



PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA

MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

TIM DOSEN PENGAMPU:
apt. Elly Wardani, M.Farm.
apt. Ani Pahriyani, M.Sc.
Imam Hardimam, M.Sc.
Tahyatul Bariroh, M.Biomed.
Maharadingga, M.Si.
Rindita, M.Si.
Dra. Hayati, M.Farm.

2023



PENGESAHAN

MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan petunjuk-Nya sehingga Modul Praktikum Mikrobiologi Farmasi dapat diselesaikan. Modul praktikum ini disusun guna memberikan petunjuk dan pegangan bagi mahasiswa program Studi Ilmu Farmasi yang akan melaksanakan Praktikum Mikrobiologi Farmasi.

Penyusun menyadari bahwa buku modul ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Untuk itu penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran guna perbaikan Modul Praktikum Mikrobiologi Farmasi, dan nantinya untuk dapat lebih menyempurnakan.

Semoga Modul Praktikum Mikrobiologi Farmasi ini dapat bermanfaat adanya.

Jakarta, Maret 2023

Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	III
DAFTAR ISI	IV
TATA TERTIB PRAKTIKUM	VIII
DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM	IX
PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM	X
PRAKTIKUM 1: PENGENALAN & STERILISASI PERALATAN UMUM LABORATORIUM MIKROBIOLOGI	1
1. KOMPETENSI DASAR	1
2. INDIKATOR CAPAIAN	1
3. TUJUAN PRAKTIKUM	1
4. URAIAN TEORI	1
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	16
6. EVALUASI	16
7. SOAL LATIHAN	17
8. DAFTAR PUSTAKA	18
PRAKTIKUM 2: MEDIUM PERTUMBUHAN MIKROORGANISME	19
1. KOMPETENSI DASAR	19
2. INDIKATOR CAPAIAN	19
3. TUJUAN PRAKTIKUM	19
4. URAIAN TEORI	19
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	22
6. EVALUASI	24
7. SOAL LATIHAN	25
8. DAFTAR PUSTAKA	25
PRAKTIKUM 3: ISOLASI MIKROORGANISME	26
1. KOMPETENSI DASAR	26
2. INDIKATOR CAPAIAN	26
3. TUJUAN PRAKTIKUM	26
4. URAIAN TEORI	26
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	32
6. EVALUASI	35
7. SOAL LATIHAN	36
8. DAFTAR PUSTAKA	36
PRAKTIKUM 4: PERHITUNGAN ANGKA KUMAN	37
1. KOMPETENSI DASAR	37

2. INDIKATOR CAPAIAN	37
3. TUJUAN PRAKTIKUM	37
4. URAIAN TEORI	37
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	42
6. EVALUASI	43
7. SOAL LATIHAN	43
8. DAFTAR PUSTAKA	45
PRAKTIKUM 5: PEWARNAAN BAKTERI	46
1. KOMPETENSI DASAR	46
2. INDIKATOR CAPAIAN	46
3. TUJUAN PRAKTIKUM	46
4. URAIAN TEORI	46
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	47
6. EVALUASI	50
7. SOAL LATIHAN	50
8. DAFTAR PUSTAKA	51
PRAKTIKUM 6: MORFOLOGI KAPANG DAN KHAMIR	52
1. KOMPETENSI DASAR	52
2. INDIKATOR CAPAIAN	52
3. TUJUAN PRAKTIKUM	52
4. URAIAN TEORI	52
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	54
6. EVALUASI	55
7. SOAL LATIHAN	56
8. DAFTAR PUSTAKA	56
PRAKTIKUM 7: PENENTUAN KADAR HAMBAT MINIMAL ANTIBIOTIKA	57
1. KOMPETENSI DASAR	57
2. INDIKATOR CAPAIAN	57
3. TUJUAN PRAKTIKUM	57
4. URAIAN TEORI	57
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	59
6. EVALUASI	61
7. SOAL LATIHAN	61
8. DAFTAR PUSTAKA	61
PRAKTIKUM 8: PENENTUAN UJI RESISTENSI ANTIMIKROBA	63
1. KOMPETENSI DASAR	63
2. INDIKATOR CAPAIAN	63
3. TUJUAN PRAKTIKUM	63
4. URAIAN TEORI	63
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	64
6. EVALUASI	66
7. SOAL LATIHAN	66

8. DAFTAR PUSTAKA	66
PRAKTIKUM 9: UJI KOEFISIEN FENOL	67
1. KOMPETENSI DASAR	67
2. INDIKATOR CAPAIAN	67
3. TUJUAN PRAKTIKUM	67
4. URAIAN TEORI	67
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	68
6. EVALUASI	69
7. SOAL LATIHAN	70
8. DAFTAR PUSTAKA	71
PRAKTIKUM 10: UJI CEMARAN KOLIFORM DALAM SEDIAAN CAIR	72
1. KOMPETENSI DASAR	72
2. INDIKATOR CAPAIAN	72
3. TUJUAN PRAKTIKUM	72
4. URAIAN TEORI	72
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	74
6. EVALUASI	76
7. SOAL LATIHAN	76
8. DAFTAR PUSTAKA	77
PRAKTIKUM 11: UJI SALMONELLA	78
1. KOMPETENSI DASAR	78
2. INDIKATOR CAPAIAN	78
3. TUJUAN PRAKTIKUM	78
4. URAIAN TEORI	78
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	79
6. EVALUASI	80
7. SOAL LATIHAN	80
8. DAFTAR PUSTAKA	81
PRAKTIKUM 12: UJI STERILITAS SEDIAAN FARMASI	82
1. KOMPETENSI DASAR	82
2. INDIKATOR CAPAIAN	82
3. TUJUAN PRAKTIKUM	82
4. URAIAN TEORI	82
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	83
6. EVALUASI	84
7. SOAL LATIHAN	85
8. DAFTAR PUSTAKA	85
PRAKTIKUM 13: MENGENAL FERMENTASI	86
1. KOMPETENSI DASAR	86
2. INDIKATOR CAPAIAN	86
3. TUJUAN PRAKTIKUM	86

4. URAIAN TEORI	86
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	89
6. EVALUASI	91
7. SOAL LATIHAN	92
8. DAFTAR PUSTAKA	92

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Pada saat masuk laboratorium tidak boleh membawa barang-barang yang tidak diperlukan dan melepaskan alas kaki. Barang yang tidak diperlukan disimpan pada tempat yang telah disediakan.
2. Gunakan jas lab selama bekerja. Cuci tangan dengan menggunakan sabun sebelum dan sesudah praktikum.
3. Bersihkan meja praktikum dengan menggunakan alcohol sebelum memulai pekerjaan.
4. Dilarang merokok, makan dan minum serta jauhkan tangan anda dari mulut, hidung dan telinga selama bekerja di laboratorium.
5. Perlakukan semua mikroba yang digunakan bersifat pathogen.
6. Dilarang membawa biakan ke luar laboratorium.
7. Dilarang mencampur mikroba yang satu dengan mikroba lainnya. Bila biakan tumpah dan tercecer segera bersihkan dengan menggunakan alcohol 70 %, bersihkan dengan kertas tisu, kemudian buang di tempat yang telah tersedia.
8. Biakan yang telah digunakan, segera dimatikan dengan menggunakan autoklaf. Kemudian tempat biakan dicuci/dibersihkan berdasarkan protap pencucian alat gelas. Dilarang membuang biakan di sembarang tempat.
9. Alat, pipet, biakan yang sudah digunakan dan masih diperlukan lagi, jangan diletakan langsung di atas meja, letakkan di atas penyangga/baki/tempat yang sudah disediakan.
10. Peralatan yang tidak digunakan lagi harus ditempatkan secara khusus (cawan Petri, labu dalam keranjang, tabung reaksi dan lain-lain) dimasukkan ke dalam keranjang.
11. Semua alat gelas harus disterilkan pada setiap akhir minggu, disimpan dalam lemari alat untuk digunakan pada pertemuan berikutnya.
12. Semua bahan yang akan digunakan harus steril.
13. Sebelum meninggalkan laboratorium, bersihkan meja kerja dan cuci tangan. Teliti kembali bahwa gas, kran air, listrik, lampu mikroskop telah dimatikan. Susun kembali alat-alat ke tempat penyimpanan semula.

Deskripsi Mata Kuliah Praktikum

Mata kuliah Praktikum Mikrobiologi Farmasi merupakan mata kuliah wajib bagi mahasiswa program studi sarjana farmasi dengan beban 1 SKS yang mempelajari tentang keterampilan dasar dan aplikasi pengujian secara mikrobiologi bahan-bahan sediaan farmasi dengan melakukan praktikum sterilisasi alat dan medium pertumbuhan mikroorganisme, mengisolasi mikroorganisme dari berbagai substrat baik dari bahan pangan, minuman, obat-obatan dan obat tradisional, dasar-dasar melakukan teknik pewarnaan bakteri, identifikasi kapang, uji kualitas air dengan metode MPN, uji IMVIC, analisa mikroba patogen terutama *Salmonella sp.* Uji sterilitas sediaan farmasi dan pengujian kualitas desinfektan dibandingkan dengan fenol serta memberikan keterampilan di bidang mikrobiologi industri diantaranya pembuatan susu fermentasi dengan menggunakan bakteri penghasil asam laktat. Hasil dari proses pembelajaran diharapkan mahasiswa mampu menjelaskan tentang jenis-jenis mikroorganisme dan beberapa pengujian pada sampel makanan, minuman maupun sediaan farmasi. Metode pembelajaran yang digunakan yaitu praktikum, Tanya jawab, diskusi, dan kajian literatur.

PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM

Hal-hal yang harus diperhatikan :

1. Modul praktikum wajib dibawa pada saat memasuki laboratorium
2. Sebelum mulai praktikum saudara diwajibkan membaca dan memahami prosedur yang akan dilakukan setiap materi praktikum
3. Saudara wajib mengerti dan memahami alasan atau tujuan dari setiap kegiatan serta mempelajari hubungannya dengan prinsip dasar Mikrobiologi Farmasi yang diperoleh dalam materi perkuliahan/buku teks.
4. Pada saat praktikum mahasiswa mencatat hasil pengamatan pada setiap lembaran evaluasi dan pembahasan.
5. Serahkan laporan praktikum anda tanpa ditunda-tunda.

Pembuatan Laporan

Laporan praktikum dikumpulkan berdasarkan kelompok kerja dan dikumpulkan satu minggu setelah praktikum. Setiap laporan mengenai satu macam percobaan harus memuat hal-hal berikut :

1. **Judul** : singkat dan tercantum tanggal serta kelompok percobaan.
2. **Pendahuluan** : tuliskan latar belakang dan tujuan percobaan tersebut.
3. **Tinjauan Pustaka** : berikan latar belakang teori yang menunjang percobaan tersebut (kuliah atau *textbook*).
4. **Metodologi Praktikum** : tuliskan alat, bahan dan prosedur kerja.
5. **Hasil dan Pembahasan** : data hasil pengamatan dalam tabel/secara deskriptif. Uraikan/analisa serta bandingkan antara data pengamatan dengan literatur. Bila berbeda, ungkapkan alasan-alasannya. Jangan selalu menyalahkan alat atau kekurangtelitian praktikan.
6. **Kesimpulan** : Jawaban dari tujuan sehingga harus dibuat singkat & jelas
7. **Daftar Pustaka** : cantumkan daftar acuan yang dipakai yang berkaitan dengan percobaan.
8. **Gambar** : hasil percobaan dalam bentuk gambar atau grafik harus dicantumkan pada laporan.

PRAKTIKUM 1. PENGENALAN & STERILISASI PERALATAN UMUM LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

1. Kompetensi Dasar

- a. Mengenal dan memahami berbagai jenis serta fungsi dan prinsip kerja dari masing-masing peralatan laboratorium mikrobiologi yang umum digunakan dalam praktek dan/atau penelitian di dalam laboratorium mikrobiologi.
- b. Memahami konsep dasar sterilisasi pada laboratorium mikrobiologi.
- c. Keterampilan, ketelitian, dan kerapian dalam melakukan teknis sterilisasi pada laboratorium mikrobiologi.

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu menyebutkan berbagai jenis peralatan dasar yang harus dimiliki oleh laboratorium mikrobiologi beserta fungsinya.
- b. Mahasiswa mampu memahami konsep dasar sterilisasi dan mampu melakukan teknik sterilisasi pada peralatan-peralatan dan media uji laboratorium mikrobiologi.

3. Tujuan Praktikum

- a. Mampu mengenal berbagai peralatan umum/dasar pada laboratorium mikrobiologi beserta fungsinya.
- b. Mampu menjelaskan dan membedakan teknik-teknik sterilisasi.
- c. Mampu melakukan sterilisasi peralatan dan media uji pada laboratorium mikrobiologi.

4. Uraian Teori

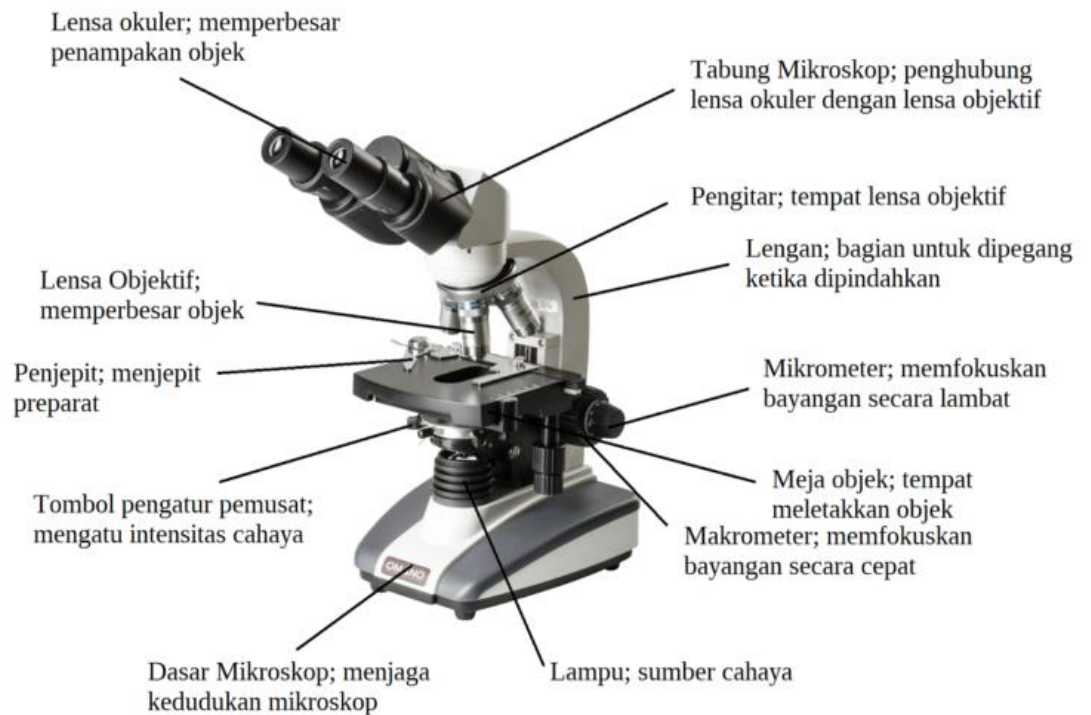
A. Peralatan Umum/Dasar Laboratorium Mikrobiologi

Dalam melakukan fungsi dan peranannya laboratorium mikrobiologi sebaiknya memiliki beberapa peralatan umum/dasar yang senantiasa digunakan dalam menjalankan aktivitas kesehariannya. Adapun peralatan-peralatan tersebut diantaranya adalah:

1) Mikroskop Cahaya

Mikroskop merupakan salah satu alat yang wajib ada di laboratorium mikrobiologi. Hal ini dikarenakan dunia mikrobiologi merupakan dunia kasat mata yang tidak dapat diamati tanpa bantuan alat pembesar karena

rata-rata ukuran objek yang diamati memiliki ukuran mikroskopis, atau berkisar di 10^{-6} m (10^{-4} cm).

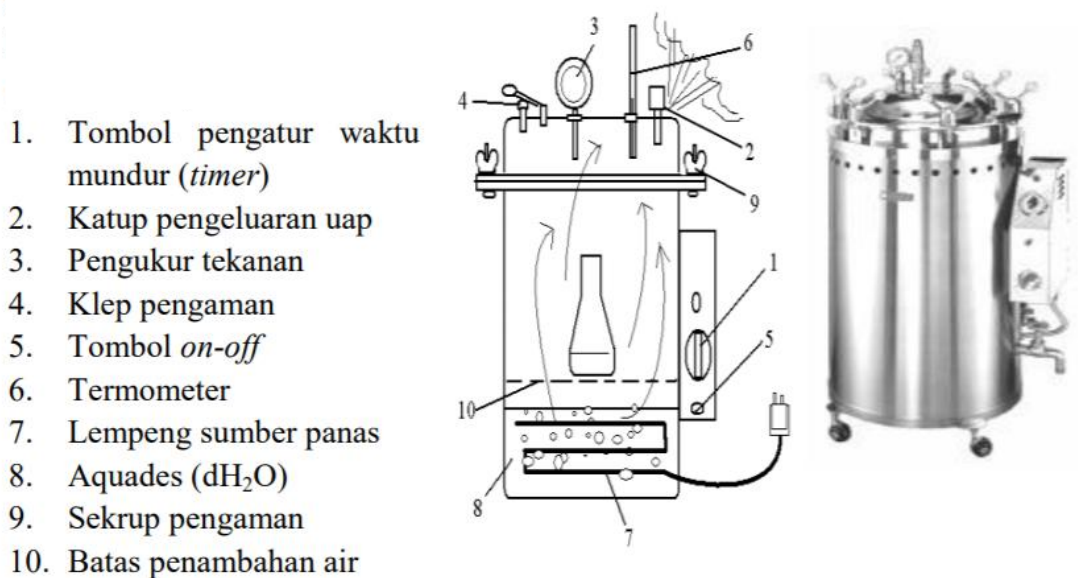


Gambar 1. *Mikroskop Cahaya*

Prinsip Kerja: Prinsip kerja dari mikroskop mirip dengan lup (kaca pembesar). Hanya saja mikroskop dapat melihat objek yang jauh lebih kecil karena perbesaran yang dihasilkannya berlipat ganda dibandingkan dengan lup. Dengan memanfaatkan dua buah lensa positif (cembung), bayangan benda yang dibentuk oleh lensa objektif bersifat nyata, terbalik, dan diperbesar yang kemudian bayangan tersebut dianggap sebagai objek oleh lensa okuler yang kemudian ditangkap/dilihat oleh mata kita.

2) Autoklaf

Autoklaf merupakan alat untuk sterilisasi yang paling umum yang digunakan untuk mensterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan di laboratorium mikrobiologi yang tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi yaitu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($250\text{ }^{\circ}\text{F}$) dan 2 atm (15 Psi) selama 15–20 menit.



1. Tombol pengatur waktu mundur (*timer*)
2. Katup pengeluaran uap
3. Pengukur tekanan
4. Klep pengaman
5. Tombol *on-off*
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas
8. Aquades (dH_2O)
9. Sekrup pengaman
10. Batas penambahan air

Gambar 2. *Autoklaf Elektrik*

Prinsip Kerja: Sterilisasi memanfaatkan panas dari uap air bertekanan tinggi yang dapat membunuh seluruh bentuk vegetatif dan generatif dari mikroorganisme yang tidak tahan terhadap suhu tinggi dan tekanan tinggi yang ada pada alat dan bahan yang akan kita sterilkan.

3) Inkubator

Inkubator merupakan alat yang paling sering kita temui pada laboratorium mikrobiologi dalam jumlah lebih dari satu unit. Hal ini dikarenakan fungsi dari alat ini yang menyediakan lingkungan tertutup dengan suhu terkontrol sehingga mikroorganisme dapat tumbuh pada suhu pertumbuhan optimumnya. Inkubator membuat pengaruh perubahan suhu yang terjadi di lingkungan tidak akan mengganggu pertumbuhan dari mikroorganismenya. Suhu inkubator itu sendiri dapat diatur sesuai dengan suhu pertumbuhan mikroba uji yang ingin kita amati.

Prinsip Kerja: Menjaga suhu sesuai dengan pengaturannya menggunakan suhu udara yang ada di dalamnya sebagai indikator. Suhu udara dapat kita naik dan turunkan sesuai dengan regulator yang ada pada alat inkubator itu sendiri. Sumber panas dari inkubator biasanya

menggunakan pemanasan plat/kawat logam yang ada di dalam inkubator itu sendiri.



Gambar 3. *Inkubator*

4) *Hot Plate Stirrer*

Hot plate stirrer merupakan alat yang biasa digunakan dalam membantu membuat suatu larutan atau medium agar lebih mudah larut/homogen dengan prinsip pengadukan kontinu dan pemanasan. Proses pengadukan yang kontinu akan dibantu oleh *stirrer bar* yang bersifat magnetik sehingga dapat berputar secara kontinu di atas pelat (plate) yang juga dapat berfungsi sebagai pemanasan larutan atau media sehingga membantu mempercepat homogenisasi (terutama kandungan agar dalam media).



Gambar 4. *Hot Plate Stirrer*

Prinsip Kerja: *Hot plate stirrer* merupakan alat bantu homogenisasi menggunakan prinsip kerja pengadukan kontinu menggunakan medan magnetik dan juga pemanasan. Kombinasi pengadukan kontinu dan

pemanasan dapat membantu menghomogenisasikan/melarutkan suatu senyawa dan/atau media uji yang mana terdapat agar di dalamnya.

5) *Colony Counter*

Menumbuhkan mikroorganisme biasanya dilanjutkan dengan melakukan uji kuantifikasi atau yang lebih dikenal dengan proses enumerasi (perhitungan jumlah koloni). Jumlah koloni yang tumbuh dapat menjadi indikator kebersihan suatu sampel uji ataupun kelayakan suatu sampel pangan untuk dikonsumsi. Perhitungan jumlah koloni biasanya dilakukan secara manual atau kita bisa menggunakan alat bantu seperti *colony counter*. *Colony counter* memadukan konsep mikroskop sederhana dengan menggunakan lup dan lampu sebagai sumber cahayanya.



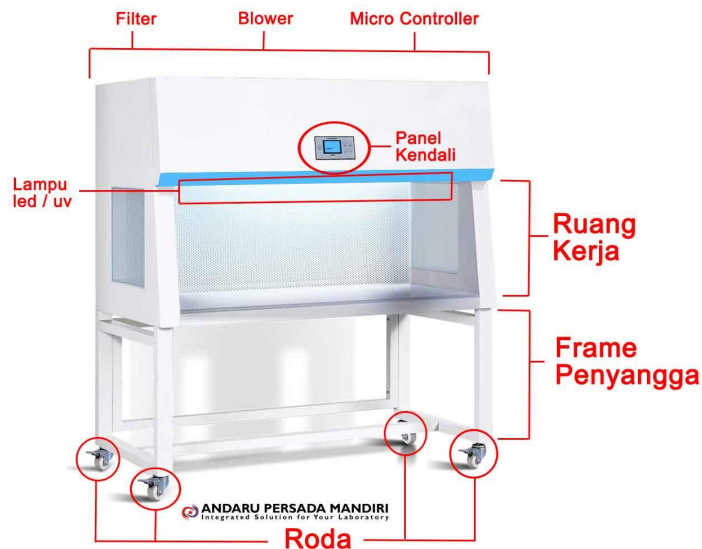
Gambar 5. *Colony Counter*

Prinsip Kerja: *Colony counter* memiliki prinsip kerja seperti mikroskop yang menggabungkan prinsip kerja persebaran objek dengan lup dan sumber cahaya agar memudahkan dalam menghitung jumlah koloni yang tumbuh. Di alat *colony counter* juga dilengkapi oleh skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni yang sangat banyak.

6) *Laminar Air Flow (LAF)/Biological Safety Cabinet (BSC)*

Laminar Air Flow (LAF) adalah miniatur dari ruangan steril yang dipergunakan untuk menyediakan ruang kerja aseptis di laboratorium sehingga proses memindahkan atau men-*subculture* biakan mikroorganisme menjadi terjaga dari proses kontaminasi. Ada beberapa tipe LAF tergantung dari arah aliran udara serta jenis filter penyaring

udara yang digunakannya. Beberapa tipe LAF juga dikenal dengan sebutan *Biological Safety Cabinet* (BSC) dikarenakan pola aliran udara dalam alat tersebut sedemikian rupa diatur sehingga tidak mempersempit kontaminasi dari luar maupun di dalam alat tersebut.



Gambar 6. *Laminar Air Flow (LAF)*

Prinsip Kerja: LAF maupun BSC memiliki prinsip kerja penyaringan aliran udara sehingga tercipta ruang kerja yang steril dalam melakukan aktivitas di laboratorium tanpa khawatir terjadinya proses kontaminasi. Kecepatan aliran udara dalam instrument ini juga menjadi nilai tambah dalam menghalangi proses kontaminasi dari atau ke dalam alat. Alat ini juga dilengkapi dengan lampu UV yang memiliki prinsip sterilisasi dengan radiasi.

7) Mikropipet dan Tip

Mikropipet merupakan alat yang berfungsi untuk memindahkan cairan dengan volume yang cukup kecil, biasanya kurang dari 1.000 μl . Ada dua tipe mikropipet yang biasa digunakan dalam laboratorium, mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) dan yang tidak dapat diatur volumenya (*fixed volume pipette*). Bila disesuaikan dengan bahan pembuatannya, terdapat dua tipe

mikropipet; yang dapat disterilisasi dengan autoklaf (*autoclavable*) atau yang tidak dapat diautoklaf.



Gambar 7. Mikropipet

Kedua jenis mikropipet tersebut dalam penggunaannya membutuhkan bantuan tip untuk menampung volume cairannya. Secara umum terdapat 3 jenis tip yang dibedakan dari kapasitas maksimum volume cairan yang dapat diambil yang biasanya dapat dibedakan dengan 3 warna yang berbeda; tip warna biru (kapasitas maksimum 1.000 µl), tip warna kuning (kapasitas maksimum 150 µl), dan tip warna putih (kapasitas maksimum 10 µl). Bahan plastik yang digunakan dalam pembuatan tip dirancang agar dapat tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi sehingga menyebabkan tip dapat di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf.



Gambar 8. Tip

Prinsip Kerja: Dalam pengoperasiannya, mikropipet menggunakan prinsip sistem vakum udara. Dimana jumlah volume udara yang dikeluarkan berbanding lurus dengan jumlah volume cairan yang diambil ke dalam tip dan begitu juga sebaliknya. Terdapat dua hambatan/stop pada tombol knob mikropipet, hambatan/stop pertama

digunakan untuk cairan dengan viskositas rendah dan hambatan/stop kedua digunakan untuk cairan dengan viskositas tinggi.

8) Cawan Petri

Cawan Petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan Petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa digunakan berdiameter 15 cm dan dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml. Cawan petri ada yang bisa digunakan berkali-kali (tipe kaca) dan yang digunakan hanya sekali (tipe plastik). Kaca yang menjadi bahan baku cawan petri dibuat sedemikian rupa supaya tahan terhadap suhu tinggi dan tekanan tinggi agar dapat dilakukan sterilisasi dengan autoklaf.



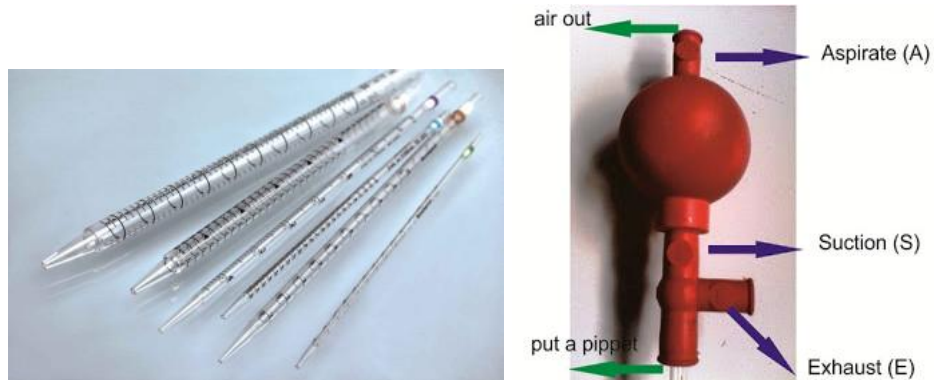
Gambar 9. Cawan Petri

9) Pipet Ukur dan Pipet Filler/*Rubber Bulb*

Pipet ukur merupakan alat yang digunakan untuk memindahkan cairan dengan volume yang diketahui. Terdapat berbagai macam ukuran kapasitas pipet ukur, diantaranya berukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml.

Dalam penggunaannya, pipet ukur dibantu dengan alat yang dikenal sebagai *filler*. *Filler* adalah alat bantu untuk menyedot cairan 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*)

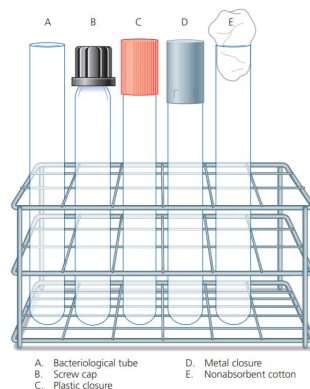
merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (*exhaust*) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.



Gambar 10. Pipet Ukur (kiri) dan Pipet Filler (kanan)

10) Tabung Reaksi

Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. 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*).



Gambar 11. Tabung Reaksi

Berbeda dengan cawan petri, bahan kaca dari tabung reaksi dapat dibagi menjadi 2 jenis, bahan yang tahan suhu dan tekanan tinggi (*autoclavable*) dan bahan yang tidak tahan suhu dan tekanan tinggi. Jadi hati-hati dalam melakukan proses sterilisasi terhadap tabung reaksi ini.

11) Labu Erlenmeyer

Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan yang akan digunakan. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dan lain-lain. Terdapat berbagai macam pilihan ukuran disesuaikan dengan kapasitas volume cairan yang dapat ditampungnya, yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1.000 ml. Penulisan labu Erlenmeyer selalu menggunakan huruf E kapital (besar), hal ini dikarenakan Erlenmeyer adalah nama seorang kimiawan asal Jerman yang menemukan labu ini di tahun 1860, Emil Erlenmeyer.

Penggunaan labu Erlenmeyer untuk kultivasi mikroba dengan media cair ataupun pembuatan media tumbuh mikroba sebaiknya hanya menggunakan maksimal $\frac{1}{2}$ dari volume total Labu Erlenmeyer. Contohnya, bila ingin membuat 500 ml media, gunakan labu Erlenmeyer ukuran 1.000 ml atau 1.500 ml. Hal ini untuk mencegah proses meluapnya media saat proses sterilisasi (pendidihan).



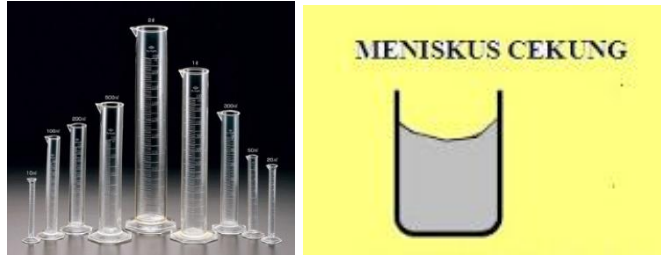
Gambar 12. Labu Erlenmeyer

Seperti halnya cawan petri, labu Erlenmeyer terbuat dari bahan kaca yang tahan terhadap suhu tinggi dan tekanan tinggi agar dapat dilakukan sterilisasi dengan autoklaf.

12) Gelas Ukur

Seperti halnya dengan labu Erlenmeyer, gelas ukur berfungsi sebagai alat bantu ukur volume suatu cairan. Gelas ukur itu sendiri memiliki beberapa pilihan sesuai dengan skala volumenya. Proses pengukuran

menggunakan gelas ukur sebaiknya suatu volume ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan tersebut.



Gambar 13. Gelas Ukur dan Meniskus Cekung Larutan

13) Batang L

Batang L berfungsi untuk menyebarkan cairan di permukaan agar yang telah memadat supaya suspensi bakteri dapat menyebar merata ke permukaan agar. Teknik kultivasi yang menggunakan batang L ini dikenal dengan metode sebar.



Gambar 14. Batang L (kiri) dan Beaker Glass (kanan)

14) *Beaker Glass*

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

15) Pembakar Bunsen

Pembakar bunsen merupakan salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril. Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk sterilisasi jarum ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk

memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas) bukan yang dekat sumbu.



Gambar 15. Pembakar Bunsen (kiri) dan Tabung Durham (kanan)

16) 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).

17) Jarum Inokulum

Jarum inoculum berfungsi untuk memindahkan/transfer mikroorganismenya untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum ini biasanya terbuat dari kawat nichrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Terdapat dua tipe jarum yang dibedakan dari bentuk ujungnya, berbentuk lingkaran (*loop*) atau lebih dikenal dengan jarum ose dan yang berbentuk lurus (*needle*) atau lebih dikenal dengan jarum tanam tajam. Jarum ose cocok digunakan untuk melakukan inokulasi dengan metode gores (*streak*), sedangkan jarum tanam tajam cocok digunakan untuk melakukan inokulasi dengan metode tusuk (*stab*).



Gambar 16. Jarum Inokulum

18) Spektrofotometer Transmittan

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur *optical density* (kerapatan optis) dari suatu cairan misalnya suatu medium cair yang berisi suspensi bakteri. Kerapatan optis adalah nilai logaritmik yang digunakan untuk memplot pertumbuhan bakteri pada suatu grafik.



Gambar 17. Spektrofotometer transmittan

Prinsip kerja : berdasarkan prosentase transmisi dari suatu suspensi yang akan diukur pada panjang gelombang tertentu.

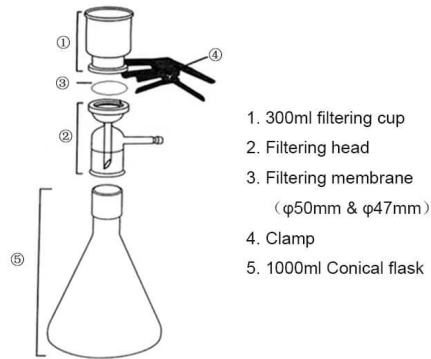
B. Konsep Sterilisasi

Kondisi bersih sangat diperlukan dalam melakukan aktivitas keseharian di dalam laboratorium mikrobiologi. Bukan hanya bersih terhadap alat dan bahan yang akan kita gunakan akan tapi juga bersih pada ruangan kerja yang akan kita gunakan. Konsep bersih ini bukan sekedar bersih dari sampah dan debu tapi juga bersih dari kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan. Konsep bersih ini kemudian kita kenal dengan konsep sterilisasi.

Sterilisasi itu sendiri adalah proses untuk membebaskan alat dan bahan serta area kerja dari segala macam bentuk kehidupan terutama mikroorganisme yang tidak kita inginkan. Sterilisasi dapat dilakukan secara mekanik, fisik maupun secara kimia tergantung dari alat atau bahan yang akan disterilisasi.

Sterilisasi secara mekanik dapat dilakukan dengan penyaringan/filtrasi. Diameter pori yang biasa digunakan adalah 0.22 mikron atau 0.45 mikron. Hal ini bertujuan agar mikroba dapat tertahan pada saringan yang digunakan. Berbeda dengan konsep sterilisasi lainnya konsep sterilisasi secara mekanik

tidak membunuh atau menghambat pertumbuhan dari mikroba yang tidak diinginkan, hanya melakukan pemisahan dari bahan uji yang kita inginkan. Olehkarenanya, mekanisme sterilisasi secara mekanik cocok digunakan untuk bahan berbentuk cairan yang tidak tahan panas atau mudah menguap seperti enzim, antibiotik, ataupun serum.



Gambar 18. *Aparatus Filtrasi (kiri) dan Membran Filter (kanan)*



Gambar 17. *Sterilisasi Pemijaran (kiri) dan Sterilisasi Panas Kering (kanan)*

Sterilisasi secara fisik secara umum dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu pemanasan dan penyinaran. Sterilisasi menggunakan panas, dapat dibedakan menjadi 4 cara, yaitu:

- 1) Pemijaran, cara sterilisasi dengan menggunakan api secara langsung. Biasanya digunakan untuk sterilisasi peralatan yang tahan panas dan dapat berpijar; Contohnya adalah sterilisasi jarum-jarum inoculum maupun batang L.
- 2) Panas kering, cara sterilisasi dengan memanfaatkan udara panas. Biasanya digunakan untuk peralatan berbahan kaca, seperti labu Erlenmeyer, tabung reaksi, maupun cawan petri.
- 3) Panas lembab tidak bertekanan, cara sterilisasi dengan memanfaatkan uap air panas seperti mengukus (tyndalisasi). Teknik ini biasanya digunakan untuk sterilisasi bahan yang mengandung air supaya tidak terjadi dehidrasi; Contohnya sterilisasi susu.
- 4) Panas lembab bertekanan, cara sterilisasi dengan memanfaatkan uap panas dan tekanan tinggi seperti autoklaf. Metode ini banyak digunakan luas untuk sterilisasi alat dan bahan laboratorium mikrobiologi. Gabungan uap panas dan tekanan dapat berimbas pada kerusakan sel-sel generatif (spora) dari mikroba. Suhu 121 °C yang digunakan pada autoklaf adalah suhu dimana air mendidih pada tekanan 2 atm.

Sterilisasi secara fisik lainnya adalah dengan menggunakan metode penyinaran/radiasi. Sumber penyinaran/radiasi yang sering digunakan adalah radiasi sinar Ultra Violet (UV). Sinar UV biasanya digunakan untuk sterilisasi ruangan ataupun sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF).

Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan seperti fenol ataupun alkohol. Cara kerja senyawa desinfektan ini adalah membunuh sel-sel vegetative dari mikroorganisme akan tetapi tidak berpengaruh pada sel-sel generatifnya (endospora). Penggunaan desinfektan ini banyak diaplikasikan untuk sterilisasi area kerja terutama di area permukaannya dan juga untuk membantu proses sterilisasi dengan metode

pemijaran. Alkohol 70% adalah salah satu senyawa desinfektan yang paling umum yang digunakan di laboratorium mikrobiologi.

5. Pelaksanaan Praktikum:

a. Alat dan Bahan

Alat : Cawan Petri, jarum ose, jarum tanam tajam, tabung durham, kaca silinder, tabung reaksi, Erlenmeyer, Beaker Glass, Bunsen, LAF, oven, incubator, mikropipet dan tip, pinset, gelas ukur, *colony counter* dan batang L.

Bahan : alcohol 70%, kapas

b. Prosedur Kerja

- 1) Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- 2) Perhatikan dan catat Peralatan Umum yang biasa digunakan dalam Laboratorium Mikrobiologi
- 3) Tuliskan peralatan-peralatan laboratorium yang kalian temui di laboratorium mikrobiologi UHAMKA beserta fungsi dan/atau prinsip kerjanya serta cara penggunaannya.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

No.	Nama Alat	Fungsi/Cara Penggunaan

- d. Mengapa dalam pengoperasiannya, alat autoklaf harus diisi dengan air/mengecek level airnya terlebih dahulu?
- e. Mengapa saat mempersiapkan tabung reaksi kita harus menyumbatnya terlebih dahulu dengan menggunakan sumbat kapas?

8. Daftar Pustaka

- a. Benson, H.J. 1973. *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*. 2 nd ed. Iowa: W.M.C. Brown Co. Publ. Dubuque
- b. Cappuccino JG, Welsh C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. 11th ed. (Cappuccino JG, ed.). Edinburgh: Pearson; 2017.
- c. Frazier, W.C, E.H. Merth & R.H. Deibel. 1968. *Laboratory Manual for Food Microbiology*. 4 th ed. Minneapolis, Burgess Publ. Co.
- d. Madigan, M.T, J.M. Martinko & J. Parker. 1997. *Brock, Biology of Microorganism*. 8th ed. Prentice Hall International, Inc. Upper Saddle River, New York
- e. Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit UI Press. Jakarta
- f. Widodo, L.U. & D.F. Kusharyati. 2013. *Praktikum Mikrobiologi, Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi*. Universitas Terbuka, Jakarta.

PRAKTIKUM 2. MEDIUM PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

1. Kompetensi Dasar

- a. Mengenal dan memahami berbagai jenis medium pertumbuhan yang umum digunakan dalam praktek dan/atau penelitian di dalam laboratorium mikrobiologi.
- b. Mengenal dan memahami fungsi medium
- c. Mampu melakukan pembuatan medium baik medium alami maupun sintetik

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu menyebutkan berbagai jenis medium yang biasa digunakan di laboratorium mikrobiologi beserta fungsinya.
- b. Mahasiswa mampu membuat medium alami maupun sintetik
- c. Mahasiswa mampu menuang medium, membuat medium agar lempeng, agar tegak dan agar *slant*

3. Tujuan Praktikum

- a. Mampu mengenal berbagai medium yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi beserta fungsinya
- b. Mampu menjelaskan dan membedakan jenis-jenis medium pertumbuhan
- d. Mampu menuang medium, membuat medium agar lempeng, agar tegak dan agar *slant*

4. Uraian Teori

A. Pengertian Medium

Medium pertumbuhan jasad renik adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran bahan makanan (nutrien untuk menumbuhkan jasad renik tersebut). Medium dipergunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan, untuk isolasi, pengujian sifat-sifat fisiologi dan guna memproduksi metabolit sekunder. Dalam pembuatan medium harus memenuhi syarat-syarat berikut :

- 1) Medium harus memenuhi semua kebutuhan nutrien yang mudah digunakan oleh mikroorganisme

- 2) Medium tidak mengandung zat penghambat pertumbuhan
- 3) Medium harus steril
- 4) Medium harus memiliki tekanan osmose, pH dan lain-lain yang sesuai.

Untuk membuat medium, diperlukan bahan-bahan yang dapat dikelompokkan menjadi tiga macam, yaitu :

a) Bahan dasar

- 1) Air
- 2) Agar (berasal dari rumput laut) tidak terurai oleh mikroba, membeku pada suhu 15°C dan mencair pada suhu relatif rendah (45°C)
- 3) Gelatin yaitu protein yang dapat diurai oleh mikroba, sifatnya seperti agar
- 4) Silika gel, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat khusus untuk menumbuhkan mikroba bersifat autotrof obligat.

b) Unsur nutrisi atau makanan

- 1) Sumber karbon, contoh : Karbohidrat, lemak, asam organik
- 2) Sumber nitrogen, contoh : pepton, protein
- 3) Garam-garam mineral, contoh : K, Na, Fe, Mg
- 4) Vitamin
- 5) Bahan alami, contoh : sari buah, ekstrak sayur, susu, darah.

c) Bahan tambahan, yaitu bahan yang sengaja ditambahkan ke dalam medium untuk tujuan tertentu, seperti : bahan indikator (misal *phenol red*), antibiotik.

B. Klasifikasi medium

Klasifikasi medium menurut bahan yang digunakan :

1. Medium alamiah: medium yang bahan dasarnya berupa substrat bahan alam, seperti: sari buah wortel, jagung, sari buah anggur dan lain-lain.
2. Medium semi alamiah; medium alamiah ditambahkan ke dalamnya senyawa kimia, seperti medium: PDA (*Potato Dextrose Agar*); TEA (*Touge Extract Agar*)

3. Medium buatan atau bahan sintetis; medium yang komposisinya telah ditentukan dan terdiri dari bahan kimia, contoh: *Nutrient Agar*.

Klasifikasi medium menurut kegunaannya :

1. Medium umum; medium yang dapat ditumbuhi oleh mikroorganisme secara umum, contoh : SDA (*Saubouroud Dextrose Agar*), TEA, PDA, dan lain-lain.
2. Medium selektif; medium yang komposisinya diatur sedemikian rupa sehingga hanya jenis mikroorganisme tertentu yang dapat tumbuh, contoh : SSA (*Salmonella Shigella Agar*), BGLB (*Brilliant Green Lactose Broth*)
3. Medium differensial; medium yang digunakan untuk membedakan jenis mikroorganisme yang satu dengan lainnya, contoh : *Blood Agar*, EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*)
4. Medium pengkayaan (*Enrichment medium*); medium untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu dan diharapkan memiliki jumlah sel yang lebih banyak untuk tujuan tertentu, seperti YMA (*Yeast Malt Agar*) medium pertumbuhan yang baik untuk sel khamir.

Medium dibuat dengan cara melarutkan semua bahan dalam akuades sampai semua bahan terlarut. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml (agar slant) atau 15 ml pada agar tegak dan cawan Petri atau dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (2/3 volume untuk menghindari menyemburnya medium ke kapas). Untuk menghindari kontaminasi medium tersebut disumbat dengan kapas, sebelum disterilkan dengan autoklaf sumbat kapas dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas *yellow pages* dan diikat kuat.

Untuk membuat medium miring segera setelah dikeluarkan dari autoklaf, tabung tersebut diletakkan dengan sudut kemiringan yang diinginkan, kemudian biarkan hingga mengeras. Untuk pembuatan medium tegak biarkan medium membeku dalam posisi tegak. Untuk pembuatan medium tegak biarkan medium membeku dalam posisi tegak. Untuk pembuatan medium tegak yang telah beku, maka jika akan dipergunakan medium

harus dicairkan kembali dalam penangas air. Jangan memanaskan langsung di atas api.

Preparasi medium dalam tabung dan cawan :

1. Agar miring/*slant*

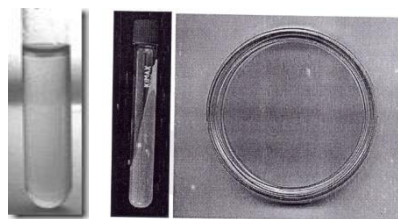
Medium Agar miring dibuat dengan memasukkan 3-5 ml (umumnya 4 ml) medium ke dalam tabung reaksi, kemudian disterilisasi pada autoklaf suhu 121°C selama 15-20 menit. Setelah di autoklaf baru dimiringkan sesuai dengan sudut kemiringan yang diinginkan, biarkan hingga mengeras.

2. Agar tegak/*Deep*

Medium yang dibuat dimasukkan ke dalam tabung reaksi 3-5 ml (umumnya 4 ml) di autoklaf, setelah itu segera simpan di rak tabung reaksi biarkan hingga mengeras.

3. Agar cawan

Dari medium yang dibuat dimasukan ke dalam labu ukur Erlenmeyer kemudian di sterilisasi dengan autoklaf. Setelah itu tunggu hingga medium hangat kuku 43°C dan segera tuang ke dalam cawan Petri steril (10-15 ml) secara aseptis, proses penuangan harus segera dilakukan menghindari bekunya medium.



Gambar 20. Jenis-jenis medium

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat & Bahan

Alat:

- 1) Erlenmeyer 1000 ml
- 2) Tabung reaksi
- 3) Batang pengaduk/stirrer

- 4) Corong
- 5) Cawan Petri
- 6) Kompor listrik
- 7) Kertas yellow page

Bahan : Alkohol 70%, Kapas, Medium alami & sintetis (medium NA dan PDA)

b. Prosedur

1. Medium Alamiah

a. Air Kaldu

Sebanyak 500 gram daging sapi giling yang bebas lemak dan serat otot, 1 liter aquades diaduk sampai rata, diamkan selama 1 malam dalam lemari es. Keesokan harinya dimasak hingga mendidih selama 20 menit, saring dengan kain kasa ke dalam labu Erlenmeyer menggunakan corong (gunakan kapas putih). Air hasil saringan ditambah aquades sampai 1 liter kembali, sterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15-20 menit.

b. Agar Kaldu Pepton

Sebanyak 20 gram agar oxoid (2%), 10 gram pepton, 5 gram NaCl, 1 liter air kaldu, diaduk rata, diamkan 1-2 menit masak sampai mendidih sampai semua bahan melarut. Saring dengan kasa menggunakan corong, pH dibuat 7,2 kemudian tambahkan akuades sampai 1 liter. Masukkan medium ke dalam tabung reaksi 4 ml (agar *slant/deep*) dan 10 ml untuk agar cawan. Tutup dengan proof kapas, bungkus dengan kertas koran, sterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15-20 menit.

c. *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Timbang 100 g kentang, sukrosa/dekstrose 10 g, agar 2% dari volume medium yang akan dibuat, akuades 1000 ml. Bersihkan kentang dengan air mengalir lalu kupas setelah itu dibersihkan kembali, kentang dipotong dengan ukuran dadu lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer bersama dengan Akuades 1000 ml, rebus selama 2-3 jam, saring dengan menggunakan kain kasa. Ekstrak kentang dididihkan kembali bersama dengan agar dan

sukrosa (tambahkan akuades sampai volume 1000 ml) aduk hingga larut dan mendidih. Medium yang telah dibuat di saring kembali dengan kasa. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15-20 menit.

d. *Touge Extraxt Agar* (TEA)

Timbang 100 g taugé, sukrosa/dextrose 10 g, agar 2% dari volume medium yang akan dibuat, aquades 1000 ml. Tauge dicuci lalu tiriskan. Masukkan ke dalam labu Erlenmeyer didihkan dengan akuades selama 2-3 jam, saring dengan kain kasa. Ekstrak dididihkan kembali bersama dengan agar dan surosa dengan menambahkan volume air hingga 1000 ml, tunggu hingga semua bahan larut, kemudian saring kembali. Sterilisasi dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15-20 menit.

2. Medium Sintetis

- a. Timbang bahan sesuai dengan takaran yang terdapat pada kemasan
- b. Larutkan ke dalam akuades sesuai dengan volume yang telah ditetapkan, dalam Erlenmeyer.
- c. Panaskan di atas pemanas (*hot plate*) yang dilengkapi pengaduk (*magnetic stirrer*) sampai larut dengan baik.
- d. Sterilkan dalam autoklaf suhu 121⁰C selama 15-20 menit
- e. Untuk membuat agar miring, letakkan tabung reaksi pada posisi kemiringan yang diinginkan dan biarkan sampai membeku
- f. Untuk membuat medium agar di cawan Petri, medium dalam labu Erlenmeyer yang telah disterilkan didinginkan hingga suhu 43-50⁰C kemudian segera tuang ke dalam cawan masing-masing sebanyak 10-15 ml medium
- g. Medium yang telah padat dan siap tanam namun tidak akan dipergunakan segera sebaiknya disimpan di lemari pendingin.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

No.	Ciri sifat fisik	PDA Alami	TEA	NA	PDA sintetis
1	Warna				

2	Fasa (padat/cair)				
3	Turbiditas (jernih/keruh)				
4	Kontaminasi				
5	Jenis mikroba				

b. Pembahasan :

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Jelaskan tentang persyaratan medium yang dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba!
- Apakah tujuan penggunaan agar sebagai bahan dasar dari pembuatan medium?
- Sebutkan jenis medium berdasarkan kegunaannya dan berikan masing-masing dua contohnya!
- Apakah kelebihan dan kekurangan medium sintesis?
- Jelaskan cara penyimpanan medium yang telah diproduksi?

8. Daftar Pustaka

- Denyer S. and R. Baird, Guide to Microbiological Control In Pharmaceuticals, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 190.
- Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Penerbit UI Press. Jakarta.
- Salle, A.J. 1961. Fundamental Principles of Bacteriology. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York

PRAKTIKUM 3: ISOLASI MIKROORGANISME

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji isolasi mikroorganisme

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji isolasi mikroorganisme dari tanah, bahan pangan, obat, obat tradisional, maupun lingkungan air dan udara
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan berbagai teknik isolasi *steak plate methode*, *pour plate methode*, *spread plate methode*

3. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu melakukan uji isolasi mikroorganisme berdasarkan jenis sampel

4. Uraian Teori

Mikroorganisme (Bakteri, kapang dan khamir) terdapat dalam populasi yang besar dan beragam di alam ini. Mereka terdapat hampir di setiap tempat kita berada (tanah, air maupun udara). Mikroorganisme juga dapat kita jumpai pada setiap bagian tubuh kita seperti di rambut, tangan, kaki, kulit dan lain-lain. Semua sumber tersebut dapat merupakan sumber kontaminasi pada medium pertumbuhan mikroorganisme. Kontaminasi adalah tumbuhnya mikroorganisme yang tidak kita inginkan. Kontaminasi dapat dihindari apabila kita melakukan tindakan aseptis.

Mikroorganisme di alam terdapat dalam bentuk kumpulan massa sel yang disebut dengan koloni. Untuk mempelajari suatu jenis koloni dan sifat mikroorganisme secara lebih mendalam, kita memerlukan teknik pembiakan mikroorganisme. Teknik tersebut disebut isolasi (Seely & Van den Mark, 1962:13). **Isolasi adalah** suatu teknik yang dipergunakan untuk memisahkan suatu koloni dari biakan campuran. Tujuan isolasi adalah mendapatkan biakan murni. Biakan murni merupakan biakan yang sel-selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal.

A. Teknik Pengambilan dan Preparasi Sampel

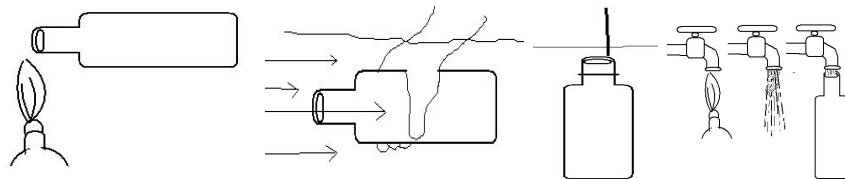
Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel. Berikut merupakan prosedur pengambilan sampel.

1) Sampel tanah

Jika mikroorganisme 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.

2) 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.



Gambar 21. Pengambilan sampel air

B. Isolasi dengan Cara Pengenceran (*Dilution*)

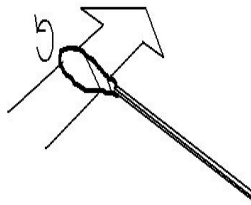
1) Teknik Preparasi Suspensi

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 :

a) *Swab* (ulas)

Dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan

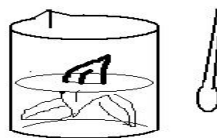
atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dan lain-lain. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. *Swab* akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan akuades steril.



Gambar 22. Metode *swab*

b) *Rinse* (bilas)

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



Gambar 23. Metode *rinse*

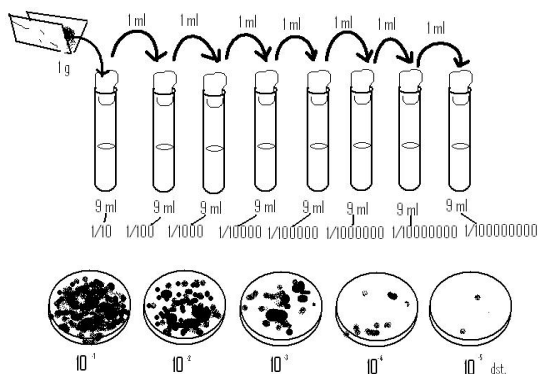
c) *Maseration* (pengancuran)

Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortir dan stamper sehingga mikroba yang ada di permukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antara lain bakso, biji, buah dan lain-lain. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (b/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi.



Gambar 24. Metode maserasi

2) Teknik Pengenceran Bertingkat



Gambar 25. Metode 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 mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.

C. Teknik Penanaman

1) Metode Gores (*Streak plate method*)

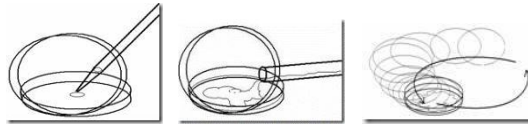
Menggoreskan sejumlah inokulum pada medium padat dengan menggunakan alat transfer (jarum tajam atau jarum ose).



Gambar 26. Metode gores

2) Metode Tuang (*Pour plate method*)

Menghomogenkan sejumlah substrat cair dengan medium agar yang masih cair kemudian campuran tersebut dituang ke cawan Petri steril.



Gambar 27. Metode tuang

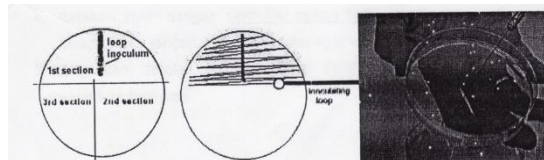
3) Metode Sebar (*Spread plate method*)

Menyebarkan sejumlah inokulum pada permukaan medium padat dengan menggunakan alat misalnya spatel drugalsky.



Gambar 28. Metode sebar

Berikut di bawah ini berbagai teknik isolasi untuk mendapatkan biakan murni.



Gambar 29. Cara untuk mendapatkan biakan murni

Metode gores dapat dibedakan menjadi 3 yaitu :

1) Goresan Sinambung



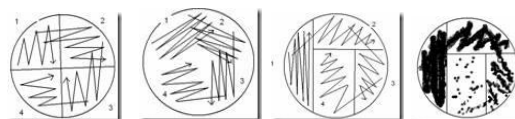
Gambar 30. Goresan sinambung

2) Goresan T



Gambar 31. Goresan T

3) Goresan Kuadran



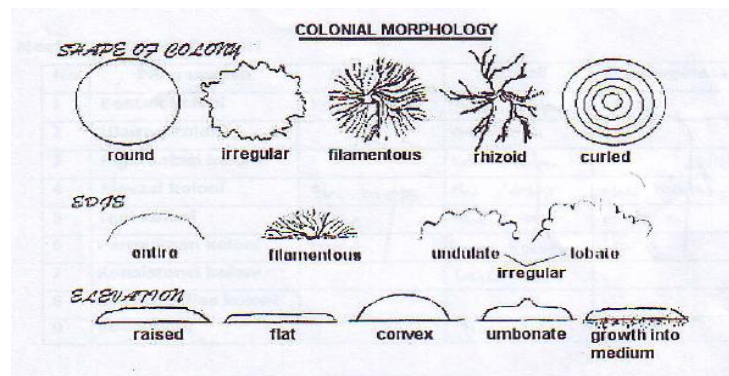
Gambar 32. Goresan kuadran

Bakteri tumbuh pada medium padat dan cair sebagai satu koloni. Koloni adalah kumpulan massa mikroorganisme yang berasal dari satu sel, yang secara genetik dianggap sama. Identifikasi bakteri mencakup morfologi koloni bakteri yang terlebih dahulu harus ditumbuhkan dalam satu medium baik medium cair maupun medium padat. Pertumbuhan mikroorganisme dalam suatu medium dapat kita amati morfologi koloninya.

D. Parameter Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengamatan morfologi bakteri:

- 1) Bentuk koloni, diamati apakah berbentuk bulat sempurna, bulat lonjong (oval) atau tidak beraturan.
- 2) Ukuran koloni, diukur diameter koloni dengan menggunakan jangka sorong
- 3) Kromogenesis (pigmentasi) : hasil metabolit sekunder dari bakteri yang diekskresikan ke medium. Warnanya beragam: putih, coklat, merah, ungu dll.
- 4) Elevasi koloni : dilihat dari tampak samping ketinggian (elevasi) koloni.
- 5) Tepi koloni, dilihat bagian tepi koloni apakah halus, bergerigi, bergelombang, berfilamen atau tidak beraturan.
- 6) Permukaan koloni : halus, kasar, bergelombang, *glistening rough*, dull (*opposite of glistening*), rugose (wrinkled).
- 7) Konsistensi: *butyrous* (buttery), *viscid* (lenget dan susah untuk dilepaskan), *brittle/friable* (kering dan remah), *mucoïd* (berlendir)
- 8) Emulsifiabilitas koloni : tingkat mudah sukarnya membentuk emulsi. Apakah koloni mudah menjadi suspensi granular atau tidak dapat membentuk emulsi?
- 9) Bau : Apakah koloni berbau atau tidak? Jika koloni berbau, seperti apa baunya?



Gambar 33. Beberapa tipe morfologi koloni bakteri berdasarkan bentuk, tepi dan elevasi koloni

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- 1) Cawan Petri steril
- 2) Tabung reaksi
- 3) Pipet volume
- 4) Vortex
- 5) Lampu bunsen
- 6) Medium agar tegak
- 7) Cotton bud steril
- 8) Tanah steril

b. Prosedur Kerja

1) Isolasi mikroorganisme dari udara dan lingkungan

Tujuan : mengisolasi/menangkap mikroorganisme dari udara dan lingkungan sekitar kita.

Cara kerja :

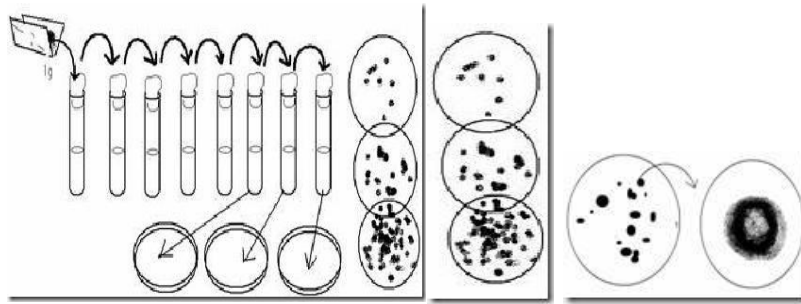
- a) Cairkan medium agar tegak dalam dalam penangas air
- b) Dinginkan sampai suhu 50°C , hal ini dapat diperkirakan dengan menyentuh pada telapak tangan kita.
- c) Tuang agar cair tersebut dalam cawan Petri steril secara aseptis (buka cawan Petri secukupnya, panaskan dulu mulut tabung reaksi dan pinggir cawan sebelum dibuka).

- d) Ratakan agar dengan memutar cawan Petri membentuk profil angka delapan dan jangan tunggu sampai agar mengental.
- e) Dinginkan, setelah padat inokulasi dengan sumber mikroorganisme yang kita inginkan.
- f) Dari lingkungan udara : buka tutup cawan Petri selama 5 menit kemudian tutup kembali. Dari nafas : buka tutup cawan Petri secukupnya kemudian hembuskan aliran udara ke dalamnya.
- g) Dari lingkungan : ambil *cotton bud* secara aseptis, celupkan pada akuades steril selama 1 menit, gosokkan pada setiap sumber lingkungan (rambut, kulit, tangan, kaki, meja, tas dan lain-lain) yang kita inginkan, kemudian goreskan *cotton bud* tersebut di atas permukaan agar, secara aseptis. Inkubasi 24 – 48 jam.
- h) Pengamatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme dilakukan dengan melihat ada tidaknya koloni yang tumbuh di atas medium.

2) Isolasi bakteri dari sampel tanah

Cara kerja :

- a) Timbang tanah seberat 1 gram
- b) Tanah seberat 1 g dimasukkan ke dalam akuades steril 9 ml (tabung pengenceran 10^{-1}) secara aseptis dan divortex, lalu ambil 1 ml larutan masukan dalam 9 ml akuades steril (pengenceran 10^{-2}) dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-7}
- c) Dari masing-masing 3 pengenceran terakhir (pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada medium Petri PDA & NA
- d) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam
- e) Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut kemudian dipilih koloni yang relatif terpisah dari koloni lain dan koloni yang mudah dikenali
- f) Koloni yang terpilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA & PDA baru dengan teknik *streak methode*
- g) Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C .



Gambar 34. Isolasi mikroorganisme dari sampel tanah

3) Morfologi Koloni Bakteri

Tujuan : mengetahui bentuk morfologi koloni bakteri hasil isolasi.

Cara Kerja :

- a) Gunakan kultur cawan yang mempunyai koloni tunggal yang terpisah dari kelompoknya. Pilih koloni terbesar (yang terlihat oleh mata telanjang) untuk menentukan bentuk, kromogenesis dan bau koloni.
- b) Gunakan mikroskop stereoskopik untuk melihat detailnya. Letakan cawan di meja preparat dengan cover masih tertutup (untuk mencegah kontaminasi). Gunakan perbesaran yang paling baik untuk mengamati elevasi, permukaan, kekeruhan, ukuran dan tepi koloni.
- c) Untuk menentukan konsistensi koloni, diperlukan jarum inokulum atau tusuk gigi steril untuk mengambil koloni dan diamati konsistensi koloni saat jarum terangkat dari medium agar.
- d) Untuk menentukan emulsifiability, koloni disuspensikan dalam air atau larutan garam fisiologis dalam sebuah tabung reaksi. Diamati bagaimana koloni tersebut bercampur dalam air atau garam fisiologis, apakah mudah larut, menjadi emulsi, menjadi suspensi atau tidak sama sekali. Atau dapat juga dengan cara : ambil koloni dengan jarum, celupkan ke dalam tabung yang mengandung air atau garam fisiologis, kemudian sebarkan di permukaan gelas. Amati apakah koloni akan menjadi suspensi atau menjadi massa bakteri yang tidak larut dan akan mengapung di air.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

1) Isolasi mikroorganisme dari udara dan lingkungan

No.	Sumber	Bakteri	Jamur	Keterangan
1	Lingkungan udara			
2	Nafas manusia			
3	Lingkungan			
	a. Rambut			
	b. Kulit			
	c. Tangan			
	d. Kaki			
	e. Meja			
	f. Tas			

2) Isolasi bakteri dari sampel tanah

Sumber isolat	Intensitas pertumbuhan	Jenis mikroorganisme	Keterangan
Cawan 10^{-4}			
Cawan 10^{-5}			
Cawan 10^{-6}			

Gambar hasil biakan murni :

3) Morfologi Koloni Bakteri

No.	Pengamatan	Bakteri 1	Bakteri 2
1	Bentuk koloni		
2	Ukuran koloni		
3	Pigmentasi koloni		
4	Elevasi koloni		
5	Tepi koloni		
6	Permukaan koloni		
7	Konsistensi koloni		
8	Emulsifibilitas koloni		
9	Bau koloni		

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- apa yang dimaksud dengan isolasi mikroorganisme ?
- Sebutkan keuntungan dan kerugian *spread plate metode* ?
- Bagaimanakah cara untuk mendapatkan biakan murni ?
- Apakah tujuan dilakukan isolasi mikroorganisme ?
- Sebutkan ciri-ciri bakteri, khamir dan kapang ?

8. Daftar Pustaka

Cappuccino JG, Welsh C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. 11th ed. (Cappuccino JG, ed.). Edinburgh: Pearson; 2017.

PRAKTIKUM 4. PERHITUNGAN ANGKA KUMAN

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji perhitungan angka kuman mikroba

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji perhitungan angka kuman mikroba melalui angka lempeng total
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam perhitungan langsung dan tidak langsung

3. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu melakukan melakukan uji perhitungan angka kuman mikroba yang terdapat dalam produk obat, obat tradisional, makanan, kosmetika, dan alat kesehatan

4. Uraian Teori

Menghitung atau menentukan banyaknya mikroba dalam suatu bahan (makanan, minuman, dan lain-lain) dilakukan untuk mengetahui sampai seberapa jauh bahan itu tercemar oleh mikroba. Dengan mengetahui jumlah mikroba, maka dapat diketahui kualitas mikrobiologi dari bahan tersebut. Bahan yang dapat dikatakan baik jika jumlah mikroba yang terkandung dalam bahan tersebut masih di bawah jumlah standar yang telah ditentukan oleh suatu lembaga. Kandungan mikroba pada suatu bahan juga sangat menentukan tingkat kerusakannya, serta dapat ditentukan oleh tingkat kelayakan untuk dikonsumsi.

Jumlah mikroba dalam suatu bahan dapat dihitung menggunakan beberapa cara. Namun secara garis besar dibedakan menjadi :

a. Cara perhitungan langsung

Cara perhitungan langsung berarti kita dapat mengetahui beberapa jumlah mikroba pada saat dilakukan perhitungan. Hasil perhitungan secara langsung menunjukkan seluruh jumlah mikroba yang masih hidup maupun yang sudah mati. Adapun caranya:

- 1) Pembuatan preparat sederhana yang diwarnai
 - a) Menggunakan ruang hitung
- b. Cara perhitungan tidak langsung

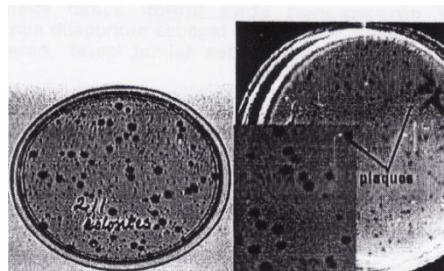
Cara perhitungan tidak langsung, hasil perhitungan jumlah mikroba baru dapat diperoleh kemudian setelah dilakukan perlakuan terlebih dahulu. Hasil perhitungan tidak langsung akan menunjukkan jumlah mikroba yang masih hidup saja. Adapun caranya :

 - 1) Menghitung jumlah total mikroba (*Total Plate Count* = Angka Lempeng Total)
 - 2) Cara pengenceran
 - 3) Memperkirakan jumlah terkecil mikroba yang ada (MPN = *Most Probable Number*)
 - 4) Cara kekeruhan (turbiditas)

Cara perhitungan tidak langsung dapat digunakan baik untuk bahan padat maupun cair. Khusus untuk bahan padat maka sebelum dilakukan perhitungan bahan itu perlu dilakukan pelarutan atau dibuat suspensi, dengan memperhitungkan faktor pengencerannya.

Prinsip Pengenceran

Sediaan yang telah dihomogenkan dan diencerkan dengan pengenceran yang sesuai ditanam pada media agar (PCA = *Plate Count Agar*), setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Satuan perhitungan jumlah mikroba dikenal dengan istilah **Colony Forming Units (CFUs)** untuk perhitungan bakteri dan kapang/khamir.



Gambar 35. Perhitungan koloni mikroba yang tumbuh pada media

Faktor pengenceran = pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan

Jumlah koloni = jumlah koloni x 1/faktor pengenceran

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.



Gambar 36. Syarat koloni yang dihitung

Standar Perhitungan

Cawan yang dipilih adalah yang mengandung jumlah koloni 30 – 300 koloni, beberapa koloni yang bergabung menjadi satu dihitung sebagai satu koloni, maupun koloni yang seperti sederetan garis tebal. Hasil yang dilaporkan terdiri dari 2 angka, yaitu angka pertama didepan koma dan angka kedua dibelakang koma. Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua.

10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
234	28	1	$2,3 \times 10^4$
700	125	10	$1,3 \times 10^5$

Jika semua pengenceran menghasilkan **angka kurang dari 30 koloni** pada cawan Petri maka hanya **koloni pada pengenceran terendah yang dihitung**. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 koloni dikalikan dengan faktor pengenceran tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
16	28	1	$<3,0 \times 10^3$ ($1,6 \times 10^3$)

Jika semua pengenceran menghasilkan **angka lebih dari 300 koloni** pada cawan Petri maka hanya **koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung**. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 koloni dikalikan dengan faktor pengenceran tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan di dalam kurung. Cara perhitungan hanya ¼ bagian saja kemudian hasilnya dikalikan.

10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
TBUD	TBUD	355	>3,0 x 10 ⁶ (3,6 x 10 ⁶)

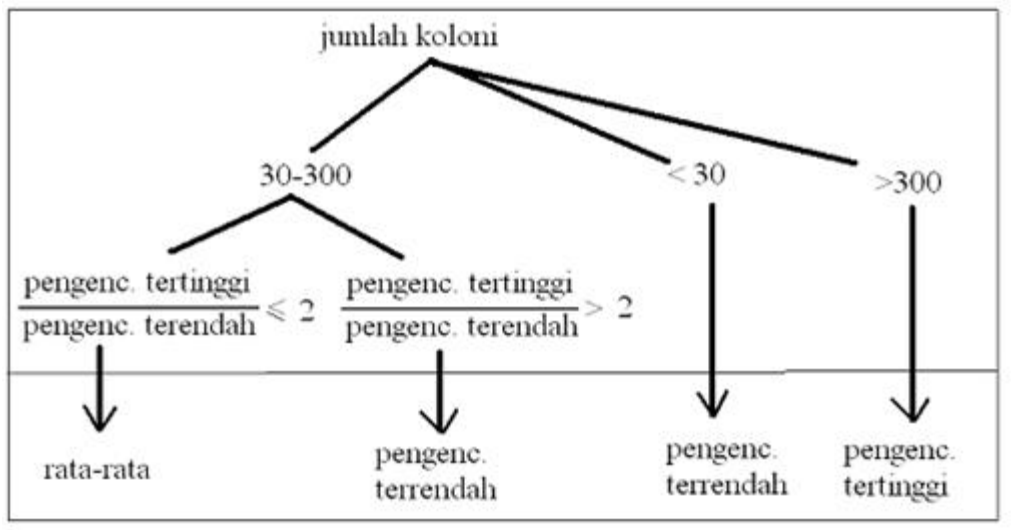
Jika semua pengenceran menghasilkan **angka antara 30 – 300 koloni** pada cawan Petri. Perbandingan dari pengenceran tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata rata dari kedua pengenceran tersebut dengan mem[perhitungkan pengenceranya. Jika perbandingan antara hasil pengenceran tertinggi dan terendah hasilnya **lebih dari 2 maka yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil**.

10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
293	41	4	3,5 x 10 ⁴ [rata rata 41.000/29.300=1,4 (<2)]
140	32	2	1,4 x 10 ⁴ [rata rata 321000/14000=2,3 (>2)]

Jika digunakan dua cawan Petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tidak memenuhi syarat 30-300 koloni. Berikut contoh duplo :

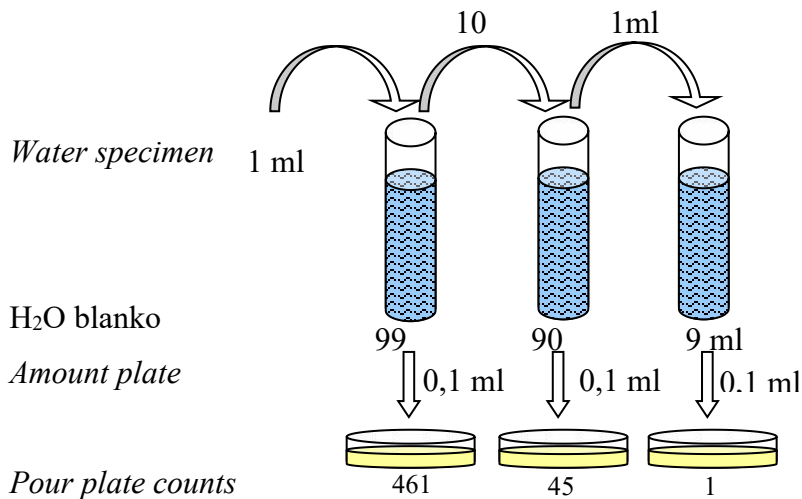
10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
175	16	4	1,9 x 10 ⁴
208	17	2	Rata-rata pengenceran 10 ⁻²
10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)
138	42	4	1,5 x 10 ⁴
162	43	2	Rata-rata pengenceran 10 ⁻² Karena perbandingan pengenceran 10 ⁻³ dan 10 ⁻² = 2,4
10-2	10-3	10-4	SPC (Standar Plate count)

290	36	4	$3,1 \times 10^4$
280	32	2	Rata-rata pengenceran 10^{-2}
			Karena perbandingan pengenceran 10^{-3} dan $10^{-2} = 1,2$



Gambar 37. Bagan untuk mempersingkat syarat SPC

Contoh studi kasus :



Dimasukkan contoh sampel air sebanyak 1 ml ke dalam 99 ml larutan pengencer, kemudian diambil 10 ml dimasukkan kembali ke dalam 90 ml larutan pengencer. Dari sini diambil kembali 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan pengencer. Pada semua pengenceran dimasukkan 0,1 ml ke medium PCA di cawan petri sehingga diperoleh jumlah koloni 461 pada pengenceran pertama dan 45 pada pengenceran kedua. Berapakah jumlah koloni dari tahapan tersebut ?

Jawab :

- a) Jumlah koloni yang memenuhi syarat adalah **45** koloni
- b) Total pengenceran pada tabung kedua adalah $1/10^2 \times 10/100 = 1/10^3$
- c) Jumlah sampel yang dimasukkan ke cawan = **0,1** ml
- d) Faktor pengenceran = Pengenceran x jumlah sampel yang ditumbuhkan = $1/10^3 \times 1/10 = 1/10^4 = 10^{-4}$
- e) Jumlah koloni = jumlah koloni x 1/faktor pengenceran = $45 \times 1/10^{-4} = 4,5 \times 10^5$ (penulisan SPC) atau 450.000/ml.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat & Bahan

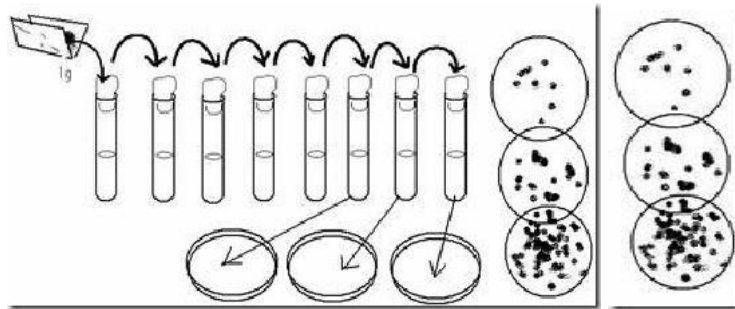
Alat :

- 1) Cawan Petri steril
- 2) Tabung reaksi
- 3) Pipet volume
- 4) Vortex
- 5) Lampu Bunsen

Bahan : tanah, Akuades steril, alcohol 70%, Medium Petri PCA

b. Prosedur kerja :

- 1) Timbang tanah seberat 1 gram
- 2) Tanah seberat 1 g dimasukan ke dalam akuades steril 9 ml (tabung pengenceran 10^{-1}) secara aseptis dan divortex, lalu ambil 1 ml larutan masukan dalam 9 ml akuades steril (pengenceran 10^{-2}) dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-7}
- 3) Dari masing-masing 3 pengenceran terakhir (pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada medium Petri PCA (*Plate Count Agar*)
- 4) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam
- 5) Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut
- 6) Hitung jumlah mikroba pada masing-masing Petri tersebut.



Gambar 38. Isolasi mikroorganismenya dari sampel tanah

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

10-4	10-5	10-6	SPC (<i>Standar Plate count</i>)
.....

Perhitungan :

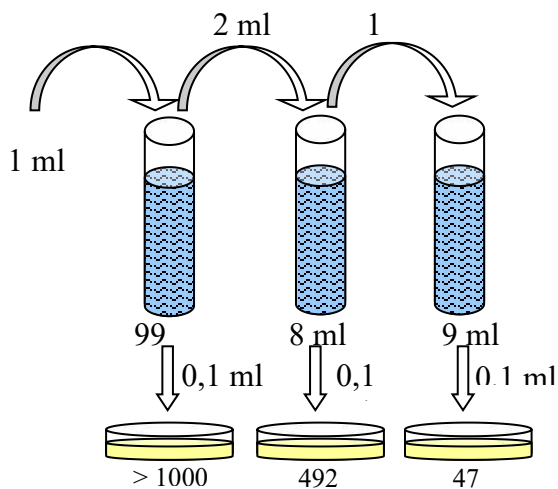
b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

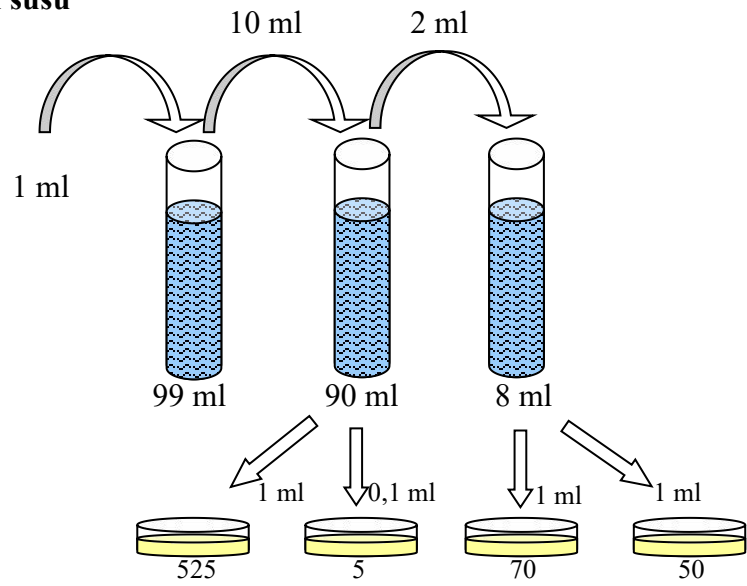
7. Soal Latihan

Dilakukan 3 pengenceran yang berbeda, berapakah jumlah koloni dari masing-masing sampel di bawah ini :

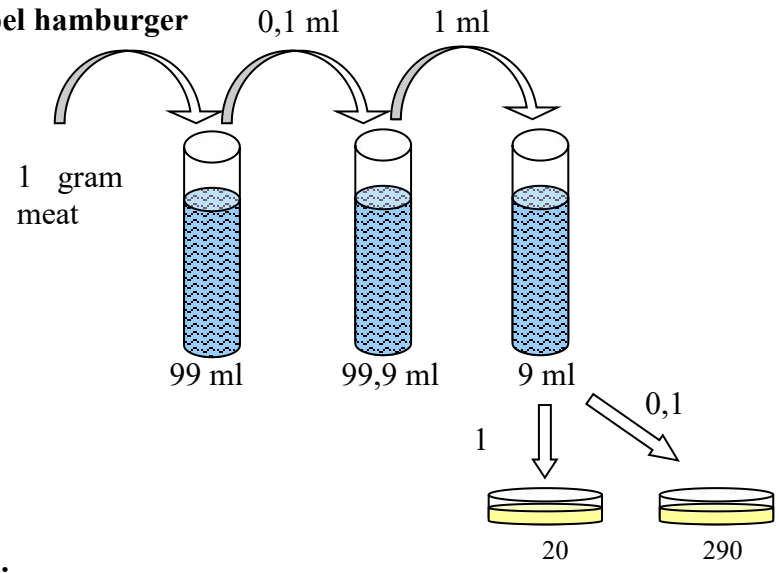
a. Sampel air



b. Sampel susu



c. Sampel hamburger



JAWAB :

a. Sampel Air

b. Sampel Susu

c. Sampel Hamburger

8. Daftar Pustaka

- a. Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Penerbit UI Press. Jakarta.
- b. Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York
- c. Prescott, L.M, J.P. Harley & D.A. Klein. 2003. *Mikrobiologi*, 5th ed. Mc Graw Hill, Singapore
- d. Denyer, S.P, N.A. Hodges & S.P. Gorman. 2004. *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. Seventh edition. Blackwell Science, Massachusetts .

Praktikum 5. PEWARNAAN BAKTERI

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji identifikasi bakteri

2. Indikator Capaian

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji identifikasi bakteri Gram positif maupun negatif

3. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu melakukan uji identifikasi bakteri gram positif dan gram negatif

4. Uraian Teori

Bakteri adalah mikroba uniseluler bersifat transparan dan tidak berwarna, sehingga sulit dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya, karena tidak mengabsorpsi ataupun membiaskan cahaya. Teknik pewarnaan merupakan cara yang banyak dipergunakan untuk melihat struktur dan morfologi bakteri.

Sel bakteri mengandung bermacam-macam senyawa kimia antara lain lipida, asam nukleat dan protein. Zat-zat itu akan bereaksi dengan zat warna asam atau basa dengan hasil kenampakan yang berbeda. Kadang bagian tertentu dari sel bakteri harus diberi pewarnaan khusus untuk dapat dilihat. Asam nukleat kuman mengandung gugus fosfat bermuatan negatif yang dapat mengikat warna basa yang bermuatan positif. Zat warna asam tidak dapat mewarnai latar belakangnya. Zat warna asam terikat dengan protoplasma bakteri secara kimia dan zat warna yang digunakan berbentuk garam. Akan tetapi umumnya zat warna yang digunakan untuk pewarnaan bakteri adalah zat warna basa seperti: metilen-blue, kristal-ungu, karbol fuchsin.

Penggunaan satu macam zat warna untuk pewarnaan bakteri sering tidak menghasilkan pengamatan yang baik, oleh karena umumnya bakteri diwarnai menggunakan lebih dari satu zat warna. Sebelum diberi zat warna sel bakteri perlu difiksasi yaitu mematikan sel pada preparat ulas tanpa mengakibatkan perubahan bentuk dan struktur yang ada di dalam sel. Selain itu dengan fiksasi,

maka afinitas sel terhadap zat warna menjadi meningkat sehingga zat warna lebih kuat melekat pada sel.

Pewarnaan bakteri ada beberapa cara yang dapat dikelompokkan :

- a. Pewarnaan sederhana
 - 1) Pewarnaan langsung
 - 2) Pewarnaan tidak langsung
- b. Pewarnaan diferensial
 - 1) Pewarnaan Gram
 - 2) Pewarnaan acid-fast
 - 3) Pewarnaan struktur sel
- c. Pewarnaan Endospora
- d. Pewarnaan Flagela dan pewarnaan Kapsul

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Pewarnaan Sederhana

1) Alat dan Bahan

Alat: jarum ose, objek glass, lampu Bunsen, mikroskop

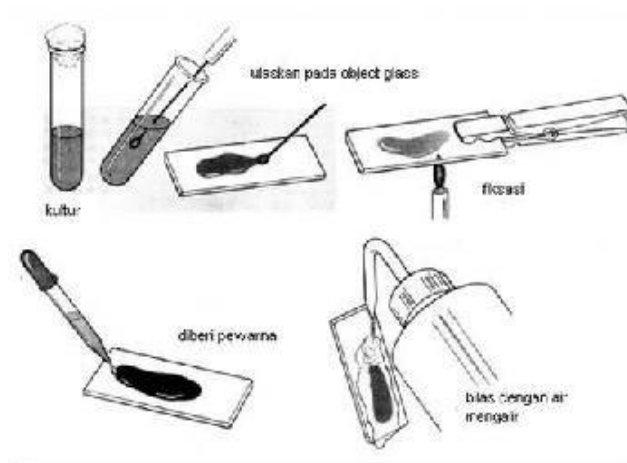
Bahan: biakan kuman *Bacillus sp.*, *Klebshiella sp.*, *Streptococcus sp.*, *E. Coli*, *karbol fuchsin*, *Methylen Blue*.

2) Prosedur Kerja

- a) Siapkan biakan murni bakteri (berumur 24 jam), bersihkan geas objek dengan alkohol lewatkan di atas nyala api untuk menghindari lemak. Buat bulatan dengan pensil gelas untuk membatasi zat warna pembuatan preparat ulas, letakan di tempat pewarnaan.
- b) Jika bakteri yang diperiksa ditanam di media cair, ambil satu sengkeli ditaruh di atas gelas objek ratakan 1-2 cm. Jika biakan berasal dari media padat, maka buat suspensi biakan dengan satu mata ose NaCl fisiologis (bisa juga akuades steril) di atas gelas objek. Biarkan mengering di udara atau dilewatkan di api bunsen (difiksasi)
- c) Tuang dengan zat warna yang telah disaring misalnya : air, *methylen blue* atau *karbol fuchsin*. Diamkan selama 30-60 detik.
- d) Zat warna dibuang, dengan cara bilas dengan akuades mengalir

e) Preparat dikeringkan dengan kertas saring atau dikeringkan di udara, tetesi dengan minyak imersi periksa dengan mikroskop

Hasil pewarnaan : Bakteri berwarna biru (menggunakan *methylen blue*), berwarna merah (menggunakan karbol fuchsin)



Gambar 39. Pewarnaan sederhana

b. Pewarnaan Gram

a. Alat dan Bahan

Alat : jarum ose, objek glass, lampu Bunsen, mikroskop

Bahan : Biakan Kuman *Staphylococcus sp.*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Klebshiella sp.* Zat warna : karbol kristal ungu 0,5% (Gram A), cairan lugol (Gram B), alkohol 96% (Gram C), *karbol fuchsin* 0,5% atau safranin (Gram D).

b. Prosedur kerja :

- a) Buatlah preparat ulas bakteri biakan murni
- b) Teteskan larutan cat utama (kristal violet) sebanyak 2 tetes, diamkan 5 menit cuci dengan air mengalir, keringkan.
- c) Cuci dengan air mengalir
- d) Teteskan lugol (Gram B), diamkan 1 menit cuci dengan air mengalir
- e) Cuci dengan alkohol 96% (Gram C) sambil digoyang-goyangkan selama 30 detik atau sampai zat warna luntur mengalir dari preparat
- f) Cuci dengan air mengalir

g) Preparat ditetaskan dengan safranin/air fuchsin (Gram D) diamkan selama 1-2 menit. Cuci dengan air mengalir keringkan diantara kertas saring atau di udara.

h) Amati di mikroskopsop.

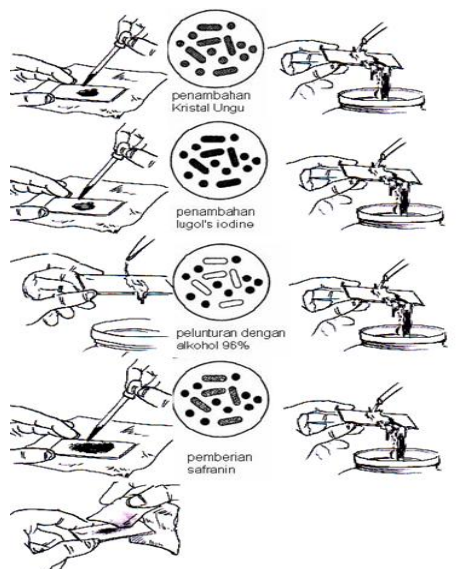
Hasil pewarnaan :

bakteri gram positif berwarna ungu,

bakteri gram negatif berwarna merah.

1. Unstained	Clear	Clear
2. Crystal violet	Violet	Violet
3. Iodine	Violet	Violet
4. Decolorization (Alkohol-acetone)	Violet	Clear
5. Safranin	Purple	Red

Gambar 40. Skema tahap dan hasil pewarnaan



Gambar 41. Skema tahap pewarnaan gram

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Pewarnaan Sederhana

Pengamatan	<i>Methylen blue</i>	<i>Karbol Fuchsin</i>
Nama bakteri :		
Bentuk sel		
Warna sel		
Keterangan		

Pewarnaan Gram

Pengamatan	Gram positif	Gram negatif
Nama bakteri :		
Bentuk sel		
Warna sel		
Keterangan		

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Mengapa pewarnaan Gram dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri?
- Apa yang dimaksud dengan bakteri gram positif bakteri dan gram negatif?
- Mengapa sel bakteri gram negatif berwarna merah, sedangkan bakteri gram positif berwarna ungu setelah pewarnaan gram?
- Sebutkan prinsip dari pewarnaan gram ?
- Bagaimana mekanisme tahapan pewarnaan bakteri gram ?

- f. Mengapa perlu dilakukan fiksasi bakteri sebelum pewarnaan sel ?
- g. Apa fungsi pemberian alkohol 96% dalam teknik pewarnaan gram?

8. Daftar Pustaka

Cappuccino JG, Welsh C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. 11th ed. (Cappuccino JG, ed.). Edinburgh: Pearson; 2017.

PRAKTIKUM 6. MORFOLOGI KAPANG DAN KHAMIR

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji identifikasi kapang dan khamir

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan identifikasi kapang secara makroskopis dan mikroskopis struktur kapang
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan metode Heinrich

3. Tujuan Praktikum

- a. Mahasiswa mampu melakukan uji identifikasi kapang secara makroskopis dan mikroskopis struktur kapang
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan metode Heinrich

4. Uraian Teori

Fungi (jamur) terbagi dalam :

- a. *Unicellular* (*yeast*/khamir)
- b. *Yeast* merupakan fungi mikroskopik uniseluler, tidak membentuk hifa (beberapa spesies dapat membentuk pseudohifa). Bentuk selnya bervariasi dapat berbentuk bulat, bulat telur, bulat memanjang dengan ukuran 1-9x20 μm . Beberapa spesies *yeast* memiliki sifat dimorfisme yaitu bentuk sel tunggal dan bentuk hifa atau pseudohifa. Pseudohifa adalah hifa yeast yang terbentuk dari rangkaian sel hasil pembelahan aseksual secara budding, tetapi tidak melepaskan diri dari induk. Morfologi internal sel mudah dilihat dan terdiri dari inti dan organel seperti mitokondria, granula lemak dan glikogen.
- c. *Filamentous* (*mould*/kapang), kapang merupakan kelompok fungi yang memiliki struktur filament yang disebut hifa. Hifa membentuk kumpulan massa yang dinamakan miselium.
- d. *Filament* beragregat membentuk tubuh buah (*mushroom*/cendawan). Sel khamir bersifat *unicellular*, dengan ukuran yang relatif lebih besar dari sel

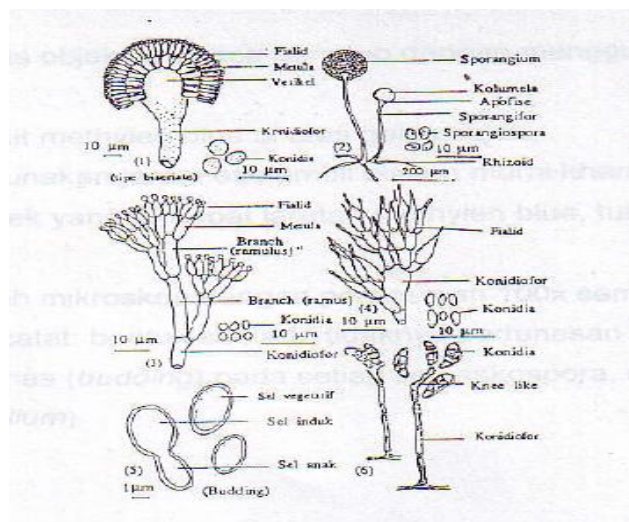
bakteri, tidak membentuk miselium tetapi dapat membentuk miselium semu (*pseudomyselium*).

A. Identifikasi Kapang Genus *Aspergillus*

Koloni genus *Aspergillus* tumbuh sangat cepat dengan warna koloni putih, kuning, kuning kecokelatan, coklat, hitam atau hijau. Konidiophore (pada umumnya aseptik) tidak bercabang, memiliki pengembangan di ujung konidiophore membentuk vesikel dan konidia terdapat di atas *conidia head* (kepala konidia yang terdiri dari phialid atau metula). Genus *Aspergillus* banyak terdapat di daerah tropis dan subtropics selain mengkontaminasi sebagian besar produk pangan juga dapat menghasilkan senyawa toksin, enzim, maupun asam organik.

B. Mengamati sel morfologi kapang dengan metode *Slide Culture* (*Microculture*)

Teknik ini bertujuan untuk mengamati sel kapang dengan menumbuhkan spora pada *object glass* yang ditetesi media pertumbuhan. Pengamatan struktur spora dan miselium dapat juga dilakukan dengan preparat ulas. Namun seringkali miselium atau susunan spora menjadi pecah atau terputus sehingga penampakan di mikroskop dapat membingungkan. Dengan teknik ini, spora dan miselium tumbuh langsung pada *slide* sehingga dapat mengatasi masalah tersebut.



Gambar 45. Morfologi kapang : 1. *Aspergillus oryzae*, 2. *Rhizopus oryzae*, 3. *Penicillium*, 4. *Paecilomyces*, 5. *Saccharomyces cereviceae*, 6. *Curvularia lunata*

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat & Bahan

Alat: Jarum tanam tajam, Objek glass dan cover glass

Bahan: Larutan laktofenol dan methylen blue serta biakan kapang *Aspergillus* dan khamir

b. Prosedur Kerja :

1) Kapang

a) Pengamatan Makroskopis

1. Tanam biakan murni kapang pada tabung, kemudian pindahkan ke cawan petri dengan menggunakan jarum ose
2. Inkubasi selama 4-5 hari pada suhu kamar
3. Amati setiap hari perubahan warna pada koloni, keadaan permukaan koloni (rata, menggunung, seperti tepung, beludru, kapas), ada tidaknya garis-garis radial, ada tidaknya garis atau lingkaran (*zonation*), ada tidaknya *exudate drop*, warna sebalik koloni.

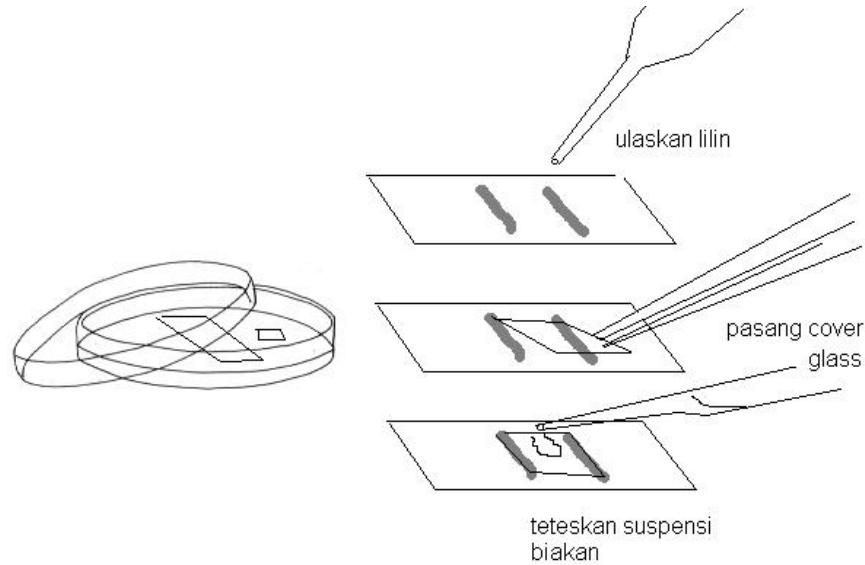
b) Pengamatan Mikroskopis

1. Bersihkan objek glass dengan alkohol 70%
2. Buat preparat ulas
 - a. ambil kapang dengan jarum tanam tajam
 - b. teteskan larutan laktofenol
3. Tutup dengan cover *glass*, amati di bawah mikroskop.

c) Pengamatan **Metode Heinrich's**

1. Siapkan *object glass*, *cover glass*, kapas, dan akuades steril 2 ml yang dimasukkan dalam cawan Petri.
2. Letakkan pentul korek pada *object glass* sebelah kiri dan kanan tempat yang akan ditutup *cover glass*. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
3. Teteskan spora jamur dalam media cair pada media *object glass* tersebut. Berikan sampai setengah luasan *object glass*. Tekan *cover glass* secara media merata.

4. Inkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam.
5. Ambil preparat dan amati di bawah mikroskop.



Gambar 46. Metode *Heinrich's slide culture*

2) Khamir

- a) Bersihkan objek glass dengan alkohol 70%
- b) Teteskan sedikit *methylen blue* di atas objek glass
- c) Dengan menggunakan jarum ose ambil biakan murni khamir, letakkan di atas objek glass tersebut
- d) Tutup dengan *cover glass*, amati di bawah mikroskop.
- e) Gambar dan catat : bentuk sel, ada tidaknya pertunasan (*budding*), banyaknya tunas (*budding*) pada setiap sel, askospora, miselium semu (*pseudomyselium*).

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

1) Kapang

No	MAKROSKOPIS		MIKROSKOPIS	
1	Media pertumbuhan		Media pertumbuhan	
2	Umur isolat		Umur biakan	
3	Warna koloni		Tipe konidiophore	

4	Warna sebalik koloni		<i>Vesicle</i>	
5	<i>Zonasi</i>		<i>Metulae</i>	
6	<i>Radiate</i>		<i>Phialid</i>	
7	<i>Exudate drop</i>		<i>Conidial</i>	

2) Khamir

No	MIKROSKOPIS	
1	Bentuk sel	
2	Ukuran sel	
3	<i>Budding</i>	
4	<i>Miselium</i>	
5	Letak spora	

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Sebutkan karakteristik kapang ?
- Apa fungsi pemberian larutan laktofenol (Lactophenol cotton blue) pada pengamatan mikroskopis kapang?
- Sebutkan tahapan pembuatan slide culture secara ringkas?
- Apa saja yang perlu diamati pada pengamatan mikroskopis kapang?
- Mengapa cawan petri (petridish) harus dibalik selama proses inkubasi kapangberlangsung ?

8. Daftar Pustaka

- Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Penerbit UI Press. Jakarta.
- Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York
- Prescott, L.M, J.P. Harley & D.A. Klein. 2003. *Mikrobiologi*, 5th ed. Mc Graw Hill, Singapore

PRAKTIKUM 7. PENENTUAN KADAR HAMBAT MINIMAL ANTIBIOTIK

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji potensi antimikroba

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji potensi antimikroba menggunakan metode difusi secara silinder
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji potensi antimikroba menggunakan metode difusi secara cakram

3. Tujuan Praktikum

- a. Mahasiswa mampu melakukan uji potensi antimikroba menggunakan metode difusi secara silinder
- b. Mahasiswa mampu melakukan uji potensi antimikroba menggunakan metode difusi secara cakram

4. Uraian Teori

Uji antibakteri ada beberapa macam, yaitu :

a. Metode difusi

Pada metode ini zat antibakteri berdifusi pada lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Dasar pengamatannya adalah terbentuk zona hambat di sekeliling cakram atau silinder yang berisi antibakteri. Metode ini dipengaruhi faktor fisik dan kimia, selain antara obat dan organisme.

1) Cara Parit (*ditch*)

Pada medium agar yang telah diinokulasi dengan bakteri dibuat parit kemudian diisi dengan zat antibakteri dan diinkubasi pada suhu dan jangka waktu sesuai dengan jenis bakteri uji. Pengamatan dilakukan atas ada atau tidaknya hambatan di sekeliling parit.

2) Cara Silinder

Pada medium agar yang telah diinokulasi dengan bakteri dibuat lubang, diletakkan silinder kemudian diisi dengan zat antibakteri, setelah itu diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan jenis bakteri

uji. Pengamatan dilakukan atas dasar ada atau tidaknya hambatan di sekeliling silinder.

3) Cara Cakram

Kertas cakram yang mengandung zat antibakteri diletakkan diatas lempeng, setelah diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan bakteri uji. Pengamatan dilakukan atas ada atau tidaknya hambatan di sekeliling cakram.

b. Metode dilusi

Metode ini menggunakan antibakteri yang turun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat, kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Dasar pengamatannya adalah dengan melihat tumbuh atau tidaknya bakteri.

1) Cara Pengenceran Tabung (Metode Kirby-Bauer)

Pada metode ini zat yang akan diuji kepekaan antibakterinya diencerkan secara serial dengan pengenceran kelipatan dua dalam medium cair, kemudian diinokulasikan dengan bakteri uji, inkubasi pada suhu 37°C selama 18-21 jam (untuk bakteri) dan pada suhu kamar 1-2 minggu (untuk jamur). Aktivitas antibakteri ditentukan sebagai konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

2) Cara Penapisan Lempeng

Pada metode ini zat yang akan diuji antibakterinya diencerkan secara serial dengan pengenceran kelipatan dua dalam medium agar pada suhu 40-50°C, kemudian dituang dalam cawan Petri. Setelah lempeng agar membeku ditanam inokulum bakteri dan diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan pertumbuhan bakteri uji. Kadar hambat minimum zat antibakteri yang diuji, ditentukan sebagai konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

c. Turbidimetri

Pada metode ini pengamatan aktivitas didasarkan atas kekeruhan yang terjadi pada medium pembenihan. Pertumbuhan bakteri juga dapat

ditentukan dari perubahan yang terjadi sebelum dan sesudah inkubasi, yang dilakukan dengan mengukur serapannya secara spektrofotometer. Adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan peningkatan jumlah sel bakteri, yang mengakibatkan meningkatnya kekeruhan. Kekeruhan yang terjadi umumnya berbanding lurus dengan serapan.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan	Alat
1. Mikroba uji standart	1. Tabung reaksi
2. Antibiotika uji (obat)	2. Jarum Ose
3. Akuades steril	3. Pipet ukur
4. Larutan dapar fosfat pH 6-8	4. Bakteri
	5. Labu ukur

b. Prosedur kerja :

- 1) Sediakan biakan kuman standart dalam kaldu nutrisi atau medium NB pada agar miring suhu 37°C selama 10 -24 jam, buat inokulasi dari suspensi kuman standart sesuai dengan reagent Mc. Farland III 0,5 atau 25% transmittan menggunakan alat spektrofotometer.

Pembuatan Inokulum

- a) Siapkan 3 tabung reaksi secara berurut dan diberi nomor 1,2, dan 3 masing – masing diisi NaCl fisiologis /akuades steril sebanyak 9 ml.
- b) Pada tabung pertama diisi 1 ml suspensi kuman sesuai dengan reagent Mc. Farland III 0,5, kocok sampai homogen.
- c) Ambil 1 ml dari tabung pertama dan masukkan pada tabung kedua sesuai dengan reagent Mc. Farland III 0,5, kocok sampai homogen.
- d) Ambil 1 ml dari tabung ke dua, masukkan ke dalam tabung ketiga, kocok sampai homogen, sehingga diperoleh suspensi pengenceran 10 x, 100x, dan 1000x (setara dengan 10⁶ kuman per ml).

2) Pembuatan Larutan Stok Antibiotika

Timbang seksama 25 mg antibiotika dan larutkan dalam labu takar 25 ml dengan pelarut yang cocok sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml, saring dengan filter bakteri. Buat seri pengenceran kelipatan dua sehingga diperoleh kadar : 500 mg/ml, 125 mg/ml, 62,5 mg/ml, 31,2 mg/ml, 15,6 mg/ml, 7,8 mg/ml, 1,95, mg/ml, 0,95 mg/ml, 0,475 mg/ml, dan 0,237 mg/ml.

3) Penentuan KHM

a) Siapkan 24 tabung reaksi, isi tiap tabung dengan 0,8 ml larutan kaldu nutrisi.

b) Tambahkan pada tiap tabung reaksi suspensi kuman (10^6 kuman per ml) sebanyak 0,1 ml.

c) Tambahkan 0,1 ml larutan antibiotik hasil pengenceran pada tiap tabung reaksi, lakukan secara duplo.

d) Inkubasi di inkubator 18-24 jam 37°C .

4) Pembacaan Hasil

Konsentrasi hambat minimal adalah konsentrasi obat terkecil yang menghambat pertumbuhan kuman.

+ : Keruh, ada pertumbuhan kuman

- : Jernih, tidak ada pertumbuhan kuman

Cara Lain Pengujian KHM dengan Cakram

1) Pembuatan Lapisan Dasar (*Base Layer*)

Siapkan cawan Petri steril, tiap cawan diisi 10 ml *base layer* (lapisan dasar medium), usahakan merata memenuhi seluruh permukaan Petri. Biarkan membeku.

2) Pembuatan Lapisan Pembenuhan (*Seed Layer*)

Siapkan 6 tabung reaksi isi masing–masing tabung dengan 4 ml lapisan pembenuhan cair, ratakan sehingga menutupi lapisan *base layer*. Tunggu sampai mengeras masukkan 1 ml suspensi kuman dari pengenceran 1000x, ratakan dengan menggunakan spatel Drugalsky (metode *pour plate*).

3) Pemasangan Silinder (Cakram Kertas)

Letakkan silinder glass atau kertas cakram, di atas permukaan agar dengan jarak satu sama lain \pm 20-35 mm. Inkubasi 24 jam suhu 37°C hitung diameter zona bening yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Jenis Antibiotika	Pengenceran 1000 μ g/ml	Pengenceran 500 μ g/ml	Pengenceran 250 μ g/ml	Pengenceran 125 μ g/ml

Perhitungan :

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Apa perbedaan metode difusi dan dilusi pada pengujian KHM antibiotika ?
- Mengapa perlu dilakukan penentuan KHM pada antibiotika?
- Apa keuntungan dan kerugian menggunakan kertas cakram pada penentuan KHM?
- Sebutkan keuntungan metode difusi dibandingkan dilusi pada uji KHM antibiotika?
- Bagaimana cara menghitung zona hambat pada uji KHM metode difusi kertas cakram?

8. Daftar Pustaka

- Denyer S. and R. Baird, *Guide to Microbiological Control In Pharmaceuticals*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 190.

- b. Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Penerbit UI Press. Jakarta.
- c. Denyer, S.P, N.A. Hodges & S.P. Gorman. 2004. *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. Seventh edition. Blackwell Science, Massachusetts .

PRAKTIKUM 8. PENENTUAN UJI RESISTENSI ANTIMIKROBA

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji resistensi antimikroba

2. Indikator Capaian

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji resistensi antimikroba menggunakan metode difusi secara cakram

3. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu melakukan uji potensi antimikroba menggunakan metode difusi secara cakram

4. Uraian Teori

Uji resistensi (uji kepekaan) adalah suatu pengujian untuk mengetahui kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Telah diketahui bahwa antibiotik merupakan bahan yang cukup representatif untuk membunuh bakteri. Penggunaan antibiotik yang tidak terkendali telah menyebabkan terjadinya efek samping yang sangat membahayakan yaitu menyebabkan bakteri-bakteri tertentu menjadi tahan atau resisten terhadap antibiotik. Untuk mengetahui bakteri-bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik maka dilakukan uji resistensi.

Penentuan uji resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yaitu dilusi dan difusi agar. Metode difusi agar adalah metode yang paling sering digunakan. Bakteri ditumbuhkan pada medium lempeng agar, kemudian bahan antibiotik dipaparkan dengan menempatkannya di atas kertas berbentuk cakram (*paper disk*) dan diletakan di atas lempeng agar tersebut. Media kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Ketahanan bakteri terhadap antibiotik dilihat berdasarkan daerah hambat (zona bening) yang terbentuk di sekeliling *paper disk* antibiotik tersebut. Penilaian terhadap zona hambat (mm) yang dihasilkan dibandingkan dengan tabel interpretasi diameter zona

hambat pada *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Hasil penilaiannya berupa :

- a. Sensitif (S) : apabila diameter zona hambat \geq diameter zona standar
- b. Intermediate (I) : apabila diameter zona hambat diantara resisten dan sensitif
- c. Resisten (R) : apabila diameter zona hambat \leq diameter zona hambat standar.

Tabel 1. Interpretasi Zona Hambat *Disk Content* Antibiotik Berdasarkan Tabel CLSI 2014 terhadap bakteri *S.aureus*

Antibiotika	Disk content (µg)	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Sensitif (S)	Intermediate (I)	Resisten (R)
Gentamicin	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Ampicillin	10	≥ 29	-	≤ 28
Cefotaxime	30	≥ 24	21-23	≤ 20
Tetracycline	30	≥ 19	15-18	≤ 14
Amikasin	30	≥ 17	15-16	≤ 14

Tabel 2. Interpretasi Zona Hambat *Disk Content* Antibiotik Berdasarkan Tabel CLSI 2014 terhadap bakteri *E. coli*

Antibiotika	Disk content (µg)	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Sensitif (S)	Intermediate (I)	Resisten (R)
Gentamicin	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Ampicillin	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Cefotaxime	30	≥ 26	23-25	≤ 22
Tetracycline	30	≥ 15	12-14	≤ 11
Amikasin	30	≥ 17	15-16	≤ 14

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

- 1) Tabung Reaksi
- 2) Jarum Ose
- 3) Cawan Petri
- 4) Beaker Glass

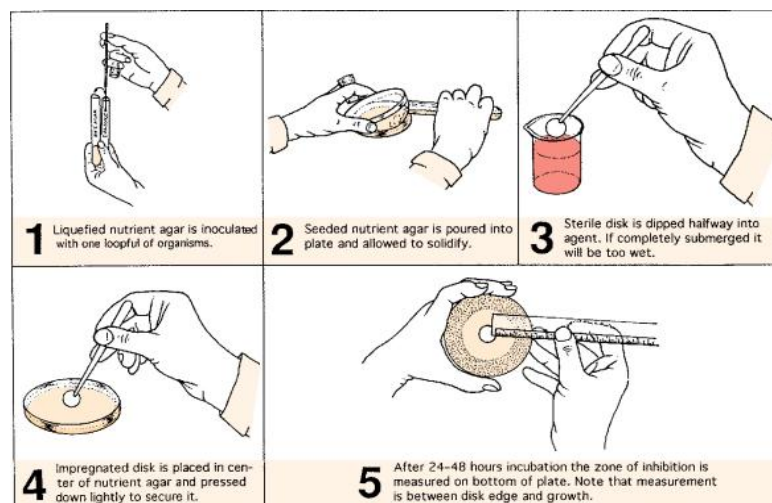
Bahan :

- 1) Biakan (Agar Culture)
- 2) NaCl Fisiologis
- 3) Antibiotik
- 4) Aquades Steril

- 5) Pinset Steril
- 6) Bunsen
- 7) Jangka Sorong
- 8) Spatel drugalsky
- 5) *Paper disk*
- 6) Spiritus

b. Prosedur Kerja

- 1) Persiapkan biakan bakteri yang sudah ditanam dalam medium Agar Miring
- 2) Secara aseptis, ambil 1 (satu) Ose biakan dari medium Agar Miring, masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl Fisiologis;
- 3) Suspensikan biakan dengan Vortex;
- 4) Ukur Densitas/Kekeruhan suspensi dengan membandingkannya dengan Reagent Mc. Farland III 0,5;
- 5) Ambil 100 μ L suspensi dengan menggunakan Micropipet, tebarkan di atas medium Agar Plate yang sudah padat, ratakan dengan spatel drugalsky;
- 6) Dengan menggunakan Pinset Steril, celupkan *Paper Disk* ke dalam larutan antibiotik, kemudian tempatkan di atas Lempeng Agar;
- 7) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam;
- 8) Amati dan Ukur Zona Hambat yang terbentuk.



Gambar 47. Pengujian resistensi antimikroba

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Jenis isolat	Diameter zona hambat (mm)		
	Antibiotika	Antibiotika	Antibiotika

Perhitungan :

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Kapan pengujian resistensi antimikroba pada seorang pasien perlu dilakukan?
- Apa yang dimaksud dengan resistensi antimikroba?
- Sebutkan alasan terjadinya peningkatan resistensi antimikroba di Indonesia?
- Bagaimanakah cara melakukan pengujian resistensi antibiotika?
- Sebutkan metode pada uji resistensi antibiotika?

8. Daftar Pustaka

- Denyer S. and R. Baird, *Guide to Microbiological Control In Pharmaceuticals*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 190.
- Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit UI Press. Jakarta.
- Denyer, S.P, N.A. Hodges & S.P. Gorman. 2004. *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. Seventh edition. Blackwell Science, Massachusetts .

PRAKTIKUM 9. UJI KOEFISIEN FENOL

1. Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan uji koefisien fenol

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji antiseptika
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji desinfektan

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami uji desinfektan dengan pembandingan fenol serta menyimpulkan kekuatannya

4. Uraian Teori

Fenol adalah zat pembaku daya antiseptik obat lain sehingga daya antiseptik dinyatakan dalam koefisien fenol. Mekanisme kerja fenol sebagai desinfektan yaitu dalam kadar 0,01% - 1% fenol bersifat bakteriostatik. Larutan 1,6% bersifat bakterisid, yang dapat bersifat mengadakan koagulasi protein. Ikatan protein dan fenol mudah lepas sehingga fenol dapat berpenetrasi ke dalam kulit utuh. Larutan 1,3% bersifat fungisid, berguna untuk sterilisasi alat kedokteran.

Senyawa turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hydrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sel dan membran sitoplasma mengalami lisis.

Banyak zat kimia dapat menghambat atau mematikan mikroorganisme berkisar dari unsure logam berat, seperti perak dan tembaga sampai kepada molekul organik yang seperti persenyawaan ammonium kurtener. Berbagai substansi tersebut menunjukkan efek antimikrobiahnya dalam berbagai cara dan terhadap berbagai macam mikroorganisme. Efeknya terhadap permukaan benda atau bahan juga berbeda-beda ada yang serasi dan ada yang bersifat merusak. Dari uraian di atas maka perlu sekali diketahui terlebih dahulu perilaku suatu bahan kimia setelah digunakan untuk penerapan praktis-praktis tertentu.

Metode koefisien fenol merupakan cara membandingkan dan mengevaluasi potensi desinfektan, dan dipergunakan bahan kimia murni sebagai pembanding (Rideal Walker 1903). Metode koefisien fenol menggunakan pengenceran tertinggi (konsentrasi terendah) dari bahan kimia/desinfektan yang mematikan mikroba uji dalam satu seri interval waktu tertentu, pada kondisi waktu tertentu. Hasilnya dibandingkan terhadap aktivitas yang diberikan oleh fenol sebagai pembanding.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan: *Nutrient broth* (NB), akuades, bakteri uji *Staphylococcus aureus*.

Alat: Tabung reaksi, ose, pencatat waktu (timer), inkubator, Erlenmeyer, pipet ukur.

b. Prosedur kerja

1) Pembuatan media

Media *Nutrient Broth* (NB) dibuat dalam tabung sebanyak 10 ml. Media ini dibuat sebanyak 21 buah.

2) Persiapan bakteri uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanam pada medium NA agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Buat pengenceran setara dengan Mc. Farland III atau ukur 25% transmittan jika menggunakan spektrofotometer.

3) Pembuatan larutan baku fenol

Buat larutan baku induk fenol 2% atau dengan cara menimbang 2 gram kristal fenol dalam 100 ml air, kemudian encerkan dengan perbandingan 1:80; 1:90; 1:100; volume yang diperlukan untuk pengujian adalah 5 ml baku fenol.

4) Pembuatan larutan desinfektan

Dibuat larutan desinfektan dalam akuades steril sehingga diperoleh larutan dengan perbandingan sebagai berikut : 1:100; 1:150; 1:200; 1:250. Volume pengujian adalah 5 ml dari tiap-tiap pengenceran.

5) Proses inokulasi

- a) Siapkan 6 tabung reaksi yang berisi disinfektan dan larutan baku fenol. Masukkan masing-masing sebanyak 5 ml dari larutan tersebut. Kemudian semua tabung ke dalam penangas air pada suhu 20°C dan biarkan selama 5 menit.
- b) Tambahkan 0,5 ml biakan bakteri hasil pengenceran 100x, catat waktu kontak, aduk hingga homogen kemudian dimasukkan ke dalam vortex mixer
- c) Pasang timer dan biarkan kontak selama 5 menit kemudian lakukan transfer pertama dengan jalan menginokulasi 1 jarum ose dari tabung campuran disinfektan dan fenol masing-masing ke dalam medium NB, inkubasi biakan selama 24-48 jam pada suhu 37°C.
- d) Lakukan hal yang sama setelah kontak 10 dan 15 menit (lakukan duplo untuk masing-masing inokulum).

Ket. (+) ; ada pertumbuhan,

(-) ; tidak ada pertumbuhan

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Hitunglah koefisien fenol

Koefisien fenol adalah hasil bagi dari faktor pengenceran tertinggi disinfektan dengan faktor pengenceran tertinggi baku fenol yang masing-masing dapat membunuh bakteri uji dalam waktu 10 menit, tetapi tidak dalam waktu 5 menit.

Bakteri uji :

Desinfektan :

No.	Pengenceran	5 menit	10 menit	15 menit	Keterangan
1	1 :				
2	1 :				
3	1 :				
4	1 :				
5	1 :				

Fenol :

No.	Pengenceran	5 menit	10 menit	15 menit	Keterangan
1	1 :				
2	1 :				
3	1 :				
4	1 :				
5	1 :				

Keterangan :

+ : terjadi pertumbuhan (kekeruhan pada medium)

- : tidak terjadi pertumbuhan (medium bening)

Perhitungan :

b. Pembahasan

Dari data hasil praktikum lakukan analisa bagaimana kekuatan antimikroba dari berbagai desinfektan berdasarkan perbandingan fenol.

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Mengapa senyawa fenol yang dijadikan sebagai baku zat pembaku daya antiseptik obat lain sehingga daya antiseptik dinyatakan dalam koefisien fenol?
- Jelaskan mekanisme senyawa fenol sebagai bakteriostatik atau bakterisid?
- Apa yang dimaksud dengan koefisien fenol?
- Apa prinsip metoda koefisien fenol?
- Bagaimana cara menentukan nilai koefisien fenol?
- Bagaimana cara membuat pengenceran larutan fenol 1 : 60 dengan baku fenol 2%?
- Mengapa perlu dilakukan pengujian koefisien fenol ?

8. Daftar Pustaka

- Salyers, A.A. and D.D. Whiht, *Bacterial Pathogenesis : A Molecular Approach*. ASM Press, Wasington DC, 1994.
- Denyer S. and R. Baird, *Guide to Microbiological Control In Pharmaceuticals*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 190.
- Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Penerbit UI Press. Jakarta.

- d. Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York
- e. Prescott, L.M, J.P. Harley & D.A. Klein. 2003. *Mikrobiology*, 5th ed. Mc Graw Hill, Singapore

PRAKTIKUM 10. UJI CEMARAN KOLIFORM DALAM SEDIAAN CAIR

1. Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan uji pendekatan nilai MPN (*Most Probable Number*)

2. Indikator Capaian

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan pengujian suatu sediaan cair atau air yang diduga terdapat bakteri koliform
- b. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan perhitungan mikroba dengan metode MPN

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami pengujian sediaan cair atau air yang diduga terdapat bakteri koliform dan mampu melakukan perhitungan mikroba dengan metode MPN.

4. Uraian Teori

Sebagian mikroba yang ada di dalam air tidak mampu tumbuh pada media buatan di laboratorium. Untungnya tidak semua mikroba dalam air harus diketahui dalam rangka menentukan kualitas air berdasarkan jumlah mikroorganismenya, kecuali bakteri koliform.

Bakteri koliform berada di dalam air berasal dari bahan–bahan tinja dari usus manusia atau hewan berdarah panas. Kehadiran bakteri koliform di dalam air itu juga mengandung jasad patogen yang berasal dari usus dan penyebab penyakit perut. Dengan ditemukannya bakteri koliform terutama *Escherichia coli*, maka diduga keras bahwa air itu mengandung patogen penyebab sakit perut.

Bakteri *E. coli* merupakan jasad indikator pencemaran air atau makanan oleh tinja. Air yang diperiksa dengan hasil bakteri koliform apalagi *E. coli* maka dikatakan bahwa air itu tidak saniter. Atau makanan yang mengandung bakteri koliform atau *E. coli* maka dikatakan kualitas makanan itu tidak baik, dan kemungkinan besar mengandung patogen. Untuk mengetahui adanya

patogen tidak perlu mencari jasadnya itu sendiri, sudah cukup dengan mengetahui adanya jasad indikator.

Standart analisa air untuk mengetahui bahwa air itu berkualitas baik atau jelek ada 3 tahapan uji, yaitu :

a. Uji Duga

Pada tahap ini uji ditunjukan untuk mendeteksi mikroba yang dapat menfermentasikan laktosa menghasilkan asam laktat dan gas. Mikroba itu kemudian diduga sebagai bakteri koliform. Bakteri koliform ini meliputi semua bakteri Gram negatif, tidak membentuk endospora, berbentuk batang pendek, bersifat fakultatif anaerob dan membentuk gas dari peruraian laktosa pada suhu 37°C dalam 48 jam. Apabila tidak terbentuk gas setelah 48 jam, uji dinyatakan negatif dan uji berikutnya tidak perlu dilakukan. Perlu dingat bahwa selain koliform, *Clostridium perfringens* juga dapat membentuk gas dari laktosa.

b. Uji Penetapan

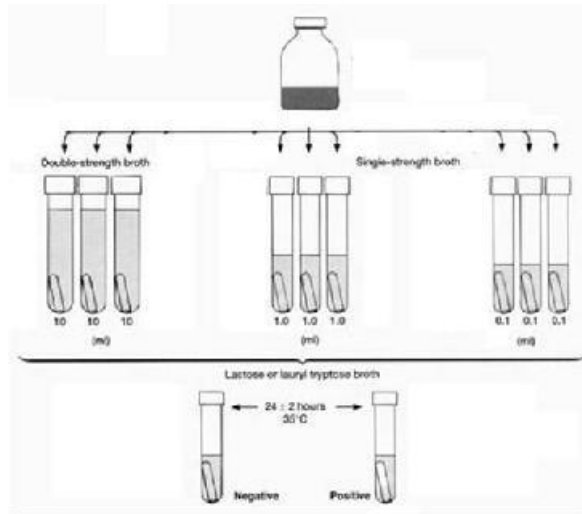
Tahap uji ini adalah melanjutkan tahap pertama, yaitu dengan membuat biakan agar tuang dari biakan laktosa cair pada agar media selektif-diferensial. Media yang umum digunakan adalah *Agar Eosin Metilin Biru* (EMBA) atau *Endo Agar* (EA). Koloni yang tumbuh pada agar itu ada 3 tipe, yaitu :

- 1) Koloni Tipikal, yang tampak gelap dan ada kilap logam pada bagian tengahnya.
- 2) Koloni Atipikal, yang tidak tampak bagian gelap dan tidak mengkilap pada bagian tngahnya, berwarna merah muda (pink) dan buram.
- 3) Koloni yang tidak termasuk kedua tipe koloni sebelumnya. Kalau didapatkan koloni terakhir itu, uji dinyatakan negatif.

c. Uji Lengkap

Pada uji ini dilakukan pembuatan biakan cair dalam media laktosa Broth dari koloni tipikal (pada media EMBA atau EA) dengan tujuan untuk mendeteksi apakah mikroba yang diduga *E. coli* tersebut dapat difermentasikan laktosa. Selain membuat biakan cair itu, dalam tahapan ini

dilakukan isolasi terhadap koloni tipikal dan diamati morfologinya (untuk memastikan bentuk koliform).



Gambar 48. Bagan kerja uji koliform

Untuk menentukan jenis koliform dilanjutkan dengan pengujian IMVIC (Indol, Methyl Red, Vogues-Proskauer, Citrat)

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan :

- 1) Sampel air
- 2) Media laktosa cair dengan tabung durham di dalamnya.
- 3) Media EMBA dan BGBB
- 4) Zat warna Gram

Alat :

- 1) Cawan Petri steril
- 2) Pipet
- 3) Pembakar Bunsen
- 4) Jarum Ose
- 5) Inkubator

b. Prosedur kerja :

- 1) Uji Duga

- a) Inokulum 3 tabung reaksi berisi 10 ml laktosa cair konsentrasi lipat 2 (*Double Strength*) dengan masing – masing 10 ml sampel air.
- b) Inokulum 3 tabung reaksi berisi masing – masing 10 ml laktosa cair (*Single Strength*) dengan masing – masing 1 ml sampel air.
- c) Inokulum 3 tabung reaksi berisi masing – masing 10 ml laktosa cair (*Single Strength*) dengan masing – masing 0,1 ml sampel air.
- d) Inkubasi piaraan itu dalam inkubator suhu 37°C selama 2x24 jam
- e) Amati setiap 24 jam

Adanya gas setelah 24 jam uji dinyatakan positif. Timbulnya gas setelah 24 jam pertama dikatakan uji dengan hasil meragukan. Sedangkan tanpa gas setelah 48 jam dikatakan uji negatif, berarti air tidak tercemar benda tinja. Dengan hasil negatif pada uji duga, maka uji penetapan dan uji lengkap tidak perlu dilakukan.

2) Uji penetapan

Pada uji ini semua hasil uji duga positif maupun negatif harus dilakukan.

- a) Buat piaraan goresan pada EMBA atau EA dari piaraan dalam uji duga, dengan inokulum yang paling sedikit dan hasilnya positif
- b) Inkubasikan piaraan itu dalam inkubator suhu 37°C selama 2 x 24 jam
- c) Amati pertumbuhan koloni tipikal yang menunjukkan hasil uji positif

3) Uji Lengkap

- a) Ambil 2 koloni tipikal dari EMBA dan EA dan masing – masing diinokulasikan ke dalam laktosa cair dan yang lain digoreskan pada agar miring.
- b) Inkubasikan pada inkubator suhu 37°C selama 2 x 24 jam
- c) Amati terbentuknya gas di dalam tabung durham setiap 24 jam
- d) Buat pewarna Gram dari piaraan miring NA dan juga pewarnaan spora. Terbentuknya gas dalam waktu 24 jam dan bentuk sel batang serta tidak adanya spora dalam sel, maka mikroba yang ada di dalam air contoh tersebut koliform. Berarti sampel air telah tercemar bahan tinja.

Cara Kerja Penentuan Coli Fekal Dan Non Fekal

- 1) Inokulasikan tabung berisi laktosa cair dan tabung durham dengan koloni tipikal pada EMBA.
- 2) Inkubasikan dalam inkubator suhu 44,5°C selama 2 x 24 jam.
- 3) Amati terbentuknya gas setiap 24 jam. Terbentuknya gas dalam tabung Durham menunjukkan bahwa koloni tipikal itu adalah bakteri koliform yang tahap suhu tinggi dan tidak lain adalah *E. coli* sebagai coli fekal. Artinya bakteri tersebut berasal dari feses baru. Hal itu berkaitan dengan teori yang menyatakan bahwa *E. coli* tidak dapat hidup lama di luar usus manusia atau hewan berdarah panas lainnya. Sedangkan coli non fekal adalah koliform selain *E. coli* yang dapat hidup di lingkungan perairan setelah keluar dari usus. Perairan mengandung coli non fekal berarti pernah tercemar tinja.

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

No.	Sampel	Uji Duga	Uji Penetapan	Uji Lengkap
1				
2				

- b. Pembahasan
- c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Apa yang dimaksud dengan bakteri koliform ?
- b. Mengapa dilakukan pengujian koliform pada suatu sediaan cair ?
- c. Bagaimana cara mempersiapkan sampel suatu sediaan cair ?
- d. Mengapa pada uji duga ditandai dengan adanya gas gelembung pada tabung durham ?
- e. Sebutkan komposisi medium EMBA dan BGGB ?
- f. Sebutkan prosedur pengujian IMVIC?
- g. Sebutkan ciri-ciri bakteri koliform?

8. Daftar Pustaka

- a. Denyer S. and R. Baird, *Guide to Microbiological Control In Pharmaceuticals*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 190.
- b. Pelczar, M.J & E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit UI Press. Jakarta.
- c. Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York

PRAKTIKUM 11. UJI SALMONELLA

1. Kompetensi Dasar

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam uji salmonella

2. Indikator Capaian

Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji salmonella

3. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu melakukan uji salmonella

4. Uraian Teori

Salmonella sering pathogen untuk manusia atau binatang. Mereka disebarkan dari binatang dan produk dari binatang ke manusia, dimana mereka menyebabkan enteritis, infeksi sistemik dan demam enteric.

Morfologi dan identifikasi

Salmonella merupakan kuman berbentuk batang, tidak berspora, pada pewarnaan Gram bersifat negatif, ukuran 1-3,5 μm x 0,5-0,8 μm ; dan besar koloni rata-rata 24 mm. Salmonella tumbuh cepat dalam media yang sederhana tetapi mereka hampir tidak pernah memfermentasikan laktosa atau sukrosa. Mereka membentuk asam dan kadang gas dari glukosa dan mannose. Mereka biasanya memproduksi H_2S . Mereka tahan hidup dalam air membeku pada periode yang lama, salmonella tahan terhadap bahan kimia tertentu (misalnya *brilliant green*, *sodium tetrathionate*, *sodium deoxycholate*) yang menghambat bakteri enteric lain, senyawa tersebut kemudian berguna untuk ditambahkan pada media untuk mengisolasi salmonella dari tinja. *Salmonella typhi* hanya membentuk sedikit H_2S dan tidak membentuk gas pada fermentasi glukosa.

Salmonellosis terutama demam tifoid masih merupakan masalah kesehatan di Indonesia. Makanan dan minuman yang terkontaminasi merupakan mekanisme transmisi kuman salmonella termasuk *S. typhi*. Khususnya *S. typhi*, *carrier* manusia adalah sumber infeksi. *S. typhi* bisa berada dalam air, es, debu, sampah kering yang bila organisme ini masuk ke dalam vehicle yang cocok (daging, kerang dan sebagainya) akan berkembang biak menjadi dosis infeksi. Maka perlu diperhatikan faktor kebersihan lingkungan, pembuangan sampah,

dan khlorinasi air minum di dalam pencegahan salmonellosis khususnya demam tifoid.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

cawan Petri tabung reaksi, pipet volume, jarum ose, lampu Bunsen, alkohol 70%, akuades, bahan makanan/minuman/obat tradisional

b. Prosedur Kerja

1) Pengambilan sampel

a) Jika dilakukan pengambilan sampel daging mentah, jeroan dan ikan mentah dilakukan penyimpanan sampel di media pengkaya setiap 25 g disimpan di 225 ml *Brilliant Green*.

b) Setiap 25 g daging, jeroan, ikan yang telah dipanaskan diolah atau dikeringkan dilakukan pengkayaan dengan memasukkan ke medium 225 ml *Lactose Broth*.

c) Jamu bentuk serbuk : ditimbang 10 g cuplikan ke dalam 90 ml larutan pengencer (*Pepton Dilution Fluid*) hingga diperoleh pengenceran 1:10 dihomogenkan dan dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan.

d) Jamu bentuk rajangan : jamu tersebut dipotong-potong dengan pisau steril menjadi bagian kecil, tumbuk dengan mortar hingga jadi partikel-partikel kecil, semua dikerjakan dalam suasana aseptis. Timbang 25 g cuplikan campur dengan 225 ml larutan *Pepton Dilution Fluid* hingga diperoleh pengenceran 1:10.

e) Jamu bentuk kapsul : timbang 10 g cuplikan ke dalam Erlenmeyer steril tambahkan 90 ml larutan *Pepton Dilution Fluid* hingga diperoleh pengenceran 1:10 dikocok hingga seluruh kapsul hancur.

2) Pra pengkayaan (*Pre-enrichment*)

Ambil bahan makanan atau obat tradisional yang akan diujikan masukan ke dalam medium *Lactose Broth* (LB) inkubasi 37 °C selama 18-24 jam.

3) Pengkayaan selektif

Dipipet masing-masing 5 ml biakan LB ke dalam 50 ml media TBGB (*Tetrathionate Brilliant Green Broth*) inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

4) Isolasi

Dari medium TBGB ambil satu mata ose diinokulasikan pada medium BGA (*Brilliant Green Agar*) pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pada BGA koloni dari tidak berwarna merah muda hingga merah, dari transparan hingga keruh dengan lingkaran merah muda hingga merah.

5) Identifikasi

Diambil 2 atau lebih koloni tumbuhkan pada medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) dengan cara goresan. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Biakan diduga salmonella positif jika ada pada TSIA terlihat warna merah pada permukaan agar, warna kuning pada dasar tabung dengan satu atau tanpa pembentukan H₂S.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

No.	Pre-Enrichment	Pengkayaan selektif	Isolasi	Identifikasi

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- Sebutkan ciri-ciri bakteri salmonella ?
- Mengapa dilakukan pengujian salmonella pada suatu makanan ?
- Bagaimana cara mempersiapkan sampel makanan untuk pengujian salmonella?
- Sebutkan parameter uji yang dihasilkan pada tahapan identifikasi dari pengujian salmonella?
- Sebutkan jenis medium yang digunakan pada pengujian salmonella?

8. Daftar Pustaka

Cappuccino JG, Welsh C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. 11th ed. (Cappuccino JG, ed.). Edinburgh: Pearson; 2017.

PRAKTIKUM 12 : UJI STERILITAS SEDIAAN FARMASI

1. Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan uji sterilitas sediaan farmasi

2. Indikator Capaian

Keterampilan, ketelitian, dan kerapian dalam melakukan uji sterilitas pada sediaan kapas, perban, benang bedah, sediaan obat steril seperti tetes mata, salep mata dan sejenisnya

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu menguji sediaan farmasi baik obat maupun alat kesehatan.

4. Uraian Teori

Di bidang obat – obatan syarat pengujian uji sterilitas terutama persyaratan bidang mikrobiologi sangatlah penting.

Jumlah sampel untuk pengujian

Jumlah wadah	Jumlah contoh yang dipakai
<100	100% atau 4, diambil yang besar
>100 – 500	10
>500	2% atau 20 diambil yang kecil

Jumlah cuplikan yang dipakai dan media yang dipergunakan dalam pengujian

Volume contoh pada tiap wadah (ml)	Volume cuplikan yang diinokulasikan ke dalam tiap wadah (ml)	Volume media thioglikolat tiap tabung (ml)	Volume medium cair PDB / sabouroud tiap tabung (ml)
<1	Seluruh isi	15	15
1 – 10	1	15	15
10 - <50	5	40	40
50 - <100	10	80	80
50 – 500	Seluruh isi	100	100
>500	500	100	100

Pengujian Langsung

Sediaan Cair

- a. Pipet sejumlah volume tertentu cairan dengan pipet atau jarum suntik steril secara aseptis

- b. Inokulasi ke dalam media thioglikolat cair atau PDB/sabouroud dalam tabung reaksi homogenkan
- c. Inkubasi 37° C selama 18-24 jam untuk media thioglikolat dan 25-28° C untuk media PDB/sabouroud cair selama tidak kurang dari 7 hari

Salep dan minyak/lemak yang tidak larut dalam isopropil miristat.

Sejumlah sediaan cair didispersikan dengan bahan pendispersi yang sesuai, sebaiknya tidak bersifat antimikroba, prosedur selanjutnya dilakukan seperti sediaan cair.

Zat padat (solid)

Sejumlah sediaan terlebih dahulu dibuat larutan atau suspensi. Kemudian dilakukan prosedur seperti cairan

Alat kesehatan

Kasa, pembalut, perban, benang bedah dan bahan sejenisnya

- a. Ambil sampel secara aseptis 100 – 500 mg atau seluruh bagian jika ukurannya kecil.
- b. Prosedur sama dilakukan seperti pada sediaan cair.

Alat suntik atau alat siap pakai

- a. Masukkan cairan pembilas ke dalam wadah dan pasang jarumnya
- b. Bilas wadah melalui jarum suntik secara aseptis
- c. Masukkan cairan pembilas ke dalam media thioglikolat dan 25-28° C untuk media PDB/sabouroud cair selama tidak kurang dari 7 hari.

5. Pelaksanaan Praktikum

- a. Alat dan Bahan

Bahan: Media cair thioglikolat, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Broth* (NB), Sediaan obat: tetes mata, kasa, spuit

Alat: Tabung reaksi, ose, pencatat waktu (timer), inkubator, Erlenmeyer, pipet ukur.

- b. Prosedur kerja

- 1) Pembuatan media

Membuat media cair thioglikolat, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Broth* (NB),

- 2) Uji sterilitas tetes mata
 - a) Pipet sejumlah volume tertentu cairan dengan pipet atau jarum suntik steril secara aseptis
 - b) Inokulasi ke dalam media thioglikolat cair atau PDB/sabouroud dalam tabung reaksi homogenkan
 - c) Inkubasi 37° C selama 18-24 jam untuk media thioglikolat dan 25-28° C
- 3) Uji sterilitas kasa
 - a) Ambil sampel secara aseptis 100 – 500 mg atau seluruh bagian jika ukurannya kecil.
 - b) Bilas kasa dengan aquades steril
 - c) Pipet sejumlah volume tertentu cairan dengan pipet atau jarum suntik steril secara aseptis
 - d) Inokulasi ke dalam media thioglikolat cair atau PDB/sabouroud dalam tabung reaksi homogenkan
 - e) Inkubasi 37° C selama 18-24 jam untuk media thioglikolat dan 25-28° C
- 4) Uji sterilitas spuit
 - a) Masukkan cairan pembilas ke dalam wadah dan pasang jarumnya
 - b) Bilas wadah melalui jarum suntik secara aseptis
 - c) Masukkan cairan pembilas ke dalam media thioglikolat dan 25-28° C.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Hasil pengamatan setelah 24 jam yakni ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba dalam medium uji.

No.	Nama sampel	Mikroba + / -	Keterangan
1			
2			
3			
4			

5			
---	--	--	--

b. Pembahasan

Dari data hasil praktikum lakukan analisa faktor apa saja yang menyebabkan sterilitas sediaan serta titik kritis pengujian sterilitas.

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Unduh Farmakope Indonesia edisi VI dari internet
- b. Carilah materi tentang sterilitas sediaan farmasi
- c. Tulis ulang tabel jumlah minimum bahan uji yang digunakan untuk tiap media!
- d. Tulis ulang tabel jumlah minimum bahan yang diuji sesuai dengan jumlah bahan dalam bets!
- e. Buatlah resume cara preparasi uji sterilitas sediaan berdasarkan jenis sediaan farmasi (krim, larutan, zat padat dan lain-lain)

8. Daftar Pustaka

- a. Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York
- b. Prescott, L.M, J.P. Harley & D.A. Klein. 2003. *Mikrobiologi*, 5th ed. Mc Graw Hill, Singapore
- c. Denyer, S.P, N.A. Hodges & S.P. Gorman. 2004. *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. Seventh edition. Blackwell Science, Massachusetts .

PRAKTIKUM 13. MENGENAL FERMENTASI

1. Kompetensi Dasar

- a. Keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam membuat susu fermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat
- b. Ketepatan, keterampilan, ketelitian, dan kerapihan dalam melakukan uji organoleptic yoghurt dan kefir

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu membuat produk fermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat
- b. Mahasiswa mampu melakukan uji organoleptic yoghurt dan kefir

3. Tujuan Praktikum

- a. Mampu membuat produk fermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat.
- b. Mampu melakukan uji organoleptic yoghurt
- c. Mampu melakukan uji organoleptic kefir

4. Uraian Teori

Proses fermentasi tidak hanya mngawetkan bahan makanan, akan tetapi juga memperbaiki nilai gizinya dan rasa serta aroma makanan hasil fermentasi. Dalam proses fermentasi terlibat mikroba seperti bakteri, kapang dan kamir, yang aktif merombak senyawa senyawa kimia kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana. Secara umum bahan dasar yang dapat difermentasikan itu dapat berupa bahan padat, cair maupun campuran dari keduanya. Proses fermentasi akan menghasilkan senyawa tertentu bersifat mudah menguap (seperti alkohol) atau asam organik seperti asam laktat. Berdasarkan produk yang dihasilkannya, proses fermentasi dapat dibedakan : farmentasi alkohol dan fermentasi non-alkohol.

Mikroba yang terlibat dalam proses fermentasi adalah mikroba yang bersifat fermentatif. Ada dua jenis kelompok mikroba berdasarkan sifat yaitu: mikroba homofermentatif dan heterofermentatif.

Susu sebagai salah satu bahan makanan yang mudah rusak dapat diawetkan dan dan ditingkatkan nilai gizinya dengan memfermentasikannya.

Mikroba yang terlibat dalam fermentasi susu diantaranya: bakteri *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Produk yang dihasilkan dari fermentasi susu diantaranya adalah yoghurt dan kefir. Yoghurt adalah satu jenis makanan fermentasi dari bahan dasar susu dengan melibatkan bakteri asam laktat (bakteri yoghurt) yang mempunyai aroma khusus, rasanya asam dan tidak mengandung alkohol. Bakteri yang digunakan dalam fermentasi susu ini akan merombak gula susu atau laktosa menjadi asam laktat dan senyawa asam organik lainnya (selain alkohol) yang akan menentukan rasa dan aroma yoghurt.

Berbeda dengan yoghurt, maka kefir merupakan hasil fermentasi susu yang rasanya khas karena mengandung campuran antara asam laktat dan alkohol. Pada fermentasi kefir ini melibatkan mikroba yang mampu merombak gula susu menjadi asam laktat dan alkohol. Mikroba yang menghasilkan asam laktat adalah jenis-jenis bakteri asam laktat (bakteri yoghurt), sementara alkohol dihasilkan oleh jenis khamir seperti *saccharomyces cerevisiae*.

Kultur starter memegang peranan penting dalam proses pembuatan yogurt. Kultur bakteri yang digunakan akan mempengaruhi flavor serta tekstur yogurt yang dihasilkan. Kultur yang digunakan dalam pembuatan yogurt pada umumnya merupakan campuran dari beberapa bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan karakteristik organoleptik yang lebih baik dibanding penggunaan kultur tunggal (Silvia, 2002). Kultur bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian ini tersedia dalam bentuk bubuk dengan pengeringan beku (freeze dried). Campuran jenis bakterinya terdiri dari *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, dan *Lactobacillus bulgaricus*. *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* memiliki peran yang sangat penting dalam pembentukan flavor dan tekstur dari yogurt, sedangkan *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum* berperan sebagai bakteri probiotik yang baik bagi pencernaan tubuh (Supriadi, 2003).

Kultur starter pada kefir disebut butiran kefir, mengandung mikroba yang terdiri dari bakteri dan khamir yang masing-masing berperan dalam pembentukan cita rasa dan struktur kefir. Bakteri menyebabkan terjadinya asam

sedangkan khamir menghasilkan alkohol dan CO₂ pada proses fermentasi. Hal ini yang membedakan rasa yoghurt dan kefir. Komposisi mikroba dalam butiran kefir dapat bervariasi sehingga hasil akhir kefir kadang mempunyai aroma yang bervariasi. Spesies mikroorganisme dalam bibit kefir diantaranya *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir* yang berfungsi dalam pembentukan asam laktat dari laktosa. *Lactobacillus kefirnofaciens* sebagai pembentuk lendir (matriks butiran kefir), *Leuconostoc* sp. membentuk diasetil dari sitrat dan khamir *Candida kefir* membentuk etanol dan karbondioksida dari laktosa. (Hidayat, dkk., 2006)

Kandungan bakteri asam laktat yang bersifat probiotik pada yogurt menentukan seberapa besar nilai fungsional yang dapat diambil dari yogurt tersebut. Bakteri probiotik mampu bertahan pada kondisi pencernaan manusia hingga sampai ke dalam usus, kemudian beradaptasi dan bersaing dengan bakteri-bakteri jahat yang terdapat dalam usus. Dengan begitu, populasi bakteri jahat yang merugikan bagi pencernaan dapat ditekan jumlahnya dengan kehadiran bakteri probiotik dari yogurt (Chaitow dan Trenev, 1990)

Yogurt memiliki banyak manfaat, terutama untuk tujuan kesehatan. Konsumsi yogurt secara teratur dapat menyeimbangkan mikroflora usus, dimana bakteri-bakteri yang merugikan dapat ditekan jumlahnya dan sebaliknya, usus akan didominasi oleh bakteri-bakteri yang menguntungkan. Yogurt juga mengandung faktor penghambat sintesis kolesterol, yaitu 3-hydroxy-3-methylglutaric acid. Senyawa ini dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Helferich dan Westhoff, 1980). Menurut Astawan (2002), manfaat lain dari mengkonsumsi yogurt dan produk minuman susu fermentasi lain yaitu meningkatkan pertumbuhan badan, mengatur saluran pencernaan, memperbaiki gerakan perut, mencegah kanker, menghambat pertumbuhan bakteri patogen, membantu penderita intoleransi terhadap laktosa, dan sebagai faktor anti-diare

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Fermentasi Yoghurt

Bahan :

- 1) Susu sapi atau kambing, kuda dan lain-lain
- 2) Starter bakteri *Lactobacillus bulgaricus*
- 3) Bakteri *Streptococcus thermophilus*

Alat :

- 1) Labu Erlenmeyer
- 2) Inkubator
- 3) pH meter
- 4) tempat untuk pasteurisasi
- 5) jarum ose
- 6) Bunsen

b. Fermentasi Kefir

Bahan :

- 1) Susu sapi atau kambing, kuda dan lain-lain
- 2) Starter bakteri *Lactobacillus bulgaricus*
- 3) Bakteri *Streptococcus thermophilus*

Alat :

- 1) Labu Erlenmeyer
- 2) Inkubator
- 3) pH meter
- 4) tempat untuk pasteurisasi
- 5) jarum ose
- 6) Bunsen

c. Prosedur Kerja

Fermentasi Yoghurt

1) Pembuatan starter

- a) Sebanyak 100 ml susu segar dimasukan dalam labu Erlenmeyer. Ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 1 dan 5 % aroma strawberry atau tomat atau apel

- b) Sterilisasikan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm, selama 20 menit
 - c) Dinginkan pada suhu 37°C kemudian diinokulasi dengan 1 ose bakteri yogurt secara terpisah. Artinya starter *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dalam masing-masing wadah.
 - d) Inkubasikan dalam inkubator pada suhu 30-37°C selama 24 jam. Apabila menghendaki starter yang baik (aktif, maka setiap 2 x 24 jam starter itu harus diremajakan).
- 2) Proses fermentasi yoghurt
- a) Bahan susu segar dipasteurisasi dengan cara merebus dalam wadah
 - b) Turunkan dari alat pemanas biarkan dingin sampai suhu 43°C
 - c) Inokulasi susu itu dengan starter campuran berikan masing-masing sebanyak 1%
 - d) Homogenkan susu yang diinokulasi dengan starter
 - e) Inkubasi dalam inkubator pada suhu 45°C selama 3 jam, kemudian pada suhu kamar, suhu almari 2 x 24 jam.

Fermentasi Kefir

- 1) Pembuatan starter bakteri untuk kefir (tidak ada bedanya dengan starter yogurt)
- 2) Pembuatan starter khamir :
 - a) Sediakan sari buah tomat yang sudah diencerkan dengan 2-3 kali aquades, sebanyak 100 ml
 - b) Tambahkan sukrosa 13 – 15%
 - c) Inokulasi dengan 1 ose biakan khamir *S. cerevisiae*
 - d) Inkubasikan pada suhu 30°C selama 2 x 24 jam
- 3) Proses fermentasi kefir
 - a) Bahan susu segar dipasteurisasi dengan cara merebus dalam wadah, kemudian turunkan dari alat pemanas dan biarkan dingin sampai suhu 43°C
 - b) Sebelum direbus dapat ditambahkan gula sebanyak 13 – 15%
 - c) Inokulasi susu itu dengan starter masing-masing sebanyak 1%

- d) Homogenkan susu yang diinokulasi dengan starter
- e) Inkubasi dalam inkubator pada suhu 45°C selama 3 jam, kemudian pada suhu kamar, suhu almari selama 2 x 24 jam

d. Pemeriksaan

- 1) Ukur pH yoghurt dan kefir (sebelum fermentasi, selama fermentasi dan akhir fermentasi)
- 2) Ciumlah aromanya
- 3) Lakukan uji organoleptik yang meliputi : warna, aroma dan rasa

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Pengukuran pH

Jenis ferm.	Sebelum fermentasi	Selama fermentasi	Setelah fermentasi	Keterangan
<i>Yog. L. bugaricus</i>				
<i>Yog. S. thermophilus</i>				
<i>Yog. L. bugaricus + S. thermophilus</i>				
Kefir				

Uji Organoleptik

Tester	Yoghurt 1			Yoghurt 2			Yoghurt 3			Kefir		
	W	A	R	W	A	R	W	A	R	W	A	R
1												
2												
...												
...												
11												
12												

Keterangan : W= warna, A= aroma, R=rasa

- Skala: 1 = sangat tidak suka
 2 = tidak suka
 3 = netral
 4 = suka
 5 = sangat suka

b. Pembahasan

Dari data dan hasil percobaan yang dilakukan, simpulkan hasil fermentasi susu dengan menggunakan bakteri asam laktat (yoghurt) dan kefir serta jelaskan hasil uji organoleptic dari kedua fermentasi tersebut.

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

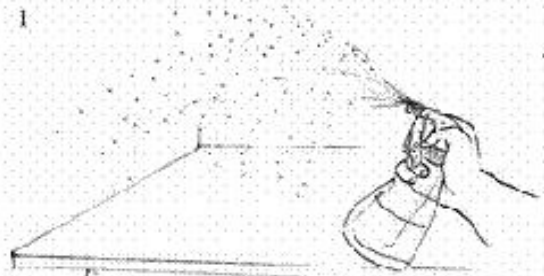
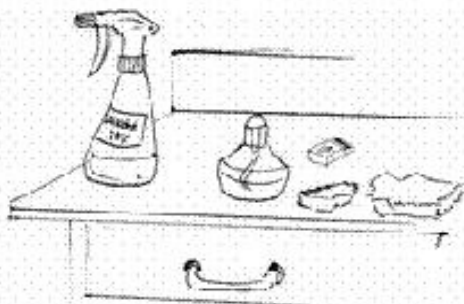
6. Soal Latihan

- a. Apa yang dimaksud dengan Bakteri Asam Laktat (BAL) dan sebutkan contohnya ?
- b. Jelaskan perbedaan fermentasi alkohol dan fermentasi asam laktat ?
- c. Sebutkan jenis bakteri yang digunakan dalam pembuatan produk fermentasi ?
- d. Sebutkan faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuatan yoghurt?
- e. Apa peranan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dalam pembuatan yogurt?
- f. Apa peranan bakteri *Lactobacillus parakefir* dalam pembuatan kefir ?
- g. Apa perbedaan produk fermentasi yoghurt dan kefir ?

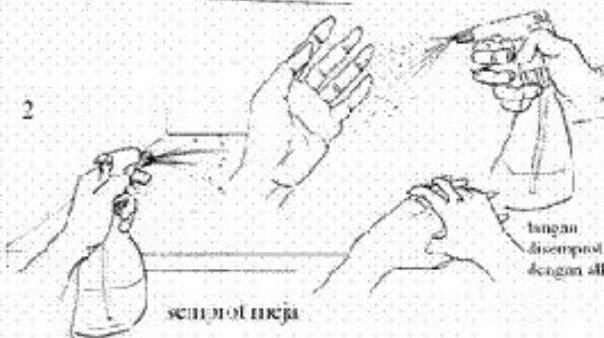
7. Daftar Pustaka

- a. Astawan, M. 2002. Khasiat dan Nilai Gizi Yoghurt. <http://www.halal.mui.or.id/pustaka/yoghurt.htm>
- b. Chaitow, L. dan N. Trenev. 1990. Probiotics. Thorsons, London
- c. Helferich, W dan D. Westhoff. 1980. All About Yoghurt. Prentice Hall Inc., Engelwood Cliffs, New Jersey
- d. Silvia, 2002. Pembuatan Yoghurt Kedelai (Soygurt) dengan Menggunakan Kultur Campuran Bifidobacterium bifidum dan Streptococcus thermophilus. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- e. Supriadi, Y. 2003. Pembuatan Soygurt Sinbiotik dengan Menggunakan Kultur Campuran Bifidobacterium bifidum, Streptococcus thermophilus, dan Lactobacillus casei galur Shirota. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- f. Hidayat, Nur., Padaga, Masdiana C., Suhartini, Sri., 2006. Mikrobiologi Industri. Penerbit ANDI Yogyakarta.

MENSTERILKAN MEJA KERJA



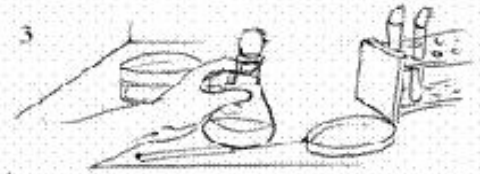
1
semprot sekitar meja kerja dengan alkohol 70% beberapa kali, sampai merata



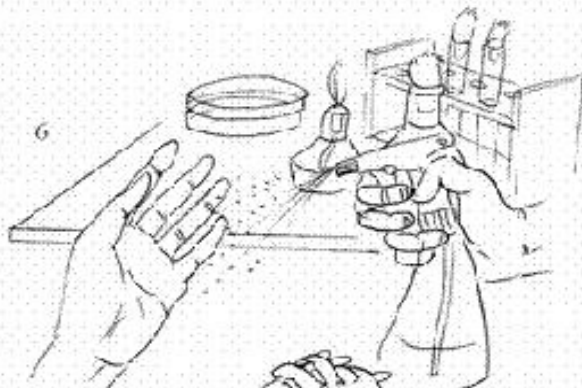
2

semprot meja

tangan disemprot dengan alkohol

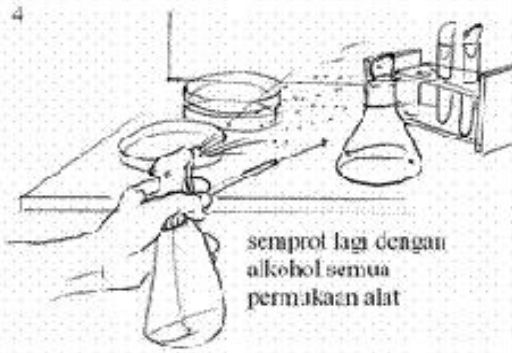


3
letakkan alat dan bahan yang diperlukan

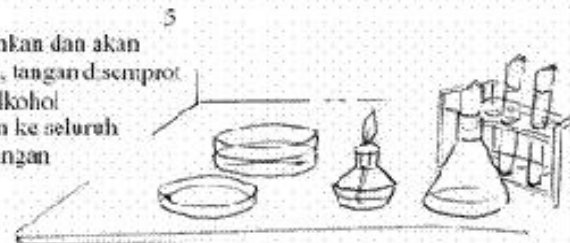


6

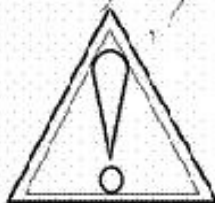
setelah didiamkan dan akan mulai beku, tangan disemprot lagi dengan alkohol dan ditsempkan ke seluruh permukaan tangan



4
semprot lagi dengan alkohol semua permukaan alat



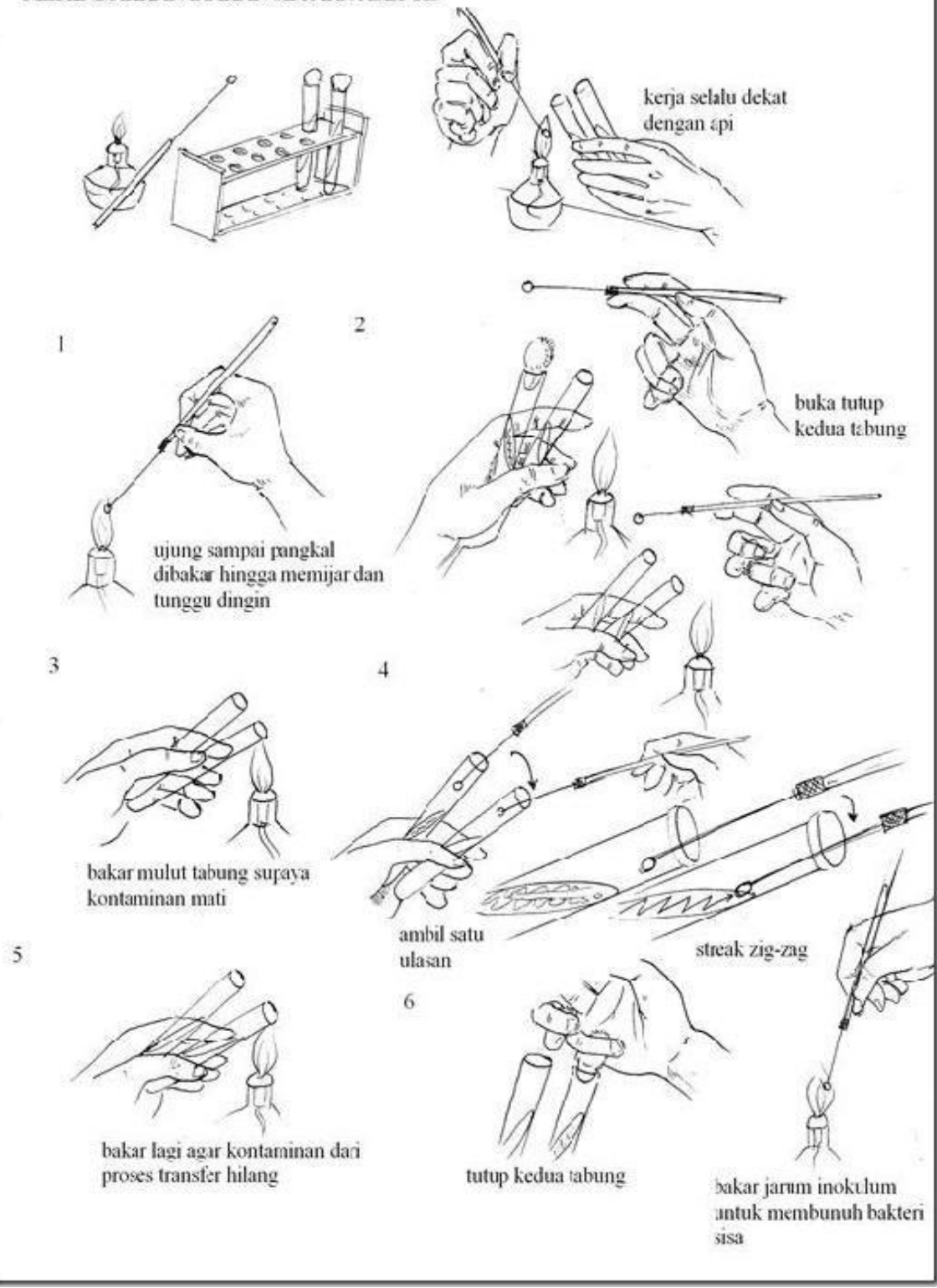
5
letakkan pembakar spiritus lalu biarkan sebentar



hati-hati alkohol sangat mudah terbakar

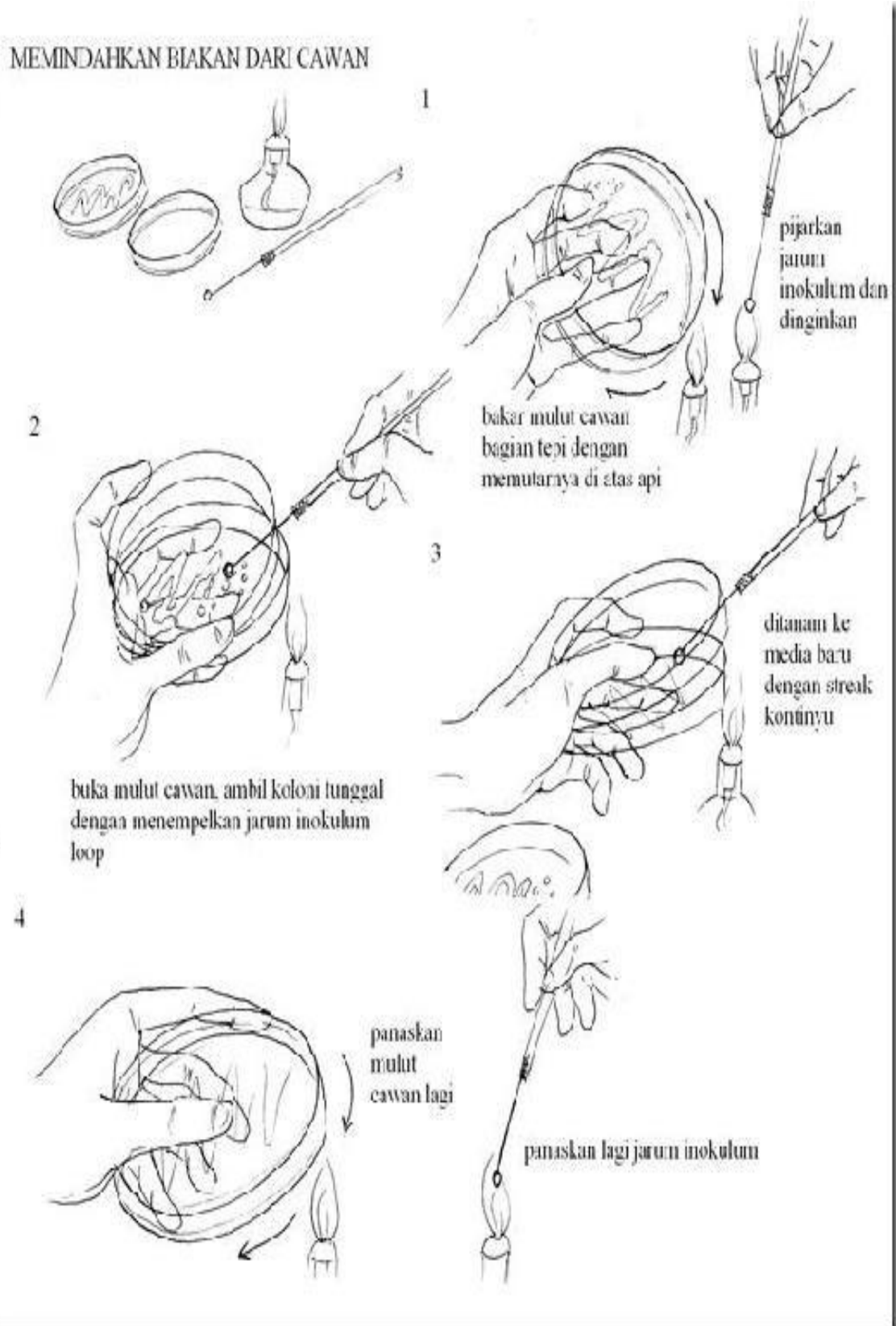
Gambar 49. Sterilisasi meja kerja

MEMINDAHKAN BIAKAN SECARA ASEPTIS



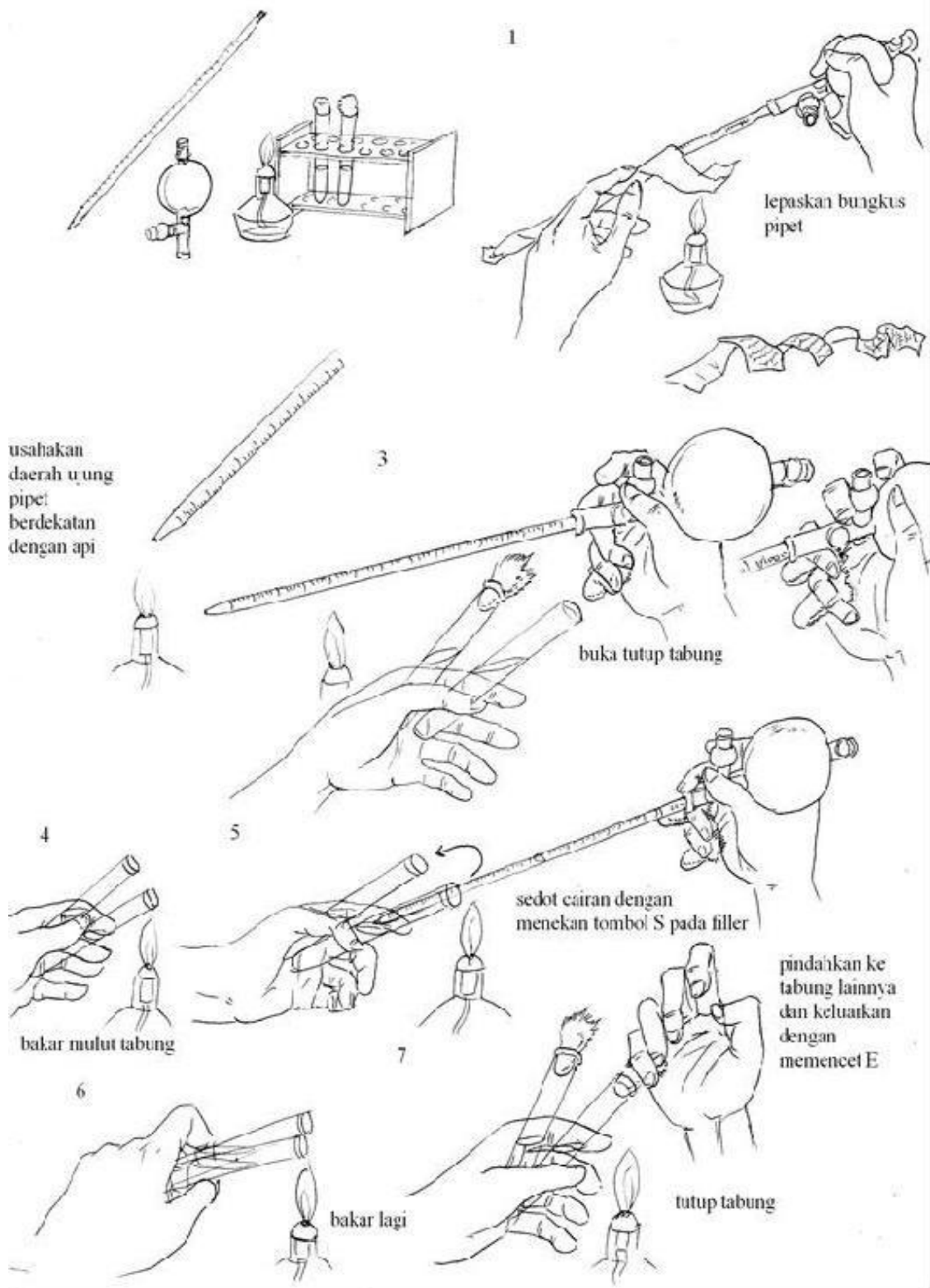
Gambar 50. Memindahkan biakan secara aseptis

MEMINDAHKAN BIAKAN DARI CAWAN



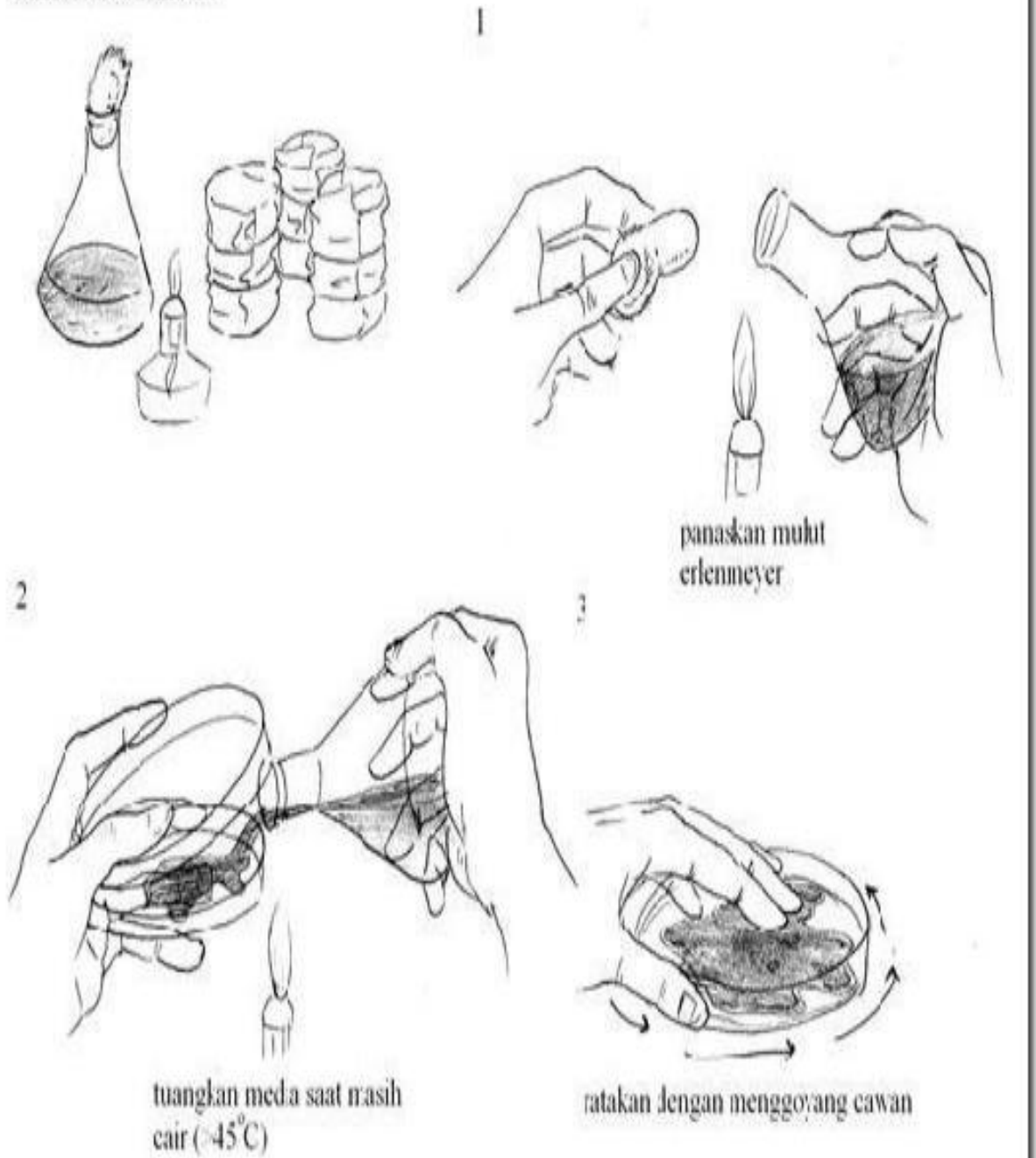
Gambar 51. Memindahkan biakan dari cawan

MEMINDAHKAN CAIRAN DENGAN PIPET



Gambar 52. Memindahkan cairan dengan pipet

MENUANG MEDIA



Gambar 53. Menuang medium

Tabel 3. *Most Probable Numbers* (MPN) per 1 g sampel menggunakan 3 tabung dengan pemberian sampel 10 ml; 1 ml; dan 0,1 ml

Tabung positif			
10 ml	1 ml	0,1 ml	MPN
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6,1
0	1	2	9,2
0	1	3	12
0	2	0	6,2
0	2	1	9,3
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9,4
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	3,6
1	0	1	7,2
1	0	2	11
1	0	3	15
1	1	0	7,3
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24
1	3	0	16
1	3	1	20

1	3	2	24
1	3	3	29
2	0	0	9,1
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100