

PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

PP/FF/MIKRO/II/R11



Disusun oleh :

Zainab, M.Si., Apt.
Dr. Nanik Sulistyani, M.Si., Apt.
Dr. Laela Hayu Nurani, M.Si., Apt.
Dr rer nat Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt

Laboratorium Mikrobiologi
Fakultas Farmasi
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
2021

PRAKATA

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu'alaikum wr wb

Alhamdulillah rabbil 'alamin atas selesainya penyusunan Buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan ini. Penelitian mengenai mikrobiologi banyak dilakukan antara lain untuk menguji sterilitas produk, sensitivitas mikroba terhadap antibiotika, mencari senyawa alam yang aktif sebagai antimiroba, dan juga mengidentifikasi mikroba dalam sampel. Metode yang digunakan dalam ujipun juga banyak macamnya. Penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroba sangat besar di Indonesia dan kegunaan penelitian mikrobiologi sangat luas. Itulah sebabnya mengapa buku ini diterbitkan.

Buku ini merupakan usaha untuk memberikan pengetahuan yang lebih dan berguna untuk para peneliti menghadapi penelitian yang berhubungan dengan mikroba, khususnya bakteri dan jamur. Di dalam buku ini dimuat dasar-dasar pemeriksaan mikrobiologi dengan berbagai metode, media, dan tujuan penelitian. Oleh karena itu kami berharap bahwa apa yang tersaji dalam buku ini dapat memberikan kemudahan kepada peneliti untuk melakukan penelitian di bidang mikrobiologi.

Kami menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak atas bantuan yang berharga dalam mewujudkan buku petunjuk praktikum ini. Semoga buku ini banyak manfaatnya. Kami berterimakasih bila ada saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan buku ini.

Wassalamu'alaikum wr wb

Yogyakarta, September 2021

Tim Penyusun :

Zainab, M.Si., Apt.

Dr. Nanik Sulistyani, M.Si., Apt.

Dr. Laela Hayu Nurani, M.Si., Apt.

Dr rer nat Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Untuk menjaga keamanan

1. Praktikan harus telah mengenakan jas lab saat memasuki laboratorium dan bekerja dengan peralatan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi dan terkena khemikalia
2. Dilarang keras makan, merokok dan minum di laboratorium
3. Sebelum dan sesudah bekerja, meja praktikum dibersihkan dengan desinfektan
4. Pengambilan kultur *cair atau suspensi dan khemikal harus menggunakan pipet dengan bantuan filler* atau menggunakan mikropipet.
5. Dilarang membuang biakan sisa atau habis pakai dan pewarna sisa disembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan oleh asisten.
6. Laporkan segera jika terjadi kecelakaan seperti kebakaran, biakan tumpah ada yang menelan bahan kimia, atau biakan kepada asisten.
7. Jika menggunakan jarum inokulum, ujung jarum dibakar sampai memijar sesudah dan sebelum bekerja menggunakan alat ini.
8. Sebelum meninggalkan laboratorium disarankan untuk mencuci tangan dengan seksama.

Untuk kelancaran praktikum

1. Praktikan diwajibkan memakai jas laboratorium sebelum memasuki laboratorium dan dilepas di luar laboratorium.
2. Praktikan wajib memakai sepatu pada saat praktikum.
3. Praktikan dilarang berbicara yang tidak perlu dan membuat gaduh
4. Praktikan ditoleransi keterlambatan sampai 10 menit dari mulai praktikum.
5. Praktikan akan dinilai keterampilannya selama praktikum oleh asisten
6. Praktikan yang tidak mengikuti asistensi tanpa keterangan tidak mendapatkan nilai pretest, tapi jika ada izin tertulis maka dapat mengikuti pretest susulan.
7. Praktikan yang tidak mengikuti pengamatan harus mengikuti pengamatan susulan.
8. Laporan harus dibawa saat masuk pada praktikum sebagai syarat masuk.
9. Praktikan yang tidak membawa laporan karena tertinggal, tetap diizinkan mengikuti praktikum tetapi harus mengambil laporan yang tertinggal pada hari itu juga dan menyerahkannya ke asisten.
10. Aturan-aturan / tata tertib yang belum tercantum akan diputuskan kemudian.

DAFTAR ISI

PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI.....	1
PRAKATA.....	2
TATA TERTIB PRAKTIKUM.....	3
DAFTAR ISI.....	4
DAFTAR GAMBAR.....	6
DAFTAR TABEL.....	7
TEORI PENGENALAN ALAT	8
TEORI STERILISASI	21
A. Panas kering	21
B. Panas basah	21
C. Filtrasi.....	22
D. Sterilisasi dengan penyinaran.....	23
E. Desinfeksi dan Antiseptik (Cara Khemis).....	23
I. PEMBUATAN MEDIA DAN ISOLASI BAKTERI	29
A. Tujuan.....	29
1. Mahasiswa mampu membuat dan menyeterilkan media untuk uji mikrobiologi..	29
2. Mahasiswa dapat memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapat kultur murni.	29
B. Teori	29
C. Alat dan Bahan	38
D. Cara Kerja	38
1. Pembuatan Media MHA (Mueller Hinton Agar).....	38
2. Isolasi Bakteri.....	39
2. PENGECATAN GRAM.....	40
a. Tujuan.....	40

b.	Teori	40
c.	Alat dan Bahan	59
d.	Cara Kerja	59
3.	UJI BIODIVERSITAS BAKTERI.....	1
a.	Tujuan.....	1
b.	Teori.....	1
c.	Alat dan Bahan.....	1
d.	Cara Kerja.....	1
4.	PENETAPAN ANGKA LEMPENG TOTAL.....	63
a.	Tujuan.....	63
b.	Teori	63
c.	Alat dan Bahan	70
d.	Cara Kerja	70
5.	UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA METODE DILUSI CAIR.....	71
a.	Tujuan.....	71
b.	Teori	71
c.	Alat dan Bahan	72
	<i>E. coli</i>	73
	<i>C. albican</i>	73
	Pengamatan KHM	75
	Pengamatan KBM	75
6.	UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA METODE DIFUSI AGAR (KIRBY BAUER DAN SUMURAN).....	76
a.	Tujuan.....	76
b.	Teori	76
c.	Alat dan Bahan	79
	<i>E. coli</i>	79
	<i>C. albicans</i>	79

d. Cara Kerja	79
---------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Prosedur desinfeksi meja kerja	24
Gambar 2. Memindahkan biakkan secara aseptik.....	25
Gambar 3. Memindahkan biakkan dari cawan	26
Gambar 4. Memindahkan cairan dengan pipet	27
Gambar 5. Menuang media.....	28
Gambar 6 Teknik pengenceran sampel bertingkat.....	34
Gambar 7. Metode pengecatan Gram	45
Gambar 8. Standar Mc Farland 0,5; 1,0; 2,0; 3,0.....	72
Gambar 9. Skema Pembuatan Suspensi Mikroba	74
Gambar 10. Uji aktivitas antimikroba.....	75
Gambar 11. Cara menetapkan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum).....	75
Gambar 12. Cara menetapkan nilai KHM/MIC dan KBM/MBC.....	Error! Bookmark not defined.
Gambar 13. Cara mengukur diameter zona hambat.....	77
Gambar 14. Skema Pembuatan Suspensi Mikroba	80
Gambar 15. Hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode agar sumuran	81

DAFTAR TABEL

Tabel I. Komposisi cat ZN.....	46
Tabel II. Contoh hasil uji KIA	56
Tabel III. Contoh hasil uji.....	57
Tabel IV. Antibiotik terhadap <i>Staphylococcus</i>	79
Tabel V. Antibiotik terhadap <i>Escherichia coli</i>	79

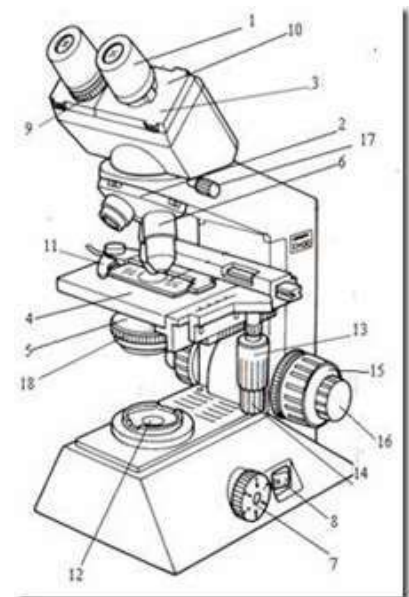
TEORI PENGENALAN ALAT

1. Mikroskop Cahaya (*Brightfield Microscope*)

Salah satu alat untuk melihat sel mikroorganisme adalah mikroskop cahaya. Dengan mikroskop kita dapat mengamati sel bakteri yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Pada umumnya mata tidak mampu membedakan benda dengan diameter lebih kecil dari 0,1 mm. berikut merupakan uraian tentang cara penggunaan bagian-bagiandan spesifikasi mikroskop cahaya merk Olympus CH20 yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi.

Bagian-bagian Mikroskop:

1. Eyepiece / oculars (lensa okuler)
Untuk memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif
2. Revolving nosepiece (pemutar lensa objektif)
Untuk memutar objektif sehingga mengubah perbesaran
3. Observation tube (tabung pengamatan / tabung okuler)
4. Stage (meja benda)
Spesimen diletakkan di sini
5. Condenser (condenser)
Untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. Objective lense (lensa objektif)
Memperbesar spesimen
7. Brightness adjustment knob (pengatur kekuatan lampu)
Untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
8. Main switch (tombol on-off)
9. Diopter adjustmet ring (cincin pengatur diopter)
Untuk menyamakan focus antara mata kanan dan kiri
10. Interpupillar distance adjustment knob (pengatur jarak interpupillar)
11. Specimen holder (penjepit spesimen)
12. Illuminator (sumber cahaya)
13. Vertical feed knob (sekrup pengatur vertikal)
Untuk menaikkan atau menurunkan object glass



14. Horizontal feed knob (sekrup pengatur horizontal)

Untuk menggeser ke kanan / kiri objek glas

15. Coarse focus knob (sekrup fokus kasar)

Menaik turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat

16. Fine focus knob (sekrup fokus halus)

Menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat

17. Observation tube securing knob (sekrup pengencang tabung okuler)

18. Condenser adjustment knob (sekrup pengatur kondenser)

Untuk menaik-turunkan kondenser

Prosedur Operasi

1. Menyalakan lampu

a. tekan tombol on (8)

b. atur kekuatan lampu dengan memutar bagian (7)

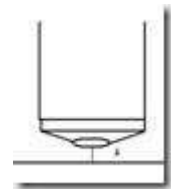
2. Menempatkan spesimen pada meja benda

a. Letakan objek glas diatas meja benda (4) kemudian jepit dengan (11). Jika meja benda belum turun, diturunkan dengan sekrup kasar (15)

b. Cari bagian dari objek glas yang terdapat preparat ulas (dicari dan diperkirakan memiliki gambar yang jelas) dengan memutar sekrup vertikal dan horizontal (13) dan (14)

3. Memfokuskan

a. Putar *Revolving nosepiece* (2) pada perbesaran objektif 4x lalu putar sekrup kasar (15) sehingga meja benda bergerak ke atas untuk mencari fokus



b. Setelah fokus perbesaran 4 x 10 didapatkan, maka putar (2) pada perbesaran selanjutnya yaitu perbesaran objektif 10x. kemudian putar sekrup halus (16) untuk mendapatkan fokusnya

c. Lakukan hal yang sama jika menggunakan perbesaran yang lebih tinggi

Berikut adalah tabel yang menunjukkan jarak antara spesimen dengan lensa objektif jika okus telah didapatkan

Perbesaran objektif	4x	10x	40x	60x
Jarak A (mm)	29	6,3	0,53	0,29

Catatan: Setelah mendapatkan fokus pada perbesaran tertentu, misal 40x, dan ingin memutar objektif ke perbesaran 100x, maka meja benda tidak perlu diturunkan dan tidak perlu khawatir bahwa lensa objektif akan menggesek *cover glass* karena terdapat sisa jarak A yang lebih kecil antara *cover glass* dengan lensa objektif (lihat tabel diatas).

4. Tambahan

- a. Jika perlu *interpupillar distance adjustment knob* (10) dapat digeser, hal ini akan mengubah dua bayangan yang akan diterima oleh 2 mata menjadi gambar yang tunggal sehingga sangat membantu dalam mengatasi kelelahan mata
- b. Jika perlu *diopter adjustment knob* (9) dapat diatur untuk memperoleh bayangan focus yang seimbang antara mata kanan dan kiri
- c. Pengaturan *condenser* (5) akan memperjelas bayangan yang tampak dengan mensetting pada posisi tertinggi (cahaya penuh)

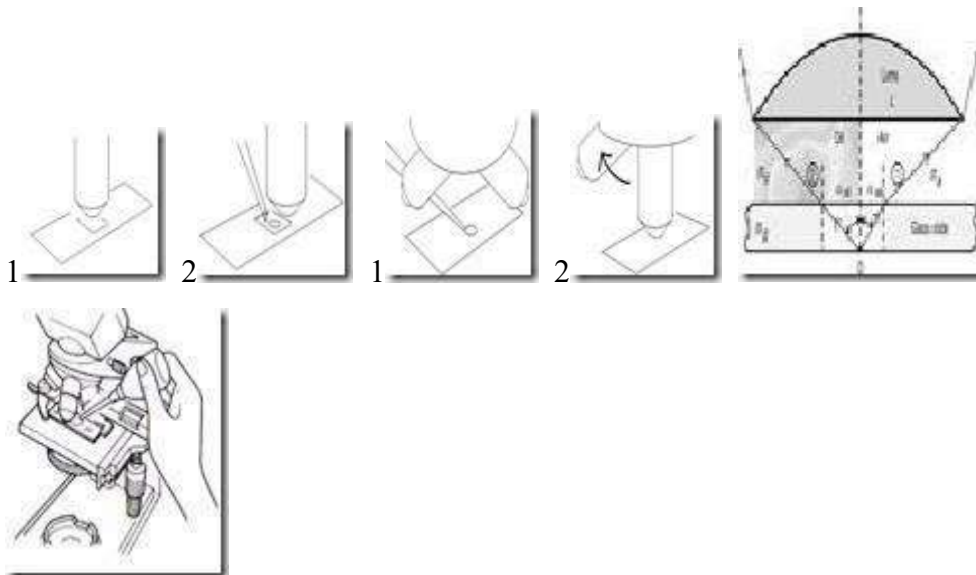
Perbesaran total

Ukuran specimen yang diamati dapat diperoleh dengan mengalikan perbesaran lensa okuler dengan lensa objektif. Misal = Okuler (10x) x Objektif (40x) = 400x

Penggunaan minyak imersi

Semakin kecil nilai daya pisah, akan semakin kuat kemampuan lensa untuk memisahkan dua titik yang berdekatan pada preparat sehingga struktur benda terlihat lebih jelas. Daya pisah dapat diperkuat dengan memperbesar indeks bias atau menggunakan cahaya yang memiliki panjang gelombang (λ) pendek. Biasanya dapat digunakan minyak imersi untuk meningkatkan indeks bias pada perbesaran 10 x 100

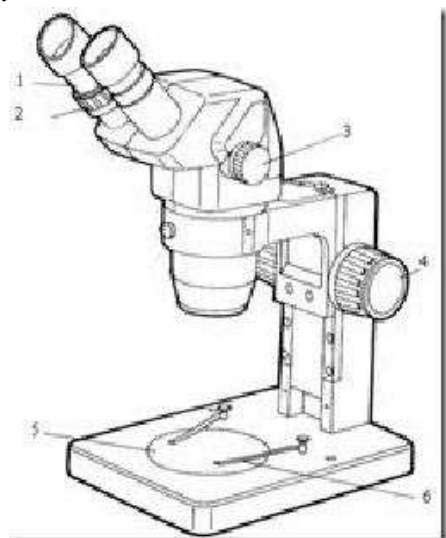
- a. Jika fokus pada perbesaran 10 x 40 telah didapatkan maka putar ke perbesaran objektif 100x
- b. tetesi minyak imersi 1 – 2 tetes dari sisi lensa
- c. Jika telah selesai menggunakan mikroskop, bersihkan lensa objektif 100x dengan kertas lensa yang dibasahi xylol



2. Mikroskop stereo (*Zoom Stereo Microscope*)

Mikroskop ini berfungsi untuk melihat objek yang membutuhkan perbesaran tidak terlalu besar. Di Laboratorium Mikrobiologi, mikroskop stereo biasanya digunakan untuk mengamati secara detail bentuk koloni dan jamur. Berikut merupakan uraian tentang mikroskop stereo yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi yaitu *Zoom Stereo Microscope*, Olympus SZ3060.

1. *Oculars eyepiece* (lensa okuler)
2. *Diopter adjustment ring* (cincin pengatur diopter)
3. *Zoom control knob* (sekrup pengatur pembesaran)
4. *Focusing knob* (sekrup pengatur fokus)
5. *Stage plate* (pelat tempat specimen diletakkan)



6. *Stage clip* (penjepit spesimen / preparat)

Prosedur operasi

1. Letakkan spesimen / preparat di stage plate (5), jepit jika perlu
2. Atur perbesaran pada perbesaran terkecil dengan memutar *Zoom Control Knob* (3) kemudian dicari fokusnya dengan memutar *Focusing Knob* (4)
3. Jika ingin mendapatkan bayangan yang lebih besar, putar *Zoom Control Knob* (3) ke perbesaran yang lebih tinggi kemudian dicari fokusnya

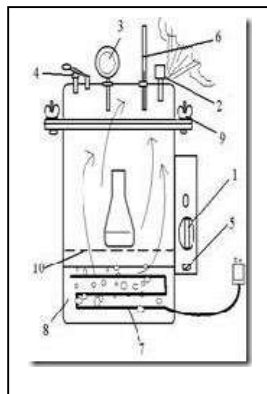
Mikroskop ini memiliki pilihan perbesaran:

Okuler	Objektif	total
10 x	0,67 x	6,7 x
	0,9 x	9 x
	1 x	10 x
	2 x	20 x
	4 x	40 x

3. Autoklaf (*Autoclave*)

Diagram autoklaf vertical

1. Tombol pengatur waktu
2. mundur (*timer*)
2. Katup pengeluaran uap
3. pengukur tekanan
4. kelep pengaman
5. Tombol *on-off*
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas



8. Aquades (dH₂O)

9. Sekrup pengaman

10. batas penambahan air

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi² (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121°C.

Cara Penggunaan :

1. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
2. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol berutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
3. Tutup autoklaf dengan 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' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
6. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *preisure gauge* menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.



4. Inkubator (*Incubator*)

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeras 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..

5. *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* seri SBS-100 dari SBS® misalnya mampu menghomogenkan sampai 10 L, dengan kecepatan sangat lambat sampai 1600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425°C.



6. *Colony counter*

Alat ini berguna untuk mempermudah perhitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan karena adanya kaca pembesar. 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*.



7. *Biological Safety Cabinet*

Biological Safety Cabinet (BSC) atau dapat juga disebut *Laminar Air Flow* (LAF) adalah alat yang berguna untuk bekerja secara aseptis karena BSC mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga menjadi steril dan aplikasinya UV beberapa jam sebelum digunakan. Prosedur penggunaan BSC seri 36212, Purifier™ *Biological Safety Cabinet* dari LABCONCO yang dimiliki laboratorium mikrobiologi adalah sebagai berikut:

1. Hidupkan lampu UV selama 2 jam, selanjutnya matikan segera sebelum mulai bekerja

2. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah

3. Nyalakan lampu neon dan blower

4. Biarkan selama 5 menit

5. Cuci tangan dan lengan dengan sabun gemisidal/alkohol 70 %



6. Usap permukaan interior BSC dengan alkohol 70 % atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap

7. masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (*overload*) karena memperbesar resiko kontaminan

8. Atur alat dan bahan yang telah dimasukkan ke BSC sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril

9. Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tapi gunakan yang berbahan bakar gas.

10. Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja

11. setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan tidak keluar dari BSC

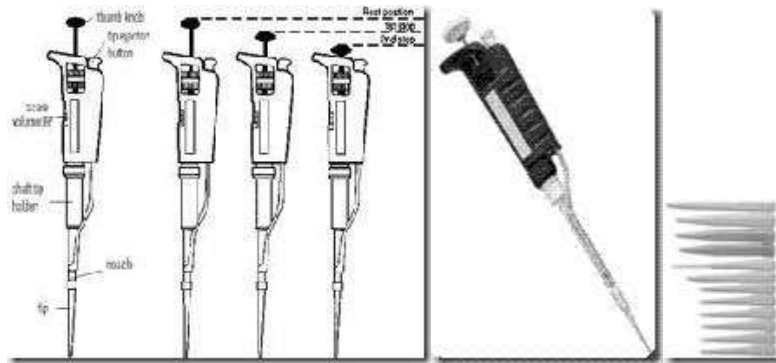
12. Usap permukaan interior BSC dengan alkohol 70 % dan biarkan menguap lalu tangan dibasuh dengan desinfektan

13. Matikan lampu neon dan blower

8. Mikropipet (*Micropipete*) dan Tip

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μ l. Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang

dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1 μl sampai 20 μl , atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (*fixed volume pipette*) misalnya mikropipet 5 μl . dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip



Cara Penggunaan :

1. Sebelum digunakan *Thumb Knob* sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
2. Masukkan Tip bersih ke dalam *Nozzle* / ujung mikropipet.
3. Tekan *Thumb Knob* 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 Knob* maka cairan akan masuk ke tip.
6. Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
7. Tekan *Thumb Knob* sampai hambatan kedua / *second stop* atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
8. 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.

9. Cawan Petri (*Petri Dish*)



Cawan petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganismenya. 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.

10. Pipet Ukur (*Measuring Pipette*)



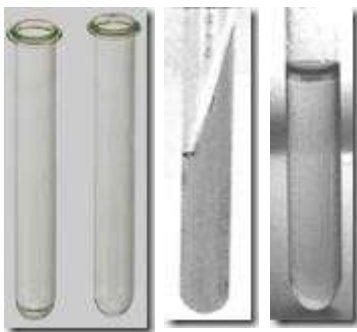
Pipet ukur merupakan alat untuk memindahkan larutan dengan volume yang diketahui. Tersedia berbagai macam ukuran kapasitas pipet ukur, diantaranya pipet berukuran 1 ml, 5 ml dan 10 ml. Cara penggunaannya adalah cairan disedot dengan pipet ukur dengan bantuan *filler* sampai dengan volume yang diinginkan. Volume yang dipindahkan dikeluarkan mengikuti skala yang tersedia (dilihat bahwa skala harus tepat sejajar dengan meniskus cekung cairan) dengan cara menyamakan tekanan *filler* dengan udara sekitar.

11. Pipet tetes (*Pasteur Pipette*)



Fungsinya sama dengan pipet ukur, namun volume yang dipindahkan tidak diketahui. Salah satu penerapannya adalah dalam menambahkan HCl / NaOH saat mengatur pH media, penambahan reagen ada uji biokimia, dll.

12. Tabung reaksi (*Reaction Tube / Test Tube*)



Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan menumbuhkan 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

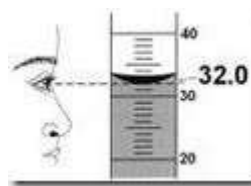
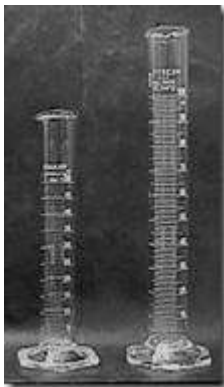
diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Untuk alasan efisiensi, media yang ditambahkan berkisar 10-12 ml tiap tabung.

13. Labu Erlenmeyer (*Erlenmeyer Flask*)



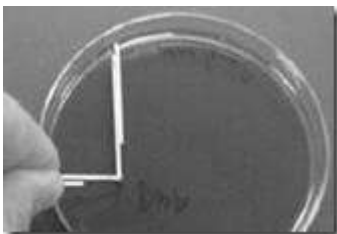
Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan yang. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 25 ml,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

14. 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.

15. Batang L (*L Rod*)



Batang L bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut *spreader*.

16. Mortar dan *Pestle*



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

17. *Beaker Glass*

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



18. Pembakar Bunsen (**Bunsen Burner**)



Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar bunsen. 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.

· *Glass Beads*

Glass Beads adalah manik-manik gelas kecil yang digunakan untuk meratakan suspensi biakan dengan menyebarkan beberapa butir di atas permukaan agar dan digoyang merata. *Glass beads* digunakan pada teknik *spread plate* yang fungsinya sama dengan batang L atau *Spreader*.

19. Tabung Durham

Tabung durham berbentuk mirip dengan tabung reaksi namun ukurannya lebih kecil dan berfungsi untuk menampung/menjebak gas yang terbentuk akibat metabolisme pada bakteri yang diujikan. Penempatannya terbalik dalam tabung reaksi dan harus terendam sempurna dalam media (jangan sampai ada sisa udara).

20. Jarum Inokulum



Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nichrome 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 inoculating*). Jarum inokulum ini akan sangat bermanfaat saat membelah agar untuk preprasi *Heinrich's Slide Culture*.

21. Pinset



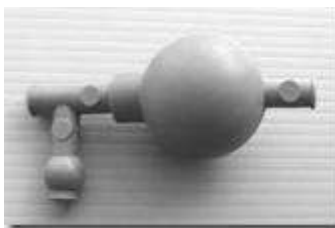
Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotik.

22. pH Indikator Universal



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.

23. Pipet Filler / Rubber Bulb



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.

TEORI STERILISASI

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 misalnya pada penanaman material dalam media, dimana petri, ose maupun media yang 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 vegetatif maupun spora. Sekarang sudah banyak peralatan yang dapat dibeli dalam keadaan steril sehingga bisa langsung digunakan untuk percobaan mikrobiologi.

Cara-cara Sterilisasi

A. Panas kering

1. Flaming (membakar)

Digunakan nyala bunsen untuk sterilisasi ose, sterilisasi mulut tabung percobaan dan wadah gelas lainnya pada waktu menginokulasi 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.

2. Oven udara panas (hot air oven)

Digunakan untuk sterilisasi alat-alat laboratorium dari gelas seperti 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.

B. Panas basah

1. Dengan merebus

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

2. Dengan uap air panas

Terutama untuk mensterilkan media-media yang dapat rusak bila disterilkan dengan autoclave (uap air panas bertekanan). Sterilisasi dilakukan dengan pemanasan 1000 C selama 1 jam. Perlu diingatkan bahwa dengan cara tersebut, spora belum dapat dimatikan.

3. Dengan uap air bertekanan (autoclave)

Digunakan terutama untuk sterilisasi media yang tahan terhadap panas tinggi. Sterilisasi dikerjakan pada suhu 1200° C selama 10-30 menit, sesuai kebutuhan (biasanya selama 20 menit)

4. Pasteurisasi

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

C. 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 yang 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 20-1000 ml

· *Disposable filter cup unit*

- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

· *Disposable filtration unit* dengan botol penyimpanan

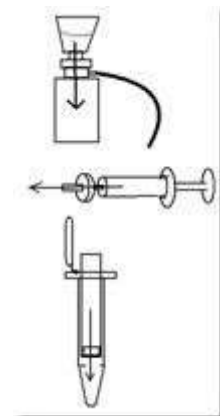
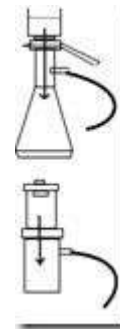
- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

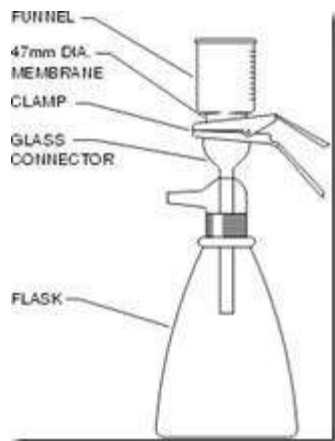
· *Syringe filters*

- Ditekan seperti jarum suntik
- Volume 1-20 ml

· *Spin filters*

- Ditekan dengan gaya setrifugasi
- Volume kurang dari 1 ml





Cara kerja menggunakan *Non-disposable filtration apparatus*

- Sterilkan saringan (dapat menggunakan saringan Bekerfeld, Chamberland Zeitz), membran 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 membran 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.

D. 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

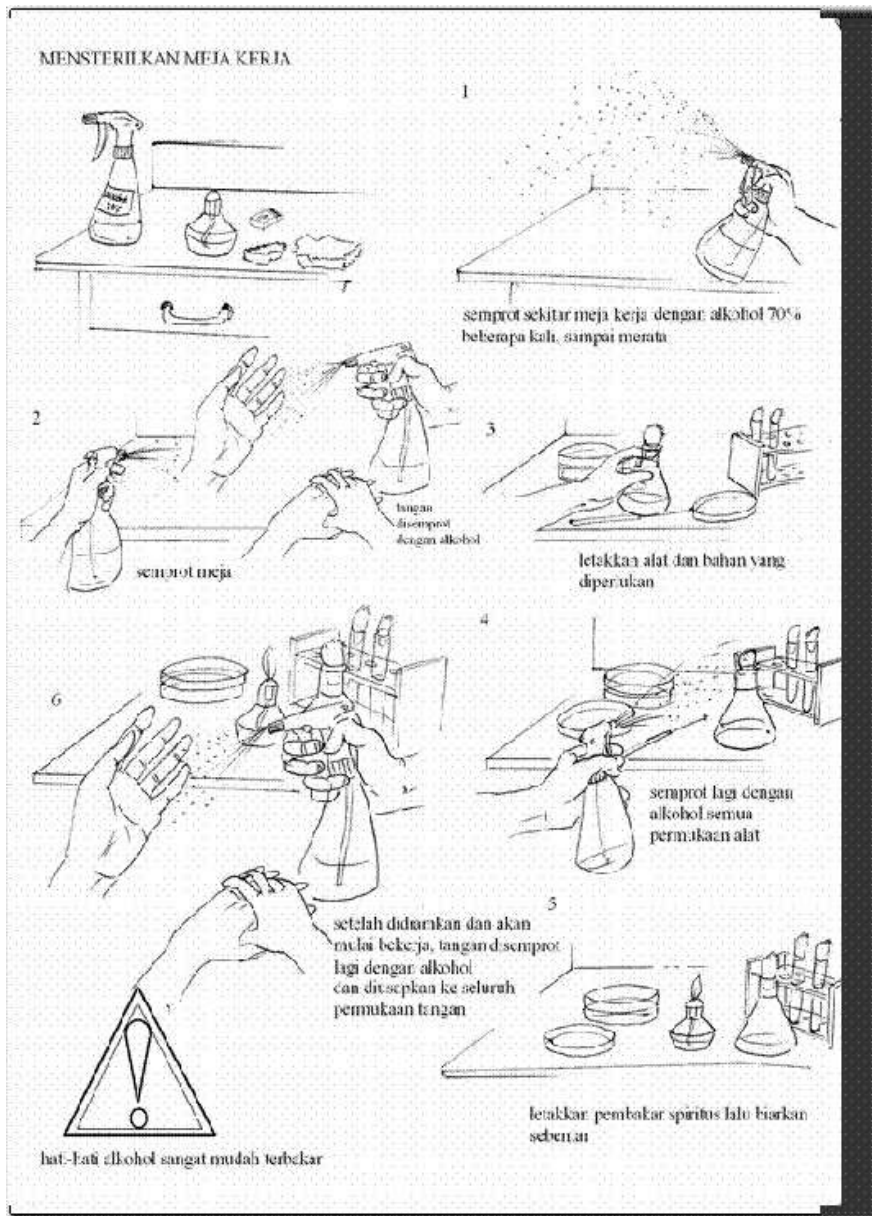
E. Desinfeksi dan Antiseptik (Cara Khemis)

Bahan yang sering digunakan :

- Fenol
- Alkohol (50 – 70%)
- Formaldehid (formalin)
- Detergen

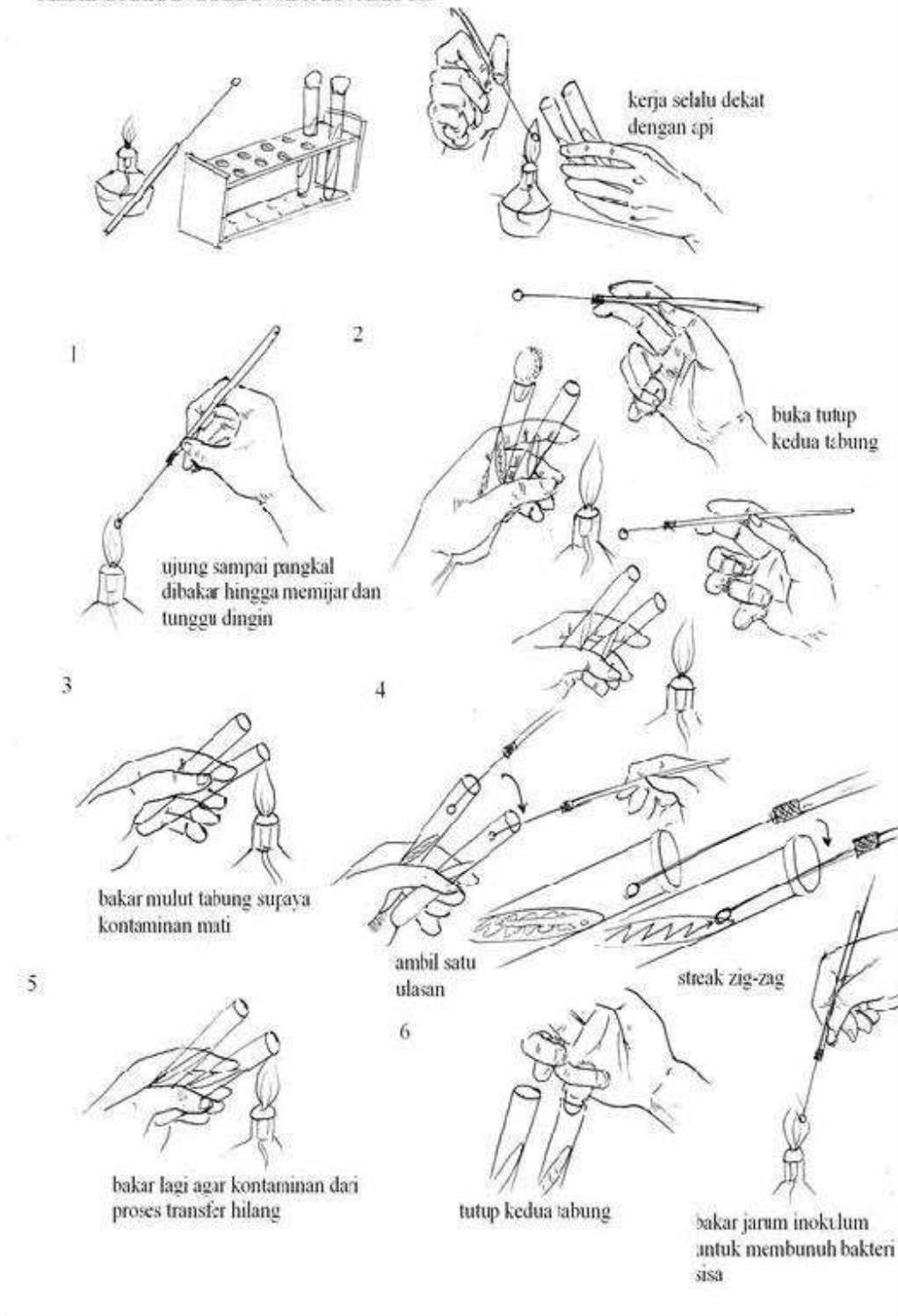
- Halogen
- Logam berat (merkutokrom)
- Etilen oksid (gas sterilisator) mudah meledak dan toksik

Berbagai prosedur umum kerja dalam mikrobiologi yang membutuhkan teknik aseptik
Desinfeksi meja kerja



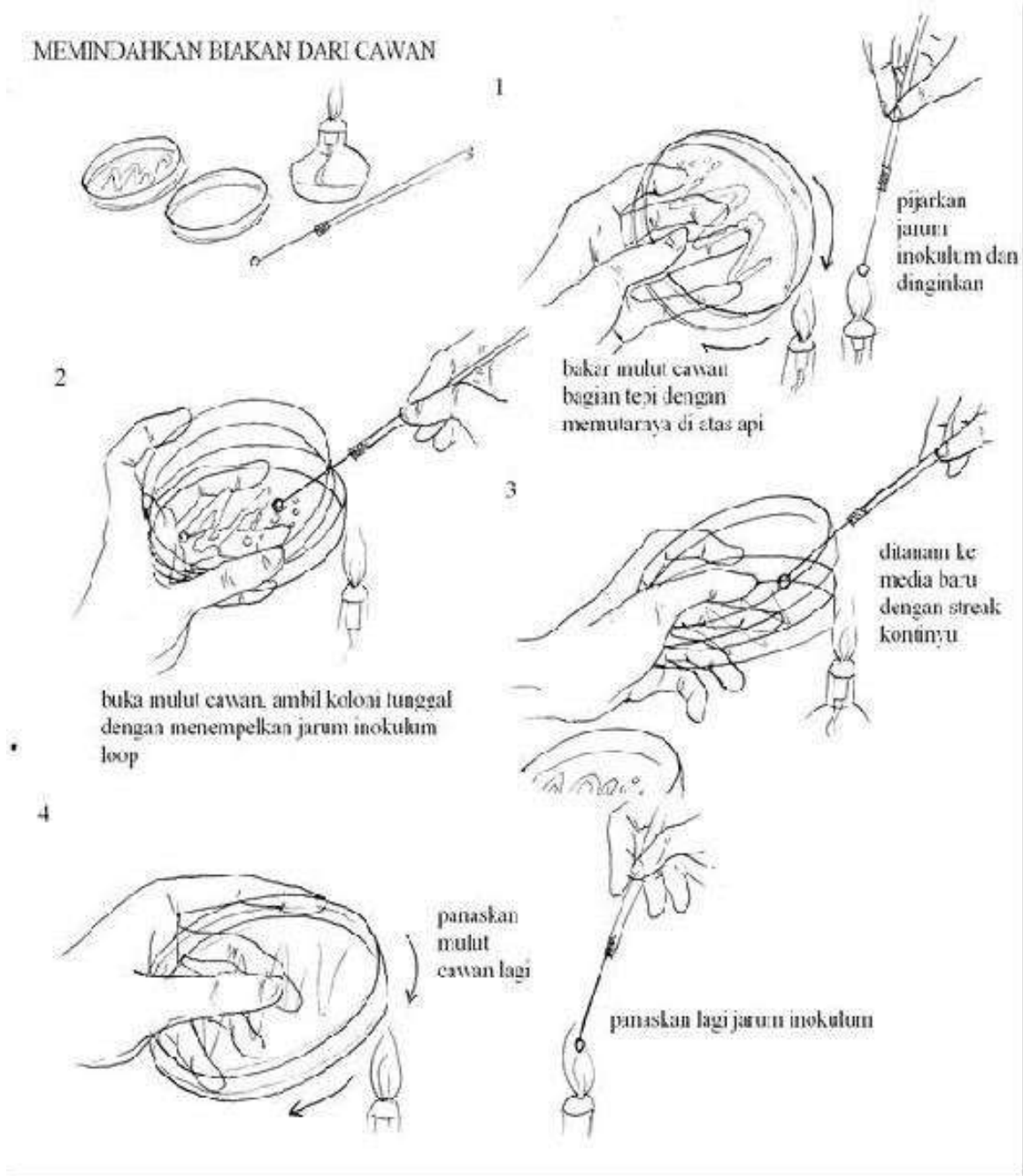
Gambar 1. Prosedur desinfeksi meja kerja

MEMINDAHKAN BIAKAN SECARA ASEPTIS



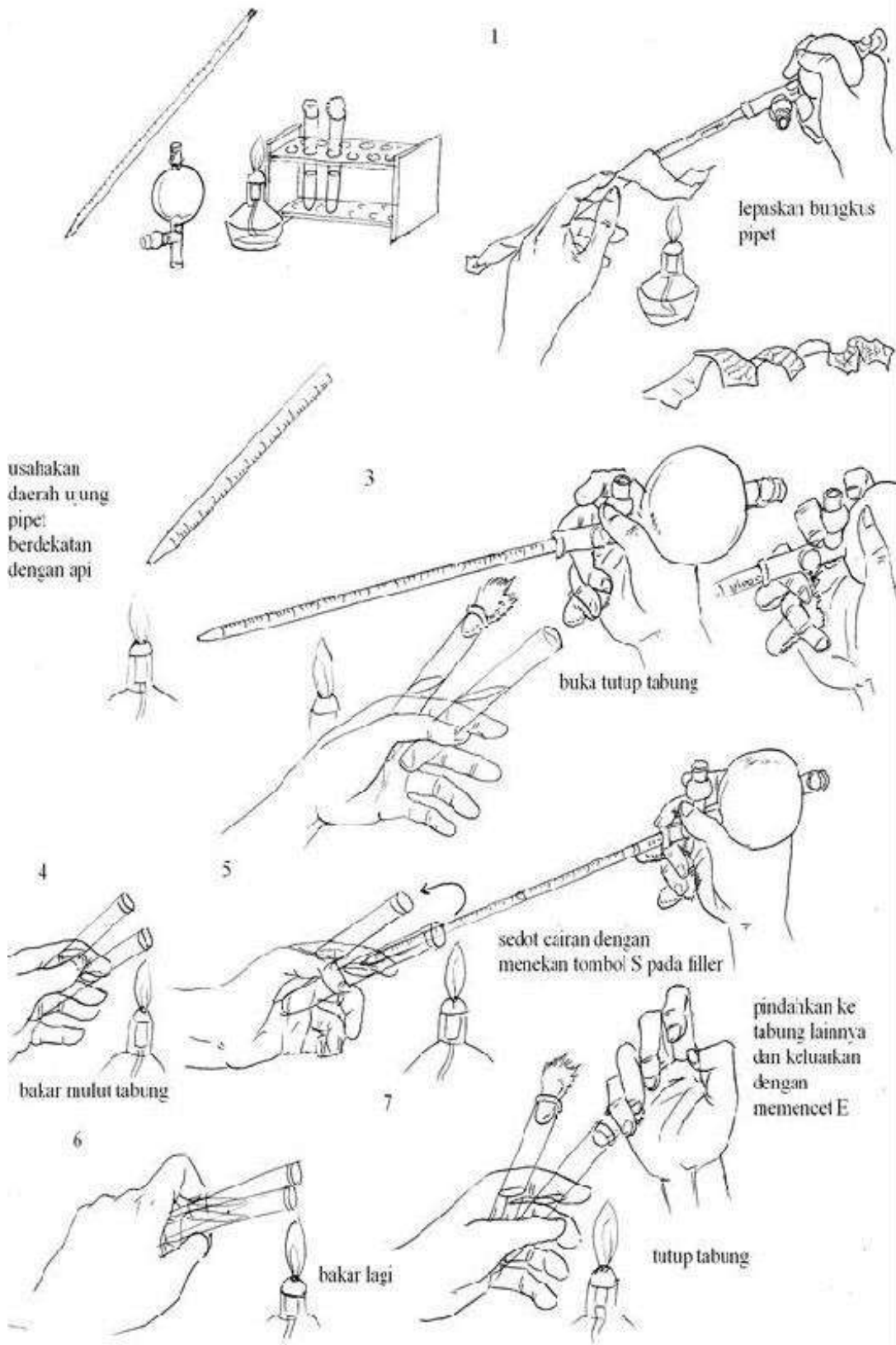
Gambar 2. Memindahkan biakkan secara aseptik

MEMINDAHKAN BIAKAN DARI CAWAN

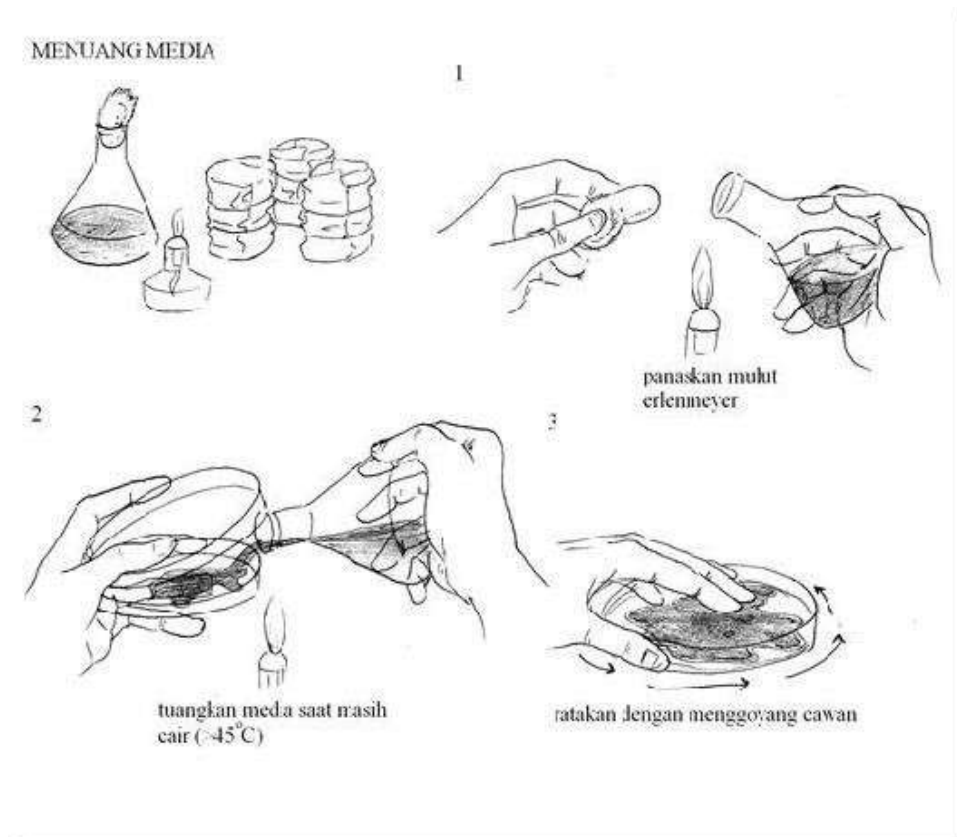


Gambar 3. Memindahkan biakkan dari cawan

MEMINDAHKAN CAIRAN DENGAN PIPET



Gambar 4. Memindahkan cairan dengan pipet



Gambar 5. Menuang media

Saran-saran kerja aseptis :

1. Sebelum membuka ruangan atau bagian steril di dalam tabung/cawan/erlenmeyer sebaiknya bagian mulut (bagian yang memungkinkan kontaminan masuk) dibakar/dilewatkan api terlebih dahulu.
2. Pinset, batang L, dll dapat disemprot dengan alkohol terlebih dahulu lalu dibakar.
3. Ujung jarum inokulum yang sudah dipijarkan harus ditunggu dingin dahulu atau dapat ditempelkan tutup cawan bagian dalam untuk mempercepat transfer panas yang terjadi.
4. Usahakan bagian alat yang diharapkan dalam kondisi steril didekatkan ke bagian api.
5. Jika kerja di *Safety Cabinet* tidak perlu memakai pembakar bunsen tetapi jika di luar *Safety Cabinet* maka semakin banyak sumber api maka semakin terjamin kondisi aseptisnya

I. PEMBUATAN MEDIA DAN ISOLASI BAKTERI

A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu membuat dan mensterilkan media untuk uji mikrobiologi.
2. Mahasiswa dapat memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapat kultur murni.

B. Teori

1. Media

Untuk mendapatkan lingkungan kehidupan yang cocok bagi pertumbuhan bakteri, maka pembuatan media harus memenuhi syarat-syarat media dalam hal :

1. Susunan makanan
2. Tekanan osmose
3. Derajat keasaman
4. Temperatur
5. Sterilisasi

Suatu media pertumbuhan harus mengandung air, sumber karbon seperti CO_2 , CH_4 , citrat, tartrat, alkohol, dan gula (misal glukosa, laktosa, maltosa, dan sebagainya). Komponen lain adalah sumber nitrogen (NO_2 , NO_3 , NH_3 , asam amino, polipeptida atau pepton), mineral (Na, K, Mg, Zn, P, S, Cl), vitamin dan gas (O_2 atau CO_2).

Media yang digunakan harus isotonis, sebab apabila hipertonis maka bakteri akan mengalami plasmoptysis, sedang bila hipotonis, maka akan terjadi plasmolisis.

Tipe Media

1. Berdasarkan konsistensinya :

- a. Media padat, baik datar, miring maupun tegak
- b. Setengah padat, misal : SSS (Semi Solid Sucrose medium) MIO (Motility Indol Ornithine)
- c. Media cair, seperti media gula, media kaldu, kaldu pepton, kaldu darah. dan lain-lain

2. Media basal

Digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat media lain yang lebih kompleks. misalnya : kaldu agar, kaldu pepton, air pepton.

3. Enriched Media (Media diperkaya)

Adalah media basal yang ditambah dengan zat-zat pendukung sehingga kuman yang sukar tumbuh, dapat tumbuh lebih baik, misal : agar darah, agar serum, agar coklat, kaldu serum

4. Enrichment Media (Media pembiakan / penyubur)

Adalah media cair yang digunakan untuk memisahkan organisme dari organisme yang lain, yang tumbuh lebih subur dalam kultur. Media tersebut berisi zat untuk menghambat organisme yang tidak diinginkan, atau zat untuk mempersubur spesies organisme yang diperlukan.

Misal : Medium selenit F, Kaldu tetrasetat, Kaldu brilliant green, Media alkali pepton cair.

5. Media Selektif

Media padat ini mempunyai susunan sedemikian rupa sehingga kuman yang dicari akan tumbuh dengan koloni yang khas, sedang kuman yang lain kurang khas. Misal : Agar McConkey, Media Endo, DCLS Agar untuk isolasi kuman perut.

Kuman perut (enterobakteri) yang tidak memecah laktosa (Non lactose Fermented) misalnya : Samonella, Shigella, Proteus dan lain-lain akan terlihat jernih/transparan, sedang yang memecah laktosa akan berwarna merah.

Secara garis besar berbagai macam media dapat dikelompokkan menurut fungsinya yaitu :

1. Media Transport :

- a. BGS (Buffered Glycerol Saline)
- b. Carry and Blair transport medium
- c. Amies transport medium
- d. Alkaline pepton water (air pepton alkalis)
- e. Stuart transport medium
- f. Kaldu pepton

2. Medium untuk isolasi :

- a. Kultur umum
 1. Agar darah (untuk kultur dan angka kuman)
 2. Agar Coklat
 3. DCLS (Deoxycholate Citrate Lactose Sucrose) Agar
 4. Media Tellurit
 5. Media untuk pertussis (Mordet Gengou Agar)
 6. Thayer Martin Medium'

- 7. MC Conkey Agar
- b. Penanaman *Mycobacterium tuberculosis*
Medium Loewenstein-Jensen, Middlebrook
- c. Penanaman bakteri anaerob
 - 1. Brucella Agar darah
 - 2. Brucella Agar darah dengan kanamycin/antibiotik lain
 - 3. Agar darah
 - 4. Thioglycolat
 - 5. Thioglycolat dengan antibiotik
- d. Leptospira :
Fletcher's medium
- e. Jamur
Sabouraud dan Sabouraud dengan chloramphenicol
- f. Enterobacteriaceae
 - 1. DCLS
 - 2. DST agar
 - 3. Mac Conkey Agar
- 3. Enriched media (media penyubur)
 - 1. Selenit Cystein Broth
 - 2. Larutan alkali pepton
 - 3. Kaldu darah
 - 4. Thioglycolat
 - 5. Gal kultur

2. Isolasi Bakteri

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai macam sel. Di dalam laboratorium populasi bakteri ini dapat diisolasi menjadi kultur murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat dan kemampuan biokimiawinya.

Teknik Pengambilan Sampel

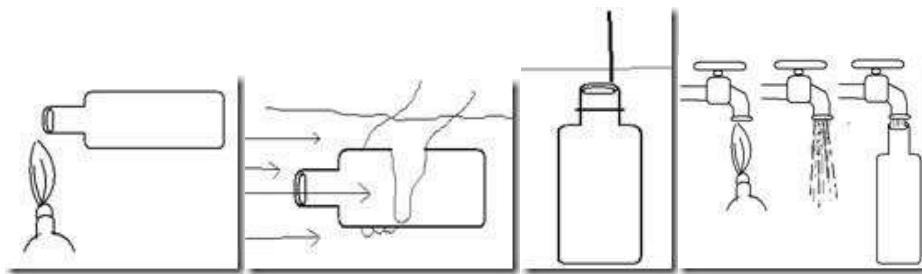
Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel.

a. Sampel tanah

Jika mikroorganismenya yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah, maka cara pengambilannya disesuaikan dengan tujuan dan kebutuhan. Misal jika yang diinginkan mikroorganisma rhizosfer maka sampel diambil dari sekitar perakaran dekat permukaan hingga ujung perakaran.

b. Sampel air

Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air. Bila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan dengan tali, jika ingin mengambil sampel dari air keran maka sebelumnya keran dialirkan dulu beberapa saat dan mulut kran dibakar.

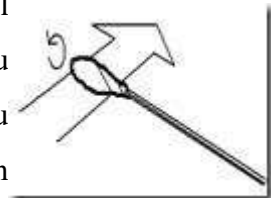


Isolasi Dengan Cara Pengenceran (*Dilution*)

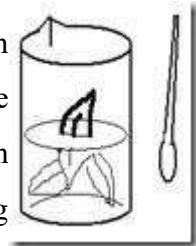
a. Teknik Preparasi Suspensi Sampel

Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

1). *Swab* (ulas), dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal *pepton water*.



2). *Rinse* (bilas) ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. *Rinse* merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam akuades dengan perbandingan 1 : 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan akuades 45 ml yang terdapat dalam *beaker glass*.

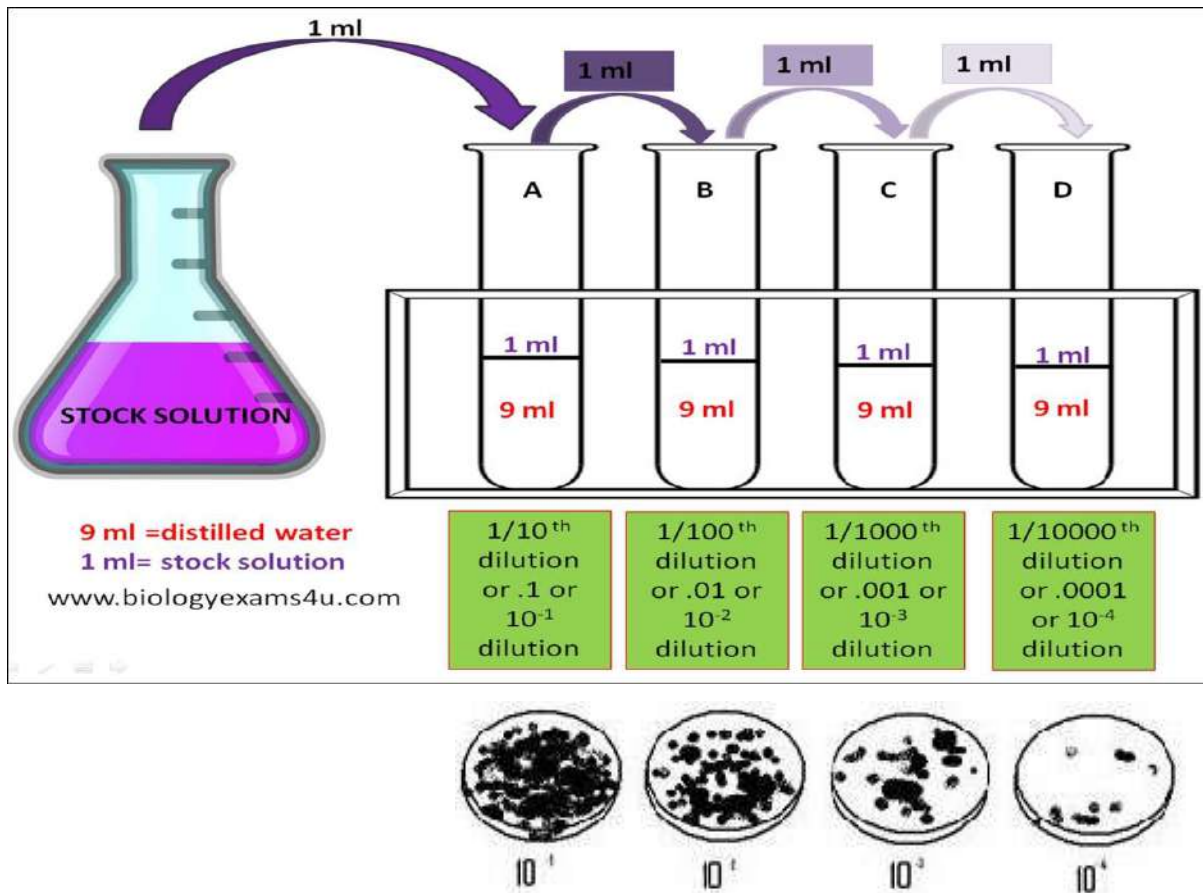


3). *Maseration* (pengancuran), sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antara lain bakso, biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi.



b. Teknik Pengenceran Bertingkat

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisma dari pengenceran sebelumnya.



Gambar 6 Teknik pengenceran sampel bertingkat

c. Teknik Penanaman

1). Teknik penanaman dari suspensi sampel

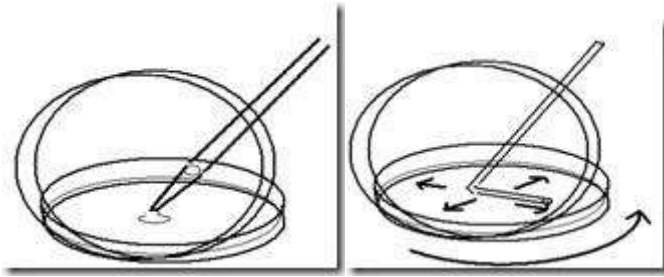
Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir.

a). *Spread Plate* (cawan sebar)

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut :

- Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang L atau batang drugal (spreader) diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menggosokannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

- Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroorganisme dapat mati karena panas.

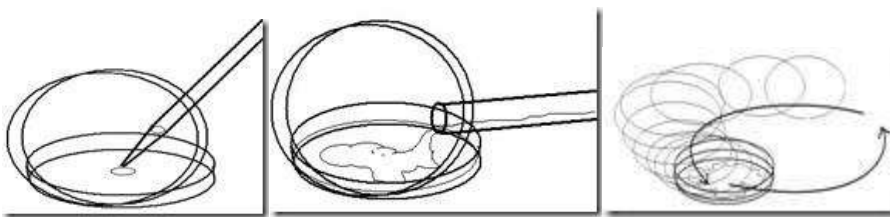


b). *Pour Plate* (cawan tuang)

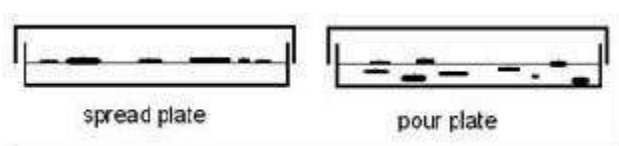
Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ($>45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen.

Prosedur kerja :

- Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ($>45^{\circ}\text{C}$)
- Teteskan 1 ml secara aseptis. suspensi sel kedalam cawan kosong
- Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi.



Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk spread plate dan 1 ml untuk pour plate karena spread plate ditujukan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada *spread plate*.



2). Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

Bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.

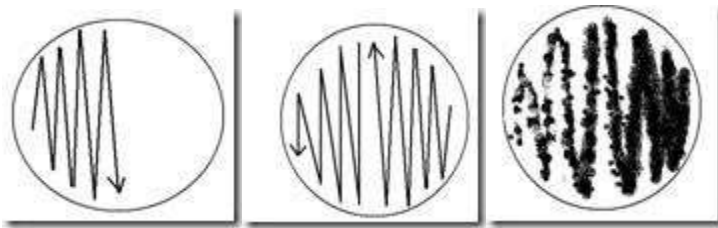
a). Goresan Sinambung

Cara kerja :

· Sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar.

· Jangan pijarkan loop, lalu putar cawan 180°C lanjutkan goresan sampai habis.

Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru.



b). Goresan T

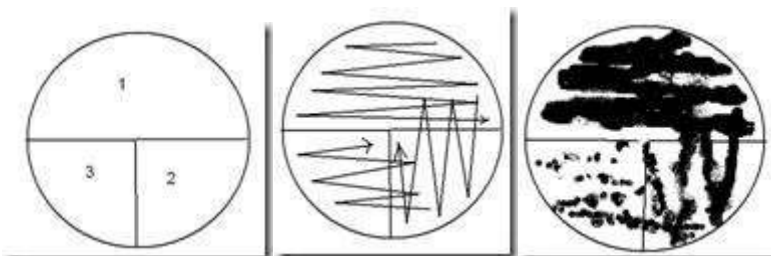
Cara kerja :

· Bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker

· Inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag

· Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2 (*streak* pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna

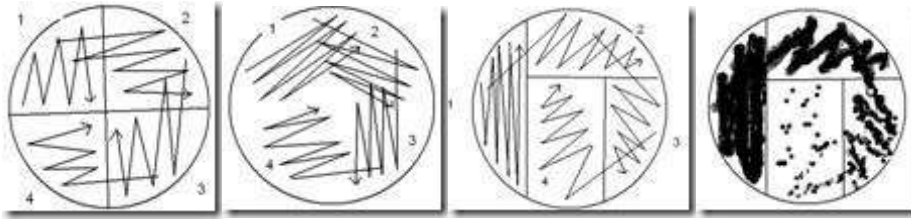
· Lakukan hal yang sama pada daerah 3



c). Goresan Kuadran (*Streak quadrant*)

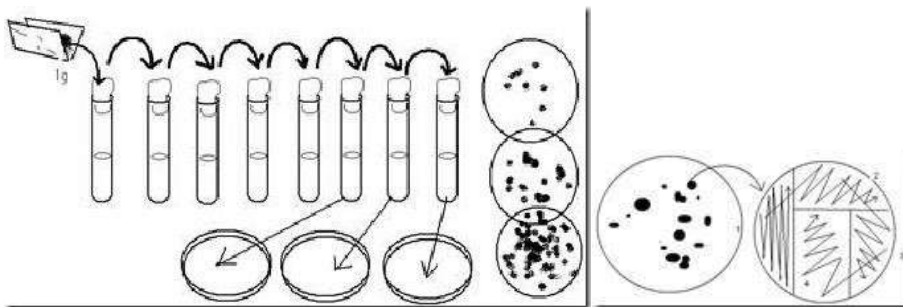
Caranya hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel

mikroorganisma. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.



Cara Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah :

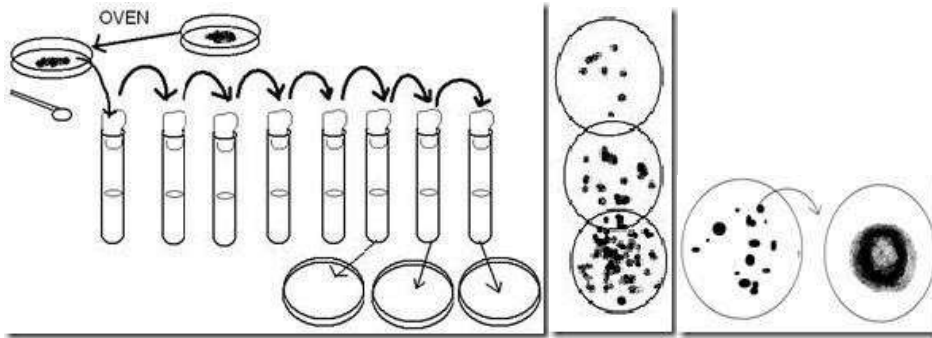
- Tanah seberat 1 g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-8}
- Tiga pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara spread plate pada medium NA, setelah selesai, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
- Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut kemudian dipilih koloni yang relatif terpisah dari koloni lain dan koloni yang mudah dikenali
- Koloni yang terpilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA baru dengan teknik streak kuadran
- Inkubasi 1x24 jam.



Cara Isolasi Jamur dari Tanah :

- Tanah dalam cawan petri dipanaskan dengan oven pada suhu 80°C selama 30 menit dengan cawan petri untuk membunuh sel vegetatif tetap bertahan
- Tanah yang telah dioven diambil 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung pengenceran bertingkat
- Tiga pengenceran terakhir diambil untuk ditanama secara *spread plate* ke media PDA yang ditambah *streptomycin* atau *penicillin*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari

- Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada medium PDA baru,
- Inkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.



C. Alat dan Bahan

1. Alat :

Pembuatan media: Cawan petri, Erlenmeyer, pengaduk, timbangan, gelas Beker, spatula, hot plate dan magnetik stirer, aluminiumfoil, otoklaf, LAF atau Enkas.

Isolasi Bakteri: laminar air flow (LAF)/ Biosafety Cabinet (BSC), Cawan petri, ose, *spreader*, lampu spiritus, tabung reaksi

2. Bahan:

Pembuatan media: Akuades, media MHA (38g/L)

Isolasi Bakteri: air sumur, media agar Mueller Hinton (MHA), larutan NaCl 0,9%

D. Cara Kerja

1. Pembuatan Media MHA (Mueller Hinton Agar)

Tiap kelompok membuat 5 cawan petri berisi masing-masing 20 ml media MHA.

1. Timbang sebanyak 3,8 g serbuk media MHA dimasukkan ke dalam 100 ml akuades dalam Erlenmeyer 250 ml. Aduk hingga campur homogen.
2. Tutuplah Erlenmeyer yang berisi media dengan aluminium foil.
3. Bungkus 5 cawan petri kosong dengan kertas payung.
4. Sterilisasi 5 cawan petri yang sudah dibungkus dan Erlenmeyer berisi media dengan otoklaf selama 15 menit.
5. Biarkan media yang telah disterilkan hingga suhu mencapai 40-45°C (media masih cair tapi suhu sudah tidak terlalu panas).
6. Siapkan 5 cawan petri steril dan tuang media MHA secara aseptik @ 20 ml.
7. Setelah dituang dinginkan media hingga suhu kamar.

8. Kemas masing-masing petri dalam kantong plastik untuk menjaga tetap steril, beri label dan simpan dalam almari es.

b. Isolasi Bakteri

Preparasi sampel

1. Siapkan sampel yang akan diisolasi bakteri, misalnya: swab lidah, air sumur/kran, air kolam.
2. Suspensikan sampel dalam tabung reaksi steril yang berisi 9 ml NaCl 0,9% (pengenceran 10^{-1}) secara aseptis, selanjutnya disebut suspensi sampel.

Penanaman sampel dengan metode gores dan metode sebar

3. Ambil 1 ose suspensi sampel, lalu ditanam pada media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan metode penanaman goresan T (*Streak T*). Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
4. Ambil 0,1 ml suspensi sampel, lalu ditanam pada media MHA dengan metode penanaman sebar (*spread plate*). Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
5. Amati pertumbuhan bakteri dari hasil penanaman gores dengan hasil penanaman metode sebar

Isolasi bakteri dari koloni tunggal

6. Pilih koloni tunggal yang relatif terpisah dari koloni lain atau disebut dengan koloni tunggal
7. Ambil salah satu koloni tunggal dari kedua media tersebut pada no 5 dengan ose lalu goreskan masing-masing pada media MHA baru dengan teknik goresan sinambung. Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
8. Amati keseragaman morfologi dari biakan dan terbentuknya koloni tunggal.
9. Dokumentasikan hasil praktikum isolasi bakteri.

2. PENGECATAN GRAM

a. Tujuan

Mahasiswa dapat melakukan pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan Gram dan menentukan bakteri Gram positif atau negatif dari hasil pengecatan Gram

b. Teori

1. Pemeriksaan mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopik terhadap bakteri dapat dilakukan dalam keadaan hidup maupun mati. Pemeriksaan bakteri dalam keadaan hidup dapat dikerjakan dengan membuat preparat tetesan gantung atau dengan melihat bakteri dalam mikroskop medan gelap. Dalam keadaan mati, bakteri dapat dibuat preparat dan di cat.

a. Pembuatan Preparat

Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan mikroskopik yang baik, diperlukan :

- Preparat dapat dilihat dengan baik yaitu, tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis
- Pengecatan yang baik

1) Pembuatan preparat dari bahan berasal langsung dari penderita.

Bahan dapat berupa : sputun, pus, discharge telinga, discharge hidung, urine (perlu disentrifuge terlebih dahulu, endapannya dibuat preparat).

Cara :

- Bahan diambil dengan ose steril atau kapas lidi steril dan digoreskan pada obyek gelas setipis mungkin. Panaskan obyek gelas di atas nyala api spiritus sambil digoncangkan (jarak preparat sampai api spiritus, kira-kira 20 cm) sampai preparat tersebut kering. Setelah kering formalin 1%, tunggu 5 menit dan keringkan sekali lagi dan preparat siap dicat.

2) Pembuatan preparat dari biakan cair.

Cara :

- Ambil obyek gelas yang bersih dan steril, bebaskan dari lemak dengan memanaskan di atas nyala api spiritus. Ambil kuman dari Cat sekunder / tanaman cair (yang sebelumnya telah diaduk secara steril) dengan menggunakan ose steril, diratakan pada obyek gelas sehingga membentuk diameter kira-kira 1-2 cm. Ose yang sudah dipakai

mengambil kuman harus disterilkan kembali dengan membakar ose diatas nyala api spiritus. Jika akan dipakai lagi, harus disterilkan dengan cara yang sama.

- Preparat yang sudah dibuat kemudian dikeringkan dan ditetesi formalin dengan cara seperti pembuatan preparat langsung.

Perhatian :

- Jangan memegang mata ose dengan menggunakan tangan
- Jangan meletakkan ose diatas meja, letakkan ose pada tempat yang telah disediakan
- Jangan lupa mensterilkan ose pada saat akan dipakai dan sesudah pemakaian

3) Pembuatan preparat dari pertumbuhan media padat.

Cara :

Tetaskan satu ose kaldu pada obyek gelas yang telah dibersihkan dan dibebaskan dari lemak. Dengan ose steril ambil sedikit dari satu koloni kuman, campurlah dengan kaldu tersebut, buatlah menjadi homogen tipiskan. Preparat kemudian dikeringkan di atas nyala api spiritus dan selanjutnya dikerjakan sebagai membuat preparat dengan bahan berasal dari material langsung.

b. Pengecatan

Pada umumnya pemeriksaan langsung kurang memberikan hasil yang memuaskan karena kontras antara sel bakteri dengan latar belakangnya kurang jelas. Untuk meningkatkan kontras biasanya dilakukan pengecatan.

1). Jenis-jenis Cat

a). Mordan

Mordan adalah bahan kimia atau proses fisik yang menfiksasi cat primer yang diserap mikroorganisme target. Contoh : kompleks yodin yang digunakan untuk pengecatan Gram, campuran asam dan alkohol untuk pengecatan tahan asam.

b). Cat sekunder kontras

Sebagian besar sistem pengecatan menggunakan cat sekunder atau kontras untuk memberikan warna mikroorganisme non target. Cat sekunder mempunyai spektrum warna yang berbeda dengan cat primer. Contoh : Safranin pada pengecatan Gram memberikan warna merah, Metilen biru pada pengecatan tahan asam memberikan warna biru.

2). Klasifikasi Pengecatan

a). Pengecatan Sederhana

Yaitu pengecatan yang hanya menggunakan 1 macam cat. Biasanya baik bakteri maupun sekitarnya akan mempunyai warna yang sama tetapi dengan intensitas yang berbeda. Contoh : karbol fuschin, Gentian violet, Metylen biru.

b). Pengecatan Differensial / Majemuk

Yaitu pengecatan yang menggunakan lebih dari satu macam cat. Pengecatan ini dapat digunakan untuk identifikasi karena masing-masing bakteri mempunyai reaksi tertentu. Contoh : Pengecatan gram, ZN.

c). Pengecatan Khusus

Yaitu pengecatan yang secara khusus digunakan untuk melihat alat tambahan pada bakteri.

Contoh :

- Pengecatan Burri untuk melihat kapsul
Kapsul akan terlihat jernih dengan badan bakteri dan sekitarnya terlihat hitam
- Pengecatan Gravy untuk melihat flagella
- Pengecatan Neisser untuk melihat granula (*Corynebacterium diphtheriae*)
C. diphtheriae akan terlihat berbentuk batang dengan kedua ujungnya membulat (bentuk halter) yang berisi granula. Badan bakteri terlihat berwarna kuning, sedang granula berwarna biru kehitaman
- Pengecatan Much Weiss untuk melihat granula *Mycobacterium tuberculosis*
Bakteri tahan asam akan terlihat berwarna merah dengan granula yang berwarna ungu. Dasar preparat dan sel-sel lain akan terlihat berwarna biru.

3). Pengecatan Gram

a) Teori Pengecatan Gram

Metode pengecatan ini ditemukan oleh Christian Gram pada tahun 1884. Dari sifat bakteri terhadap cat Gram, bakteri dapat digolongkan menjadi Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram tahan terhadap alkohol sehingga tetap mengikat cat pertama dan tidak mengikat cat kontras sehingga bakteri akan berwarna ungu. Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram tidak tahan alkohol sehingga warna cat yang pertama dilunturkan dan bakteri akan mengikat warna kontras tampak merah.

Ada beberapa teori tentang dasar perbedaan kedua golongan tersebut :

i). Teori Salton

Teori ini berdasarkan kadar lipid yang tinggi (20%) di dalam dinding sel bakteri Gram negatif. Zat lipid ini larut selama pencucian dengan alkohol. Pori-pori pada dinding sel

membesar, sehingga zat warna yang sudah diserap mudah dilepaskan dan bakteri menjadi tidak berwarna.

Bakteri Gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya oleh pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil sehingga kompleks ungu kristal yodium dipertahankan dan bakteri tetap berwarna ungu.

ii). Teori Permeabilitas Dinding Sel

Teori ini berdasarkan tebal tipisnya lapisan peptidoglikan dalam dinding sel. Bakteri Gram positif mempunyai susunan dinding yang kompak dengan lapisan peptidoglikan yang terdiri dari 30 lapisan. Permeabilitas dinding sel kurang, dan kompleks ungu kristal yodium tidak dapat keluar.

Bakteri Gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, hanya 1-2 lapisan dari susunan dinding sel tidak kompak. Permeabilitas dinding sel lebih besar sehingga masih memungkinkan terlepasnya kompleks ungu kristal yodium.

b). Komposisi cat Gram

Cat	Komposisi	Jumlah
Cat Gram A (warna ungu)	Cristal Gentian Violet (CV)	2 gram
	Alkohol 96%	20 cc
	Ammonium Oxalat 1% in aqua	80 cc
Cat Gram B (warna coklat)	Jodium	1 gram
	Kalium Jodida	2 gram
	Aquadest	300 cc
Cat Gram C (tak berwarna)	Aceton	30 cc
	Alkohol	70 cc
Cat Gram D (warna merah)	Safranine	1 gram
	Alkohol 96%	10 cc
	Aquadest	90 cc

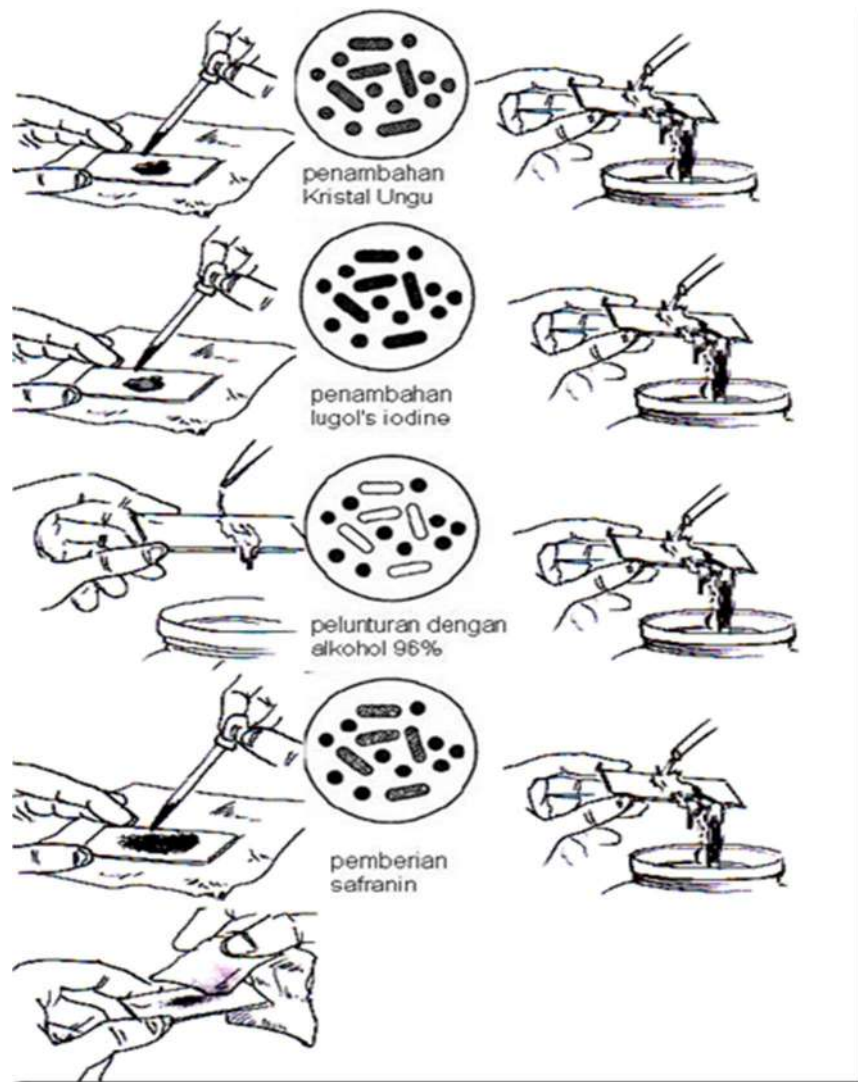
c). Cara Pengecatan Gram

- Preparat yang telah siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit. Disini semua kuman yang pada pengecatan Gram dibedakan menjadi Gram positif dan negatif akan berwarna ungu sesuai dengan warna cat Gram A. setelah 1-3 menit cat dibuang, tanpa dicuci dengan air.

- Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram B selama $\frac{1}{2}$ - 1 menit. Akibat pemberian Gram B maka pengikatan warna oleh bakteri menjadi lebih baik. Setelah itu cat dibuang dan preparat dicuci dengan air (leding).
- Preparat kemudian ditetesi cat Gram C sampai warna cat tepat dilunturkan. Setelah pemberian cat Gram C maka akan terjadi :
 Bakteri Gram positif : tahan terhadap alkohol (ikatan antara cacat dengan bakteri tidak dilunturkan oleh alkohol) sehingga bakteri akan tetap berwarna ungu.
 Bakteri Gram negatif : tidak tahan terhadap alkohol, sehingga warna ungu dari cat dilunturkan dan bakteri menjadi tidak berwarna lagi.
- Preparat digenangi dengan cat Gram D selama 1-2 menit Gram D bertindak sebagai warna kontras. Akibat dari pemberian Gram D maka :
 Bakteri Gram positif oleh karena telah jenuh mengikat cat Gram A maka bakteri tidak mampu lagi untuk mengikat Gram D sehingga bakteri akan tetap berwarna ungu.
 Bakteri Gram negatif oleh karena warna cat yang sebelumnya telah dilunturkan oleh cat Gram C sehingga bakteri tidak berwarna lagi maka ia akan mengikat warna cat Gram D sehingga bakteri akan berwarna merah.
- Setelah itu preparat dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar (dengan preparat dalam posisi miring) dan setelah itu diperiksa di bawah mikroskop dengan menggunakan pembesaran kuat.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pewarnaan Gram adalah sbb:

- Fase yang paling kritis dari prosedur di atas adalah tahap dekolorisasi yang mengakibatkan *CV-iodine* lepas dari sel. Pemberian ethanol jangan sampai berlebih yang akan menyebabkan *overdecolorization* sehingga sel gram positif tampak seperti gram negatif. Namun juga jangan sampai terlalu sedikit dalam penetesan etanol (*underdecolorization*) yang tidak akan melarutkan *CV-iodine* secara sempurna sehingga sel gram negatif seperti gram positif.
- Preparasi pewarnaan gram terbaik adalah menggunakan kultur muda yang tidak lebih lama dari 24 jam. Umur kultur akan berpengaruh pada kemampuan sel menyerap warna utama (CV), khususnya pada gram positif. Mungkin akan menampilkan gram variabel yaitu satu jenis sel, sebagian berwarna ungu dan sebagian merah karena pengaruh umur. Walaupun ada beberapa species yang memang bersifat gram variabel seperti pada genus *Acinetobacter* dan *Arthrobacter*.



Gambar 7. Metode pengecatan Gram

Contoh bakteri Gram Positif :

- Bentuk kokus : Streptococcus, Staphylococcus, Pneumococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus
- Bentuk batang : *Corynebacterium diphtheriae*, Nycobacteria, Bacillus, Clostridia

Contoh bakteri Gram Negatif :

- Bentuk kokus : Neisseria, Veillonella
- Bentuk batang : *E. coli*, shigella, Salmonella, Klebsiella, hemphillus, Pasteiurella, Bacteroides, Fusobacterium, Brusella.

4). Pengecatan Ziehl Nellsen (ZN)

a). Teori Pengecatan ZN

Pengecatan ini sering disebut dengan pengecatan acid fast atau tahan asam. Dengan pengecatan ZN, bakteri terbagi menjadi 2 golongan yaitu bakteri tahan asam dan bakteri yang tidak tahan asam. Bakteri tahan asam setelah diberi cat pertama akan tahan terhadap pencucian dengan asam dan alkohol sehingga tidak mengikat cat kedua dan tampak berwarna merah. Sedangkan bakteri yang tidak tahan asam akan tampak berwarna biru karena cat pertama dilunturkan oleh asam dan alkohol, dan kemudian mengikat cat kedua. Sifat tahan asam ini disebabkan karena terdapatnya asam mikolat yang terikat pada dinding sel. Dinding sel bakteri yang tahan asam dan alkohol terdiri dari peptidoglikan, arabinogalaktan dan lipid. Lima puluh persen dari lipid ini adalah asam mikolat.

b). Komposisi Cat ZN

Tabel I. Komposisi cat ZN

Cat	Komposisi	Jumlah
Ziehl Neelsen A (warna merah)	fuchsin basis	1 gram
	Alkohol 96%	10 cc
	phenol 5% in aqua	3 cc
Ziehl Neelsen B (tak berwarna)	asam khlorida pekat	3 cc
	Alkohol 96%	97 cc
	atau :	
	asam sulfat pekat	5 cc
	Alkohol 70%	95 cc
Ziehl Neelsen C (warna biru)	methylen biru 0,2%	10 cc

c). Cara Pengecatan Ziehl Neelsen :

- Preparat yang telah siap di cat digenangi dengan ZN-A. Kemudian dipanasi dengan lampu spiritus sampai menguap, tetapi tidak mendidih. Baik bakteri yang tahan asam dan alkohol maupun yang tidak, keduanya akan berwarna merah. Tunggu selama 5 menit, setelah itu cuci dengan air.
- Kemudian preparat ditetesi dengan cat ZN-B atau dimasukkan dalam ZN-B sampai tepat warna cat dilunturkan. Bakteri yang tahan asam dan alkohol, warna cat ZN-A

tidak dilunturkan sehingga tetap berwarna merah. Sedang bakteri yang tidak tahan asam dan alkohol, maka warna cat ZN-A akan dilunturkan sehingga bakteri menjadi tidak berwarna. Setelah itu preparat segera diangkat dan dicuci dengan air.

- Setelah itu preparat digenangi dengan cat ZN-C selama 2 menit. Bakteri yang tahan asam dan alkohol, tidak mampu lagi mengikat warna ZN-C oleh karena sudah jenuh, sehingga bakteri akan tetap berwarna merah. Sedangkan bakteri yang tidak tahan asam dan alkohol warna cat ZN-A akan dilunturkan, sehingga bakteri akan mengikat warna cat kedua (ZN-C) sehingga akan berwarna biru. Setelah itu preparat dicuci dengan air dan dikeringkan dalam temperatur kamar.

Contoh bakteri ZN positif :

- Mycobacterium tuberculosis
- Mycobacterium lepra
- Mycobacterium yang saprophyt

c. Alat dan Bahan

Alat: mikroskop, gelas preparat, lampu bunsen, ose bulat

Bahan: Cat Gram A,B,C,D, akuades

d. Cara Kerja

Preparasi preparat

1. ambil gelas preparat dan bersihkan dengan alkohol.
2. teteskan satu tetes aquades pada bagian tengah gelas preparat
3. Sterilkan ose dengan dibakar pada nyala bunsen
4. Setelah ose dingin, ambil single colony pada biakan bakteri
5. ratakan bakteri pada gelas preparat
6. sterilkan kembali ose yang telah digunakan pada nyala api
7. biarkan cairan pada gelas preparat mengering
8. Fiksasi gelas preparat dengan dilewatkan pada nyala api

Pengecatan preparat dengan cat Gram

1. tetesi preparat dengan cat Gram A selama 1-3 menit, setelah itu buang cat A
2. tetesi cat Gram B, diamkan 1 menit, buang cat B dan cuci dengan air
3. tetesi cat Gram C sampai cairan pencuci tidak berwarna, dan cuci dengan air
4. tetesi cat Gram D, diamkan 1 menit, cuci preparat dengan aquades dan biarkan preparat mengering”
5. Amati preparat di bawah mikroskop dan amati warna hasil pengecatan

3. UJI BIOKIMIA BAKTERI

A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan uji biokimia untuk identifikasi bakteri

B. Teori

Uji Biokimia

Uji biokimia banyak digunakan untuk identifikasi bakteri. Beberapa kuman memerlukan medium yang sesuai dengan kebutuhan nutrisi khususnya. Pada kasus lain, medium selektif dapat dipakai tidak hanya untuk isolasi kuman yang diperiksa, tetapi juga dipakai untuk satu uji biokimiawi atau lebih.

a. Contoh-contoh uji biokimia :

1). Hidrolisis Gelatin

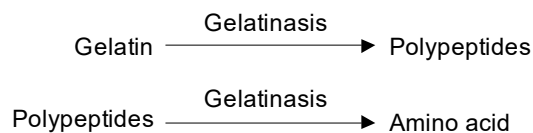
Tujuan : Untuk meneliti produksi enzim proteolitik gelatinase.

Medium Nutrient Gelatin 12%
Beef extract gram per liter 3
Pepton 5
Gelatin 120

Tumbuhan 128 gram tepung tersebut diatas ke dalam 1 liter aquades. Panaskan hingga mendidih untuk melarutkan dengan sempurna. Sesuaikan pH 7,2. Sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit. Campur baik-baik sebelum dituang, dan dinginkan 20° C atau dimasukkan refrigerator agar membeku.

Reagen: Tidak ada

Biokimia : Gelatin ialah suatu protein berasal dari collagen.



Uji : Nutrient gelatin tegak diinokulasi dengan stab culture, pelat Nutrient gelatin diinokulasi dengan 2 tetes sebuah kultur muda dalam kaldu umur 24 jam. Kemudian diinkubasikan pada suhu 20-22° C. Alternatifnya, diinkubasikan pada suhu optimum kuman, sampai dengan 1 minggu. Tempatkan ke dalam refrigerator lebih kurang selama 30 menit bersama dengan kontrol negatifnya.

Hasil Uji : Catatlah luas dan bentuk bagian gelatin yang mencair. Bila tabung percobaan diinkubasikan pada suhu diatas 25° C, pencarian gelatin hanya tampak bila kultur tetap cair setelah direndam dalam air es, atau dimasukkan ke dalam refrigerator selama 30 menit. Reaksi positif medium mencair. Reaksi negatif medium memadat pada suhu rendah.

2). Hidrolisis Casein

Tujuan : Untuk meneliti produksi enzim proteolitik dan aktivitas tryptic

Medium	Milk agar	
	Yeast extract	gram per liter 3
	Pepton	5
	Skim milk	1
	Agar	120

Larutan 24 gram tepung tersebut di atas ke dalam 1 liter aquades. Panaskan hingga mendidih untuk melarutkan dengan sempurna. Sesuaikan pH 7,2. Campur baik-baik sebelum dituang ek dalam tabung atau botol-botol yang diperlukan. Sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

- cn (i) Larutan mercuric chloride
- | | |
|---------------------------|-------|
| Mercuric chloride | 15 g |
| Hydrochoric acid pekat .. | 20 g |
| Aquades | 100 g |
- (ii) Larutan 1% HCl, atau
- (iii) Larutan 1% tannic acid

Biokimia : Casein ialah suatu campuran phosphoprotein yang terdapat di dalam air susu dan keju. Di dalam milk sai kadarnya lebih kurang 3% merupakan protein yang paling nutritif, kaya dan mengandung semua asam amino ensensial. Komponen utamanya ialah a, b, g, dan K-casein.

Uji : Plat milk agar diinokulasikan dengan menggoskan ino-kulum sebuah kultur muda dalam kaldu umur 24 jam, dengan membuat sebuah garis melintang pada permukaan agar, kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 2 – 14 hari.

Hasil uji : Zona yang jernih yang tampak pada pelat setelah inkubasi adanya hidrolisis casein. Untuk menegaskan bahwa penjernihan tersebut terjadi karena hidrolisis casein, pelat-pelat tersebut dituangi dengan salah satu larutan mercuric chloride, atau larutan 1% tannic acid, yang kesemuanya adalah protein presipitant. Lebar zona yang jernih tersebut diukur dalam mm.

3). Uji Indol

Tujuan : Untuk meneliti produksi Indol dari tryptophane

Medium : Tryptone Water

Tryptone gram per liter `10

Sodium chloride 5

pH 7,5

Tambahkan 15 ram tepung tersebut di atas ke dalam 1 liter aquades. Campur baik-baik, distribusikan ke dalam tabung-tabung percobaan, dan sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit.

Reagen(i) Reagen Kovacs

Amyl atau isoamyl alcohol 150 ml

para-Dimethylaminobenzalehyde 10 g

Hydrochloric acid pekat murni 50 ml

(ii) Reagen Ehrlich

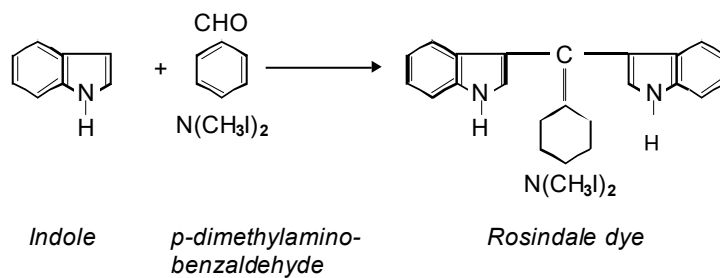
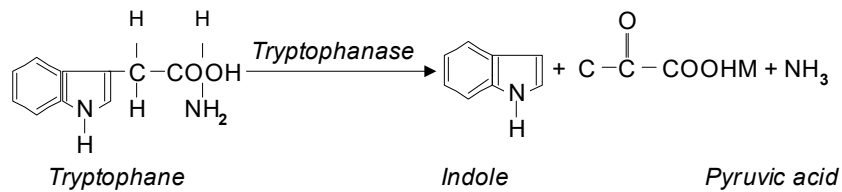
para-Dimethylaminobenzalehyde 4 g

Ethanol 96% 380 ml

Hydrochloric acid pekat murni..... 80 ml

Simpan dalam refriferator

Biokimiawi : Medium Tryptone water kaya akan Tryptophane. Produk indol di deteksi dengan xylol dan mereaksikan dengan reagen Ehrlich agar terjadi perubahan warna.



Uji : Medium tersebut diinokulasi dengan 2 tetes sebuah kultur muda dalam kaldu umur 24 jam pada permukaan medium tersebut, kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 2 – 7 hari. Tambahkan reagen Ehrlich melalui dinding tabung reaksi, jangan dikocok.

Hasil Uji : Bila terbentuk indol, terjadi perubahan warna merah pada xylool-medium. Pada reaksi negative tidak terjadi perubahan warna. Bila menggunakan reagen Konvacs, tambahkan 0,5 ml reagen Konvacs, tabung percobaan dikocok bolak-balik, dan ditaruh di rak. Bila terbentuk indol akan terjadi warna merah pada lapisan alcohol.

4). Uji kemampuan menghasilkan H₂S

Tujuan : Untuk meneliti produksi H₂S

Medium : Pepton Water

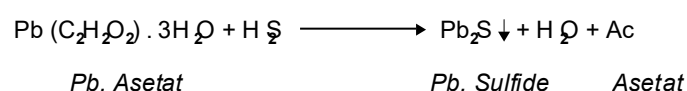
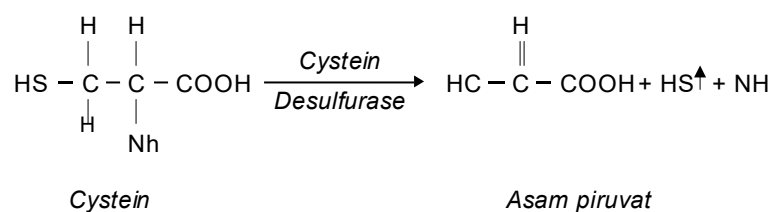
Reagen Kertas indikator, yang terdiri atas kertas filter yang di rendam dalam larutan Pb-acetate jenuh, dikeringkan.

Biokimia : Pepton adalah suatu sumber asam amino yang mengandung sulfur, umpamanya cysteine, yang dapat dicerna oleh aktivitas dari bakteri tertentu. Sulfur direduksi dengan hidrogenase.

Uji : Medium tersebut diinokulasi dengan 2 tetes sebuah kultur muda dalam kaldu umur 24 jam. Selipkan satu pita kertas inkubator yang telah diimpregnasi dengan Pb-aceate tersebut di atas medium. Diinkubasikan pada suhu optimum selama 2 – 7 hari, bersama sebuah kontrol yang tidak diinokulasi.

Hasil Uji : Produksi dan pembabahan H₂S menyebabkan penghitaman kertas indikator. Pada reaksi negatif tidak terjadi penghitaman.

Catatan : Produksi H₂S dideteksi dengan menggunakan medium S.I.M. atau agar T.S.I.



5). Hidrolisis Pati

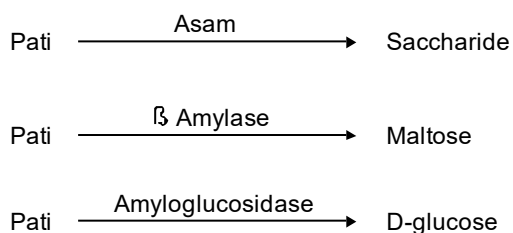
Tujuan : Untuk meneliti produksi enzim amilase dan aktivitas hidrolisis

Medium	Starch Agar	
	Bubuk Lab-Lemco	gram per liter 1
	Yeast extract	2
	Peptone	5
	Sodium chloride	5
	Phenol red	0,05
	Pati	2
	Agar	15
	pH 7,4	

Medium tersebut terdiri dari Nutrient Agar ditambah dengan 0,2 – 1% pati dan indikator phenol red. Sterilisasi dan dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril.

Reagen: Tidak ada

Biokimiawi : Pati berupa butir-butir tepung yang dipisahkan dari jagung, ketela, gandum, atau kentang. Merupakan senyawa kristal polymeric, yang terdiri atas 27% amylase dan 73% amylopectin. Tidak larut air atau alkohol. Didalam air pati akan larut bila dipanaskan, membentuk larutan kolonial, yang mengental bila pati relatif resisten terhadap hidrolisis, reaksi hanya berlangsung dengan bantuan asam atau enzim (a amylase, b amylase, amyglucosidase). Hidrolisis pati bervariasi tergantung asam atau enzim yang dipakai.

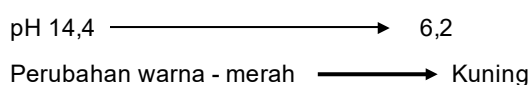


6). Uji Methyl Red

Tujuan : Untuk mendeteksi fermentasi glukose dan produksi asam dengan pH 4,5 atau kurang.

Medium : Glukose – Fosfat – Air pepton.

Reagen Larutan 0,04% methyl red dalam alkohol



Uji : Medium diinokulasi dengan 2 tetes kultur muda, dan diinkubasikan selama 48 jam

1. Tambahkan 2 tetes reagen methyl red pada kultur tersebut

2. Tambahkan 2 tetes reagen methyl red pada sebuah ubin putih, tambahkan satu usa kultur.

Hasil Uji : Positif : berwarna merah
Negatif : berwarna kuning

7). Uji Eijkmann

Tujuan : Untuk mendeteksi fermentasi laktose pada Mac Conkey broth pada suhu 44° C oleh kuman coliform dan menghasilkan asam dan gas. Uji ini dipakai untuk klasifikasi coliform dan untuk pemeriksaan air. Hanya *E. coli* tipe I yang berasal dari tinja yang mampu menyebabkan uji Eijkmann positif. Ini menunjukkan pencemaran air oleh *E. coli* patogen.

Médium : Mac Conkey broth

Uji : Médium dipanaskan pada suhu 44° C, kemudian diinkubasi dengan usa lupus, periksa adanya udara dalam tabung Dirham, dan akan diinkubasikan selama 48 jam.

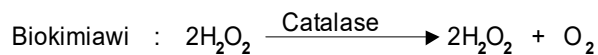
Hasil Uji : Positif : Produksi asam gas
Negatif : Produksi asam

8). Uji Catalase

Tujuan : Untuk deteksi produksi catalase

Medium : Tidak ada

Reagen: Larutan 3% H₂O₂



Uji : 1. Kuman diambil dari biakan padat dengan usa steril. Pada sebuah slide dibuat suspensi pekat kuman tersebut dalam air. Tambahkan satu tetes reagen, goyangkan supaya bercampur, dan periksa pembentukan gas.

2. Tuangkan 1 ml reagen di atas permukaan kultur pada agar miring umur 24 jam, dan letakkan tabung dengan posisi miring.

3. Tempatkan 1 tetes reagen diatas sebuah koloni pada medium agar, dan 1 tetes di atas mediaum agar sebagai pembanding.

Hasil Uji : Positif : segera timbul gelembung-gelembung gas O₂
Negatif : tidak timbul gelembung gas

9). Uji Koagulase

Tujuan: Untuk deteksi produksi enzim koagulase, penting untuk kriteria patogenesis staphylococci.

Medium : Tidak ada

Reagen: Plasma sitrat atau oxalat dari kelinci atau domba atau manusia

Prinsip: *Staphylococcus aureus* menghasilkan 2 macam enzim koagulase yang terikat dan bebas. Bila kuman tersebut dicampur dengan plasma, terjadi interaksi antara koagulase yang terikat dan plasma, yang merubah fibrinogen menjadi fibrin ini menyebabkan kuman tersebut menggumpal, menyerupai aglutinasi.

Uji :

1. Uji koagulase slide

Sebuah slide dibagi menjadi 2 bagian, ditandai dengan pensil khusus. Teteskan setetes air mata pada masing-masing bagian. Dengan usa ambil kultur kuman dari biakan padat, buat suspensi pekat di bagian slide pertama. Pada kedua bagian sitrat atau oxalat, dan campur.

2. Uji koagulase tabung

Dalam tabung percobaan steril dimasukkan : 1 ml kultur dalam kaldu alkalis ditambah 1 ml enceran 1/5 plasma oxalat steril. Inkubasikan pada suhu 37° C selama 4 jam, periksa tiap ½ jam hingga 4 jam, dan setelah 24 jam tabung kontrol berisi plasma dan kaldu alkalis dengan volume sama diinkubasikan bersama-sama.

Hasil Uji : Positif : plasma menggumpal

Negatif : plasma tidak menggumpal

Kontrol : plasma tidak menggumpal

10). Uji Decarboxylase

Tujuan : Untuk deteksi kemampuan suatu kuman untuk melepas gugus carboxyl dari macam asam amino.

Medium : pepton-kaldu glukosa + indikator pH + 0,5% asam amino

Reagen: Tidak diperlukan

Indikator pH : Bromcresol purple dalam medium

Asam – kuning

Lindi – merah ungu

Uji : Medium diinokulasi dengan 2 tetes kultur kaldu umur 24 jam, dan inkubasi pada suhu 37° C selama 1 – 4 hari

Hasil Uji : Positif : medium berwarna merah ungu

Negatif : medium berwarna kuning, dari fermentasi glukose

11). Uji CAMP

Tujuan : Untuk dugaan *Streptococcus agalactiae*

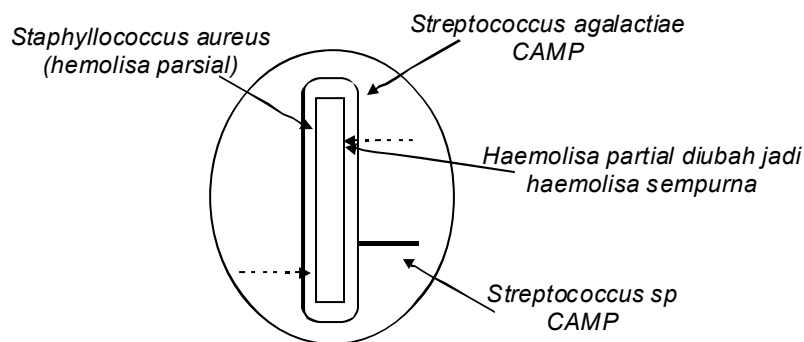
Medium : Agar darah

Reagen: tidak diperlukan

Uji : Pelat agar diinokulasi dengan galur *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan hamolisis tidak sempurna, dengan satu goresan lurus melintang di tengah medium. Pada sudut kanan atas goreskan kultur yang diduga *S. agalactiae*, jangan sampai menyentuh goresan pertama. Inkubasi selama 24 jam.

Hasil Uji : Periksaan pada ujung goresan kedua yang hampir menyentuh goresan pertama, adanya haemolisis sempurna di bagian tersebut menimbulkan dugaan, bahwa kultur yang diperiksa tersebut adalah *S. agalactiae*. (Lihat Gambar)

Keterangan Gambar : Uji CAMP : haemolisa partial di sekeliling garis pertumbuhan *Staphylococcus aureus* diubah menjadi haemolisa sempurna oleh kultur Streptococcus. Efek "arrowhead" tersebut ditunjukkan pada gambar atas kanan, dan bawah kiri, dekat garis pertumbuhan *S. aureus*. Garis bawah kanan pertumbuhan spesies Streptococcus lain.



12). Uji HAA (Hippurate aesculin hydrolysis)

Tujuan : Untuk deteksi kemampuan suatu kuman untuk menghidrolisa acylamino acid hippuric acid dan glycoside, aesculin.

Medium : Hippurate-Arginine_Aesculin composite broth

Reagen: Larutan 10% FeCl_3

Uji : Medium diinokulasi dengan 2 tetes kultur kaldu alkalis umur 24 jam. Inkubasi selama 48 jam. Tambahkan larutan 10 FeCl_3 dengan volume yang sama pada kultur.

Hasil Uji :

Positif hippurate : endapan coklat (feri benzoate) tidak larut pada reagen berlebih

Negatif hippurate : endapan coklat (feri hippurate) larut pada reagen berlebih

Positif aesculin : medium jadi warna hijau gelap pada penambahan reagen

Negatif aesculin : warna tidak berubah

b. Contoh-contoh media untuk uji biokimia

1) KIA (*Kliger Iron Agar*)

Komposisi media :

Peptone 15.0 g, Lactose 10.0 g, Proteose Peptone 5.0 g, Sodium Chloride 5.0 g, Beef Extract 3.0 g, Yeast Extract 3.0 g, Dextrose 1.0 g, Sodium Thiosulfate 0.3 g, Ferrous Sulfate 0.2 g, Phenol Red 0.024 g, Agar 12.0 g.

Media ini (bentuknya miring) digunakan untuk mempelajari :

- reaksi bakteri terhadap gula (laktosa dan glukosa), yaitu apakah bakteri tersebut menghasilkan asam dan gas, atau menghasilkan asam tanpa gas, atau tidak memecah kedua gula tersebut.
 - Pada permukaan slant (kondisi aerob), maka fermentasi karbohidrat (laktosa) dengan konsentrasi tinggi akan menghasilkan asam lebih banyak dibandingkan dengan yang dioksidasi menjadi netral, sehingga warna slant menjadi kuning. Bila bakteri tidak memfermentasi laktosa, maka warna slant tetap merah.
 - Pada butt (kondisi anaerob), fermentasi glukosa meski konsentrasi rendah bisa menghasilkan cukup asam sehingga merubah pH menjadi asam dan warna butt menjadi kuning. Fermentasi laktosa pada butt juga merubah pH menjadi asam. Semua bakteri yang memfermentasi laktosa, pasti juga memfermentasi glukosa.
 - Jika bakteri membentuk gas dari fermentasi glukosa atau laktosa, maka pada butt akan terbentuk rongga atau pecah.
- kemampuan bakteri membentuk H₂S yang akan diikat menjadi Ferri Sulfida dan akan terlihat berwarna hitam pada butt.

Tabel II. Contoh hasil uji KIA

Bakteri	Inkubasi			Hasil
	waktu	suhu	suasana	
<i>Salmonella enterica</i>	18-24 jam	35°C	Aerobic	slant merah, butt kuning, butt hitam, H ₂ S positive (biasanya), gas positive
<i>Escherichia coli</i>	18-24 jam	35°C	Aerobic	slant kuning, butt kuning, H ₂ S negative, gas positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18-24 jam	35°C	Aerobic	slant merah, butt merah, H ₂ S negative, gas negative

<i>Proteus mirabilis</i>	18-24 jam	35°C	Aerobic	slant merah, butt kuning, H ₂ S positive, gas negative
<i>Shigella flexneri</i>	18-24 jam	35°C	Aerobic	slant merah, butt kuning, H ₂ S negative, gas negative

2). SSS (*Semi Solid Sucrose*) Agar

Media ini digunakan untuk mempelajari :

- motilitas (pergerakan bakteri)
- reaksi bakteri terhadap sukrosa
- bila sukrosa diganti dengan gula yang lain (yang diperlukan) maka dapat diketahui kelakuan bakteri terhadap gula tersebut.

3). LIA (*Lysine Iron Agar*)

Komposisi : L-Lysine 10.0 g, Ferric Ammonium Citrate 0.5 g, Gelatin Peptone 5.0 g, Sodium Thiosulfate 0.04 g, Yeast Extract 3.0 g, Brom Cresol Purple 0.02 g, Dextrose 1.0 g, Agar 13.5 g, Demineralized Water 1000.0 ml.

Media ini digunakan untuk mempelajari :

- kelakuan bakteri terhadap lysine, yaitu apakah bakteri dapat melakukan dekarboksilasi lisin atau tidak. Juga apakah bakteri dapat melakukan deaminasi lisin atau tidak.
- kemampuan bakteri membentuk H₂S.

Bila slant berwarna ungu dan butt kuning, berarti tidak terjadi dekarboksilasi lisin. Bila butt menjadi ungu pekat, berarti terjadi dekarboksilasi lisin. Bila slant berwarna merah, berarti terjadi deaminasi lisin. Bila warna slant tetap ungu, berarti tidak terjadi deaminasi lisin. Bila terbentuk endapan hitam, berarti bakteri dapat membentuk H₂S.

Tabel III. Contoh hasil uji

Bakteri	Waktu Inkubasi	Suhu Inkubasi	Slant	Butt	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	18-24 jam	33-37°C	ungu	ungu	-
<i>Proteus mirabilis</i>	18-24 jam	33-37°C	merah	kuning	-
<i>Salmonella enterica</i>	18-24 jam	33-37°C	ungu	ungu	+
<i>Shigella flexneri</i>	18-24 jam	33-37°C	ungu	kuning	-

4). MIO (*Motility Indol Ornithine Medium*)

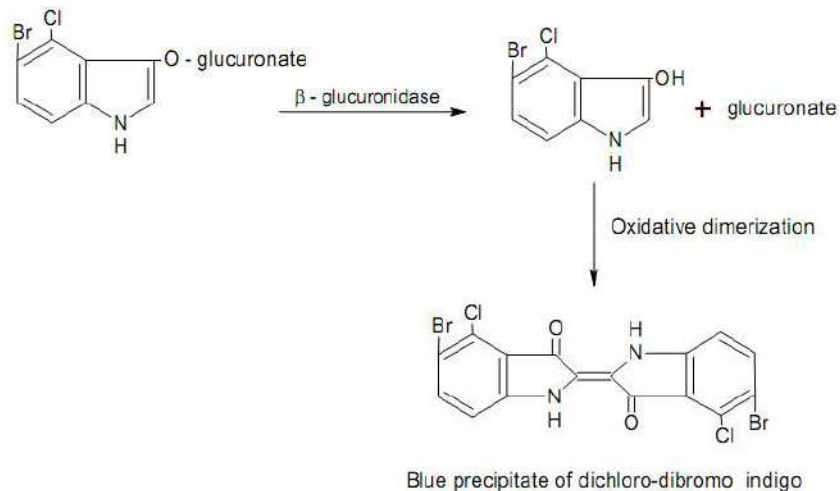
Media ini digunakan untuk mempelajari :

- pergerakan bakteri
- kemampuan bakteri menghasilkan Indol
- reaksi pemecahan ornithine

5). TBX (*tryptone bile X-glucoronide*) Agar

TBX agar adalah media kromogenik selektif untuk penghitungan koloni *E. coli* secara langsung dalam produk-produk yang ditujukan untuk manusia, hewan dan untuk konsumsi.

Prinsip media bergantung pada deteksi β -D-glukoronidase yang dimiliki *E. coli*. Medium TBX agar berisi kompleks, (kromogen yang terhubung ke gula) yang disebut 5-bromo, 4-chloro, 3-Indolyl- β -glukoronid (BCIG) yang spesifik untuk β -D-glukoronidase pada *E. coli*. Oleh karena itu TBX agar juga merupakan sebuah medium kromogenik yang bertujuan untuk membedakan antara bakteri koliform *E. coli* dan bakteri koliform lainnya. Komplek (BCIG) dihidrolisis oleh enzim β -D-glukoronidase yang dimiliki *E. coli* dan diabsorbsi oleh mikroorganisme target. Gula dikonsumsi oleh bakteri dan agen kromogen dan diakumulasi dalam sel yang sama, sehingga memberikan warna pada koloni *E. coli* yaitu berwarna biru atau biru kehijauan.



6). MSA (*Mannitol salt agar*)

Media ini mengandung senyawa karbohidrat berupa mannitol dan indikator fenol merah. Fenol merah adalah indikator pH untuk mendeteksi adanya asam yang terbentuk karena adanya fermentasi mannitol *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* lainnya tidak dapat memfermentasi mannitol, sehingga tidak merubah warna media. Adapun bila dapat memfermentasi mannitol, maka warna media menjadi kuning.

c. Alat dan Bahan

Alat

Ose lancip, lampu spiritus, botol spray, rak tabung, tabung reaksi, incubator.

Bahan:

Isolat bakteri : isolat bakteri yang belum diketahui (bisa *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* dll).

Media : KIA, LIA, MIO, SSS (untuk Gram negatif anggota kuman perut). MSA (untuk Gram positif untuk membedakan *S. aureus* dan *Staphylococcus non aureus*), TBX (*Tryptone Bile X-glucuronide*)

d. Cara Kerja

1. Identifikasi bakteri Gram negatif anggota enterobacteriaceae berdasarkan uji biokimia pada media KIA, LIA, MIO dan SSS

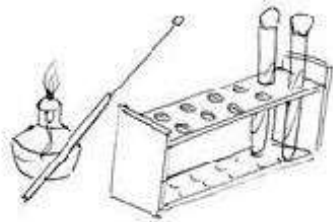
- a. Ambil ose lancip, pijarkan pada nyala api. Biar dingin dan posisi agak dekat api.
- b. Ambil bakteri dari tabung stok menggunakan ose lancip dengan cara tutup tabung dibuka, mulut tabung dilewatkan api. Goreskan ose pada bakteri. Lewatkan lagi mulut tabung dan tutup dengan kapas.
- c. Ose yang berisi bakteri ditusukkan pada deret media biokimia KIA, LIA, MIO, SSS. KIA dan LIA ditusukkan secara tegak lurus pada daerah butt dan goreskan zig-zag pada daerah slant. Sedangkan untuk MIO dan SSS hanya ditusukkan secara tegak lurus ke dalam media.
- d. Tiap membuka dan menutup tabung, mulut tabung harus dilewatkan api.
- e. Inkubasikan tabung pada suhu 37 C selama 24 jam.
- f. Amati hasil inkubasi media KIA, LIA, MIO, SSS.
- g. Tentukan nama bakteri yang diuji berdasarkan hasil uji biokimia dengan mambandingkan pada tabel enterobacteriaceae.

2. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* atau non aureus dengan media MSA

- a. Ambil ose lancip, pijarkan pada nyala api. Biar dingin dan posisi agak dekat api.
- b. Ambil bakteri dari tabung.stok bakteri Gram positif menggunakan ose lancip dengan cara tutup tabung dibuka, mulut tabung dilewatkan api. Goreskan ose pada bakteri. Lewatkan lagi mulut tb dan tutup dengan kapas.
- c. Ose yang berisi bakteri digoreskan pada media MSA.
- d. Tiap membuka dan menutup tabung, mulut tabung harus dilewatkan api.

- e. Inkubasikan tabung pada suhu 37 C selama 24 jam. Amati perubahan warna yang terjadi.
- f. Tentukan apakah bakteri *Staphylococcus* yang diuji adalah *S. aureus* atau non aureus.

MEMINDAHKAN BIAKAN SECARA ASEPTIS



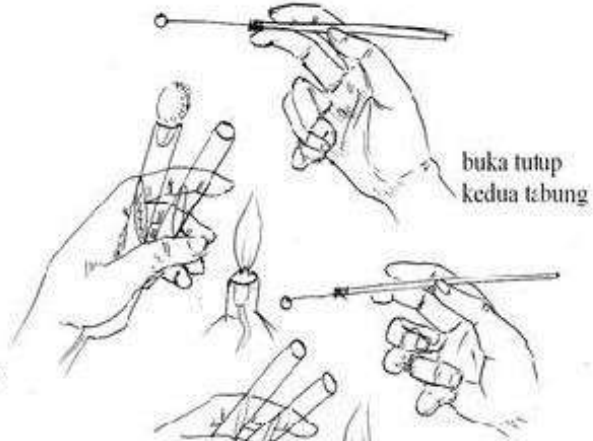
kerja selalu dekat dengan api

1



ujung sampai pangkal dibakar hingga memijar dan tunggu dingin

2



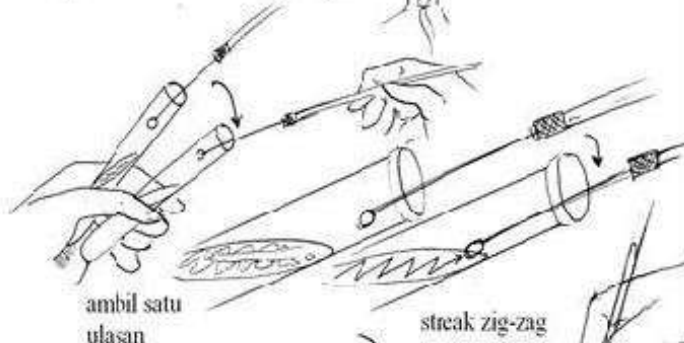
buka tutup kedua tabung

3



bakar mulut tabung supaya kontaminan mati

4



ambil satu ulasan

streak zig-zag

5



bakar lagi agar kontaminan dari proses transfer hilang

6



tutup kedua tabung

bakar jarum inokulum untuk membunuh bakteri sisa

TABLE 3. Biochemical characteristics of clinically significant genera of the family *Enterobacteriaceae*

Characteristic	Biochemical reaction of genus ^a :																
	<i>Cedecea</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Enterobacter</i> ^b	<i>Escherichia</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Morganella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Tatumella</i>	<i>Yersinia</i>
Primary test battery																	
Adonitol	-	V	-	V	V	-	-	+	-	-	-	V	-	V	-	-	-
Arginine	V	V	-	V	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-
Citrate	+	+	-	+	V	+	V	V	-	-	V	+	V	+	-	-	-
DNase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas	V	+	+	+	+	-	+	+	V	V	V	V	V	V	-	-	V
H ₂ S	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	V	+	V	-	V	-	V
Indole	-	V	+	-	+	-	-	V	V	+	V	+	V	V	V	-	V
Lysine	-	-	+	V	+	-	+	V	V	-	+	-	V	V	-	-	-
Motility	+	+	+	+	V	V	+	+	V	+	+	+	+	+	-	-	-
Ornithine	V	V	+	+	V	-	+	-	+	+	V	-	V	V	V	-	V
Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Sucrose	+	V	-	+	V	-	V	V	V	-	V	V	-	V	-	+	V
Urease	-	V	-	V	-	-	-	V	-	+	V	V	-	-	-	-	V
VP	V	-	-	+	-	+	V	V	-	-	V	-	-	+	-	-	-
Secondary test battery																	
Arabinose	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	V	V	V	-	V
Inositol	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	-	V
KCN	V	V	-	V	-	-	+	+	V	+	+	-	V	V	-	-	-
Lactose	V	V	-	V	V	V	+	+	V	+	+	-	V	V	-	-	V
Malonate	+	V	-	V	V	-	V	V	V	-	-	-	V	V	-	-	-
Mannitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	V	+	+	V	+	+
Melibiose	-	V	-	+	V	-	+	+	+	-	-	-	V	V	V	V	V
ONPG	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	V	-	V
Raffinose	-	V	-	+	V	-	+	+	+	-	-	-	V	V	V	V	V
Rhamnose	-	+	-	+	V	V	+	+	+	-	-	V	V	V	V	-	V
Salicin	+	V	-	V	V	+	V	+	+	-	V	V	-	V	-	V	V
Sorbitol	V	+	-	V	V	-	+	+	V	-	V	+	V	V	V	-	V
Trehalose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	V	V	V	V	+	V	+	+
Xylose	+	+	-	+	+	V	+	+	+	-	+	-	V	V	-	-	V

^a Symbols: -, ≈9% of strains positive; V, 10 to 89% of strains positive; +, ≥90% of strains positive. Only clinically significant species are included in the percentage values for each genus.

^b Not including *E. agglomerans*.

KEY IDENTIFICATION CHARACTERISTICS FOR THE MOST COMMON ENTEROBACTERIACEAE														
	KIA	GAS	H ₂ S	MR	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LYS	ARG	ORN	ONPG
Tribe I: Escherichieae														
Genus: <i>Escherichia</i>														
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-/+	+/-	+
Genus: <i>Shigella</i>														
Groups A, B, C	Alk/A	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	Alk/A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tribe II: Edwardsielleae														
Genus: <i>Edwardsiella</i>														
<i>E. tarda</i>	Alk/A	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Tribe III: Salmonelleae														
Genus: <i>Salmonella</i>														
	Alk/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-
Tribe IV: Citrobactereae														
Genus: <i>Citrobacter</i>														
<i>C. freundii</i>	A/A; Alk/A	+	+	+	-	-	+	-	+/-	+	-	+/-	-/+	+
<i>C. koseri</i>	Alk/A	+	-	+	-	+	+	-	+/-	+	-	+/-	+	+

4. PENETAPAN ANGKA LEMPENG TOTAL

a. Tujuan

- Mahasiswa dapat melakukan menetapkan angka lempeng total (ALT) dengan cara *Plate Count*

b. Teori

1. Penghitungan jumlah bakteri (enumerasi) hidup (tidak langsung)

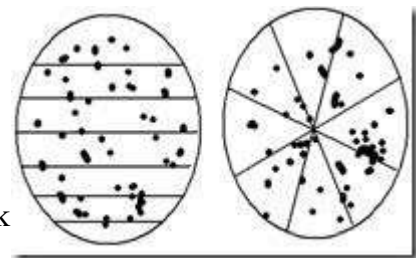
a. *Plate Count* (hitungan cawan)

Metode *Plate count* / *viable count* didasarkan pada asumsi bahwa setiap sel mikroorganisme hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan lingkungan yang sesuai. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan merupakan perkiraan atau dugaan dari jumlah mikroorganisme dalam suspensi tersebut. Beberapa istilah untuk menggambarkan konsentrasi total mikroorganisme dalam sampel adalah APC (*Aerobic Plate Count*), TPC (*Total Plate Count*), SPC (*Standard Plate Count*), TVC (*Total Viable Count*), TAC (*Total Aerobic Count*), atau ALT (Angka Lempeng Total)

Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung membentuk kelompok atau berantai. Berdasarkan hal tersebut digunakan istilah *Coloni Forming Units* (CFU) per ml. koloni yang tumbuh berasal dari suspensi yang diperoleh menggunakan pengenceran bertingkat dari sebuah sampel yang ingin diketahui jumlahnya.

1) Prosedur kerja metode *Plate Count*.

- Lakukan preparasi suspensi kepada sampel terlebih dahulu (swab, maserasi dan rinse) (jika perlu).
- Masukkan sampel ke tabung berisi 9 ml akuades untuk pengenceran pertama, selanjutnya diencerkan sampai tingkat pengenceran (misalnya sampai 10⁻⁸) tertentu.
- Dari 3 pengenceran terakhir diplating (ditanam) ke media NA (*Nutrient Agar*) atau PCA (*Plate Count Agar*) sebanyak dua kali tiap pengenceran (duplo). Plating dapat secara *Spread Plate* atau *Pour Plate*. Jika secara *Spread Plate*, dapat digunakan batang L atau glass beads.



- Inkubasi pada suhu 30° C selama 1-2 x 24 jam.
- Setelah tumbuh, koloni dihitung.

2) Penghitungan jumlah koloni

Penghitungan koloni pada cawan sebaiknya dibuat transek atau dibagi-bagi jika koloni yang tumbuh terlalu banyak. Transek dibuat dengan spidol/marker di bagian bawah cawan petri. Pola transek dapat dibuat bervariasi, tergantung kebutuhan. Penghitungan akan lebih mudah bila memakai *Colony Counter*.

Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung adalah sebagai berikut :

- Satu koloni dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni.
- Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni.
- Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah luas cawan) tidak dihitung.
- Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni.



3). Cara menghitung konsentrasi sel mikroorganisme (CFU per ml) :

CFU / ml = jumlah koloni X faktor pengenceran

Misal : penanaman dilakukan sebanyak 0,1 ml sampel dari tabung pengenceran 10^{-6} dengan metode *Spread Plate* dan *Pour Plate*.



Pada metode *Spread plate* (volume sampel 0,1 ml) :

Faktor pengenceran (Fp) = $1/10^{-6} = 10^6$

Misal, jumlah koloni = 50

Berarti konsentrasi sel = 50×10^6 CFU/0,1 ml
 $= 5 \times 10^8$ CFU /ml

Pada metode *Pour plate* (volume sampel 1 ml) :

Berarti konsentrasi sel = 50×10^6 CFU/1 ml
 $= 5 \times 10^7$ CFU /ml

4) Persyaratan dalam perhitungan konsentrasi sel mikroorganisme pada metode SPC

Koloni yang dipilih untuk dihitung menggunakan cara SPC memiliki syarat khusus berdasarkan statistic untuk memperkecil kesalahan dalam perhitungan. Perhitungan mengacu kepada standar atau peraturan yang telah ditentukan.

Syarat-syarat perhitungan pada SPC sebagai berikut :

- Pilih cawan yang ditumbuhi koloni dengan jumlah 30-300 koloni.
 $> 300 = \text{TNTC}$ (*Too Numerous To Count*) atau TBUD (Terlalu Banyak Untuk Dihitung).
 $< 30 = \text{TFTC}$ (*Too Few To Count*).

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
234	20	5	$2,3 \times 10^4$	28 dan 5 < 30
650	127	10	$1,3 \times 10^5$	650 > 300
TNTC	TNTC	195	2×10^6	TNTC > 300

- Jumlah koloni yang dilaporkan terdiri dari 2 digit yaitu angka satuan dan angka sepersepuluh yang dikalikan dengan kelipatan 10 (eksponensial), misal $2,3 \times 10^4$, bukan $2,34 \times 10^4$. pembulatan keatas dilakukan pada angka seperseratus yang sama atau lebih besar dari lima, misal $2,35 \times 10^4$ menjadi $2,4 \times 10^4$, atau $2,34 \times 10^4$ menjadi $2,3 \times 10^4$
- Bila jumlah koloni kurang dari 30 dari semua level pengenceran, maka SPC hanya dihitung berdasarkan jumlah koloni pada pengenceran terendah.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
15	1	0	$1,5 \times 10^3$	Semua < 30

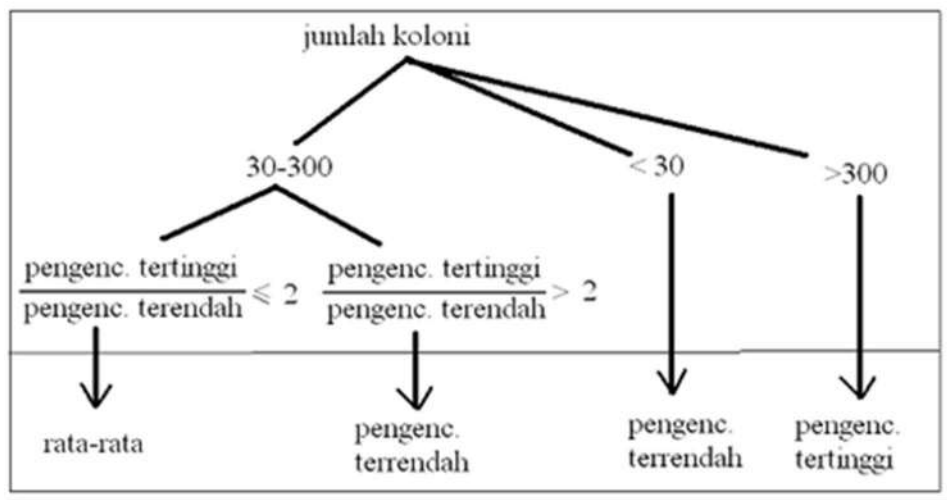
- Bila diperoleh perhitungan lebih dari 300 dari semua level pengenceran, maka SPC hanya dihitung berdasarkan jumlah koloni pada pengenceran tertinggi. Misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada $\frac{1}{4}$ bagian (transek) cawan kemudian hasilnya dikalikan empat. Hasil tersebut dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya faktor pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
TNTC	TNTC	358	$> 3,0 \times 10^6$ ($3,6 \times 10^6$)	Pngc. trtgg (10^{-4})
TNTC	325	18	$> 3,0 \times 10^5$ ($3,3 \times 10^5$)	Pngc. trtgg (10^{-3})

- Bila ada 2 cawan dengan level pengenceran yang berurutan memiliki jumlah koloni 30-300, maka perhitungan dilakukan berdasarkan hasil pembagian jumlah koloni pengenceran tertinggi dan terendah setelah masing-masing dikalikan faktor pengenceran. Bila hasil bagi ≤ 2 , maka SPC adalah nilai rata-ratanya. Jika hasil bagi > 2 maka SPC adalah hasil perhitungan dari pengenceran terendah.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
295	40	5	$3,5 \times 10^4$	$40.000/29.500 < 2$
140	35	1	$1,4 \times 10^4$	$35.000/14.000 > 2$

- Apabila setiap pengenceran digunakan dua cawan Petri (duplo), maka jumlah angka yang digunakan adalah data dari kedua cawan, tidak boleh diambil salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat diantara 30-300. Data yang dilaporkan adalah rata-rata dari kedua cawan duplo tersebut.



Skema perhitungan jumlah koloni sel metode SPC

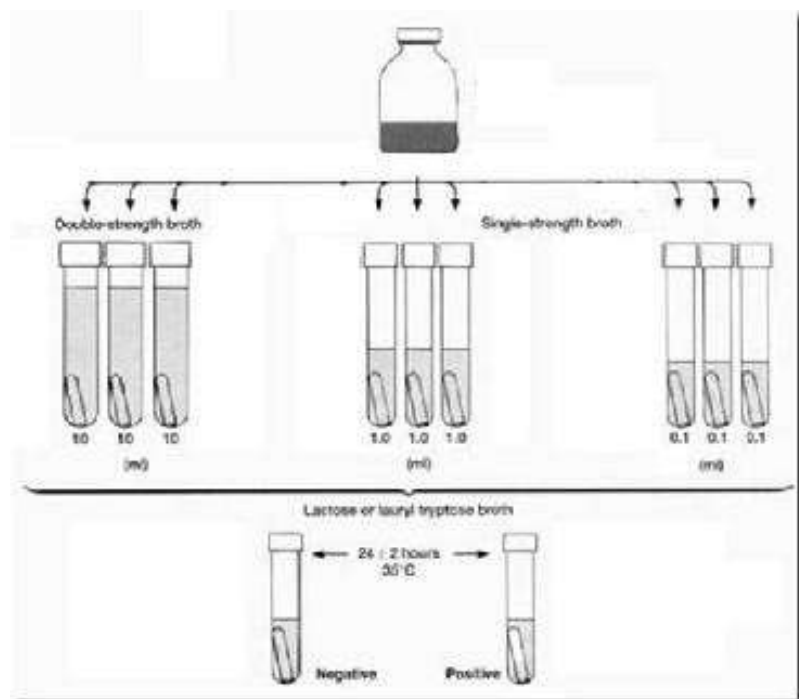
Contoh perhitungan SPC :

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
175 208	15 20	5 2	$(17.500+20.800)/2 = 1,9 \times 10^4$	15 dan 20 < 30
135 165	45 45	5 8	$= 1,5 \times 10^4$	$(135+165)/2=150$ $(45+45)/2=45$ maka $45.000/15.000=3, >2$ dilap. pengc. terendah
275 285	35 40	5 7	$(28.500+37.500)/2=65.500$ $6,6 \times 10^4$	$(275+285)/2=280$ $(35+40)/2=37,5$ maka $37500/28.000=1,34, ?2$ dilap. hasil rata-rata
290 305	25 28	5 0	$(29.000+30.000)/2 = 29.750$ 3×10^4	Rata-rata dari 10^{-2} meskipun 305 > 300

b. Most Probable Number (MPN)

Pendekatan lain untuk enumerasi bakteri hidup adalah dengan metode MPN. MPN didasarkan pada metode statistik (teori kemungkinan). Metode MPN ini umumnya digunakan untuk menghitung jumlah bakteri pada air khususnya untuk mendeteksi adanya bakteri

koliform yang merupakan kontaminan utama sumber air minum. Ciri-ciri utamanya yaitu bakteri gram negatif, batang pendek, tidak membentuk spora, memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas yang dideteksi dalam waktu 24 jam inkubasi pada 37° C. Sampel ditumbuhkan pada seri tabung sebanyak 3 atau 5 buah tabung untuk setiap kelompok. Apabila dipakai 3 tabung maka disebut seri 3, dan jika dipakai 5 tabung maka disebut 5 seri. Media pada tabung adalah *Lactose Broth* yang diberi indikator perubahan pH dan ditambah tabung durham. Pemberian sampel pada tiap seri tabung berbeda-beda. Untuk sampel sebanyak 10 ml ditumbuhkan pada media LBDS (*Lactose Broth Double Strength*) yang memiliki komposisi *Beef extract* (3 gr), *peptone* (5 gr), *lactose* (10 gr) dan *Bromthymol Blue* (0,2 %) per literinya. Untuk sampel 1 ml dan 0,1 ml dimasukkan pada media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*) yang berkomposisi sama tapi hanya kadar laktosa setengah dari LBDS yaitu 5 g. Berdasar sifat coliform, maka bakteri ini dapat memfermentasikan laktosa menjadi asam dan gas yang dideteksi oleh berubahnya warna dan gas dalam tabung durham. Nilai MPN ditentukan dengan kombinasi jumlah tabung positif (asam dan gas) tiap serinya setelah diinkubasi.



Prosedur kerja metode MPN:

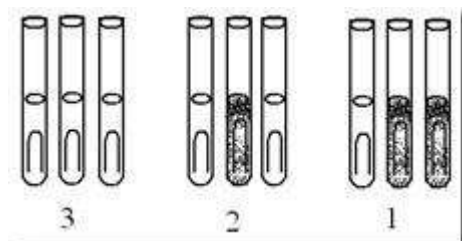
- Sediakan 3 tabung berisi LBDS (9 ml tiap tabung) dan 6 tabung berisi LBSS (9 ml tiap tabung) lengkap dengan tabung durham. Atur kesembilan tabung menjadi 3 seri (seperti di gambar).
- Kocok botol yang berisi air sampel.

- Pindahkan suspensi air sample sebanyak 10 ml ke masing-masing tabung seri pertama (3 tabung LBDS), secara aseptis.
- Pindahkan suspensi air sampel sebanyak 1 ml ke masing-masing tabung seri kedua (3 tabung LBSS), secara aseptis.
- Pindahkan suspensi air sampel sebanyak 1 ml ke masing-masing tabung seri ketiga (3 tabung LBSS), secara aseptis.
- Inkubasi semua tabung pada suhu 37° C selama 48 jam.
- Lihat tabung gas positif (asam dan gas ; harus ada keduanya), lalu hitung tabung positif untuk tiap seri. Tulis kombinasi tabung positif tiap seri (misal : 3 2 1). Kombinasi angka tersebut lalu dicocokkan dengan tabel MPN untuk seri 3 sehingga diperoleh jumlah mikroba sebenarnya.

nomor tabung yang positif			indeks MPN per 100 ml	95% batas kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		terendah	tertinggi
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	2	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	3	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Misal :

didapatkan kombinasi jumlah tabung positif : 321 maka jumlah bakteri *coliform* adalah 150 sel/100 ml.

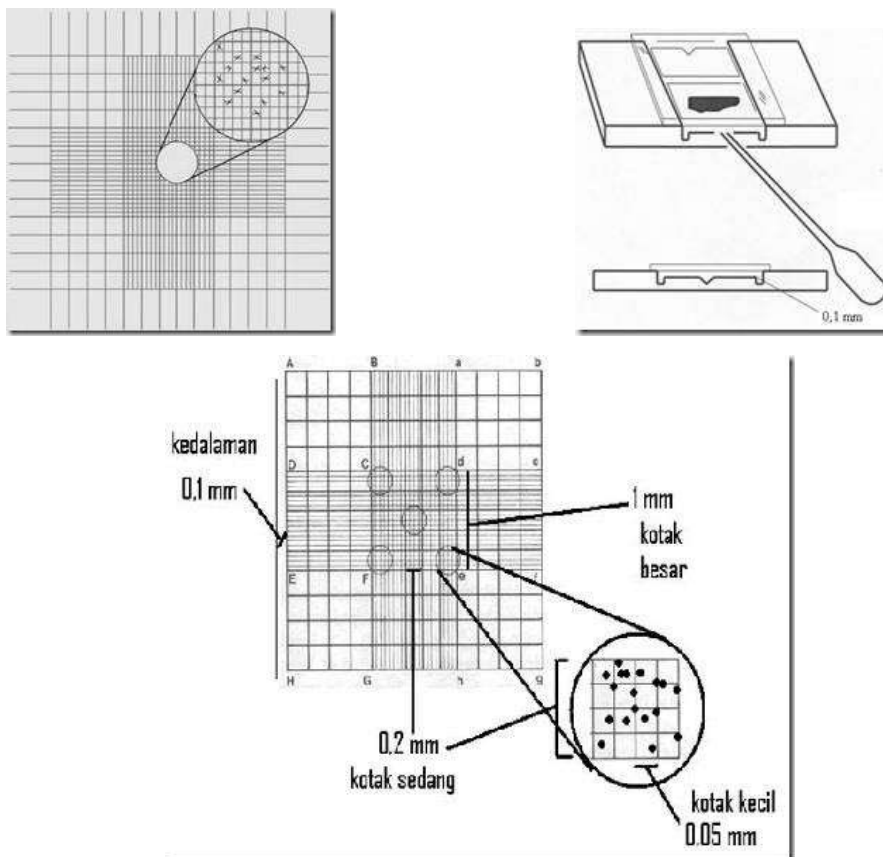


2. Penghitungan jumlah bakteri secara keseluruhan (langsung)

Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah

Petroff-Hauser Chamber atau *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu.

Ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel nakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.



$$\begin{aligned} \text{Volume kotak sedang} &= \text{panjang} \times \text{lebar} \times \text{tinggi} \\ &= 0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ ml} \end{aligned}$$

Misalnya diperoleh ada 20 sel dalam satu kotak sedang

$$\begin{aligned} \text{maka jumlah sel keseluruhan} &= \text{jumlah sel} / 4 \times 10^{-6} \text{ ml} \\ &= \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5 = 20 \times 2,5 \times 10^5 \\ &= 5 \times 10^6 \text{ sel/ml} \end{aligned}$$

Prosedur penghitungan sel

- Bersihkan Petroff-Hauser Counting Chamber atau Haemocytometer dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tissue.

- Letakkan cover glass di atas alat hitung.
- Tambahkan $\pm 50 \mu\text{l}$ suspensi sel yeast (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
- Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
- Letakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
- Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10.
- Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

c. Alat dan Bahan

1. Alat :

Spiritus, cawan petri, pipet ukur, tabung reaksi (iwaki pyrex), *beaker glass* (iwaki pyrex) rak tabung reaksi, mikropipet (biohit proline), *yellow tip* (gilson), *blue tip* (gilson), *spreader*, inkubator (heraus) dengan suhu 37°C , oven, autoklaf.

2. Bahan :

Sampel (dapat sampel cairan atau sampel padat yang akan dihitung jumlah mikrobanya), NaCl 0,9 % b/v sebagai pengencer. Media PCA (Plate Count Agar).

d. Cara Kerja

1. Diambil sampel cair dengan volume tertentu (0,5 ml). untuk sampel padat ditimbang 0,5 gram sampel.
2. Masukkan sampel ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 4,5 ml NaCl 0,9 % steril (pengenceran 1:10). Kocok homogen
3. Dilakukan pengenceran 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 dengan NaCl 0,9 % steril.
4. Diambil 100 μl tuangkan pada media PCA untuk masing-masing pengenceran. Kemudian diratakan dengan menggunakan spreader (metode cawan sebar).
5. Diinkubasi pada suhu 37 C selama 18-24 jam.
6. Dihitung jumlah koloni bakteri pada masing-masing petri pada berbagai pengenceran.
7. Hitunglah jumlah mikrba dalam sampel tersebut dengan metode SPC (CFU/ml untuk sampel cair dan CFU/g untuk sampel padat).

5. UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA METODE DILUSI CAIR

a. Tujuan

Mengetahui kemampuan suatu antibiotika dalam menghambat pertumbuhan mikroba secara dilusi cair dengan parameter KHM dan KBM.

b. Teori

Antimikroba adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan mikroba dengan cara mengganggu metabolisme yang merugikan. Mikroorganisme dapat menyebabkan bahaya karena kemampuan menginfeksi dan menimbulkan penyakit serta merusak bahan pangan. Antifungi termasuk dalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan fungi.

Antifungi hanya dapat digunakan jika mempunyai sifat toksisitas selektif, artinya dapat membunuh fungi yang menyebabkan penyakit tetapi tidak beracun bagi penderitanya. Mekanisme kerja dari senyawa antifungi diantaranya yaitu menghambat sintesis ergosterol, berikatan langsung dengan ergosterol yang terdapat dalam membran sitoplasma, menghambat sintesis khitin, mengganggu sintesis asam nukleat dan protein.

Langkah pertama kerja obat berupa pengikatan obat pada reseptor sel (beberapa) diantaranya adalah enzim transpeptida. Kemudian dilanjutkan dengan reaksi transpeptidase dan sintesis peptidoglikan terhambat. Mekanisme diakhiri dengan pembuangan atau penghentian aktivitas penghambat enzim autolisis pada dinding sel. Pada lingkungan yang isotonis lisis terjadi pada lingkungan yang jelas hipertonik, mikroba berubah menjadi protoplas atau sferoflas yang hanya tertutup oleh selaput sel yang rapuh.

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput sitoplasma yang bekerja sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif, melakukan fungsi pengangkutan aktif sehingga dapat mengendalikan susunan sel. Bila integritas fungsi selaput sitoplasma terganggu misalnya oleh zat bersifat surfaktan sehingga permeabilitas dinding sel berubah atau bahkan menjadi rusak, maka komponen penting, seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain keluar dari sel dan sel berangsur-angsur mati.

Aktivitas senyawa antifungi dipengaruhi oleh pH, suhu stabilitas senyawa tersebut, jumlah fungi yang ada, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolisme fungi. Berdasarkan aktivitasnya zat antifungi dibedakan menjadi dua jenis, yaitu fungistatik dan fungisida. Fungistatik adalah zat antifungi yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan fungi (menghambat perbanyakan populasi bakteri), namun tidak mematikan. fungisida adalah zat

antifungi yang memiliki aktifitas membunuh fungi. Namun ada beberapa zat antifungi yang bersifat fungistatik pada konsentrasi rendah dan bersifat fungisida pada konsentrasi tinggi.

Metode dilusi dibedakan menjadi dua, yaitu dilusi cair (broth dilution) dan dilusi padat (solid dilution).

a. Metode dilusi cair, digunakan untuk mengukur MIC atau kadar hambat minimum dan MBC atau kadar bunuh minimum. Cara yang dilakukan adalah dengan memberi seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya ditanam/digoreskan pada media padat dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media padat yang tidak ditumbuhi fungi setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

b. Metode dilusi padat, metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah suatu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

Konsentrasi suspensi mikroba yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba biasanya dibuat terstandar dibandingkan kekeruhannya dengan standar 0,5 Mc Farland yang setara dengan 10^8 CFU/ml, seperti yang ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 8. Standar Mc Farland 0,5; 1,0; 2,0; 3,0

c. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat gelas, lampu spiritus, yellow tip, blue tip, ose, *spreader*, mikropipet, tabung reaksi, inkubator, otoklaf, oven, neraca, kompor listrik, blender, corong, pipet volume, botol semprot.

2. Bahan

NaCl 0,9%, akuades, media cair, media padat, antibiotika, destilata dan etanol.

Mikroba	Antibiotik	Media cair (I)	Media cair (II) untuk membuat suspensi 10 ⁶ CFU/ml	Media padat
<i>S. aureus</i>	Vancomisin, amoksisilin	BHI	BHI DS	Agar darah
<i>E. coli</i>	Kloramfenikol	BHI	BHI DS	Mc. Conkey
<i>C. albican</i>	Flukonazol, amfoterisin B	CYG	CYG DS	SDA

Cara Kerja

1. Sterilisasi alat dan bahan

Semua alat dan bahan yang digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu 160°-180°C selama 2 jam dan bahan yang akan digunakan disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 10-20 menit.

2. Pembuatan suspensi mikroba

Ambil 1 mata ose biakan mikroba dari media agar miring ke media cair. Kemudian inkubasi selama 24 jam 37 °C. Diambil 100 µl kultur cair yang telah diinkubasi selama 24 jam dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml media cair I, kemudian diinkubasi selama 4-6 jam 37 °C. Setelah diinkubasi selama 3-5 jam kemudian diambil 100 µl dimasukkan ke dalam tabung dan diencerkan dengan NaCl 0,9 % sampai kekeruhannya sama dengan standard 0,5 Mc. Farland 10⁸ CFU/ml. Kemudian diencerkan 100 kali dengan media cair II sehingga konsentrasi suspensi mikroba menjadi 10⁶ CFU/ml. Pembuatan suspensi mikroba dapat dilihat Gambar 8.

4. Penyiapan larutan sampel

- a). Isi tabung no 2,3 dan 4 dengan 1 ml aquades
- b). Masukkan 2 ml larutan sampel 2% dalam tabung no 1
- c). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 1 ke dalam tabung no 2, homogenkan
- d). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 2 ke dalam tabung no 3, homogenkan
- e). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 3 ke dalam tabung no 4, homogenkan
- f). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 4 ke dalam tabung kontrol sampel.

5. Pembuatan Larutan Kontrol

Dibuat 3 macam larutan kontrol dalam tabung reaksi.

K1 Kontrol suspensi : 2 ml suspensi mikroba

- K2 Kontrol pelarut : 1 ml media cair DS + 1 ml aquades
 K3 Kontrol sampel : 1 ml larutan obat + 1 ml media II
 K4 Kontrol media : 2 ml media cair DS

6. Uji aktivitas antimikroba larutan uji (antibiotika).

- Tabung reaksi yang mengandung 1 ml arutan sampel dengan konsentrasi 2%, 1%, 0,5%, 0,25% b/v
- Ditambah 1 ml suspensi mikroba dan dikocok homogen, tabung-tabung tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Dilakukan pengamatan adanya pertumbuhan mikroba pada masing-masing tabung. Untuk mengetahui KHM ditandai dengan tidak adanya mikroba (larutan tampak jernih) seperti yang terlihat pada Gambar 10 dan 11.
- Untuk mengetahui KBM, dilakukan penggoresan dari masing-masing cairan dalam tabung tersebut pada media padat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Setelah dilakukan penginkubasian, hasil goresan diamati apakah terjadi pertumbuhan koloni pada media padat tersebut.

Dibiakkan mikroba pada media padat



Gambar 9. Skema Pembuatan Suspensi Mikroba

6. UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA METODE DIFUSI AGAR (KIRBY BAUER DAN SUMURAN)

a. Tujuan

1. Mengetahui kemampuan suatu antibiotika dalam menghambat pertumbuhan mikroba dengan parameter diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
2. Mengetahui kemampuan suatu antibiotika dalam menghambat pertumbuhan mikroba dengan parameter diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran.

b. Teori

Pemeriksaan sensitivitas mikroba terhadap antibiotika dapat dilakukan dengan beberapa cara :

a. Metode difusi

Metode difusi merupakan suatu metode yang menggunakan cakram kertas saring, cawan berliang (sumuran) atau suatu silindris yang tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada media padat yang telah ditanami bakteri yang diperiksa. Pada metode sumuran atau silinder, cairan yang diuji dimasukkan ke dalam sumuran/silinder (Anonim, 1993). Setelah diinkubasi maka garis tengah daerah hambatan yang jernih di sekeliling obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap bakteri yang diperiksa.

Media yang dipakai adalah Mueller Hinton Agar (MHA) untuk bakteri dan media SDA untuk fungi. Pada metode ini ada beberapa cara:

1). Cara Kirby Bauer

Satu koloni mikroba dari pertumbuhan 24 jam pada agar, diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml media cair, diinkubasi 4-8 jam pada suhu 37°C. Diambil 0,1 ml suspensi tersebut diambil dan ditambah larutan NaCl fisiologis (0,9%b/v) steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standard 0,5 Mc. Farland. Kemudian suspensi diencerkan lagi hingga konsentrasi bakteri 10^6 CFU per ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga merata. Kemudian diletakkan kertas samir (disk) yang mengandung antibiotika di atasnya, terakhir diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Kemudian dilihat hasilnya :

a). Zona radikal adalah suatu daerah disekitar disk yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.

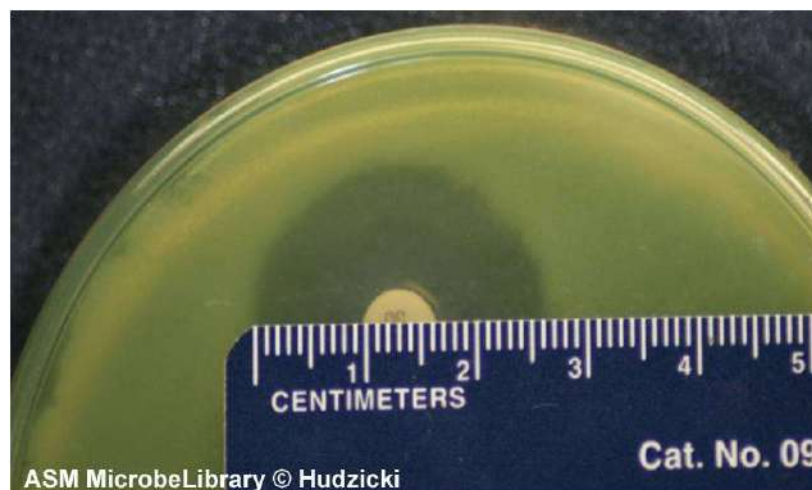
b). Zona Irradikal adalah daerah di sekitar disk yang pertumbuhan bakterinya dihambat oleh antibiotika tersebut tetapi tidak dimatikan.

2). Cara Sumuran

Satu koloni mikroba dari pertumbuhan 24 jam pada agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml media cair, diinkubasikan 4-8 jam pada suhu 37°C. Diambil 0,1 ml suspensi di atas kemudian ditambah NaCl 0,9% steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar 0,5 Mc. Farland dan diencerkan lagi hingga konsentrasi mikroba 10^6 CFU per ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi mikroba lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga merata. Media agar dibuat sumuran dengan antibiotika, diinkubasi, dan dibaca hasilnya seperti cara Kirby Bauer.

3). Cara pour Plate

Satu koloni mikroba dari pertumbuhan 24 jam pada agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml media cair, diinkubasikan 4-8 jam pada suhu 37°C. Diambil 0,1 ml suspensi di atas ditambah larutan NaCl 0,9% steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar 0,5 Mc. Farland, dan diencerkan lagi hingga standar konsentrasi mikroba 10^6 CFU per ml. Suspensi mikroba dengan konsentersasi 10^6 CFU/ml diambil 1 ml dan dimasukkan kedalam 4 ml agar base 5% yang mempunyai temperatur 50°C, setelah larutan mikroba tersebut homogen, dituang ke cawan Petri, ditunggu sebentar agar membeku, kemudian disk diletakkan di atas media tersebut, selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, dibaca hasilnya seperti cara Kirby Bauer (Anonim, 1993).



Gambar 12. Cara mengukur diameter zona hambat

Tabel V. Antibiogram antibiotik terhadap *Staphylococcus*

***Staphylococcus* species
(Zone Diameter, nearest whole mm)**

	Resistant	Intermediate	Susceptible
Cefazolin (30 µg)	≤14	15-17	≥18
Clindamycin (2 µg)	≤14	15-20	≥21
Erythromycin (15 µg)	≤13	14-22	≥23
Gentamicin (10 µg)	≤12	13-14	≥15
Oxacillin (1 µg)	≤10	11-12	≥13
Penicillin G (10 µg)	≤28	--	≥29
Tobramycin (10 µg)	≤12	13-14	≥15
Vancomycin (30 µg)	--	--	≥15

Tabel V. Antibiogram antibiotik terhadap *Escherichia coli*

***E. coli* and other enteric Gram Negative Rods
(Zone Diameter, nearest whole mm)**

	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (30 µg)	≤14	15-16	≥17
Ampicillin(10 µg)	≤13	14-16	≥17
Cefazolin (30 µg)	≤14	15-17	≥18
Gentamicin (10 µg)	≤12	13-14	≥15
Tetracycline (30 µg)	≤14	15-18	≥19
Ticarcillin (75 µg)	≤14	15-19	≥20
Trimethoprim (5 µg)	≤10	11-15	≥16
Tobramycin (10 µg)	≤12	13-14	≥15

c. Alat dan Bahan

1. Alat

Cawan petri, mikropipet, yellow tip, blue tip, kertas cakram kosong (blank disk), tabung reaksi, erlenmeyer, labu takar 5 ml, pengaduk, timbangan analitik, inkubator, otoklaf, jangka sorong atau penggaris, botol semprot, kapas, jarum Ose, pinset, pelubng gabus

2. Bahan

Antibiotika, akuades, etanol teknis 70%v/v, NaCl 0,9%b/v, media cair, media padat, stock mikroba.

Mikroba	Antibiotik	Media cair (I)	Cairan pengencer untuk membuat suspensi 10^6 CFU/ml	Media padat
<i>S. aureus</i>	Vancomisin, amoksisilin	BHI	NaCl 0,9%b/v	MHA
<i>E. coli</i>	Kloramfenikol	BHI	NaCl 0,9%b/v	MHA
<i>C. albicans</i>	Flukonazol, amfoterisin B, ketokonazol.	CYG	NaCl 0,9%b/v	SDA

d. Cara Kerja

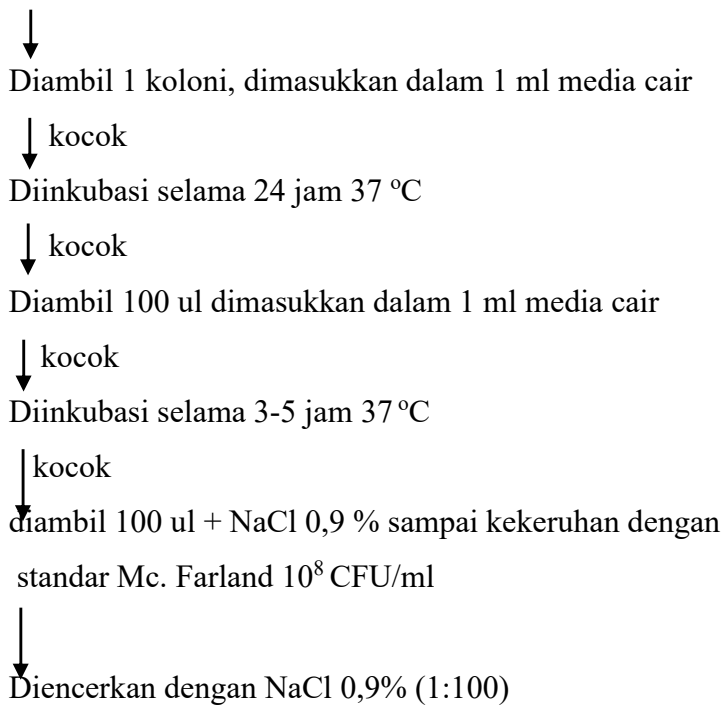
1. Sterilisasi alat dan bahan

Semua alat dan bahan yang digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu 160°-180°C selama 2 jam dan bahan yang akan digunakan disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 10-20 menit.

2. Pembuatan suspensi mikroba

Ambil 1 mata ose biakan mikroba dari media agar miring ke media cair. Kemudian inkubasi selama 24 jam 37 °C. Diambil 100 µl kultur cair yang telah diinkubasi selama 24 jam dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml media cair I, kemudian diinkubasi selama 4-6 jam 37 °C. Setelah diinkubasi selama 3-5 jam kemudian diambil 100 µl dimasukkan ke dalam tabung dan diencerkan dengan NaCl 0,9 % sampai kekeruhannya sama dengan standard 0,5 Mc. Farland 10^8 CFU/ml. Kemudian diencerkan 100 kali dengan media cair II sehingga konsentrasi suspensi mikroba menjadi 10^6 CFU/ml.

Dibiakkan mikroba pada media padat



Gambar 13. Skema Pembuatan Suspensi Mikroba

3. Pembuatan larutan sampel

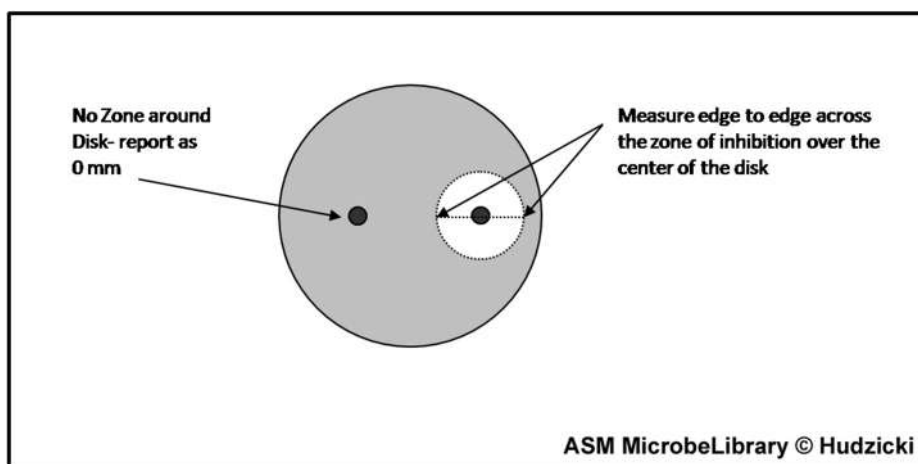
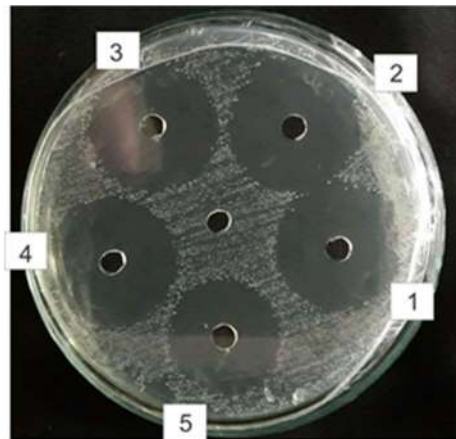
- a). Isi tabung no 2,3 dan 4 dengan 1 ml aquades
- b). Masukkan 2 ml larutan sampel 2% dalam tabung no 1
- c). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 1 ke dalam tabung no 2, homogenkan
- d). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 2 ke dalam tabung no 3, homogenkan
- e). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 3 ke dalam tabung no 4, homogenkan
- f). Pindahkan 1 ml larutan sampel dari tabung no 4 ke dalam tabung kontrol sampel.

4. Uji aktivitas antimikroba metode Kirby Bauer

Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi mikroba 10^6 CFU/ml lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga merata. Kemudian letakkan masing-masing kertas cakram yang telah diberi larutan uji sebanyak 20 μ L. Setelah semua kertas cakram diletakkan di atas media yang sudah ditanami mikroba, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Amati dan ukur diameter zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram.

6. Uji aktivitas antimikroba metode sumuran

Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi mikroba 10^6 CFU/ml lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga merata. Tunggu hingga suspensi meresap, kemudian buat lubang dengan pelubang gabus sebanyak 6 lubang. Tiap lubang diisi dengan 20 μ L larutan uji. Setelah semua sumuran terisi kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Amati dan ukur diameter zona hambat yang terbentuk.



Gambar 14. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode agar sumuran

DAFTAR PUSTAKA

- Abramowitz, M. (2003). *Microscope Basics and Beyond* (Vol. 1). Olympus America inc.
- Bell, S. M., Pham, J. N., Rafferty, D. L., & Allerton, J. K. (2016). Antibiotic Susceptibility Testing by The CDS Method A Manual for Medical and Veterinary Laboratories.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., & Hu, D. (2003). Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis, *41*(2), 767–771. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.2.767>
- Islam, M. M., Islam, M. N., & Fakhruzzaman, M. (2014). Isolation and identification of *Escherichia coli* and *Salmonella* from poultry litter and feed, *1*, 1–7.
- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., ... Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test, 1–7.
- Saha, A., & Santra, S. C. (2014). Isolation and Characterization of Bacteria Isolated from Municipal Solid Waste for Production of Industrial Enzymes and Waste Degradation, *1*(1), 1–8. <http://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00003>
- Stiles, M. E., & Ng, L.-K. (1981). Biochemical Characteristics and Identification of Enterobacteriaceae Isolated from Meats, *41*(3), 639–645.
- Tóth, E. M., Borsodi, A. K., Felföldi, T., Vajna, B., Sipos, R., & Márialigeti, K. (2013). *Practical Microbiology*. (E. M. Tóth & K. Márialigeti, Eds.).