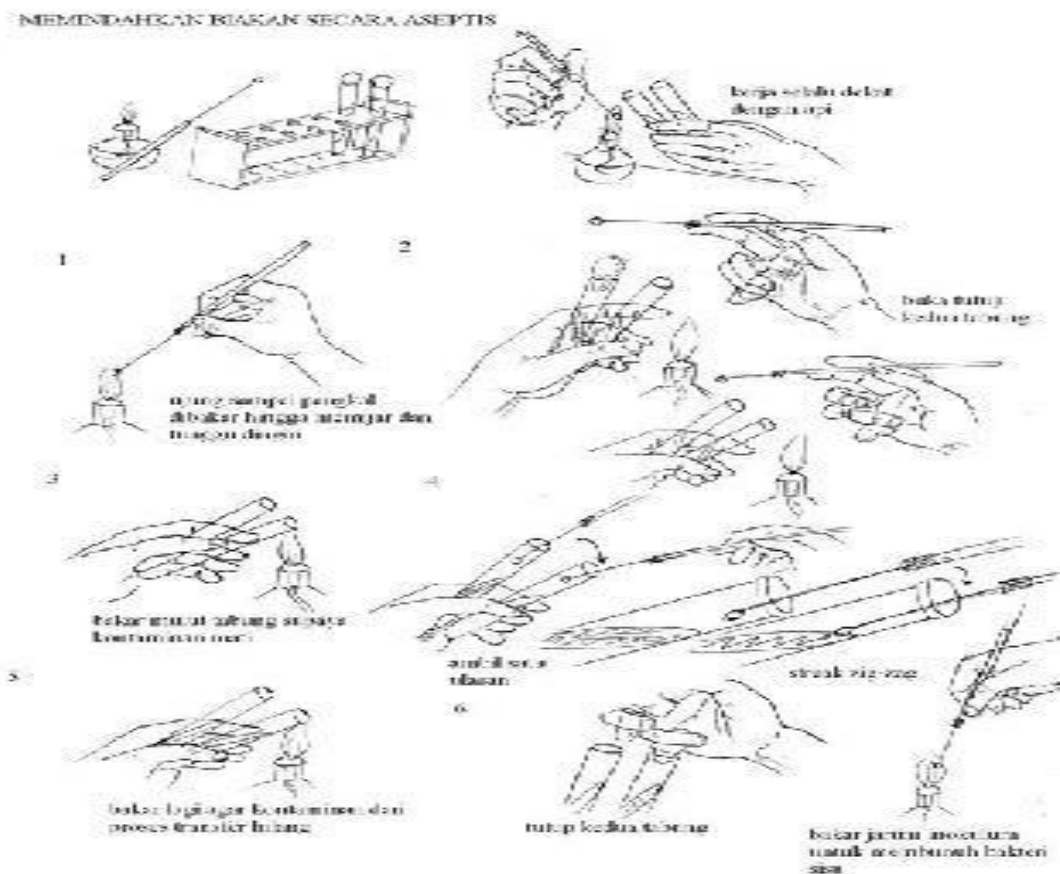
### 1. Mensterilkan meja kerja



### 2. Mensterilkan Alat dengan Metode Panas Kering

- Siapkan lampu spiritus
- Siapkan alat yang akan disterilasi seperti ose, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer dan alat lainnya.
- Sterilisasi alat dengan cara membakar permukaan alat gelas diatas nyala api bunsen.
- Untuk sterilisasi ose dilakukan dengan cara memanaskan ose pada lampu piritus atau nyala api bunsen, mulailah dari pangkal kawat dan setelah terlihat merah berpijar, secara pelan-pelan pemanasan dilanjutkan ke ujung ose.

3. Mensterilkan Alat dengan Oven Udara Panas
  - a. Siapkan alat-alat laboratorium dari gelas seperti cawan petri, tabung, pipet.
  - b. Alat percobaan kering dan ditutup dengan kapas, pipet dibungkus dengan kertas
  - c. sterilisasi pada suhu  $175^{\circ}\text{C}$  selama 1,5 – 2 jam.
  
4. Mensterilkan Alat dengan uap air bertekanan (autoklaf)
  - a. Siapkan alat-alat yang akan disterilisasi
  - b. Bungkus alat-alat yang akan disterilkan dengan plastik
  - c. Masukkan alat yang akan disterilisasi kedalam autoklaf
  - d. sterilisasi pada suhu  $1200^{\circ}\text{C}$  selama 10 – 30 menit.
  
5. Memindahkan Biakan Secara Aseptis



### **C. PROSEDUR KERJA**

#### **ALAT DAN BAHAN**

Alat :

1. Ose bulat dan panjang
2. Cawan petri
3. Tabung reaksi
4. Lampu spiritus
5. Erlenmeyer
6. Rak Tabung Reaksi
7. Botol Semprot
8. Autoklaf
9. Oven

Bahan :

1. Kertas sampul
2. Aluminium foil
3. Kapas
4. Aquades
5. Alkohol
6. Kapas

#### **D. CARA KERJA**

1. Sediakan alat-alat yang akan disterilisasikan.
2. Bungkus cawan petri dengan kertas sampul lalu dilipat.
3. Masukkan alat dan bahan yang akan di sterilkan ke dalam alat sterilisasi yaitu autoklaf. Cara penggunaan autoklaf seperti yang dijelaskan pada pengenalat alat laboratorium.
4. Sterilisasi dengan alat autoklaf dengan menggunakan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
5. Jika tekanan pada autoclave jarum penunjuknya mendekati garis merah, maka segera tekananya diturunkan ke LOW, kemudian sebaliknya, dan tekanan dipertahankan selama 15 menit.
6. Setelah sterilisasi, dinginkan alat dan bahannya, kemudian matikan autoklaf.

## PERCOBAAN IV

### DASAR-DASAR TEKNIK MIKROBIOLOGI

#### A. TUJUAN :

1. Mempelajari teknik-teknik isolasi dan penanaman mikroba.
2. Mempelajari cara-cara pemindahan mikroba secara aseptis.
3. Mempelajari teknik pembuatan pulasan bakteri untuk pengecatan/pewarnaan bakteri
4. Mengenal bermacam-macam mikroba di alam.

#### 1. Teknik-teknik Isolasi atau Penanaman Mikroba

Untuk menanam suatu mikroba perlu diperhatikan faktor- faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen (gas, O<sub>2</sub> atau udara). Cara menumbuhkan mikroba yang anaerob sangat berbeda dengan yang aerob. Mengisolasi suatu mikroba ialah memisahkan mikroba tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Untuk isolasi harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroba pada medium biakan serta syarat-syarat lain untuk pertumbuhannya (Jutono dkk, 1980).

Mikroba jarang terdapat di alam dalam keadaan murni. Kebanyakan merupakan campuran bermacam-macam spesies mikroba. Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikrobia adalah : 1). *Spread plate method* (cara tebar/sebar), 2). *Streak platemethod* (cara gores), 3). *Pour plate method* (cara tabur).

##### a. *Spread PlateMethod* (Cara Tebar/Sebar)

Teknik *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat.

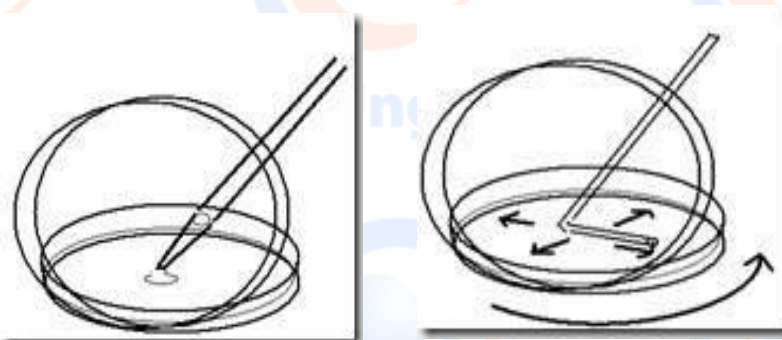
Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikrobia yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung.

### Alat dan bahan:

1. *Spreader*/batang bengkok/batang Drigalsky
2. Pipet volume, lampu bunsen
3. Media NA dalam cawan petri
4. Kultur murni bakteri
5. Larutan pengencer (BPW atau NaCl fisiologis 0,9%)

### Cara kerja:

1. Buatlah pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-6}$  dari kultur murni bakteri dengan larutan pengencer.
2. Ambil tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri, buka dan bakar leher tabung.
3. Pindahkan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media NA dalam cawan petri.
4. Bakar *spreader* yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol, biarkan dingin.
5. Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan *spreader* secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar 1).
6. Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.
7. Bandingkan pertumbuhan dari tiap-tiap pengenceran dan bandingkan pertumbuhannya dengan hasil teknik *spread plate* pada **percobaan 2 (sterilisasi secara filtrasi)**.



**Gambar 1. Spread Plate Method**

### **b. Pour Plate Method (Cara Tabur)**

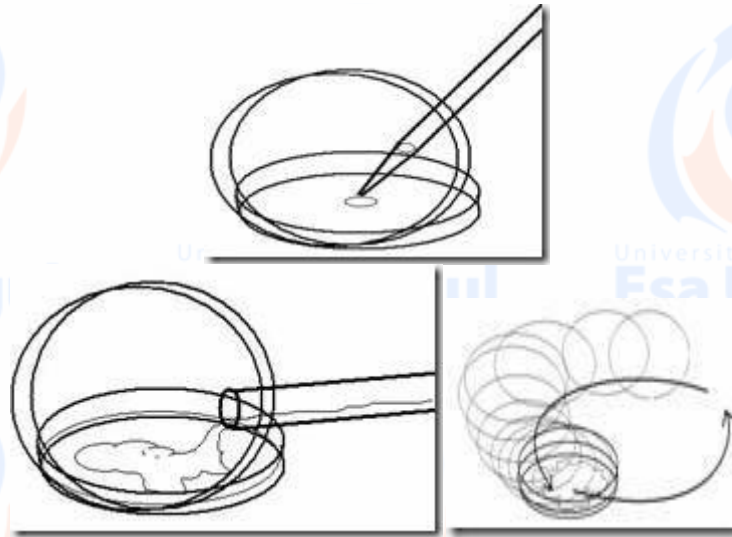
Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980)

**Alat dan bahan:**

1. Media NA dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
2. Cawan petri steril
3. Kultur murni bakteri
4. Pipet volume, lampu bunsen

**Cara kerja:**

1. Dinginkan mediaNA dalam tabung reaksi sampai suhu  $\pm 45 - 50^{\circ}\text{C}$  (cirinya : terasa hangat di kulit/tidak 'kemranyas').
2. Buka tutup tabung yang mengandung kultur murni bakteri, dan bakar leher botol.
3. Pindahkan 1 ml kultur murni bakteri ke dalam tabung reaksi yang mengandung NA secara aseptis.
4. Bakar leher tabung di atas bunsen, dan tuangkan media NA yang telah mengandung kultur murni bakteri ke dalam cawan petri.
5. Goyangkan perlahan-lahan untuk mencampur kultur bakteri dengan NA sampai homogen. Penggoyangan petri jangan terlalu kuat. Pada saat penuangan media, petri bisa diletakkan dalam radius maksimal 20 cm dari sumber api (zona steril) (lihat Gambar 2).
6. Setelah agar memadat diinkubasi terbalik pada suhu kamar selama 24 jam. Inkubasi terbalik dilakukan setelah agar memadat. Amati pertumbuhannya.



**Gambar 2. Pour Plate Method**

### **c. Streak Plate Method (Cara Gores)**

Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980). Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994)

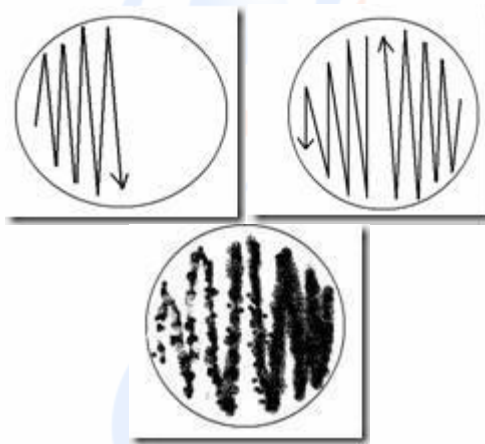
#### **Alat dan bahan:**

1. Media NA dalam cawan petri
2. Kultur murni bakteri

3. Jarum ose
4. Lampu bunsen

**Cara kerja:**

1. Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri.
2. Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada permukaan media agar dimulai pada satu ujung. *Perhatikan teknik penggoresan!* (lihat Gambar 3, 4, 5, 6). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar.
3. Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
4. Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar selama 24 jam dan amati pertumbuhannya.

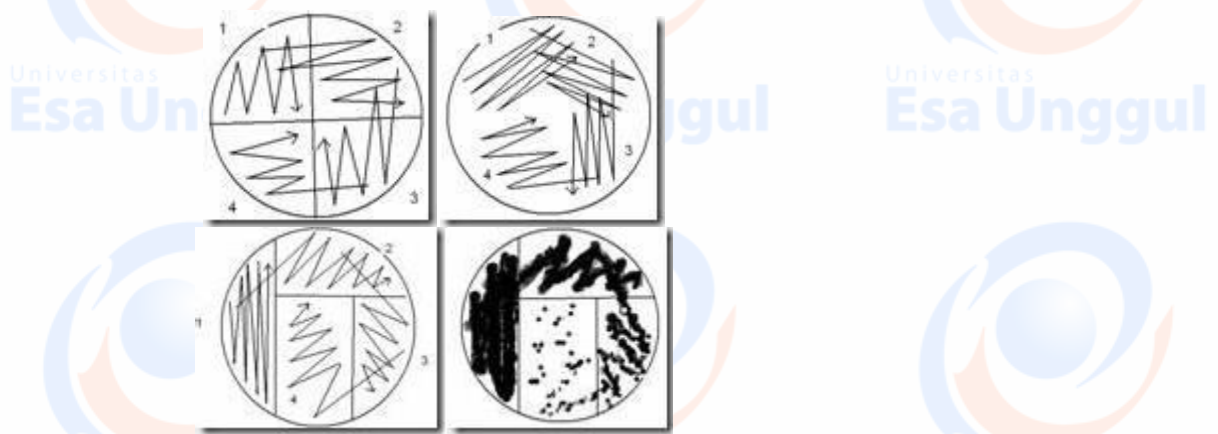


**Gambar 3. Streak Plate Method secara Goresan Sinambung**

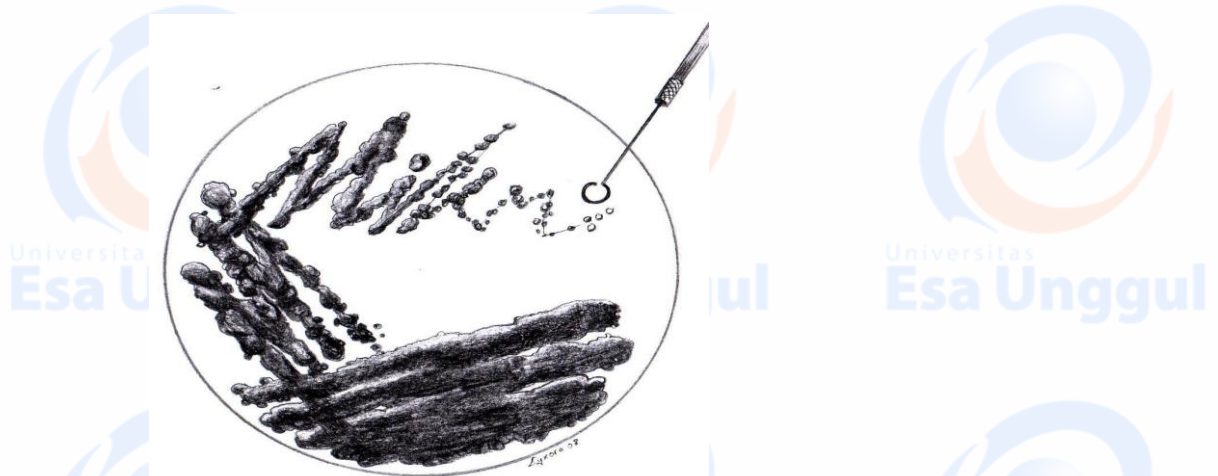




**Gambar 4. *Streak Plate Method* secara Goresan T**



**Gambar 5. *Streak Plate Method* dengan lebih banyak Sektor**



**Gambar 6. Contoh Hasil Isolasi *Streak Plate Method***

## 2. Teknik - Teknik Pemindahan Kultur Mikroba (Kultur Murni)

Untuk mencegah tercemarnya biakan murni, perlu diadakan teknik aseptik pada waktu memindahkan mikroba. Dalam percobaan- percobaan ini akan dipelajari cara-cara memindahkan biakan murni dengan cara aseptik.

### Alat dan bahan:

1. Media NA miring dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
2. Media NA tegak dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
3. Media nutrisi cair atau NB dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
4. Jarum ose
5. Jarum inokulasi
6. Kultur murni bakteri
7. Lampu bunsen
8. *Vortex mixer*

### Cara kerja:

1. Siapkan media NA dan NB hasil percobaan 1 (media NA miring, media NA tegak dan media NB/cair). Pemindahan kultur mikroba dilakukan satu persatu untuk masing-masing media.
2. Longgarkan tutup dari masing-masing tabung reaksi yang berisi media (*jangan di lepaskan!*).
3. Pegang tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri di tangan kiri.
4. Pegang jarum ose pada tangan kanan dan bakar di atas nyala lampu bunsen hingga kawat memijar. *Perhatian : pemanasan jarum ose dilakukan dari pangkal ke ujung sampai memijar, sebelum digunakan kawat didinginkan beberapa saat!*
5. Pegang ose menggunakan ibu jari dan jari telunjuk, gunakan jari kelingking untuk membuka tutup tabung reaksi (tutup tabung reaksi tetap dipegang seperti posisi semula).
6. Bakar mulut tabung reaksi, masukkan jarum ose dan ambil 1 ose biakan bakteri.
7. Bakar kembali mulut tabung reaksi dan tutup tabung reaksi kembali.
8. Ambillah tabung reaksi yang akan diinokulasi dengan tangan kiri, dengan cara yang sama buka tutup tabung reaksi, dan bakar mulut tabung reaksi.
9. Inokulasikan biakan bakteri pada tabung reaksi inokulasi dengan cara goresan zigzag pada permukaan NA miring.

10. Bakar mulut tabung reaksi dan tutup tabung reaksi kembali, kemudian bakar ose.
11. Beri label : tanggal percobaan, nama bakteri, teknik pemindahan dan nama kelompok.
12. Lakukan dengan cara yang sama untuk media nutrisi cair/NB menggunakan jarum ose dan media agar tegak secara tusukan tegak lurus menggunakan jarum inokulasi.
13. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.

### 3. Teknik-teknik Pembuatan Pulasan Bakteri

Bakteri atau mikroba lainnya dapat dilihat dengan mikroskop cahaya tanpa pewarnaan/pengecatan atau dengan pewarnaan/pengecatan. Pengamatan tanpa pengecatan lebih sukar dan tidak dapat dipakai untuk melihat bagian-bagian sel dengan teliti karena sel bakteri atau mikroba lainnya transparan atau semi transparan. Dengan pengecatan, dapat dilihat struktur sel mikroba lebih seksama. Fungsi pengecatan adalah a). memberi warna pada sel atau bagian-bagiannya sehingga member kontras dan tampak lebih jelas, b). dapat untuk menunjukkan bagian-bagian struktur sel, c). membedakan mikroba satu dengan yang lain, dan d). menentukan pH dan potensial oksidasi reduksi ekstraseluler dan intraseluler (Jutono dkk., 1980).

Pengecatan bakteri umumnya menggunakan lebih dari satu tingkat pengecatan. Hasil pengecatan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti : fiksasi, substrat, dekolorisator dan sebagainya. Dalam pembuatan pulasan bakteri yang siap diwarnai, perlu dilakukan fiksasi terlebih dahulu yang bertujuan antara lain : a). mencegah mengkerutnya globula-globula protein sel, b). merubah afnitas cat, c). mencegah terjadinya otolisis sel, d). dapat membunuh mikroba secara cepat dengan tidak menyebabkan perubahan-perubahan bentuk atau strukturnya, e). melekatkan bakteri di atas gelas benda dan f). membuat sel-sel lebih kuat/keras.

Cara fiksasi yang paling banyak digunakan dalam pengecatan bakteri adalah dengan membuat lapisan suspensi/pulasan bakteri di atas gelas benda, kemudian dikeringanginkan dan dilalukan beberapa kali di atas nyala lampu spiritus (Jutono dkk., 198

#### **Alat dan bahan :**

- a. Gelas benda
- b. Jarum ose
- c. Lampu Bunsen
- d. Label preparat

- e. Aquades steril
- f. Kultur murni bakteri
- g. Penjepit gelas benda

**Cara kerja :**

1. Labellah gelas benda yang kering dan bersih. Sterilkan jarum ose dengan memijarkannya pada nyala bunsen dan dinginkan.
2. Jika kultur dalam bentuk cair (suspensi), ambillah 1 ose penuh dan letakkan di tengah-tengah gelas benda dan ratakan seluas  $\pm 1 \text{ cm}^2$
3. Jika kultur dalam medium padat, ambillah dengan jarum ose satu bagian kecil kultur dan letakkan di tengah gelas benda yang sebelumnya telah diberi aquadest steril dan ratakan
4. Biarkan kering dengan mengangin-anginkan gelas benda
5. Fiksasi pulasan bakteri dengan melewati di atas nyala bunsen (*hati-hati, jangan sampai terlalu kering/gosong*), tergantung jenis pengecatannya.
6. Pulasan bakteri siap untuk diwarnai

**D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI DAN TUGAS :**

1. Jelaskan prinsip dasar dan tujuan teknik isolasi mikroba secara *streak plate*, *pour plate* dan *spread plate*!
2. Apa yang dimaksud dengan kultur murni/biakan murni?
3. Bagaimana teknik penggoresan yang benar pada teknik isolasi secara *streak plate* agar supaya didapatkan koloni bakteri terpisah?
4. Mengapa pada waktu inkubasi cawan petri harus diletakkan terbalik?

**PERCOBAAN V**  
**UJI POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBA SECARA DIFUSI**  
**SUMURAN DAN DIFUSI *PAPER DISK***

**A. TUJUAN :**

Mengetahui ada tidaknya potensi antibakteri dari suatu senyawa antimikroba, misalnya antibiotik, secara difusi sumuran dan difusi *paper disk*.

**B. LANDASAN TEORI :**

Uji potensi antimikroba dapat dilakukan dengan 2 macam metode, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Cara pengujian potensi (daya atau kekuatan) senyawa antimikroba ada bermacam- macam, tergantung pada sifat dan bentuk sediaan senyawa antimikroba. Pada umumnya digunakan cara pengenceran, *cylinder diffusion plate method*, *paper disk diffusion method* dan *agar dilution plate method*.

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Metode difusi dapat dilakukan secara *paper disk* dan secara sumuran.

Pada metode difusi secara *paper disk*, kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan di atas permukaan media agar yang telah ditanam mikroba uji, setelah itu hasilnya dibaca. Penghambatan pertumbuhan mikroba oleh antibiotik terlihat sebagai zona jernih di sekitar pertumbuhan mikroba. Metode difusi secara sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang telah ditanami mikroba uji. Sumuran dibuat tegak lurus terhadap permukaan media. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran ini dan diinkubasikan, setelah itu hasilnya dibaca seperti pada difusi secara *paper disk*. Luasnya zona jernih merupakan petunjuk kepekaan mikroba terhadap antibiotik. Selain itu, luasnya zona jernih juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media (Lay, 1994; Jawetz dkk, 1986).

**C. PROSEDUR KERJA :**

**1. Uji Potensi Senyawa Antibiotik Secara Difusi Sumuran**

**Alat dan Bahan :**

- a. Alat gelas : petridish steril, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes,

- gelas ukur
- b. Mikropipet, pelobang gabus no. 4, jangka sorong/penggaris, jarum ose, spidol, kertas label, *vortex mixer*, *spreader*, *incubator*, *autoklaf*, *oven*, *kulkas*
- c. Senyawauji berupa antibiotik (misalnya Amoxycillin sirup kering) dengan variasi konsentrasi : 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml
- d. Kultur murni bakteri ujidalam media NB umur 24 jam
- e. Media nutrien agar (NA)
- f. Deret larutan standar Mac Farland
- g. Nutrient Broth (NB) untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- h. Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji
- i. Alkohol 70 %

### **Cara kerja :**

#### **a. Preparasi Senyawa Uji**

Preparasi senyawa uji dilakukan sesuai petunjuk dalam kemasan, kemudian buatlah berbagai variasi konsentrasi senyawa uji. Pada praktikum ini dibuat 4 variasi konsentrasi senyawa uji (konsentrasi 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml (*Perhatikan cara pembuatan konsentrasi senyawa uji!*))

#### **b. Preparasi Mikroba Uji**

- 1) Siapkan kultur murni bakteri uji
- 2) Siapkan deret larutan standard Mac Farland
- 3) Buat sebanyak 2 tabung @ 10 ml suspensi bakteri ujimenggunakan media PW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroba  $6 \cdot 10^8$  CFU/ml).

#### **c. Pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran**

- 1) Siapkan beberapa petri berisi 20 ml media nutrient agar (NA), 15 ml NA dan 5 ml NA steril
- 2) **Pembuatan kontrol kontaminasi media**
  - a) Buka petri berisi 20 media NA, secara aseptis buatlah sumuran pada petri 1) dengan pelobang gabus no. 4. Ambil bulatan NA pada sumur yang dibuat dengan jarum ose secara hati-hati sehingga NA di sekelilingnya tidak tergores/rusak. Masukkan bulatan NA tersebut dalam beker glass berisi alkohol.

b) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan

**3) Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji secara double layer**

a) Tuang 5 ml NA steril ke dalam cawan petri steril, biarkan memadat sebagai *base layer agar*.

b) Ambil 1 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke dalam 15 ml media NA secara *pour plate*, kemudian tuangkan secara merata sebagai *seed layer agar* di atas *base layer agar*, biarkan memadat.

c) Buat 1 sumuran dengan menggunakan pelubang gabus No. 4. Pembuatan sumuran dilakukan sampai dasar *seed layer agar* dan tidak menembus *base layer agar* yang berfungsi sebagai dasar sumuran.

d) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji

**4) Pembuatan kontrol negatif dan pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran**

a) Buatlah media *base layer agar* dan *seed layer agar* seperti pada tahan 3). Bagian dasar petri dibuat garis dengan spidol untuk membaginya menjadi 4 bagian. Buat sumuran pada bagian tengah ke-4 bidang petri tersebut dengan cara yang sama dengan no. 3). c).

b) Dengan menggunakan mikropipet, pada masing- masing sumuran tersebut diinokulasikan 50  $\mu$  l senyawa uji dengan kontrol negatif/pelarut dan 4 variasi konsentrasi senyawa uji.

c) Beri label pada dasar petri secara benar

d) Inkubasikan selama 24 jam. *Perhatian : inkubasi tidak dilakukan secara terbalik!* Amati zona keruh dan jernih di setiap petri.

e) Amati, gambar pertumbuhannya. Ukur diameter zona jernih di sekitar sumuran dengan jangka sorong/penggaris. Hitung diameter zona hambat yang terbentuk.

*Langkah a dikerjakan untuk 1 golongan praktikum (dikerjakan oleh praktikan meja I untuk dipakai 1 golongan praktikum).*

*Langkah b dikerjakan per meja*

*Langkah c no 2, 3, 4 : Kel prakt 1 mengerjakan 2 & 4*

*Kel prakt 2 mengerjakan 3 & 4*

*Kel prakt 3 mengerjakan 2 & 4*

*Kel prakt 4 mengerjakan 3 & 4*

*Kel prakt 5 mengerjakan 2 & 4*

*Kel prakt 6 mengerjakan 3 & 4*

## 2. Uji Potensi Senyawa Antibiotik Secara Difusi *Paper Disk*

### Alat dan Bahan :

- a. Alat-alat : petridish , pinset, pipet volume steril
- b. Kultur murni bakteri uji dalam media NB umur 24 jam
- c. Disk antibiotik (*paper disk* yang mengandung antibiotik penisilin/ampisilin) sebagai kontrol positif
- d. *Disk blank*
- e. Senyawauji berupa antibiotik (misalnya Amoxycillin sirup kering) dengan variasi konsentrasi : 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml
- f. Media nutrien agar (NA)
- g. Deret larutan standar Mac Farland
- h. Buffered Pepton Water (BPW) untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- i. Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji
- j. Alkohol 70 %

### Cara kerja :

#### a. Preparasi Mikroba Uji

- 1) Siapkan kultur murni bakteri uji.
- 2) Siapkan deret larutan standard Mac Farland
- 3) Buat 10 ml suspensi bakteri uji menggunakan media BPW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroba  $6 \cdot 10^8$  CFU/ml).

#### b. Pengujian potensi antibiotik secara difusi *paper disk*

##### 1) Pembuatan kontrol kontaminasi media

- a) Siapkan 20 ml media NA dan tuang secara aseptis ke dalam petri steril, biarkan memadat
- b) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan.

##### 2) Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji

- a) Ambil 0,2 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke dalam petri berisi media NA secara *spread plate* (harus merata di seluruh permukaan media) dan biarkan permukaan agar mengering.



b) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji

### 3) Pengujian potensi antibiotik secara difusi *paper disk*

a) Siapkan petri berisi 20 ml media nutrisi agar (NA)

b) Ambil 0,2 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke media NA secara merata dengan cara *spread plate* dan biarkan permukaan agar mengering.

c) Secara aseptik, letakkan 1 disk antibiotik (*disk* yang mengandung penisilin/ampisilin) dan 4 *disk blank* (yang mengandung berbagai konsentrasi senyawa uji antibiotik sebanyak 20 µl), serta 1 *disk blank* kontrol negatif (*disk* yang mengandung pelarut) pada permukaan media NA.

d) Setiap *paper disk* diinokulasikan dengan jarak tertentu secara teratur, agar supaya tidak terjadi *overlapping* zona hambat yang terbentuk.

e) Beri label pada dasar petri secara benar

f) Inkubasikan selama 24 jam. Amati zona keruh dan jernih di setiap petri

g) Amati, gambar pertumbuhannya dan ukur diameter zona jernih yang terbentuk di sekitar *paper disk* dengan jangka sorong/penggaris.

#### D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa perbedaan metode difusi sumuran dan difusi *paper disk* yang Anda kerjakan di atas?
2. Mengapa pada preparasi mikroba uji diperlukan larutan standar?
3. Bagaimana cara pembuatan larutan standar Mac Farland?
4. Apa fungsi dari : kontrol kontaminasi media, kontrol pertumbuhan mikroba uji dan kontrol negatif/pelarut?
5. Mungkinkah digunakan pelarut senyawa uji yang memiliki potensi antimikroba? Jelaskan!
6. Pertanyaan lain diberikan dosen/assisten

**PERCOBAAN VI**  
**UJI CEMARAN MIKROBIA:**  
**ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DAN ANGKA KAPANG KHAMIR (AKK)**

**A. TUJUAN**

1. Menghitung jumlah mikroba aerob mesofil yang terdapat dalam sampel
2. Menguji bahwa sampel yang diuji tidak boleh mengandung mikroba melebihi batas yang ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan manusia

**B. LANDASAN TEORI**

Angka Lempeng Total (ALT) adalah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C (SNI, 1992). Uji ALT (Angka Lempeng Total) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total (ALT) dalam tiap gram contoh bahan (Anonim, 1992; Anonim, 2000).

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25<sup>0</sup> C dan dinyatakan dalam satuan koloni /mL (Soekarto, 2008). Uji AKK (Angka Kapang Khamir) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan kapang dan khamir setelah cuplikan diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25<sup>0</sup>C. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. (Anonim, 1992; Anonim, 2002).

## C. PROSEDUR

### 1. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

#### Alat dan Bahan :

- a. Media Plate Count Agar (PCA)
- b. Buffered Pepton Water (BPW)
- c. Sampel uji (jamu gendong)
- d. Pipet volume
- e. *Colony Counter* (alat hitung koloni)
- f. Labu ukur
- g. Vortex

#### Cara Kerja :

##### a. **Penyiapan Sampel Uji**

Kemasan jamu yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.

##### b. **Persiapan dan Homogenasi Sampel**

c. Secara aseptis diambil sebanyak 10 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan 90 ml BPW dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran 10<sup>-1</sup>

d. **Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*)** (*hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan*)

##### e. **Pengenceran sampel untuk uji ALT**

Sebanyak 5 buah labu ukur 10 ml disiapkan, masing-masing telah diisi dengan 9 ml pengencer BPW. Sebanyak 1 ml pengenceran 10<sup>-1</sup> dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung pertama yang telah diisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran 10<sup>-2</sup> (homogenisasi dengan vortex). Selanjutnya dibuat pengenceran hingga 10<sup>-5</sup>.

##### f. **Uji Angka Lempeng Total (ALT)**

Dari tiap pengenceran dipipet 1 ml suspensi ke dalam cawan petri steril secara duplo. Dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 15 ml media PCA. Cawan petri digoyang dengan hati-hati agar sampel tersebar merata. Dilakukan pula uji kontrol untuk

mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam cawanpetri dan biarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dan 1 ml pengencer BPW lalu dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 35<sup>0</sup>C selama 24 - 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung. Perhitungan Angka Lempeng total dalam 1 ml contoh dengan mengkalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.

## 2. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

### Alat dan Bahan :

- a. Media *Potato Dextrrose Agar* (PDA)
- b. Larutan pengencer *Pepton Dilution Fluid* (PDF)
- c. Sampel uji (jamu gendong)
- d. Kloramfenikol 100 mg/liter media

Pembuatan larutan kloramfenikol : 1 gram kloramfenikol dalam 100 ml air suling steril.

- e. Pipet volume
- f. *Colony counter* (alat hitung koloni)

### Cara Kerja :

- a. **Penyiapan Sampel Uji (sama dengan uji ALT)**
- b. **Pembuatan media PDA (*Potato Dextrrose Agar*) (*hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan*)**
- c. **Homogenisasi dan Pengenceran Sampel**

- 1) Perhitungan Angka Kapang Khamir (AKK) bertujuan untuk menghitung jumlah koloni kapang dan khamir yang terdapat dalam bahan.

Pada prinsipnya pengujian ini menggunakan metode yang sama dengan penentuan Angka Lempeng Total (ALT).

- 2) Media pertumbuhan yang digunakan adalah PDA (*Potato Dextrrose Agar*)
- 3) Larutan pengencer yang digunakan adalah *Pepton Dilution Fluid* (PDF)

#### **d. Uji AKK**

Dari masing-masing pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri steril secara duplo. Media PDA yang telah dicairkan sebanyak 20 ml dituangkan ke dalam cawan petri yang sebelumnya telah ditambah dengan 1 ml larutan kloramfenikol dan digoyangkan sehingga campuran tersebut merata. Setelah agar membeku, cawan petri dibalik dan diinkubasikan pada suhu 25<sup>0</sup>C atau pada suhu kamar selama 5 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-5. Koloni kapang dan khamir dihitung setelah 5 hari. Uji sterilitas media dilakukan dengan menuangkan media PDA dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PDA dan 1 ml pengencer (PDF) lalu dibiarkan memadat.

#### **D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI DAN TUGAS :**

1. Interpretasikan hasil percobaan yang telah Anda lakukan dan simpulkan apakah sampel makanan yang telah Anda analisis mengandung jumlah mikroba melebihi batas yang ditetapkan atau tidak! Jelaskan! (berdasarkan Peraturan Pemerintah/Keputusan Kepala Badan POM RI tentang persyaratan cemaran mikrobial pada makanan)
2. Apa fungsi dari uji sterilitas media dan uji kontrol pengencer!
3. Bagaimana cara perhitungan koloni untuk mendapatkan nilai ALT dan AKK?
4. Uji apa saja yang dilakukan selain uji ALT dan AKK sebagai parameter untuk mengukur cemaran mikroba pada produk obat atau makanan? Jelaskan!
5. Pertanyaan lain diberikan asisten/dosen!

**PERCOBAAN VII**  
**IDENTIFIKASI DAN DETERMINASI BAKTERI : PENGECATAN GRAM**  
**DAN UJI BIOKIMIAWI**

**I. PENGECATAN GRAM**

**A. TUJUAN :** melihat bentuk sel, rangkaian sel, sifat gram (gram negatif dan gram positif)

**B. LANDASAN TEORI**

Pengecatan ini dikembangkan pertama kali oleh Christian Gram (1884) dan termasuk pengecatan differensial, karena dapat membedakan bakteri yang bersifat gram positif dan gram negatif.

Dari segi pewarnaan perbedaan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat diamati dengan jelas. Bakteri Gram positif mengikat cat utama (crystal violet) dengan kuat sehingga tidak dapat dilunturkan oleh cat peluntur dan tidak diwarnai lagi oleh cat lawan (safranin), hal ini disebabkan karena sifat dinding sel dan sitoplasmanya, yang mempunyai afinitas kuat terhadap kompleks crystal violet dan iodine (jodium). Bakteri Gram negatif tidak mengikat cat utama secara kuat, sehingga dapat dilunturkan oleh peluntur dan dapat diwarnai oleh cat lawan.

Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan gram negatif tidak mutlak tegas dan spesifik, tetapi masih tergantung pada beberapa faktor yang dapat menyebabkan variasi dalam pengecatan Gram.

**C. PROSEDUR KERJA**

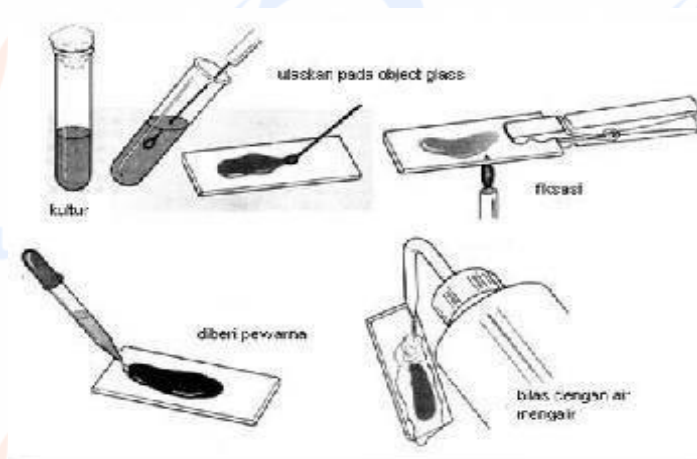
**Alat dan bahan:**

- Mikroskop cahaya
- Crystal violet (Gram A)
- Larutan iodine (Gram B)
- Alkohol 96% (Gram C)

- Safranin (Gram D)
- Minyak immersi
- Isolat murni bakteri tanah (**hasil percobaan Acara III**)
- Gelas benda
- Jarum ose

**Cara kerja:** (Gambar 9)

1. Buatlah pulasan bakteri di atas objek gelas, keringkan dan fiksasi dengan api (Lihat Acara 1).
2. Teteskan cat crystal violet (Gram A) dan diamkan 30- 60 detik.
3. Buanglah sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir.
4. Teteskan larutan iodine (Gram B) dan diamkan selama 1-2 menit.
5. Cuci dengan air mengalir, kemudian di decolorisasi (di beri larutan peluntur) dengan alkohol (Gram C) (kira- kira 20 detik, hati-hati jangan sampai berlebihan yang mengakibatkan kesalahan hasil).
6. Cuci dengan air mengalir, tambahkan larutan safranin (Gram D) selama 10-20 detik.
7. Cuci kembali dengan air mengalir, angin-anginkan dan amati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak immersi.
8. Gambar hasil-hasil pengecatan bakteri dengan diberi keterangan mengenai warna sel bakteri yang menunjukkan sifat gram dan bentuk sel.



**Gambar 9. Teknik Pengecatan Bakteri**

#### **D. Lembar Kerja Pengecatan Gram:**

Hasil Pengamatan :

Nama Pengecatan :

Nama Bakteri :

Keterangan :

## **II. UJI BIOKIMIAWI**

### **A. TUJUAN :**

Mengidentifikasi dan mendeterminasi bakteri berdasarkan sifat-sifat biokimiawinya.

### **B. LANDASAN TEORI :**

Mikroba tumbuh dan berkembang biak dengan menggunakan berbagai bahan yang terdapat di lingkungannya. Nutrien yang terdapat di lingkungan sekelilingnya terdiri dari molekul sederhana seperti  $H_2S$  dan  $NH_4^+$  atau molekul organik yang kompleks seperti protein dan polisakarida. Mikroba mengoksidasikan nutrien ini untuk memperoleh energi dan prekursor untuk sintesis dinding sel, membran dan flagella. Penggunaan nutrien tergantung aktivitas metabolisme mikroba. Percobaan-percobaan dalam uji biokimiawi mencakup berbagai uji untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroba. Pengamatan aktivitas metabolisme diketahui dari kemampuan mikroba untuk menggunakan dan menguraikan molekul kompleks, seperti zat pati, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu pengamatan juga dilakukan pada molekul yang sederhana seperti asam amino dan sakarida. Hasil dari berbagai uji ini digunakan untuk pencirian dan identifikasi mikroba (Lay, 1994).

Pada identifikasi bakteri mula-mula diamati morfologi sel individual secara mikroskopik dan pertumbuhannya pada bermacam-macam medium. Karena suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, maka perlu diteliti pula sifat-sifat biokimiawi dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Bakteri-bakteri yang morfologinya sama mungkin berbeda dalam kebutuhan nutrisi dan persyaratan ekologi lainnya (temperatur, pH dsb) (Jutono dkk, 1980).



### C. PROSEDUR KERJA :

#### Alat dan Bahan:

1. Isolat murni bakteri tanah (**hasil percobaan Acara III**) dalam NA miring dan NB (nutrien cair)
2. Reagen untuk test oksidase : tetramethyl-paraphenyldiamine
3. Reagen untuk test katalase : 10% atau 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. Bahan untuk test O-F : media O-F yang mengandung 0,5- 1% karbohidrat, paraffin cair
5. Bahan untuk test sitrat : Simmons Citrate Agar yang mengandung indikator Brom Thymol Blue-BTB
6. Bahan untuk test dekarboksilase lisin : media Lysin Iron Agar (LIA) yang mengandung Lisin dan indikator Brom Cresol Purple-BCP, media tanpa Lisin
7. Media Nutrien Agar (NA)
8. Gelatin
9. Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
10. Bahan untuk test pembentukan indol : media Tryptone Water, reagen Kovacs
11. Bahan untuk test MR-VP : media MR-VP, larutan 40% KOH, larutan 5% alpha-naphthol
12. Bahan untuk test Urease : media Urea Broth, indikator Phenol Red
13. Buku Panduan Determinasi Bakteri : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 2000)
14. Jarum ose
15. Pipet volume steril

#### Cara kerja:

##### 1. Test Oksidase

Letakkan 2-3 tetes larutan tetramethyl-paraphenyldiamine pada kertas saring. Ambillah suspensi isolat murni bakteri dalam nutrien cair dan inokulasikan pada kertas saring yang telah ditetesi reagen. Amati dan laporkan hasil pengujian, reaksi positif terjadi jika timbul warna ungu tua atau hitam setelah didiamkan selama beberapa menit. Kadangkala perubahan warna memakan waktu lebih lama sampai 10- 30 menit. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

## **2. Test Katalase**

Letakkan 1-2 tetes 10 % atau 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada gelas benda dan tambahkan 1 ose atau 2-3 tetes suspensi isolat murni bakteri. Amati, katalase positif ditandai oleh pembentukan buih seketika. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

## **3. Test O-F (Oksidasi-Fermentasi)**

Inokulasikan secara hati-hati isolat murni bakteri ke dalam 4 tabung berisi media O-F yang mengandung 0,5-1% karbohidrat (glukosa, laktosa, manitol, maltosa atau sukrosa) secara tusukan. Tabung I ditutup dengan parafin lunak, tabung II tidak ditutup parafin, tabung III dan IV sebagai kontrol (ditutup paraffin dan tidak ditutup paraffin tanpa inokulasi bakteri). Amati setelah 24 jam pada suhu kamar. Bandingkan perlakuan dengan kontrol. Oksidasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang tidak ditutup paraffin) terjadi pada mikroba aerobik dan fermentasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang ditutup paraffin) terjadi pada mikroba anaerob. Bandingkan dengan kontrol. Perhatikan perubahan warna media yang terjadi dan indikator yang terkandung dalam media O-F.

## **4. Test Penggunaan Sitrat**

Isolat murni bakteri diinokulasikan secara goresan zig zag menggunakan ose dan secara tusukan menggunakan jarum inokulasi pada media Simmons Citrat Agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Perhatikan perubahan warna dengan melihat perubahan warna dari hijau menjadi biru. Bandingkan dengan kontrol.

## **5. Test Dekarboksilase Lisin**

Pada medium yang mengandung lisin dan kontrol (media tanpa lisin) diinokulasi secara tusukan dengan isolat murni bakteri, inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Positif jika terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan kembali ke ungu, sementara pada kontrol (media tanpa lisin) terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning.

## **6. Test Hidrolisis Gelatin**

Dengan cara tusukan, inokulasikan isolat murni bakteri pada media yang mengandung

gelatin sedalam  $\frac{3}{4}$  bagian dari lapisan permukaan. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Pada saat pengamatan, masukkan tabung perlakuan dan kontrol (media tanpa inokulasi bakteri) dalam almari es selama 30 menit. Positif berarti terjadi pencairan.

### **7. Test H<sub>2</sub>S dan Fermentasi Gula-gula**

Dengan menggunakan media TSIA, inokulasikan isolat murni bakteri secara goresan menggunakan jarum ose dan secara tusukan menggunakan jarum inokulasi. Inkubasikan selama 24 jam. Pembentukan H<sub>2</sub>S ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna hitam. Perubahan warna media TSIA dari merah menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi gula (glukosa, sukrosa, laktosa). Amati juga apakah terbentuk gas yang ditandai dengan pecahnya media atau terangkatnya media ke atas. Bandingkan dengan kontrol (media tanpa inokulasi bakteri).

### **8. Test Indol**

Inokulasikan 1 tabung media Tryptone Water dengan 2 tetes isolat murni bakteri dan 1 tabung media untuk kontrol (tanpa inokulasi bakteri). Inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah inkubasi, tiap-tiap tabung ditambah 10 tetes reagen Kovacs. Terbentuknya warna merah/merah muda pada lapisan larutan reagen menunjukkan terbentuknya indol. Bandingkan dengan kontrol.

### **9. Test MR (Methyl Red)**

Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP (media Methyl Red-Voges Proskauer) dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Tambahkan 5 tetes reagen Methyl Red ke dalam tabung berisi media MR-VP. Kocoklah hati-hati, Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

### **10. Test VP (Voges Proskauer)**

Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Tambahkan 0,6 ml larutan alpha-naphtol 5% dilanjutkan 0,2 ml KOH 40%. Kocoklah hati-hati, longgarkan tutupnya, kocok kembali, ulangi setiap 5 menit, bacalah perubahan warnanya setelah 30 menit. Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen. Bandingkan dengan kontrol

(tanpa inokulasi bakteri).

### 11. Test Urease

Inokulasikan media Urea Broth yang mengandung indikator fenol merah dengan 1 tetes kultur muni bakteri. Amatilah perubahan warna menjadi merah (phenol red) setelah 24 jam pada suhu kamar. Bandingkan dengan kontrol.



### III. DETERMINASI BAKTERI

#### A. TUJUAN:

Untuk mendeterminasi spesies bakteri yang didapatkan berdasarkan data pengecatan Gram dan Uji Biokimia dan dapat dimasukkan ke dalam urutan taksonomi bakteri.

#### B. PROSEDUR KERJA:

Pada pengujian yang lengkap untuk determinasi bakteri, hasil-hasil pengujian dimasukkan dalam daftar pengamatan yang disebut *Descriptive Chart*. Untuk determinasi bakteri digunakan buku panduan determinasi bakteri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al*, 2000;)

Karakter-karakter hasil pengujian (meliputi : morfologi sel individual dan uji biokimiawi), masing-masing digambar, ditabulasikan dan dicocokkan dengan buku panduan determinasi bakteri yang memuat deskripsi bakteri yang telah dikenal sehingga dapat dideterminasi identitas bakteri pada tingkat genus. Contoh tabulasi data karakter-karakter hasil pengujian disajikan di bawah ini.

**Tabel I. Hasil pengamatan morfologi sel isolat murni bakteri :**

uji morfologi	Hasil	Kesimpulan
Pengecatan		

**Tabel II. Hasil pengamatan uji biokimiawi isolat murni bakteri**

Uji biokimia	Hasil pengamatan	Kesimpulan
1. Uji Oksidase		
2. Uji Katalase		
3. dst		

**PERCOBAAN VIII**  
**UJI KEPEKAAN ANTIBIOTIK :**  
**PENENTUAN KADAR HAMBAT MINIMAL (KHM)**  
**ANTIBIOTIK SECARA DILUSI PADAT**

**A. TUJUAN :**

Menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari suatu antibiotik secara dilusi padat.

**B. LANDASAN TEORI :**

Kadar Hambat Minimal (KHM) suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Kadar Bunuh Minimal suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang dapat membunuh pertumbuhan mikroba tertentu. KHM dan KBM dapat ditentukan dengan prosedur tabung dilusi. Prosedur ini digunakan untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif dalam mengontrol infeksi pada pasien (Radji, 2004).

Metode dilusi disebut metode pengenceran. Pada metode ini obat (misalnya antibiotik) dibuat dalam berbagai konsentrasi, kemudian ditambahkan pada media yang mengandung mikroba uji. Hasil yang dibaca adalah kekeruhan. Kekeruhan menandakan adanya potensi hambat obat pada konsentrasi tersebut. Keuntungan metode ini dibandingkan dengan metode difusi adalah dapat menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari obat tersebut. Ada 3 macam cara dalam metode dilusi yaitu metode *Macro Broth Dilution*, metode *Micro Broth Dilution* dan metode agar dilusi (dilusi padat). Pada metode agar dilusi digunakan satu seri plate agar, masing-masing mengandung konsentrasi obat yang berbeda yang berkisar pada dosis terapeutik. Setelah inkubasi dapat dilihat hasilnya dengan membaca kekeruhan pada masing-masing konsentrasi sehingga bisa ditentukan MIC (Koneman *et al*, 1997)

Metode dilusi (*dilution method*) menggunakan senyawa antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Pada media yang diinokulasi mikroba uji, dilarutkan senyawa antimikroba dengan menggunakan beberapa tingkatan konsentrasi senyawa antimikroba, dan kemudian diamati pada konsentrasi berapakah senyawa antimikrobia tersebut bersifat menghambat atau mematikan. Pada uji mikrodilusi cair dapat memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikrobia yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz dkk, 2001). Metode ini dapat digunakan untuk penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

### C. PROSEDUR KERJA :

#### Alat dan Bahan :

1. Kultur murni bakteri uji dalam media NB umur 24 jam
2. Senyawa uji berupa antibiotik (misalnya Amoxicillin sirup kering). Variasi konsentrasi ditentukan berdasarkan hasil percobaan VI. (variasi konsentrasi, 6,25; 3,125; dan 1,5625 mg/ml)
3. Alat-alat : petridish steril, pipet volume steril
4. Media nutrisi agar (NA)
5. Deret larutan standar Mac Farland
6. NB untuk pembuatan suspensi bakteri uji
7. Alkohol 70 %
8. Aquades steril

#### Cara kerja :

1. Buatlah seri pengenceran/variasi konsentrasi larutan antibiotik dalam aquades steril. Seri pengenceran ditentukan berdasarkan hasil percobaan acara VI
2. Siapkan media NA (siap dituang ke petri secara *pour plate*). Bila media dalam keadaan memadat, cairkan terlebih dahulu dengan pemanasan sampai menjadi cair dan buat hingga suhunya sekitar 45 – 50°C sehingga siap untuk dicampur dengan bakteri uji.
3. Buatlah suspensi bakteri uji dengan kepadatan yang setara dengan larutan standar Mac Farland II.
4. Pembuatan kontrol kontaminasi media (per meja)
  - a. Ambil 15 ml media NA, tuang ke dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat.
  - b. Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan. Inkubasi selama 24 jam. Bandingkan dengan perlakuan.
5. Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji (per meja)
  - a. Ambil 15 ml media NA dalam tabung. Masukkan 1 ml suspensi bakteri uji ke dalam tabung tersebut.
  - b. Tuang dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji. Inkubasi selama 24 jam. Bandingkan dengan perlakuan.
6. Pembuatan kontrol negatif (pengujian potensi antibakteri pelarut) (per kelompok kecil)
  - a. Ambil 15 ml media NA dalam tabung. Masukkan 1 ml suspensi bakteri uji dan 1 ml aquades steril pelarut senyawa antibiotik ke dalam tabung tersebut.
  - b. Tuang dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji. Inkubasi selama 24 jam.

Bandingkan dengan perlakuan.

7. Pengujian potensi antibiotik secara dilusi padat (per kelompok kecil)

- a. Ambil 3 tabung yang masing-masing berisi 15 ml media NA suhu 45 – 50°C, tambahkan 1 ml suspensi bakteri uji pada masing-masing tabung tersebut. Tambahkan pula larutan antibiotik dengan konsentrasi yang telah ditetapkan pada langkah 1.
- b. Siapkan 3 petri steril untuk menuang ketiga preparat di atas secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri.
- c. Inkubasi selama 24 jam. Amati dan bandingkan kekeruhan dari masing-masing petri. Bandingkan antara kontrol dan perlakuan.

8. Pembacaan Hasil

- a. Setelah masa inkubasi, kekeruhan media yang menunjukkan kepadatan pertumbuhan bakteri uji diamati dan diberi penilaian menggunakan notasi (+) untuk media yang tampak keruh dan (-) jika tidak ada kekeruhan yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri uji dalam media agar tersebut.
- b. Hasil pengamatan dianalisis untuk mendapatkan konsentrasi atau kadar hambat minimal senyawa antibiotik. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi minimal senyawa antibiotik yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

9. Penegasan Hasil

- a. Dari pengamatan kekeruhan, pilih perlakuan dengan tingkat kekeruhan (-) dan perlakuan dengan tingkat kekeruhan (+)
- b. Dengan menggunakan jarum ose, ambilah 1 ose dari tabung perlakuan tersebut dan tanamlah di atas permukaan cawan agar dengan metode goresan sederhana.
- c. Dari hasil goresan pada cawan agar, tentukan harga KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadari Bunuh Minimal). KHM : kadar antibiotik terendah yang masih menunjukkan pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar dengan metode gores. KBM : kadar antibiotik terendah yang sama sekali tidak menunjukkan pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar dengan metode gores.

(lihat lampiran 2 : Penentuan KHM dan KBM)



#### D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa prinsip kerja dari prosedur dilusi yang dikerjakan pada praktikum di atas ?
2. Apakah perbedaan dilusi padat dan dilusi cair?
3. Bagaimana cara menentukan harga KHM dan KBM? Jelaskan!
4. Pertanyaan lain bisa diberikan asisten/dosen.

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

Universitas  
Esa Unggul

## PERCOBAAN IX

### PENGUJIAN ZAT DESINFEKTAN

#### A. TUJUAN:

Untuk melihat kemampuan desinfektan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme

#### B. LANDASAN TEORI

Desinfektan yaitu suatu senyawa kimia yang dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan benda mati seperti meja, lantai dan pisau bedah. Adapun antiseptik adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme pada jaringan tubuh, misalnya kulit. Efisiensi dan efektivitas desinfektan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

1. Konsentrasi
2. Waktu terpapar
3. Jenis mikroba
4. Kondisi lingkungan: temperatur, pH dan jenis tempat mikroba hidup

Beberapa jenis desinfektan diantaranya adalah:

Jenis	Keterangan
Senyawa fenol : Fenol	Merusak membran sel Mendenaturasi protein
Cresol Hexachlorophene Resorcinol Thymol	Konsentrasi kerja : 2-5%
Alkohol : Ethyl Isopropil	Pelarut lemak Denaturasi dan koagulasi protein Konsentrasi kerja : 50-75%
Senyawa halogen : Senyawa chlorin : Sodium hipochlorite	Agen oksidasi Presipitasi protein
Chloramine Senyawa iodine : Povidone-iodine	Klorin bereaksi dengan air membentuk

(betadine)	asam hipoklorit yang bersifat bakterisidal
Logam berat :	Bereaksi dengan gugus SH (sulfhidril) pada
Senyawa Hg Senyawa Zn Senyawa Cu dll.	enzim yang menyebabkan denaturasi.
Agen aktif permukaan :	Menciptakan tegangan permukaan
Sabun Detergen emulsifier	yang rendah
	Merusak membran sel
	Memindahkan sel secara mekanis
Senyawa kationik :	Tegangan permukaan yang rendah
Senyawa amonium kuarterner	
<i>benzalconiumchloride</i>	
Senyawa anionik :	
Sodium Tertradecyl	Daya kerja sama dengan senyawa aktif
Sulphate	permukaan
Asam ( $H^+$ )	Merusak dinding sel dan membran sel
	Koagulasi protein
Basa ( $OH^-$ )	
Pewarna :	
Crystal Violet	Memiliki avinitas terhadap asam nukleus

### C. PROSEDUR KERJA

#### ALAT DAN BAHAN:

- a. Alat gelas : petridish steril, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur
- b. Mikropipet, kertas cakram, jangka sorong/penggaris, jarum ose, pinset, spidol, kertas label, vortex mixer, spreader, inkubator, autoklaf, oven, kulkas
- c. Senyawa uji desinfektan berupa: alkohol 70%, *LysoI* 5%, betadin, dan hipoklorit 5%
- d. Kultur murni bakteri uji *E. coli* dan *Bacillus* sp dalam media NB umur 24 jam
- e. Media nutrien agar (NA)
- f. Nutrient Broth (NB) untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- g. Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji

#### CARA KERJA:

1. Inokulasikan *E. coli* dan *Bacillus* sp. Pada NA cawan secara spread plate kontinyu.
2. Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam larutan desinfektan (alkohol 70%, *LysoI* 5%, betadin, dan hipoklorit 5%). Setelah diangkat, sisa tetes larutan yang berlebihan pada kertas cakram diulaskan pada dinding wadah karena dikhawatirkan larutan akan meluas di permukaan agar jika larutan terlalu banyak.
3. Kertas cakram diletakkan dipermukaan agar dengan pinset. Tekan dengan pinset supaya kertas cakram benar-benar menempel pada agar.
4. Inkubasi selama 48 jam pada 37<sup>0</sup>C.
5. Zona hambat yang terbentuk diukur diameternya, bandingkan daya kerja berbagai desinfektan.

## **RESPONSI**

### **A. RESPONSI TERTULIS**

Jadwal pelaksanaan responsi tertulis bersamaan dengan responsi praktek. Responsi tertulis berupa uraian singkat.

### **B. RESPONSI PRAKTEK**

Responsi praktek berupa simulasi Acara II hingga Acara VI secara individu oleh masing-masing praktikan kepada asisten praktikum. Setiap praktikan mendapatkan kesempatan yang sama untuk mensimulasikan acara-acara tersebut. Pengundian simulasi acara praktikum dilakukan pada saat pratikan memasuki ruangan respons

## PUSTAKA ACUAN

Anonim, 1992, *Cara Uji Cemaran Mikroba*, SNI (Standar Nasional Indonesia), SNI 01-2897-1992, Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta

Anonim, 1994, Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 661/MenKes/SK/VII/1994 Tentang *Persyaratan Obat Tradisional*, Jakarta

Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat*, Cetakan Pertama, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal POM, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta

Anonim, 2006, *Metode Analisis PPOMN (MA Suplemen 2000 Revisi 2006)*, *Mikrobiologi*, Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Jakarta

Atlas, R. M., 1997, *Principles of Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers. Iowa

Bonang, G., dan Koeswardono, E.A., 1982, *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*, 45-46, P.T. Gramedia, Jakarta

BPOM, 2006, *Metode Analisis PPOMN*, MA PPOMN nomor

96/mik/00, Uji Angka Kapang/Khamir dalam Obat Tradisional, Jakarta

Holt, *et.al.*, 2000, *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Ed., Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, USA.

Hugo, W.B. and Russel, A.D., 1999, *Pharmaceutical Microbiology*, 5<sup>th</sup> Ed. Blackwell Science, Oxford

Jawetz, and Melnick, 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta

Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., Suhadi D., 1980,

*Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta

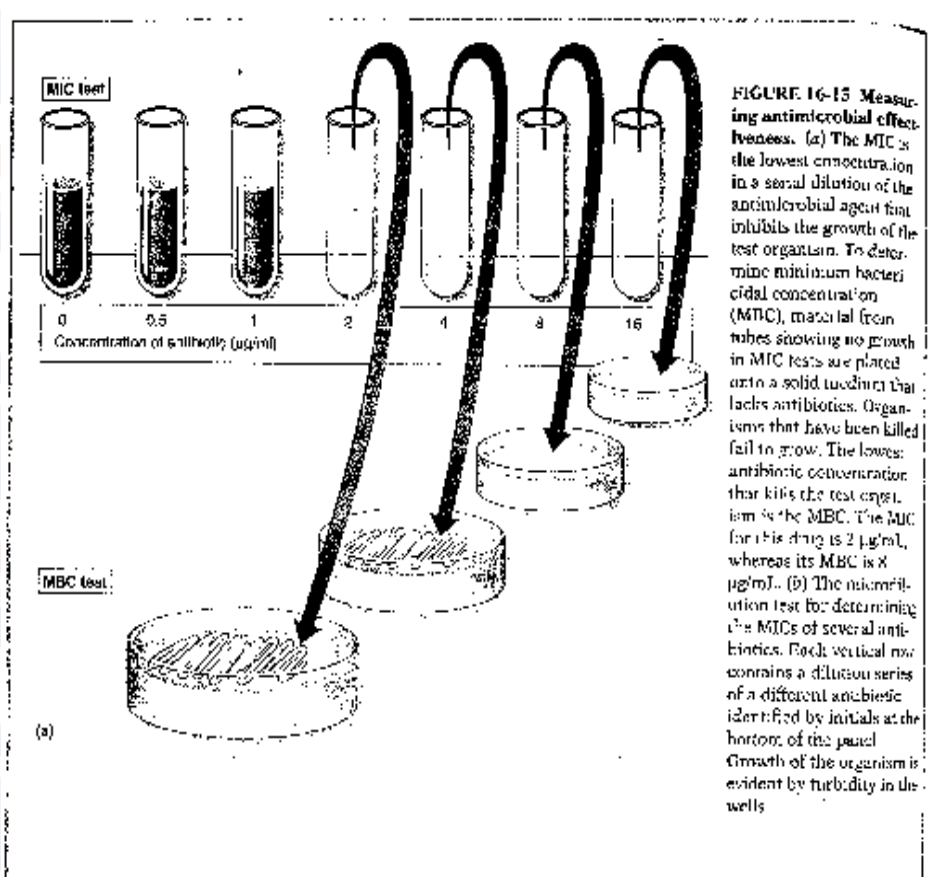
- Lay, B., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, Brock, 2000, *Biology of Microorganisms*, 9<sup>th</sup> ed, Prentice Hall International Inc., Upper Saddle River, New York
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap and D.P. Clark, 2009, *Brock Biology and Microorganisms*, 12th ed, Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco
- McKane, L., Kandel, J., 1996, *Microbiology : Essentials and Application*, Mc Graw Hill Inc., New York
- Murray P.R., 1999, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington
- Pelczar, M.J., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta Prescott, L.M., Habley, J.P., and Klein, D.A., 1999, *Microbiology*, Fourth ed., Mc Graw-Hill, New York
- Radji, M. 2004, *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*, Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia, Jakarta
- SNI, 1992, Cara Uji Cemarkan Mikroba, SNI 01-2897-1992, Jakarta, pp. 4, 36
- Soekarto, 2008, Kapang Dalam Bahan Pangan, <http://www.scumdoctor.com/Indonesian/firstaid/kapang/.html>. Diakses pada 28 November 2013
- Volk, W. A., dan M. F. Wheeler, 1988, *Mikrobiologi Dasar*, Penerbit Erlangga, Jakarta

Jurnal-jurnal mikrobiologi terkait



**Lampiran 1. Prosedur dan Cara Penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)**

Sumber :McKane, L. and J. Kandel, 1996, *Microbiology : Essentials and Applications*, Mc Graw Hill Inc., New York, p. 397- 398





## Lampiran 2. Prosedur Perhitungan ALT

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai Prosedur baku pengujian mikrobiologi, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan DepKes RI (1992)

1. Cawan petri dipilih dari satu pengenceran yang menunjukkan Jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan petri. Hitung rata-rata Jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengencer. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.
2. Jika cawan duplo dari pengenceran terendah terdapat jumlah koloninya lebih kecil dari 25, hitung jumlah koloni yang ada pada cawan dari setiap pengenceran, rerata jumlah koloni per cawan dan kalikan dengan faktor pengencerannya untuk menentukan nilai Total Plate Count (TPC). Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram (Tabel 1 nomor 3)
3. Jika hasil dari cawan duplo, cawan yang satu dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan cawan yang lain lebih dari 250 koloni, hitung kedua cawan dalam penghitungan TPC (Tabel 1 nomor 7)
4. Jika hasil dari cawan duplo, cawan yang satu dengan koloni 25- 250 dan cawan yang lain kurang dari 25 atau menghasilkan lebih dari 250 koloni, hitung keempat cawan dalam penghitungan TPC (tabel 1 nomor 8)
5. Jika kedua cawan dari satu pengenceran menghasilkan 25-250 koloni hitung keempat cawan termasuk cawan yang kurang dari 25 atau yang lebih dari 250 koloni dalam penghitungan TPC (tabel 1 nomor 9)
6. Jika jumlah koloni dari semua lebih dari 250 koloni :
  - a. Maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2,4, atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih, untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran.
7. Jika 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni maka jumlah koloni yang didapat  $8 \times 200 = 1600$ , kemudian dikalikan dengan faktor pengencer dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari  $1600 \times \text{faktor pengencer}$ ) (table 1 nomor 4)
  - i. Jika tidak koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri

perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan faktor pengencer terendah ( $<10$ ) (Tabel 1 nomor 6)

- ii. Menghitung koloni merambat (spreader). Ada tiga macam perambat pada koloni, yaitu :
  - a. Merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah,
  - b. perambat yang terjadi di antara dasar cawan petri dan perbenihan, dan
  - c. perambat yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan Maka cara menghitungnya adalah sebagai berikut:
- iii. Apabila cawan yang disiapkan untuk contoh lebih banyak yang ditumbuhi oleh spreader seperti pada butir pertama dan total
- iv. area yang melebihi 25% dan 50% pertumbuhannya dilaporkan sebagai cawan spreader .
- v. Apabila terjadi hanya satu perambatan seperti rantai, maka koloni dianggap satu. Tetapi apabila satu atau lebih rantai yang terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.
- vi. Rerata jumlah koloni dari setiap pengenceran, dilaporkan jumlahnya sebagai TPC (Tabel 1 nomor 5)
- vii. Gabungkan perhitungan koloni dan perhitungan spreader untuk menghitung TPC
- viii. Apabila butir kedua dan ketiga yang terjadi, sebaiknya pemeriksaan diulang, karena koloni dalam keadaan sulit dihitung.

**Tabel I. Petunjuk penghitungan Total Plate Count (TPC)**

NO	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	TPC per ml atau gram	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	∞ ∞	175 208	16 17	190.000	bila hanya satu pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung jumlah rerata dari pengenceran tersebut
2	∞ ∞	224 225	25 30	250.000	bila ada dua pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung jumlah masing-masing dari pengenceran sebelum merata-ratakan jumlah yang sebenarnya
3	18 14	2 0	0 0	1.600*	Jumlah koloni kurang dari 25 koloni pada pengenceran terendah, hitung jumlahnya dan kalikan dengan faktor pengencerannya dan beri tanda*

NO	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	TPC per ml atau gram	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
4	∞ ∞	∞ ∞	523 487	5.100.000 *	Jumlah koloni lebih dari 250 koloni, hitung koloni yang dapat dihitung atau yang mewakili, beri tanda*
5	∞ ∞	245 230	35 spreader	290.000	Bila ada dua pengenceran diantara jumlah koloni 25 sampai dengan 250, tetapi ada spreader, hitung jumlahnya dan kalikan dengan faktor pengenceran, namun untuk spreader tidak dihitung.

6	0 0	0 0	0 0	100*	Bila cawan tanpa koloni, jumlah TPC adalah kurang dari 1 kali pengenceran terendah yang digunakan dan beri tanda *
7	∞ ∞	245 278	23 20	260.000	Jumlah koloni 25 sampai dengan 250 dan yang lain lebih dari 250, hitung kedua cawan petri, termasuk yang lebih dari 250, dan rerata jumlahnya
8	∞ ∞	225 255	21 40	270.000	Bila salah satu cawan dengan jumlah 25 koloni sampai dengan 250 koloni dari tiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk yang kurang dari 25 koloni, lalu rerata jumlah yang sebenarnya

NO	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	TPC per ml atau gram	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
9	∞ ∞ ∞ ∞	220 240 260 230	18 48 30 28	260.000 270.000	Bila hanya satu cawan yang menyimpang dari setiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk yang kurang dari 25 koloni atau lebih dari 250 koloni, kemudian rerata jumlah sebenarnya.

### **Cara menghitung dan membulatkan angka**

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua (di mulai dari kiri), sedangkan angka ketiga diganti dengan 0, apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambah pada angka yang ke dua. Contoh: 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 ( $5.2 \times 10^5$ ), 85.700 dilaporkan sebagai 86.000 ( $8.6 \times 10^4$ ).

### Lampiran 3. Prosedur Perhitungan AKK

Cara menghitung dan menyatakan hasil AKK sesuai dengan MA PPOMN nomor 96/mik/00. Cawan petri dipilih dari suatu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari 2 tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dinyatakan sebagai angka kapang/khamir dalam tiap ml atau gram contoh. Untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut.

- a. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- b. Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran  $10^{-2}$  diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran  $10^{-3}$  diperoleh 20 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran  $10^{-2}$  yaitu 20 koloni).
- c. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai angka kapang/khamir perkiraan
- d. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka angka kapang/khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.