



**YAYASAN PERGURUAN CIKINI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL**

Jl. Noh. Kahfi II, Bumi Srengeng Indah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640 Telp. (021) 727 0090, 787 4643,
787 4647 Fax. (021) 786 6955, <http://www.istn.ac.id> E-mail: rektorat@istn.ac.id

SURAT PENUGASAN

No : 699/03.1-H/X/2023

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dr. apt. Refdanita, M.Si

Jabatan : Dekan Fakultas Farmasi ISTN

Menugaskan Kepada :

Nama : Fathin Hamida, S.Si.,M.Si.

Jabatan : Dosen

Dalam rangka Pembuatan Modul Praktikum Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Program Studi Farmasi S1 – ISTN 2023.

Demikian surat penugasan ini disampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

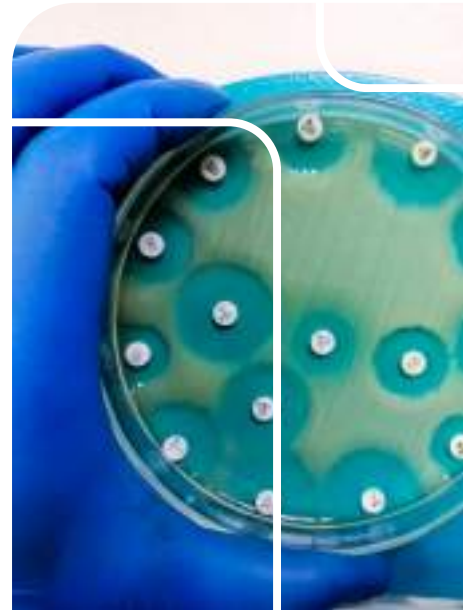
Jakarta, 18 Oktober 2023.





MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

Program Studi S1-Farmasi
2023



Fathin Hamida, S.Si., M.Si.
Saiful Bahri, S.Si., M.Si., Vilya Syafriana, S.Si., M.Si.,
Desi Muliana Wenas, S.Si., M.Si.,
Rosario Trijuliamos Manalu, M.Si.,
apt. Ainun Wulandari, M.Sc., Firdaus Ramadhan, S.Si

DAFTAR ISI

Daftar Isi i
Kata Pengantar ii
Keselamatan Kerja di Laboratorium 1
Protokol Praktikum 2
Bab 1 Teknik Aseptik 3
Bab 2 Pengenalan Alat 5
Bab 3 Sterilisasi..... 15
Bab 4 Media Pertumbuhan 17
Bab 5 Isolasi Mikroorganisme 24
Bab 6 Penentuan Angka Kuman 35
Bab 7 Morfologi dan Pewarnaan Bakteri..... 41
Bab 8 Morfologi dan Pewarnaan Fungi 52
Bab 9 Uji Aktivitas Biokimia 58
Bab 10 Uji Aktivitas Antimikroba 66
Bab 11 Uji Sterilitas Sediaan Farmasi 71

KATA PENGANTAR

Buku ini disusun sebagai buku panduan praktikum mikrobiologi pada mata kuliah praktikum mikrobiologi farmasi program studi S-1 Farmasi ISTN. Selain itu, buku ini juga dapat dimanfaatkan untuk memperkaya literatur yang beruang lingkup mikrobiologi baik yang sifatnya mendasar maupun terapan sehingga dapat digunakan oleh akademisi, dan para praktisi laboratorium mikrobiologi. Buku ini terdiri dari 11 bab yang membahas antara lain:

Bab 1. Memperkenalkan teknik aseptik

Bab 2. Memperkenalkan alat – alat yang sering digunakan di lab mikrobiologi serta fungsinya

Bab 3. Mempelajari jenis sterilisasi dan prinsipnya

Bab 4. Memperkenalkan media pertumbuhan mikrobiologi dan jenis-jenisnya

Bab 5. Mempelajari teknik isolasi mikroorganisme dari beragam sampel dan anggota tubuh

Bab 6. Mempelajari teknik penentuan angka kuman menggunakan metode *total plate count*

Bab 7. Mempelajari teknik pewarnaan bakteri dan memperkenalkan karakter morfologi mikroskopik bakteri

Bab 8. Mempelajari teknik pewarnaan fungi dan memperkenalkan karakter morfologi mikroskopik dan makroskopik fungi

Bab 9. Mempelajari teknik uji karakteristik aktivitas biokimia bakteri yang dapat diterapkan sebagai metode identifikasi bakteri

Bab 10. Mempelajari teknik uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi cakram dan difusi sumur serta cara interpretasi hasil zona hambat

Bab 11. Mempelajari teknik uji sterilitas sediaan farmasi pada sediaan steril

Setiap Bab terdiri dari tujuan praktikum, dasar teori, alat dan bahan praktikum, prosedur kerja, dan bagian hasil pengamatan yang dibuat dalam bentuk tabel yang nantinya dapat diisi untuk mencatat atau mendokumentasikan hasil pengamatan.

Dengan mengucapkan Syukur alhamdulillah kepada Allah Subhanahu wa ta'ala sehingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan buku ini. Juga ucapan terimakasih kepada rekan sejawat Tim dosen praktikum mikrobiologi prodi Farmasi ISTN atas kerja sama dan dukungannya penuh dalam penyempurnaan penyusunan buku ini. Semoga buku ini dapat memberi manfaat bagi mahasiswa dan semua yang memerlukannya.

Jakarta, Oktober 2023

Fathin Hamida, S.Si., M.Si

KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM

Bekerja di laboratorium memerlukan pengetahuan dan sikap mandiri untuk menjaga keselamatan diri dan lingkungan. Hal tersebut mencakup pengetahuan untuk menghindari kemungkinan terjadinya kecelakaan dan kebersihan lab sehingga kontaminasi dapat dihindarkan. Bekerja di laboratorium mikrobiologi utamanya memanfaatkan mikroba hidup termasuk mikroba patogen, maka mahasiswa sangat perlu memahami dan menguasai teknik aseptik. Beberapa peraturan dasar yang perlu dipatuhi guna meminimalisir kecelakaan, kontaminasi, dan infeksi, antara lain:

1. Letakkan jaket, topi, dan tas pada loker yang telah disediakan bukan pada meja kerja praktikum.
2. Cucilah kedua tangan menggunakan sabun antiseptik dan keringkan setiap kali memasuki dan meninggalkan lab.
3. Setiap kali memulai dan mengakhiri pekerjaan lakukan desinfeksi pada meja kerja menggunakan tisu yang mengandung alkohol.
4. Jangan meletakkan alat habis pakai atau terkontaminasi seperti jarum ose inokulasi, pipet, batang sebar, pinset, dll diatas meja kerja, tetapi letakkan pada wadah yang telah disediakan yang telah berisi desinfektan.
5. Semua kultur dan bahan yang telah digunakan diletakkan pada *disposal area* sesuai instruksi.
6. Ikatlah rambut bagi yang berambut panjang.
7. Pakailah jas lab dan sandal tertutup bagian depan (sandal khusus lab).
8. Jangan gunakan kosmetik mata atau lensa kontak saat bekerja di lab.
9. Jangan merokok, makan, atau minum di lab.
10. Bawalah kultur tabung reaksi dalam rak tabung bila akan berpindah tempat di lab.
11. Jangan bawa media, alat, terutama kultur bakteri ke luar lab.
12. Segeralah tutup kultur yang tumpah, tercecer atau tabung kultur yang pecah dengan tisu lebar dan jenuhi dengan desinfektan. Setelah 15 menit pindahkan ke *disposal area* dengan cara yang ditentukan oleh instruktur.
13. Jangan memipet kultur atau pereaksi kimia langsung dengan mulut.
14. Jangan banyak bicara, tertawa terbahak – bahak, atau gerakan yang tidak perlu.

PROTOKOL PRAKTIKUM

Persiapan Praktikan.

Sebelum bekerja di laboratorium praktikum diwajibkan untuk mempelajari topik dan bahasan praktikum dan merencanakan kegiatan yang dilakukan.

Persiapan Bahan Praktikum.

Siapkan spidol atau label untuk penamaan setiap eksperimen yang mencantumkan nama organisme uji, media, pengenceran, nama kelompok, dan tanggal. Tempelkan label kira-kira di dibagian Tengah tabung reaksi atau di bagian dasar cawan petri.

Prosedur Inokulasi.

Teknik aseptik sangat diperlukan untuk kegiatan mentransfer atau mengisolasi mikroba. Sebelum menggunakan jarum ose sangat disarankan untuk memijarkannya terlebih dahulu seluruh bagian kawat nya untuk mencapai keadaan steril. Agar sel yang diinokulasi tidak mati maka jarum ose setelah dipijarkan perlu didinginkan sebentar terlebih dahulu dengan cara menyentuh ujung jarum ose pada permukaan media. Bila akan memindahkan mikroba secara aseptik maka ambil sedikit saja sudah cukup tidak perlu mengambil seluruh lapisan permukaan kultur.

Prosedur Inkubasi

Inkubasi bakteri berada pada suhu optimum 37 °C selama 18-24 jam. Letakkan cawan petri yang berisi kultur secara terbalik.

Pencatatan Hasil Pengamatan

Data hasil pengamatan dicatat dan difoto.

Prosedur yang perlu dilakukan pada akhir kegiatan praktikum:

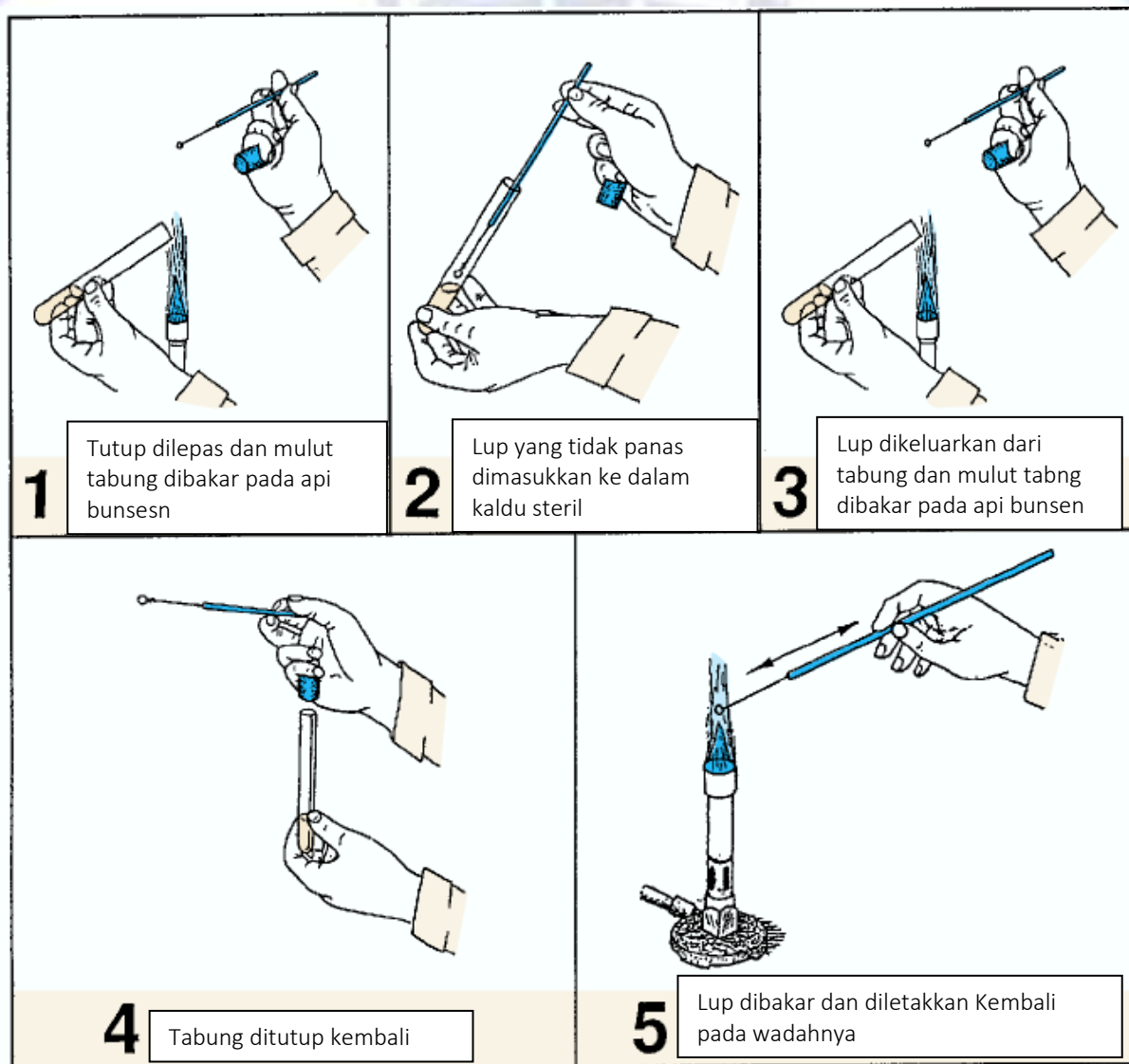
1. Seluruh peralatan, kultur, dan bahan kimia dikembalikan ke tempat semula.
2. Semua tabung reaksi dan cawan petri yang berisi kultur dan habis pakai diletakkan pada *disposal area* untuk dikilling.
3. Bahan dan alat terkontaminasi yang bersifat karsinogenik ditangani secara hati-hati dan disimpan di dalam wadah tertutup.
4. Bersihkan meja kerja dengan tisu yang mengandung desinfektan.
5. Cucilah tangan saat memasuki dan sebelum meninggalkan lab.

BAB 1

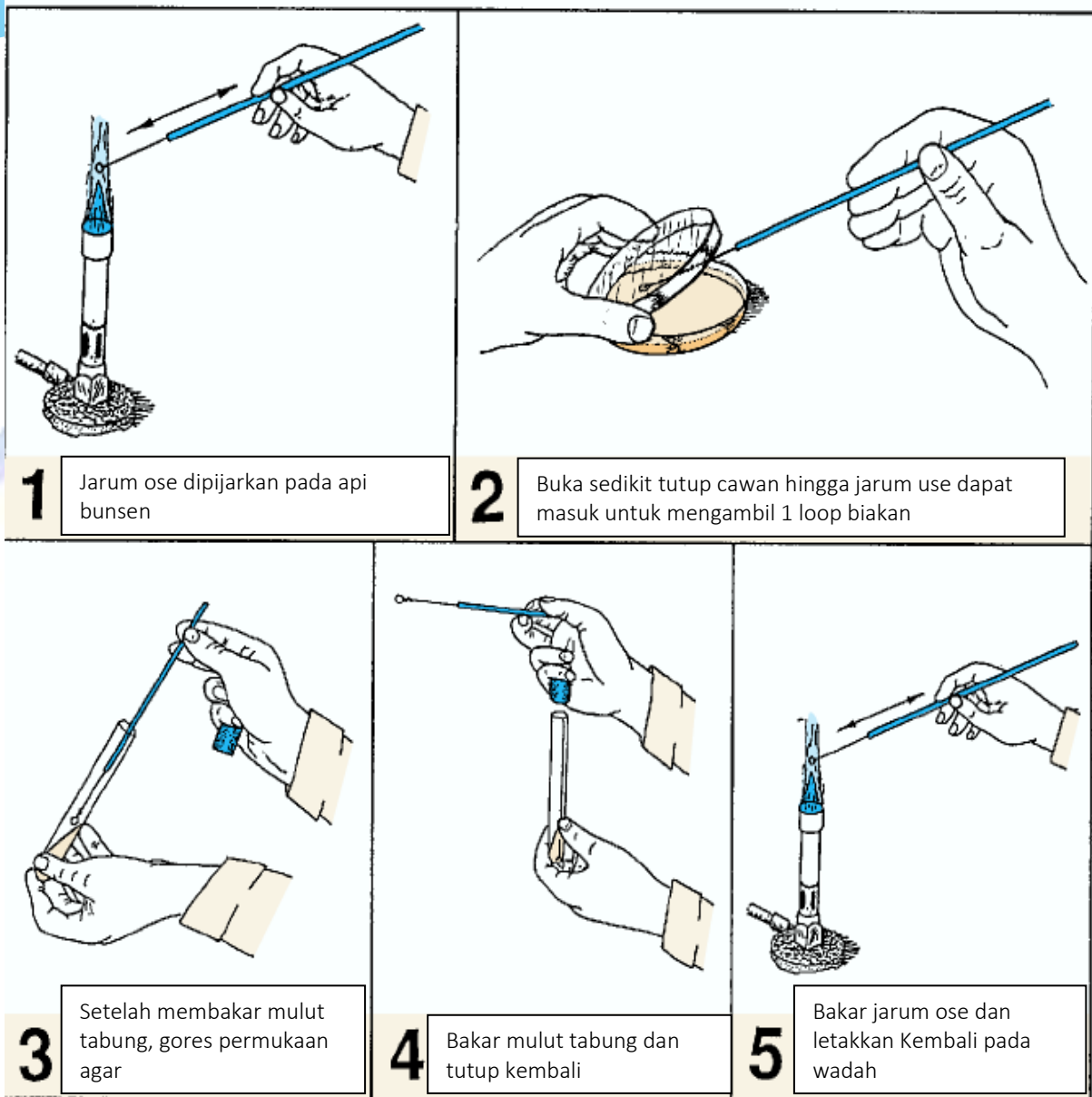
TEKNIK ASEPTIK

Teknik aseptik sangat diperlukan dalam pekerjaan mikrobiologi terutama pada kegiatan mentransfer mikrob dan isolasi mikrob. Teknik aseptik dilakukan untuk menghindari kontaminasi dan hasil yang palsu. Prosedur teknik aseptik umumnya sebagai berikut:

1. Desinfeksi area kerja sebelum dan setelah bekerja
2. Memijarkan jarum ose sebelum dan setelah digunakan pada api bunsen
3. Membakar mulut tabung dan pinggir cawan petri pada api Bunsen
4. Bekerja menggunakan api Bunsen



Gambar 1.1 Teknik Memindahkan Biakan Mikro Ke Tabung Reaksi Secara Aseptik
(Sumber: Benson, 2002)



Gambar 1.2 Teknik Memindahkan Biakan Mikrob Dari Media Agar Cawan Petri Ke Media Tabung Agar Miring Secara Septik
(Sumber: Benson, 2002)

BAB 2

PENGENALAN ALAT

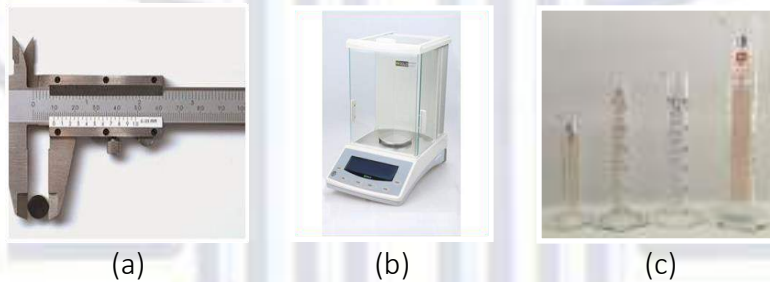
Tujuan Praktikum

1. Mengenal alat – alat laboratorium mikrobiologi
2. Membedakan alat – alat berdasarkan fungsinya
3. Mempelajari cara penggunaan alat – alat mikrobiologi

Teori

Laboratorium mikrobiologi berbeda dengan laboratorium lainnya. Laboratorium mikrobiologi digunakan untuk pekerjaan yang melibatkan mikroorganisme seperti virus, bakteri, dan fungi. Alat – alat yang digunakan dalam pekerjaan mikrobiologi beragam jenis materialnya, seperti alat – alat yang terbuat dari kaca, plastik, kayu, alumunium, dan besi. Selain itu, juga terdapat alat – alat yang membutuhkan listrik sebagai sumber energinya. Alat – alat laboratorium mikrobiologi dapat dibedakan menjadi sembilan jenis berdasarkan fungsinya, yaitu :

1. **Alat ukur**, contoh alat ukur yang digunakan di laboratorium mikrobiologi yaitu: jangka sorong, timbangan analitik, gelas ukur, dan *colony counter* (Gambar 2.1).



(a) (b) (c)
Gambar 2.1 Contoh alat ukur
 (a) jangka sorong; (b) timbangan analitik; (c) gelas ukur

Umumnya **jangka sorong** digunakan untuk mengukur diameter atau ketebalan suatu material. Namun, dalam pekerjaan mikrobiologi jangka sorong juga digunakan untuk mengukur diameter zona bening / zona hambat dari aktivitas suatu senyawa uji.

Timbangan analitik berfungsi mengukur berat suatu zat atau bahan. Kelebihannya yaitu memiliki tingkat ketelitian yang cukup tinggi dan dapat menimbang zat dengan batas 0,0001 g atau 0,1 mg,

Gelas ukur digunakan untuk mengukur suatu cairan dalam ukuran mL atau Liter. Sebaiknya volum suatu larutan yang diukur ditentukan berdasarkan meniscus cekung/cembung suatu cairan / larutan (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Cara mengukur batas volum cairan pada tabung

2. **Alat homogenisasi**, yaitu alat yang digunakan untuk meratakan atau melarutkan atau menghomogenisasi suatu campuran yang bersifat cair. Contohnya adalah batang pengaduk, batang sebar / batang drygalski/ batang segitiga, *vortex*, dan *magnetic hot plate* (Gambar 2.3).



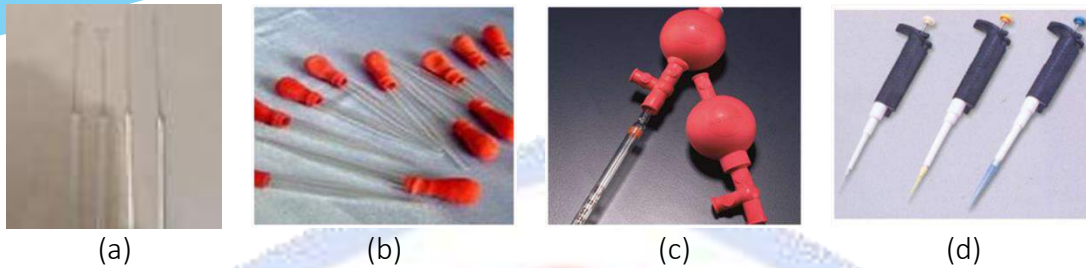
Gambar 2.3 Contoh alat homogenisasi. (a) Batang pengaduk; (b) batang sebar (batang L dan batang segitiga); (c) *vortex*; (d) *magnetic hot plate* dan *magnetic stirrer* (sumber: amazon.com)

Batang pengaduk digunakan untuk larutan yang mudah larut dan homogen dengan pengadukan. Batang sebar/ drygalski / batang L / batang segitiga digunakan untuk meratakan sebaran inokulum bakteri atau fungi pada permukaan media cawan padat.

Vortex berfungsi sebagai alat homogenisasi suatu campuran larutan / cairan di dalam tabung reaksi, tabung sentrifus, atau tabung *ependorf*. Alat ini terdiri dari motor listrik dengan poros penggerak dalam gerakan sirkuler yang diorientasikan secara vertikal dan menempel pada potongan karet yang dipasang sedikit di luar pusat. Bila wadah ditekan ke dalam cangkir karet (atau disentuhkan di ujungnya), gerakan tersebut dikirim ke cairan dalam wadah dan terbentuklah sebuah pusaran.

Magnetic hot plate selain dapat digunakan untuk homogenisasi suatu larutan campuran juga dapat digunakan untuk memanaskan / memasak media agar. Larutan sampel ditempatkan ke dalam erlenmeyer atau *beaker glass*. Alat ini dilengkapi dengan *magnetic stirrer* yang fungsinya sebagai pengaduk. Batang magnet atau *magnetic stirrer* akan berputar sirkuler membentuk pusaran di dalam larutan saat tombol *stirrer* dinyalakan.

3. **Alat transfer**, yaitu alat yang digunakan untuk pekerjaan memindahkan suatu biakan mikroorganisme atau cairan / larutan. Contohnya adalah batang inokulum atau jarum inokulum / jarum ose (ose loop dan ose lurus), pinset, pipet tetes / pipet Pasteur, pipet volumetrik, dan mikropipet (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Contoh alat transfer. (a) Jarum ose (ose *loop* dan ose lurus); (b) pipet tetes; (c) pipet volumetrik; (d) mikropipet

Jarum ose berfungsi untuk memindahkan biakan mikroorganisme yang akan ditanam / ditumbuhkan ke suatu media baik pada atau cair. Jarum ose biasanya terbuat dari kawat nikrom atau platinum yang dapat berpijar jika terkena panas. Terdapat dua jenis jarum ose berdasarkan bentuk ujungnya yaitu bentuk ujung lingkaran (*loop*) disebut *inoculating loop* / *transfer loop* / ose bulat, dan bentuk ujung lurus disebut *inoculating needle* / *transfer needle* / ose lurus / ose jarum. Ose *loop* digunakan untuk menginokulasi biakan bakteri dengan cara gores, sedangkan ose lurus digunakan untuk menginokulasi biakan fungi dan dapat digunakan juga untuk menginokulasi bakteri dengan metode stab pada media agar tegak.

Pipet tetes berfungsi untuk memindahkan cairan dalam jumlah sedikit.

Pipet bulb volumetrik adalah pipet yang bekerja dengan cara dihisap sehingga cairan akan memasuki pipet sebanyak yang diinginkan. Pipet volumetrik digunakan untuk memindahkan cairan dalam jumlah relatif lebih banyak. Balon pipet digunakan untuk menghisap dan dimasukkan ke ujung bagian atas pipet. Umumnya ukuran yang tersedia adalah 1 mL, 2 mL, 5 mL, dan 10 mL.

Mikropipet digunakan untuk memindahkan cairan / kultur mikroorganisme dalam volume $\leq 1000 \mu\text{L}$. Berdasarkan ukuran volume, mikropipet terbagi 2 jenis yaitu *adjustable volume pipette* yaitu jenis mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (misalnya ukuran 0,1–2,0 μL , 2–20 μL , 10–100 μL , 20–200 μL dan 100–1000 μL), dan *fixed volume pipette* yaitu mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya dan hanya tersedia satu pilihan volume misalnya mikropipet 10 μL , 100 μL dan 1000 μL . Penggunaan mikropipet selalu diiringi dengan tip. Warna tip umumnya memiliki 3 variasi yaitu putih transparan untuk 0,5 – 10 μL , kuning 20 – 200 μL , dan biru $>200 \mu\text{L}$. Mikropipet tidak dapat digunakan untuk memindahkan cairan yang pekat dan berserat.

4. **Alat sterilisasi.** sterilisasi merupakan proses penting dalam pekerjaan mikrobiologi. Penggunaan bahan dan alat yang tidak steril dalam pekerjaan mikrobiologi dapat memberikan hasil yang tidak akurat akibat kontaminasi. Untuk itu pekerjaan mikrobiologi membutuhkan alat – alat yang dapat digunakan untuk mensterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dalam pekerjaan mikrobiologi. Alat – alat sterilisasi tersebut diantaranya adalah autoklaf, oven, pembakar spirtus / bunsen, dan *filter milipore* (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Alat Sterilisasi. (a) Autoklaf; (b) Oven; (c) Bunsen; (d) *Filter milipore*

Autoklaf digunakan untuk sterilisasi basah. Autoklaf seperti sebuah panci dandang yang berukuran besar. Prinsip kerja autoklaf adalah menggunakan uap air jenuh dengan tekanan tinggi (suhu 121°C , tekanan 2 atm, waktu sterilisasi selama 15-20 menit). Sterilisasi bahan seperti media agar dan media cair hanya membutuhkan waktu maksimal 15 menit, untuk media yang mengandung susu / kasein sebaiknya waktu sterilisasi tidak lebih dari 10 menit. Sterilisasi alat dapat dilakukan selama 20 menit. Alat – alat yang dapat disterilisasi ke dalam autoklaf seperti alat yang terbuat dari kaca, aluminium, besi, dan kain kasa. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik seperti tip mikropipet atau tabung *Eppendorf* sebaiknya dimasukkan ke dalam wadah botol kaca terlebih dahulu atau dibungkus menggunakan kertas atau *aluminium foil* atau plastik tahan panas.

Cara penggunaan autoklaf:

1. Cek ketersediaan air dalam autoklaf dan wadah penampung uap air sesuai dengan tanda batas yang ditertera. Gunakan air hasil destilasi untuk menghindari terbentuknya kerak / korosif.
2. Masukkan bahan / alat yang akan disterilisasi ke dalam keranjang, kemudian masukkan ke dalam autoklaf.
3. Tutup dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari autoklaf.
4. Hubungkan autoklaf dengan arus listrik.
5. Nyalakan autoklaf dengan menekan tombol power.
6. Atur suhu, tekanan, dan waktu sterilisasi dengan menggunakan tombol yang terdapat pada autoklaf.
7. Tekan tombol start untuk memulai sterilisasi. Perhitungan waktu dimulai sejak suhu mencapai suhu dan tekanan yang telah ditentukan dan tunggu sampai waktu yang telah diatur sebelumnya.
8. Setelah selesai proses akan berhenti secara otomatis.
9. Jika tanda selesai berbunyi, tunggu tekanan turun mencapai nol dan suhu minimal di bawah 70°C
10. Jika sudah selesai sterilisasi, tutup autoklaf tidak boleh langsung dibuka, sangat disarankan untuk menunggu suhu dan tekanan di dalam autoklaf turun, tekanan turun mencapai nol dan suhu minimal di bawah 70°C
11. Setelah itu katup uap dapat dibuka untuk memastikan tidak ada uap panas yang tersisa di dalam sebelum tutup autoklaf dibuka. Hal ini bertujuan untuk keselamatan agar terhindar dari kecelakaan akibat terpapar uap panas dari dalam

autoklaf.

12. Matikan autoklaf dan cabut kabel
13. penghubung arus listrik apabila sudah selesai digunakan.

Oven merupakan alat sterilisasi kering yang digunakan dalam pekerjaan mikrobiologi. Prinsip kerjanya adalah sterilisasi menggunakan udara panas suhu 160 °C selama 2-3 jam. Tidak semua jenis material dapat disterilisasi menggunakan oven. Hanya alat – alat tahan panas yang dapat disterilisasi menggunakan oven, seperti alat – alat yang terbuat dari kayu, besi atau aluminium, dan kaca. Disarankan untuk alat yang akan disterilisasi dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas atau aluminium foil.

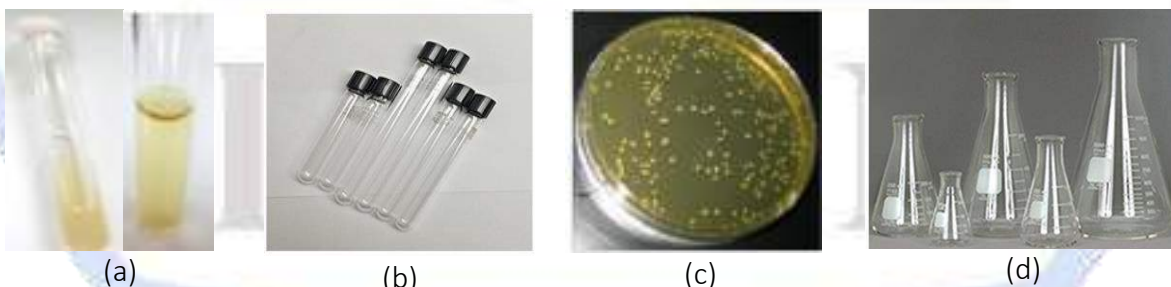
Cara penggunaan :

1. Pastikan oven terhubung dengan arus listrik
2. Masukkan alat – alat yang akan disterilisasi (telah dibungkus sebelumnya) ke dalam oven. Susun sedemikian rupa hingga memenuhi ruang dalam oven secara efektif.
3. Atur suhu menggunakan tombol pengatur suhu dan nyalakan tombol power
4. Catat waktu pada saat oven dinyalakan
5. Setelah selesai sesuai dengan waktu/ lama sterilisasi yang diinginkan, matikan oven
6. Setelah suhu turun hingga mencapai suhu kamar, keluarkan peralatan yang telah steril.

Pembakar spirtus / Bunsen digunakan untuk sterilisasi alat – alat yang terbuat dari besi / aluminium seperti jarum inokulum (ose), gunting, dan pinset. Sterilisasi ini dilakukan dengan cara memijarkan alat tersebut di dalam api sebelum digunakan.

Filter milipore adalah membran yang memiliki pori sebagai penyaring dengan diameter pori berukuran mikron. *Filter milipore* ada dua jenis yaitu diameter pori berukuran 0,2 µm dan diameter pori ukuran 0,4 µm. *Filter milipore* digunakan untuk sterilisasi bahan yang mudah rusak akibat pemanasan atau tidak tahan panas seperti cairan antibiotik, enzim, serum, albumin.

5. **Wadah kultivasi** adalah wadah yang digunakan untuk menanam dan menumbuhkan mikroorganisme. Wadah ini umumnya terbuat dari kaca dan memiliki ukuran bervariasi. Contohnya adalah cawan petri, tabung reaksi, tabung reaksi ulir, dan erlenmeyer (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Wadah kultivasi. (a) tabung reaksi; (b) tabung reaksi ulir; (c) cawan petri; (d) erlenmeyer

Cawan petri merupakan ciri khas alat yang digunakan dalam pekerjaan mikrobiologi. Cawan petri umumnya yang digunakan dapat terbuat dari kaca atau plastik. Cawan petri dimanfaatkan dalam pekerjaan mikrobiologi sebagai wadah untuk menanam atau menumbuhkan mikroorganisme seperti virus, bakteri, dan fungi pada media padat atau semi padat. Cawan petri terdapat berbagai macam ukuran, diameter cawan standar berdiameter 15x1,5 cm, dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9x1,5 cm dapat menampung media sebanyak 10 ml. Selain itu, cawan petri juga ada yang berukuran lebih kecil yaitu 6x1,5 cm dan 3x1,5 cm, jenis ini biasanya digunakan untuk menyimpan biakan murni aktinobakteri. Cawan petri kaca yang akan disterilisasi biasanya dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas.

Di dalam pekerjaan mikrobiologi, **tabung reaksi** berbahan kaca digunakan sebagai wadah media kultur baik padat (agar tegak (*deep tube agar*) atau agar miring (*slant agar*)) maupun cair. Selain itu, juga digunakan sebagai wadah cairan pengencer dan media biokimia. Penutup tabung reaksi dapat berupa sumbat kapas, tutup metal, tutup karet, atau aluminium foil.

Erlenmeyer digunakan sebagai wadah untuk menumbuhkan biakan mikroorganisme (bakteri, fungi, dan alga) dalam media cair. Selain itu, erlenmeyer juga dapat digunakan sebagai wadah untuk menampung media mikrobiologis baik padat maupun cair yang akan dipersiapkan untuk pengujian. Penutup Erlenmeyer biasanya dapat terbuat dari porselen, kayu, sumbat kapas, atau aluminium foil.

6. **Ruang kultivasi** contohnya adalah inkubator. Inkubator dikonstruksi sedemikian rupa sehingga dapat menunjang pertumbuhan mikroorganisme. Biasanya inkubator dilengkapi dengan pengatur suhu sehingga dapat diatur penggunaan suhu yang sesuai untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme yang akan ditumbuhkan. Inkubator dapat dibedakan menjadi tiga jenis yaitu inkubator statis, inkubator bergoyang (*shaker incubator*), dan *waterbath incubator* (inkubator dengan penangas air) (Gambar 2.7). Inkubator bergoyang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme aerob obligat.



Gambar 2.7 Ruang kultivasi. (a) Inkubator statis; (b) inkubator bergoyang
(sumber: [www. Generasibiologi.com](http://www.Generasibiologi.com); <https://us.vwr.com/>)

7. **Ruang transfer** merupakan ruangan steril yang di desain untuk aktivitas memindahkan / mentransfer biakan mikroorganisme / bahan mikrobiologis secara aseptis sehingga kontaminasi udara dapat dihindari. *Laminar air flow cabinet* atau disebut juga *biological*

safety cabinet adalah ruangan steril yang umum ditemukan di laboratorium mikrobiologi. Prinsip kerjanya adalah menarik udara dari luar dan dilakukan proses penyaringan udara hingga steril lalu udara steril dihembuskan di dalam ruang *laminar air flow*. LAF / BSC dilengkapi dengan lampu neon sebagai sumber penerang, lampu UV sebagai alat sterilisasi ruangan, dan blower yang menghembuskan udara steril ke dalam ruangan LAF (Gambar 2.8).



Gambar 2.8 *Laminar air flow cabinet*
(Sumber: Indiamart.com)

- Ruang simpan** adalah ruang yang digunakan untuk menyimpan dalam waktu lama stok biakan mikroorganisme, media steril, larutan termolabil, antibiotik, serum, dan pereaksi biokimia. Contoh ruang simpan adalah refrigerator (Gambar 2.9). Suhu yang digunakan $10 - 4^{\circ}\text{C}$ untuk media agar / cair, dan biakan padat / cair, sedangkan untuk biakan kering (*freeze drying* / liofilisasi) gunakan suhu $\leq 0^{\circ}\text{C}$. Ruang penyimpanan media mikrobiologis steril / larutan steril disimpan terpisah dengan ruang penyimpanan biakan bakteri dan fungi.



Gambar 2.9 Contoh penyimpanan bahan mikrobiologis di dalam freezer
(sumber: <https://cryostarindustries.com>)

- Alat Optik** yang digunakan di Lab mikrobiologi adalah mikroskop. Mikroskop berfungsi sebagai alat bantu untuk melihat organisme yang berukuran mikron atau mikroorganisme seperti yeast/khamir, kapang/mold, bakteri, dan virus. Umumnya ada

dua jenis mikroskop yang digunakan di Lab mikrobiologi yaitu mikroskop elektron dan mikroskop cahaya. Mikroskop elektron memanfaatkan sinar elektron, memiliki resolusi yang sangat tinggi dan dapat memperbesar objek spesimen hingga 1000.000 kali lebih besar dari ukuran sebenarnya. Mikroskop Cahaya memanfaatkan sinar Cahaya seperti lampu atau Cahaya matahari, memiliki resolusi lebih rendah dari mikroskop elektron dengan perbesaran hingga 1000x dari ukuran spesimen sebenarnya. Mikroskop Cahaya ada dua jenis yaitu monokuler dan binokuler.



Gambar 2.10 Mikroskop Cahaya Binokuler
(Sumber: <https://www.medicalogy.com/>)

Tabel 2.1 Bagian – Bagian Mikroskop Binokuler dan Fungsinya

No	Bagian	Fungsi
1	Lensa okuler	Bagian optik mikroskop yang berada dekat dengan mata pengamat membentuk bayangan maya, tegak, dan diperbesar sehingga bayangan dapat dilihat langsung oleh mata pengamat.
2	Sekrup pemutar kepala mikroskop	Untuk memutar kepala mikroskop, pemutaran dapat dijangkau hingga 360 ^o
3	Tubus / tabung lensa	Penghubung antara lensa okuler dengan lensa objektif
4	Lengan mikroskop	Sebagai handle / pegangan untuk membawa / memindahkan mikroskop
5	Revolver	Sebagai tuas penyangga lensa objektif yang dapat diputar ke kanan dan ke kiri
6	Lensa objektif	Lensa yang berada dekat dengan objek yang diamati. Berfungsi membentuk bayangan nyata, terbalik, dan diperbesar
7	Penjepit preparat	Menjepit preparat yang diamati sehingga tidak mudah bergeser dan mudah digerakkan / diarahkan saat pengamatan
8	Meja preparat	Alas / tempat untuk meletakkan preparate yang diamati
9	Diafragma	Mengatur jumlah cahaya yang masuk
10	Mikrometer	Menaikkan atau menurunkan tabung mikroskop atau tubus dengan lambat
11	Makrometer	Menaikkan atau menurunkan tabung mikroskop atau tubus dengan cepat.
12	Reflektor	Cermin pengatur yang berfungsi memantulkan cahaya dari cermin ke objek pengamatan.
13	Navigasi meja objek (vertikal)	Menggerakkan meja objek ke depan dan ke belakang
14	Navigasi meja objek (horizontal)	Menggerakkan meja objek ke kanan dan ke kiri
15	Tombol power lampu	Sumber Cahaya lampu mikroskop
16	Pengatur Cahaya lampu	Mengatur penerangan lampu
17	Kaki mikroskop	Penyangga / penopang mikroskop

Cara Penggunaan Mikroskop Cahaya:

1. Semprotkan meja kerja sebelum dan sesudah bekerja dengan alkohol 70% dan lap dengan tisu hingga kering.
2. Ambil mikroskop dari rak penyimpanan dengan tangan kanan menyanggah lengan mikroskop dan lengan kiri menyanggah kaki mikroskop.
3. Letakkan mikroskop di meja yang datar dan bersih dari benda – benda asing yang mengganggu.
4. Pasang supply Listrik mikroskop
5. Nyalakan tombol power pada mikroskop
6. Atur volume cahaya lampu mikroskop sesuai dengan kebutuhan
7. Naikkan lensa obyektif dengan cara memutar makrometer hingga maksimal
8. Letakkan kaca objek (preparat) yang akan diamati pada permukaan meja preparat lalu

- jepit kedua sisi kaca objek dengan penjepit preparat yang terpasang di meja preparat.
9. Tempatkan lensa obyektif perbesaran 10x diatas kaca objek dengan cara memutar revolver hingga terdengar bunyi “klik”
 10. Turunkan lensa onyektif dengan cara memutar secara perlahan makrometer hingga diperoleh bayangan objek. Untuk memastikannya gerakkan meja preparate kea kanan – kiri dan atas – bawah secara perlahan.
 11. Jika sudah mendapat bayangan objek maka perjelas objek dengan cara memutar mikrometer secara perlahan hingga diperoleh objek yang jelas.
 12. Jika objek terlalu gelap atau terang maka atur pencahayaan dengan memutar diafragma sampai diperoleh objek yang sangat jelas.
 13. Saat mengamati objek dengan perbesaran 1000x, teteskan terlebih dahulu minyak imersi pada permukaan kaca preparat. Minyak imersi berguna untuk memperjelas objek yang terlihat sangat kecil sehingga tampak lebih kontras dan tajam.
 14. Setelah selesai pengamatan, turunkan meja preparat dengan cara memutar makrometer hingga maksimal.
 15. Lepas kaca objek dari penjepit preparate
 16. Bersihkan lensa obyektif dan okuler menggunakan tisu kering dengan cara ditempelkan secara perlahan ! **JANGAN GUNAKAN ALKOHOL ATAU TISU BASAH !**
 17. Tempatkan lensa obyektif perbesaran terkecil tepat diatas meja preparat dengan cara memutar revolver.
 18. Matikan tombol power dan cabut supply Listrik mikroskop
 19. Gulung kabel mikroskop sesuai tempat yang disediakan
 20. Letakkan Kembali mikroskop pada rak penyimpanan, **CARA MEMBAWA MIKROSKOP SAMA SEPERTI NO. 2.**
 21. **PERHATIAN ! SAAT PENGAMATAN HINDARI MENGGESER – GESER MIKROSKOP, JIKA DIBUTUHKAN GUNAKAN SEKROP PEMUTAR KEPALA MIKROSKOP UNTUK MEMINDAHKAN POSISI LENS OKULER BERADA PADA PENGAMAT BUKAN MENGGESER BADAN MIKROSKOP !**

Prosedur Kerja

1. Amati serta pahami fungsi dan cara penggunaan alat – alat yang ada di dalam ruangan Laboratorium Mikrobiologi, kemudian dokumentasikan / foto setiap alat yang ada dan buatlah laporan hasil pengamatan.

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Pengenalan Alat – Alat Laboratorium Mikrobiologi

No.	Nama Alat	Fungsi Alat	Keterangan (Foto)
1			
2			
3			
dst			

BAB 3

STERILISASI

Tujuan Praktikum

1. Mempelajari prinsip kerja dari setiap jenis sterilisasi
2. Melakukan sterilisasi secara mandiri dan mengetahui cara mengoperasikan autoklaf

Teori

Sterilisasi yaitu proses atau kegiatan menghancurkan atau memusnahkan semua mikroorganisme termasuk spora dari sebuah benda atau lingkungan. Suatu alat atau bahan disebut steril apabila bahan tersebut bebas dari mikroorganisme. Sterilisasi dapat dilakukan secara mekanik, fisik, maupun secara kimia tergantung dari alat dan bahan yang akan disterilisasi. Sterilisasi secara mekanik dapat dilakukan dengan penyaringan. Sterilisasi secara fisik dilakukan dengan pemanasan, atau iradiasi sinar ultraviolet (UV). Sinar UV digunakan untuk membunuh mikroorganisme yang menempel pada permukaan LAF (Laminar Air Flow). Sterilisasi secara kimiawi dapat dilakukan dengan pemberian bahan kimia yang dapat membunuh mikroorganisme seperti desinfektan. Contoh desinfektan yaitu alkohol 70%, karbol, lisol.

1. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering atau sterilisasi panas kering dapat diterapkan dengan cara pemanasan langsung melewati di atas nyala api (pembakaran) dan sterilisasi dengan udara panas (oven).

- a. Pembakaran menggunakan api

Api digunakan untuk mensterilisasi peralatan berbahan kaca, besi, atau aluminium, seperti jarum inokulasi, kaca objek, pinset, mulut tabung reaksi, spatula, gunting, dan lain-lain. Sterilisasi ini dengan cara memijarkan alat di dalam api bunsen selama beberapa menit saja.

- b. Udara panas kering

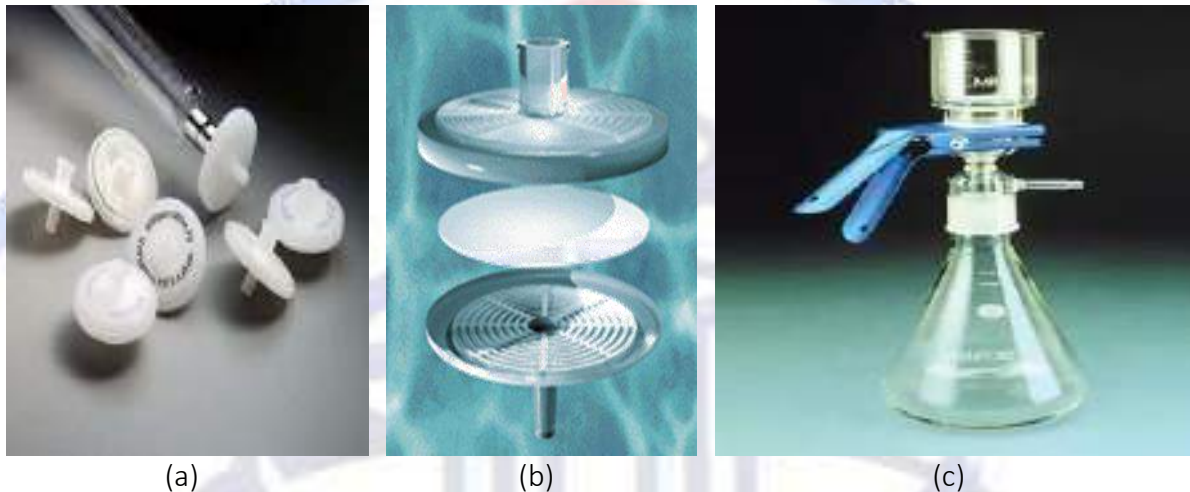
Membutuhkan alat seperti oven. Sterilisasi ini dilakukan selama 2-3 jam pada suhu 160 °C. Sterilisasi udara panas kering terjadi melalui mekanisme konduksi panas. Panas akan diabsorpsi oleh permukaan luar alat yang disterilkan, lalu merambat ke bagian dalam permukaan sampai mencapai suhu sterilisasi. Sterilisasi tersebut umumnya digunakan untuk alat yang terbuat dari kaca, misalnya: erlenmeyer, Tabung reaksi, cawan petri, dan kurang efektif dalam membunuh mikroorganisme.

2. Sterilisasi Basah

Sterilisasi basah atau sterilisasi panas lembab menggunakan alat yang disebut autoklaf. Alat ini menerapkan pemanasan dari uap air dengan tekanan dan suhu yang tinggi. Pelepasan energi uap pada sterilisasi basah bertekanan mengakibatkan denaturasi atau koagulasi protein sel mikrob sehingga melemahkan aktivitas mikrob. Sterilisasi menggunakan autoklaf merupakan cara yang paling baik karena uap air panas dengan tekanan tinggi menyebabkan penetrasi uap air ke dalam sel-sel mikrob menjadi optimal sehingga langsung mematikan mikrob. Sterilisasi ini digunakan untuk alat yang terbuat dari kaca dan bahan/media yang tidak mudah rusak dengan pemanasan. Sterilisasi menggunakan autoklaf membutuhkan waktu 15 – 20 menit pada suhu 121 °C.

3. Penyaringan (Filtrasi)

Cara ini diterapkan untuk sterilisasi bahan yang mudah rusak dengan pemanasan atau termolabil. Contohnya antibiotik, enzim, asam amino, vitamin, senyawa gula, dan lain-lain. Sterilisasi secara mekanik tersebut dilakukan penyaringan menggunakan filter yang mempunyai pori sangat halus (0,22-0,45 µm), dan pompa vakum digunakan untuk menyedot sehingga larutan akan melalui filter dengan lancar (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Alat sterilisasi dengan penyaringan. (a) Millipore syringe filters (b) membran millipore (c) Millipore vacuum filters (Sumber: <https://www.coleparmer.ca>)

Prosedur Kerja

1. Amati dan pelajari cara penggunaan alat sterilisasi yang ada di Lab Mikrobiologi seperti bunsen, oven, dan autoklaf. Pelajari hal – hal yang harus dipersiapkan sebelum melakukan sterilisasi, misalnya membungkus cawan petri dengan kertas sebelum melakukan sterilisasi, membungkus pipet bulb volumetrik menggunakan kertas sebelum sterilisasi, serta membuat sumbat kapas sebelum sterilisasi media cair di dalam tabung reaksi atau Erlenmeyer. Buatlah laporan yang membahas mengenai prinsip kerja dan fungsi sterilisasi yang anda lakukan saat praktikum.

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Alat Sterilisasi

No	Nama Alat	Jenis Sterilisasi	Foto
1			
2			
3			
dst			

BAB 4

MEDIA PERTUMBUHAN

Tujuan Praktikum

1. Membedakan jenis media mikrobiologis beserta fungsinya
2. Mendefinisikan fungsi (bahan dasar, unsur nutrisi, dan bahan tambahan) pada setiap bahan yang terkandung dalam media
3. Membuat media (cair / *broth* dan padat / *Agar solid*) secara mandiri
4. Mempelajari dan menerapkan teknis aseptis

Teori

Media Pertumbuhan adalah: unsur nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk metabolisme dan pertumbuhannya. Unsur nutrisi tersebut terdiri dari senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak), senyawa anorganik, mineral, dan vitamin. Nutrisi dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk biosintesis, pembentukan energi, metabolisme, dan pertumbuhan. Suatu media pertumbuhan harus memenuhi syarat tertentu agar dapat menunjang kehidupan mikroorganisme, syarat tersebut yaitu:

1. Harus memenuhi semua kebutuhan nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroorganisme
2. Tidak mengandung zat penghambat pertumbuhan kecuali dibutuhkan untuk tujuan tertentu
3. Harus steril
4. Harus memiliki tekanan osmosis, pH, dll yang sesuai

Nutrisi dibedakan menjadi 3 kelompok utama berdasarkan fungsinya yaitu makronutrien, mikronutrien, dan *Accessory nutrient*. Makronutrien adalah unsur nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah banyak gram, contohnya CHONSP (Karbon, Hidrogen, Oksigen, Nitrogen, Sulfur, Fosfor). Karbon dibutuhkan untuk pembentukan struktur sel dan energi. Nitrogen merupakan sumber penting dalam pembentukan makromolekul seperti protein dan asam nukleat. Protein diperlukan untuk membangun struktur molekul seperti enzim yang mengkatalisis berbagai aktivitas metabolisme di dalam sel. Fosfor di alam tersedia dalam bentuk organik dan anorganik dan sangat diperlukan untuk sintesis asam nukleat (DNA dan RNA), pembentukan senyawa pembawa energi ATP, dan fosfolipid. Sulfur dibutuhkan untuk struktur asam amino sistein dan metionin, juga dijumpai pada beberapa vitamin seperti tiamin, biotin, dan koenzim. Sulfur dalam sel berasal dari sumber anorganik seperti sulfat (SO_4^{2-}) dan sulfida (HS^-). Mikronutrien merupakan substansi nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit (mg sampai ppm), meliputi Kobalt (Co), Mangan (Mn^{2+}), Zinc (Zn^{2+}), Natrium (Na^+), Kalium (K^+), tembaga (Cu^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Fe^{2+} , dan Fe^{3+} . Mikronutrien berperan penting dalam menjalankan fungsi sel. Mikronutrien dapat berupa bagian enzim atau kofaktor yang membantu katalisis dan membentuk protein. Contoh: Zn^{2+} berada pada sisi aktif beberapa macam enzim dan terlibat dalam pengaturan dan katalisis enzim aspartat karbamiltransferase, sedangkan kobalt diperlukan dalam pembentukan vitamin B12.

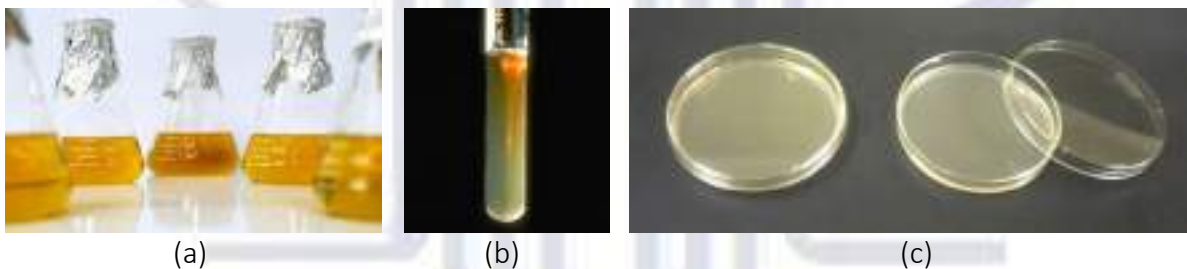
Accessory nutrient disebut juga *growth factor* (faktor tumbuh) yaitu senyawa organik yang dibutuhkan dalam jumlah kecil, tidak diperlukan untuk semua sel. *Accessory nutrient* meliputi: vitamin, asam amino, purin dan pirimidin. Vitamin sebagian besar dibutuhkan sebagai zat

tumbuh dan berfungsi sebagai komponen koenzim. BAL (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Leuconostoc*) merupakan bakteri yang membutuhkan multivitamin dalam jumlah lebih banyak dibandingkan manusia. Vitamin yang banyak dibutuhkan antara lain tiamin (B1), biotin, piridoksin (B6), dan Kobalamin (B12). Asam amino diperlukan dalam sintesis protein. Purin dan pirimidin diperlukan dalam sintesis asam nukleat.

Bahan penyusun media dibedakan menjadi tiga unsur yaitu unsur / bahan dasar, unsur nutrisi, dan unsur / bahan tambahan. Bahan dasar adalah bahan yang berperan sebagai penyusun konsistensi media, contohnya adalah akuades, agar, gelatin, dan silika gel. Bahan nutrisi merupakan bahan yang mengandung unsur – unsur nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh, contohnya yaitu sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin, dan bahan alami. Bahan tambahan merupakan bahan yang keberadaannya hanya dibutuhkan untuk tujuan tertentu dan tidak harus selalu ada dalam media pertumbuhan, contohnya adalah indikator pH, dan antibiotik.

Media kultur merupakan bahan nutrisi yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di laboratorium. Media kultur berdasarkan konsistensinya dibedakan menjadi tiga yaitu (Gambar 4.1):

1. Media cair (*broth media*): berupa media cair yang mengandung nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme.
2. Media agar padat (*solid media*): media padat menggunakan bahan pembeku (*solidifying agent*) misalnya Agar. Media padat membutuhkan konsentrasi Agar sebesar 1.5-1.8%.
3. Media semi padat (*semi solid media*), menggunakan konsentrasi Agar sebesar <1%.



Gambar 4.1 Jenis media berdasarkan konsistensinya. (a) media cair; (b) media agar semi solid; (c) media agar padat

(Sumber: <https://www.differencebetween.com>)

Media berdasarkan bentuknya dibedakan menjadi tiga jenis yaitu media agar tegak, media agar miring (*slant agar*) dan media cawan padat (Gambar 4.2). Media berdasarkan kandungan nutrisinya dibedakan menjadi 2 tipe yaitu media sintetik dan media kompleks (Tabel 4.1). **Media sintetik** adalah media yang komponen penyusunnya (substansi kimia murni baik organik maupun anorganik) sudah diketahui atau terdefinisi jumlahnya. Media ini biasanya digunakan dalam penelitian untuk mengetahui kebutuhan nutrisi mikroorganisme. **Media kompleks** yaitu media yang komponen penyusunnya secara kimiawi tidak terdefinisi jumlahnya, dan umumnya diperlukan karena kebutuhan mikroorganisme tertentu tidak diketahui. Contoh: *Nutrient Broth*, *Tryptic Soya Broth*. Pepton merupakan sumber utama protein dan karbon, ekstrak daging merupakan sumber karbon organik, sumber nitrogen yang mengandung asam-asam amino, peptida, nukleotida, asam organik, vitamin, mineral, dan garam anorganik.



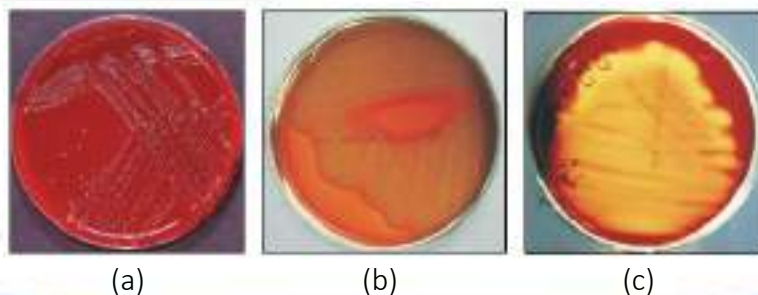
Gambar 4.2 Jenis media berdasarkan bentuknya. (a) media agar tegak; (b) media agar miring; (c) media cawan agar
(Sumber: <https://www.differencebetween.com/>)

Tabel 4.1 Perbedaan Kandungan Media Sintetik dan Media Kompleks

1. Contoh <i>Defined media</i> (media sintetik):	2. Contoh Media kompleks: NB (<i>Nutrient Broth</i>)
Glukosa : 1 g/L	Pepton : 5 g/L
Na ₂ PO ₄ : 16.4 g/L	Beef ekstrak : 3 g/L
KH ₂ PO ₄ : 1.5 g/L	
(NH ₄) ₂ . 7H ₂ O : 2 g/L	
CaCl ₂ : 0.2 g/L	
FeSO ₄ : 0.01 g/L	

Media berdasarkan fungsinya dibedakan menjadi 4 kategori, yaitu media umum, media pengaya, media selektif, dan media diferensial.

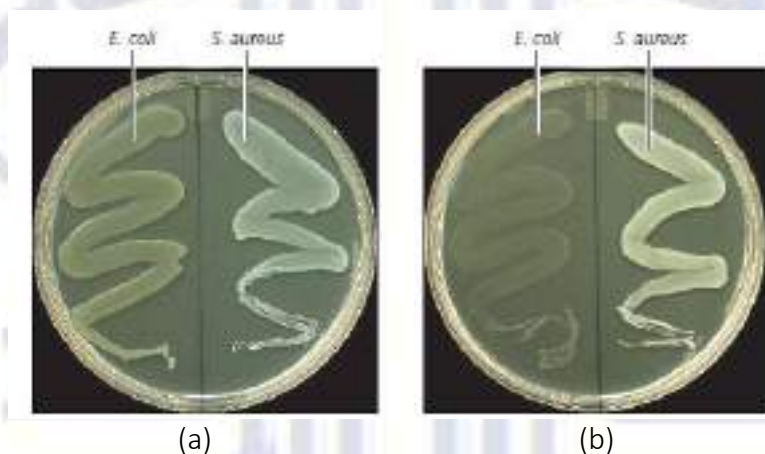
- Media Umum** merupakan media pendukung bagi banyak pertumbuhan mikroorganismenya, contoh: TSB (*Tryptic Soy Broth*), NB (*Nutrient Broth*), PDA (*Potato Dextrose Agar*), SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*), *Soybean casein digest medium*.
- Media pengaya (*enrichment media*)**, media yang berguna untuk mempercepat pertumbuhan bakteri yang bersifat *fastidious* (rewel). Media ini dilengkapi dengan bahan bernutrisi tinggi, seperti darah, serum, atau ekstrak khamir. Contoh: *Blood Agar*, dan *Yeast Extract Broth*.
 - Blood Agar** yaitu media yang ditambahkan darah (biasanya darah kuda / domba) untuk mempercepat pertumbuhan bakteri *fastidious* yang bersifat hemolitik seperti *Streptococcus*. Media juga digunakan untuk membedakan antara bakteri hemolitik dan bakteri nonhemolitik dengan mengetahui sifat lisis eritrosit (ciri: daerah jernih di sekitar koloni akibat perusakan eritrosit). Aktivitas hemolitik dapat dibedakan menjadi 3 tipe yaitu α -hemolysis, β -hemolysis, dan γ -hemolysis (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Tipe hemolisis pada media *blood agar*. (a) γ -hemolysis (b) α -hemolysis (c) β -hemolysis

(Sumber: Cappuccino & Welsh, 2017)

3. **Media selektif** berfungsi untuk mengisolasi bakteri tertentu karena bahan / zat yang ditambahkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain sehingga memudahkan untuk mengisolasi bakteri yang diinginkan. Pada media ini ditambahkan bahan penghambat pertumbuhan, misalnya *bile salt* dan *dye* (*fuchsin*, *crystal violet*, *brilliant green*) yang akan menghambat pertumbuhan bakteri Gram Positif dan tidak memberi efek pada bakteri Gram Negatif; antibiotik; dan selulosa untuk mengisolasi bakteri pendegradasi selulosa. Contoh media selektif yaitu *Phenylethyl alcohol agar*, *Crystal violet agar*, dan *7.5% sodium chloride agar*.
- Phenylethyl alcohol agar***: media ini digunakan untuk isolasi sebagian besar bakteri Gram positif. Feniletil alkohol dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif (Gambar 4.4).
 - Crystal violet agar***: media ini bersifat selektif pada sebagian besar bakteri Gram negatif. Pewarna kristal violet memberikan efek penghambatan pada sebagian besar bakteri Gram positif.
 - 7.5% sodium chloride agar***: Media ini merupakan penghambat bagi sebagian besar bakteri selain bakteri halofilik (suka garam). Media ini paling berguna untuk mengisolasi genus *Staphylococcus*.

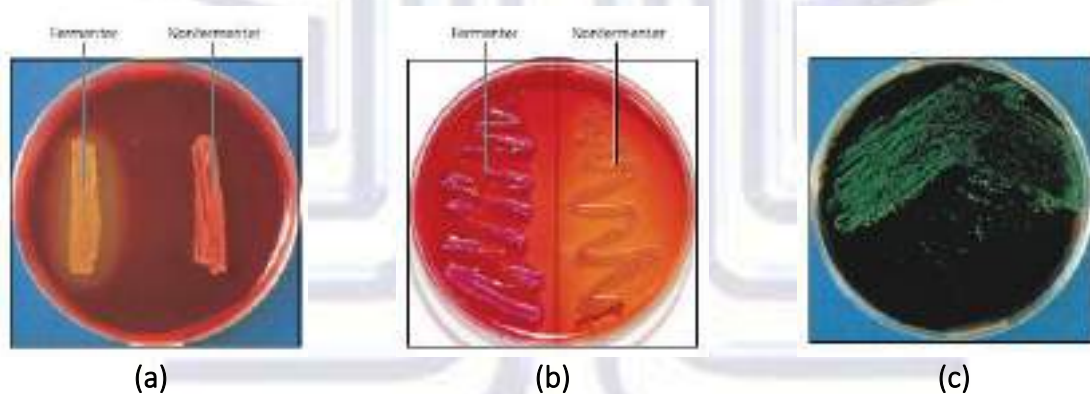


Gambar 4.4 Efek selektifitas *Phenylethyl alcohol agar* terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan menghambat (menurunkan) pertumbuhan *E. coli*. (a) *Media Nutrient Agar* (b) media *Phenylethyl alcohol agar*
(Sumber: Cappuccino & Welsh, 2017)

4. **Media Diferensial**, digunakan untuk membedakan mikroorganisme yang masih berkerabat berdasarkan perbedaan morfologi koloni dan reaksi biokimia. Contoh: media *Agar Darah (Blood Agar)* digunakan untuk membedakan antara bakteri hemolitik dan bakteri non hemolitik dengan mengetahui sifat lisis eritrosit (ciri: daerah jernih di sekitar koloni akibat kerusakan eritrosit). Terdapat media yang fungsinya kombinasi sebagai media selektif dan diferensial sekaligus atau dapat dikatakan karakteristik selektif dan diferensial dapat digabungkan dalam satu media. Contohnya media *MacConkey Agar*, *Mannitol Salt Agar*, dan *Eosin–Methylene Blue Agar* (Gambar 4.5).
- MacConkey Agar***: media ini mengandung *crystal violet* yang mempunyai efek menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif sehingga bakteri Gram negatif dapat diisolasi. Selain itu, terdapat laktosa, garam empedu dan *neutral red*. Adanya laktosa pada media digunakan untuk membedakan bakteri enterik yang

mampu melakukan fermentasi laktosa. *E. coli* yang ditumbuhkan pada media ini akan menampilkan permukaan koloni berwarna merah sedangkan bakteri enterik lainnya (basil disentri, tifoid, dan paratifoid) yang tidak mampu melakukan fermentasi laktosa akan menunjukkan permukaan koloni yang transparan.

- b. **Mannitol Salt Agar:** media ini mengandung garam kadar tinggi yaitu NaCl 7,5%. Kandungan garam yang tinggi dapat menghambat Sebagian besar bakteri kecuali *Staphylococcus*. Adanya manitol di dalam media dimanfaatkan oleh *Staphylococcus* sebagai sumber karbon dalam fermentasi karbohidrat. Dan *Phenol red* sebagai indikator pH dapat menunjukkan adanya produk asam dari hasil fermentasi manitol. *Staphylococcus* yang mampu melakukan fermentasi mannitol pada media akan terbentuk zona kuning di sekeliling koloni pertumbuhan, sedangkan bakteri lain yang tidak melakukan fermentasi tidak terjadi perubahan warna pada sekeliling koloni pertumbuhan.
- c. **Eosin–Methylene Blue Agar :** media ini berfungsi untuk mengisolasi dan membedakan bakteri fermenter laktosa dengan nonfermenter laktosa. Media ini selain mengandung laktosa juga mengandung eosin dan *methylene blue* yang berfungsi sebagai zat penghambat pertumbuhan bakteri Gram positif sehingga bakteri Gram negative dapat ditumbuh dan diisolasi. *E. coli* adalah bakteri fermenter laktosa, koloni yang tumbuh pada media ini menampilkan warna biru kehitaman dengan kilap hijau metalik. Sedangkan bakteri *Enterobacter aerogenes* menghasilkan koloni berwarna merah muda dan koloni bakteri enterik lainnya yang bersifat nonfermenter laktosa akan berwarna transparan.



Gambar 4.5 Penampakkan hasil positif media selektif diferensial. (a) Media Mannitol Salt Agar (b) MacConkey Agar (c) Eosin Methylen Blue Agar
(Sumber: Cappuccino & Welsh, 2017)

Alat dan Bahan

Bahan: Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan NA (*Nutrient Agar*), akuades

Alat: 1 erlenmeyer 250 mL, 2 tabung reaksi, 2 cawan petri, Bunsen, gelas ukur / pipet volumetrik, *beaker glass*, *magnetic hot plate*, *magnetic stirrer*, spatula, aluminium foil, plastik wrap

Prosedur Kerja

1. Membuat media PDA dan NA:

- a. Siapkan akuades di dalam gelas ukur sebanyak volume media yang akan dibuat.
- b. Timbang bubuk media yang akan dibuat sesuai petunjuk yang tertera pada kemasan. **Bersihkan menggunakan tissue kering area internal dan eksternal timbangan sebelum dan setelah menimbang. Gunakan spatula yang berbeda untuk setiap media yang berbeda untuk menghindari kontaminasi silang antar media.**
- c. Larutkan bubuk media dengan akuades yang telah disiapkan sebelumnya ke dalam Erlenmeyer / *beaker glass*.
- d. Homogenisasi media
 - i. **Untuk media cair (*broth*):** media cukup diaduk menggunakan spatula / *magnetic stirrer* tanpa pemanasan hingga homogen.
 - ii. **Untuk media agar (*solid*):** Masak media agar diatas *magnetic hot plate* sambil diaduk menggunakan batang *magnetik stirrer* (kecepatan putar magnet lambat hingga sedang) hingga media mendidih dan jernih. **Perhatian: jangan meninggalkan media saat masak ! Saat media telah mendidih (media meletup – letup) segera angkat erlenmeyer yang berisi media tersebut menggunakan sarung tangan tahan panas / sarung tangan karet kemudian matikan seluruh tombol *magnetic hot plate* dan bersihkan seluruh area *hot plate*.**
- e. Diamkan media hingga suhu turun sekitar 50 °C lalu tutup erlenmeyer menggunakan sumbat kapas dan bungkus sumbat kapas dengan plastik tahan panas atau kertas.
- f. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2. Pembuatan media tabung agar miring (*slant agar*):

- a. Masukkan sebanyak 4 mL media agar (yang telah dimasak) ke dalam tabung reaksi steril menggunakan pipet volumetric atau gelas ukur lalu tutup tabung tersebut menggunakan sumbat kapas.
- b. Bungkus seluruh media tabung menggunakan plastic tahan panas
- c. Sterilisasi media tersebut menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- d. Setelah sterilisasi selesai, keluarkan media dari autoklaf (suhu autoklaf sudah turun < 60 °C).
- e. Tempatkan media tabung yang telah steril pada meja yang datar dan tidak licin lalu posisikan tabung dengan derajat kemiringan $\pm 45^{\circ}$ (kemiringan dapat diatur menggunakan perlengkapan yang ada di Lab). **Perhatian: pastikan jarak ujung *slant agar* tidak mendekati mulut tabung untuk menghindari peluang kontaminasi.**
- f. Diamkan tabung dalam posisi miring hingga media agar memadat.
- g. Media siap digunakan.

3. Pembuatan media cawan agar:

- a. Siapkan terlebih dahulu laminar airflow yang telah diiradiasi (steril)
- b. Siapkan cawan petri steril yang telah kering (tidak basah)
- c. Tuang media agar yang telah steril sebanyak $\pm 10 - 15$ mL ke dalam cawan petri

- steril (volume media agar maksimal setengah dari tinggi cawan petri) secara aseptis menggunakan Bunsen di dalam *laminar air flow*.
- d. Bakar keliling tepi cawan menggunakan api Bunsen
- e. Tutup cawan dan diamkan hingga media agar memadat di dalam *laminar air flow* sekitar 2-3 jam.
- f. Setelah media agar memadat beri seal pada keliling pinggir cawan menggunakan plastik wrap jika media tidak langsung digunakan. Jika akan langsung digunakan cawan media agar tidak perlu diberi seal.

Hasil Pengamatan

Amati hasil media seluruh kelompok yang telah dibuat pada keesokan harinya. Apakah kondisi media tetap steril (tidak ditumbuhi mikrob) atau kondisi kontaminasi (ditumbuhi mikrob). Jika terdapat pertumbuhan mikrob pada media jelaskan faktor apa saja penyebabnya !

Tabel Hasil Pengamatan Media

No	Kelompok	Jenis Media	Foto	Keterangan
1				
2				
3				
dst				

BAB 5

ISOLASI MIKROORGANISME

Tujuan Praktikum

1. Melakukan teknik isolasi bakteri dan fungi dari berbagai sampel
2. Melakukan teknik *spread plate* dan *pour plate*
3. Mempelajari bentuk makroskopik koloni bakteri hasil isolasi

Teori

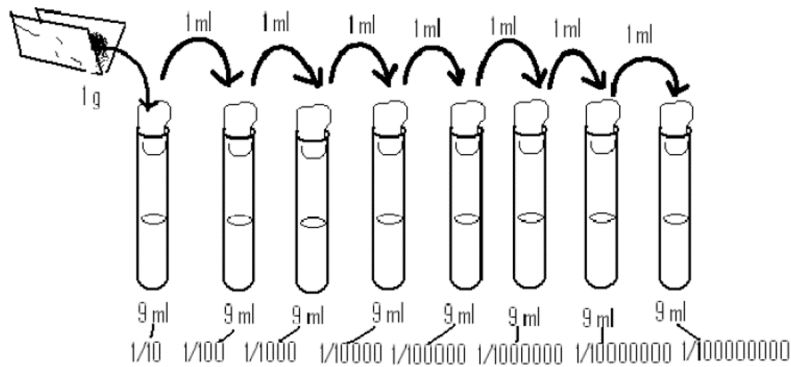
Di alam, mikroorganisme seperti bakteri, kapang, khamir hidup dalam populasi yang besar, beragam, dan bercampur satu sama lain antar spesies. Mikroorganisme bersifat kosmopolit oleh karena itu dapat ditemukan di tanah, air, udara, permukaan tubuh, bahkan terdapat prokariot tertentu yang dapat ditemukan di area ekstrem seperti lahar gunung berapi, lapisan perut bumi, dll. Untuk mempelajari suatu spesies bakteri / fungi baik karakter mikroskopik, makroskopik, biokimiawi, dan aktivitas biologisnya secara lebih mendalam, kita perlu melakukan teknik khusus di laboratorium untuk memisahkan spesies murni dari lingkungannya. Isolasi adalah suatu teknik untuk memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan (kultur) murni yang tidak tercampur dengan spesies lain. Kultur murni merupakan kultur yang sel-selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal. Jadi tujuan isolasi adalah mendapatkan kultur murni berupa koloni tunggal murni. Satu koloni merepresentasikan 1 individu. Koloni merupakan 1 individu yang tumbuh membentuk suatu massa sel pada media cawan agar padat. Teknik isolasi dilakukan secara bertahap hingga diperoleh kultur murni dalam media agar tabung miring (*slant agar*). Tahap isolasi mikroorganisme umumnya terdiri dari:

1. Homogenisasi

Homogenisasi perlu dilakukan untuk melarutkan sampel secara homogen pada larutan pengencer sebelum penanaman sampel pada media cawan agar. Apabila sampel berupa makanan padat maka perlu dihaluskan terlebih dahulu sebelum homogenisasi.

2. Pengenceran berseri

Bertujuan untuk mengencerkan sampel sehingga mencapai populasi mikrob terendah dan diperoleh koloni terpisah yang tumbuh pada media cawan agar. Umumnya larutan pengencer berupa akuades steril atau NaCl 0.85% atau NaCl fisiologis steril. Perbandingan larutan pengencer dengan sampel adalah 9:1. Pengenceran berseri biasanya dilakukan hingga pengenceran tabung ke-6 (10^{-6}) atau ke-7 (10^{-7}) (Gambar 4.1).



Gambar 5.1 Pengenceran berseri (*serial dilution*)
 (Sumber: <https://www.infolabmed.com>)

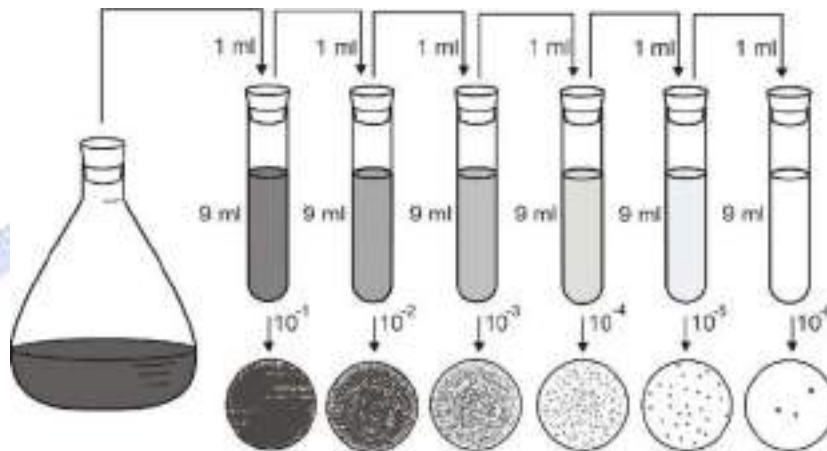
3. Penanaman pada media cawan agar (*plating*)

Plating atau penanaman pada media cawan agar padat dilakukan setelah pengenceran berseri (Gambar 5.2). Tujuannya adalah untuk menumbuhkan mikrob yang akan diisolasi. Media yang digunakan pada *plating* isolasi mikrob dapat menggunakan media tertentu sesuai mikrob yang akan diisolasi. Misalnya, untuk mengisolasi bakteri dapat menggunakan media NA (*Nutrient Broth*) dan menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) untuk mengisolasi fungi. Namun, pada tujuan tertentu isolasi bakteri tertentu dapat menggunakan media selektif atau media diferensial, contohnya isolasi bakteri *E. coli* dapat menggunakan media EMBA (Eosin Methylen Blue Agar), isolasi bakteri asam laktat dapat menggunakan media MRSA yang ditambahkan CaCO_3 . Teknik penanaman (*plating*) dibedakan menjadi dua tipe yaitu Teknik *spread plate* dan Teknik *pour plate*.

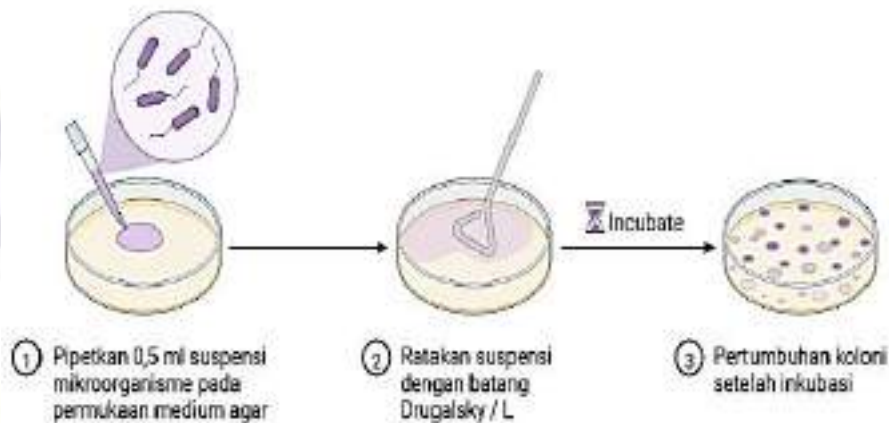
Teknik *spread plate* yaitu penanaman sampel / kultur dengan cara menyebarkannya pada permukaan media cawan agar padat. Penyebaran dapat dilakukan menggunakan batang sebar atau *glass beads*. Volume sampel / kultur yang diperlukan yaitu sebanyak 0,1 mL. Pada Teknik *spread plate* media cawan agar yang sudah memadat disiapkan terlebih dahulu sebelum dilakukan penyebaran. Setelah diinkubasi koloni bakteri hanya akan tumbuh pada permukaan media. Sehingga bakteri dengan sifat aerob yang dapat tumbuh dengan baik.

Teknik *pour plate* adalah teknik menanam suspensi sampel / kultur dengan cara menuang suspensi dalam medium agar yang belum memadat. Sehingga suspensi akan terdispersi diseluruh bagian medium pertumbuhan, baik di bagian permukaan, tengah maupun dasar medium. Penanaman sampel / kultur dengan cara tuang, media agar yang digunakan masih dalam kondisi cair (suhu 40 – 45 °C) dalam wadah erlenmeyer atau sejenisnya. Media agar yang masih cair (suhu 40 – 45 °C) sebanyak 12-15 mL selanjutnya dituang ke dalam cawan yang telah berisi 1 mL sampel / kultur. Media dan kultur yang telah dicampur dalam satu cawan selanjutnya diratakan dengan cara menggoyang – goyangkan cawan (kondisi cawan tertutup) secara perlahan membentuk angka 8, lalu media didiamkan hingga memadat. Setelah selesai inkubasi akan tampak pertumbuhan koloni bakteri pada permukaan atas, tengah maupun dasar media. Bakteri aerob hanya tumbuh pada permukaan atas media, mikroorganisme mikroaerofilik akan tumbuh di bawah permukaan media, mikroorganisme aerob fakultatif akan tumbuh di tengah-tengah media, sedangkan mikroorganisme anaerob obligat akan tumbuh di dasar media. Perbedaan teknik *spread plate* dan *pour plate*

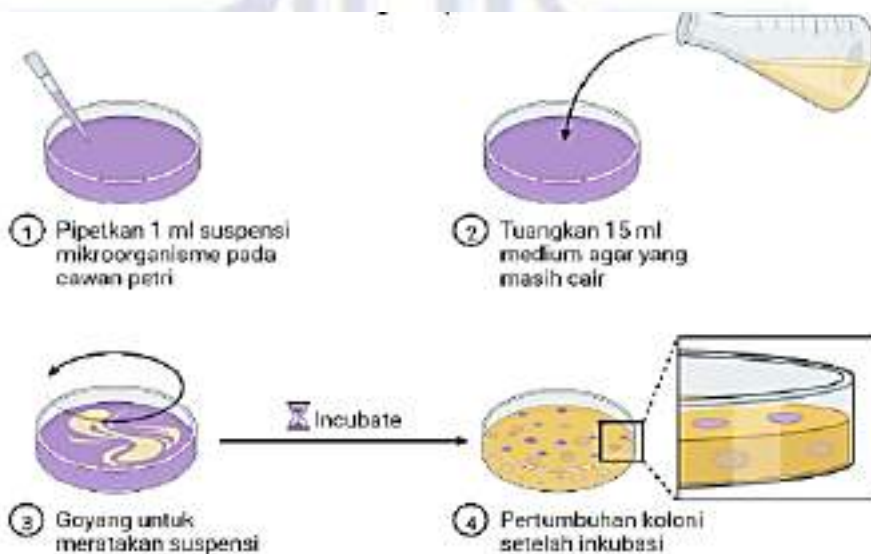
dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.2 Tahap *plating* pada isolasi mikroorganisme
Sumber: <https://www.researchgate.net/JustynaRybak>



Gambar 5.3a Teknik *spread plate*
(Sumber: <https://www.microbeholic.com>)



Gambar 5.3b Teknik *pour plate*
(Sumber: <https://www.microbeholic.com>)

4. Purifikasi

Setelah mendapatkan koloni tunggal yang tumbuh dari hasil *plating* maka dilakukan purifikasi. Tujuan purifikasi adalah untuk memisahkan mikrob spesies satu dengan spesies lainnya yang mungkin saja masih tercampur dalam 1 koloni. Purifikasi dilakukan dengan teknik gores (*streak plate*) pada media cawan agar padat menggunakan alat yang disebut jarum ose. Purifikasi dapat dilakukan lebih dari 1x ulangan hingga diperoleh koloni yang seragam. Teknik *streak* berdasarkan polanya dibedakan menjadi 3 tipe yaitu gores sinambung, gores T, dan gores kuadran (Gambar 5.4).



Gambar 5.4a Metode gores sinambung
(Sumber: <https://www.coursehero.com>)



Gambar 5.4b Metode gores T
(Sumber: <https://rbrlifescience.com>)



Gambar 5.4c Metode gores kuadran
(Sumber: <https://rbrlifescience.com>)

5. Pembuatan kultur stok dalam media *slant agar*

Setelah diperoleh kultur murni hasil purifikasi, maka dibuat kultur stok. Kultur stok merupakan 1 koloni tunggal hasil purifikasi kultur murni yang ditanam pada media tertentu misal agar tabung miring (*slant agar*), freeze drying, kriyogenik. Penanaman pada media *slant agar* dilakukan dengan cara gores zig-zag menggunakan jarum ose (Gambar 5.5).



Gambar 5.5 Kultur stok pada media *slant agar*

Sumber: <https://www.researchgate.net/JustynaRybak>; <https://hardydiagnostics.com>

Alat dan Bahan

Bahan: Media NA cawan dan Erlenmeyer dan media PDA cawan dan Erlenmeyer. Akuades steril dalam tabung reaksi, sampel / bahan isolasi (makanan, minuman, tanah, rambut,dll.)

Alat: cawan petri, batang sebar, pipet volumetrik+bulb, mikropipet *blue tip* dan *yellow tip*.

Prosedur Kerja

a. Isolasi mikroorganisme dari makanan

1. Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.
2. Siapkan 6 tabung reaksi masing – masing berisi 9 mL akuades steril, beri label tabung ke-1 (10^{-1}), tabung ke-2 (10^{-2}), tabung ke-3 (10^{-3}), tabung ke-4 (10^{-4}), tabung ke-5 (10^{-5}), dan tabung ke-6 (10^{-6}) (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
3. Potong – potong kecil dan haluskan sampel makanan padat menggunakan lumping alu
4. Timbang sampel makanan yang telah dihaluskan sebanyak 1 gr
5. Larutkan 1 g sampel makanan dengan 9 mL akuades steril di dalam tabung reaksi ke-1, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
6. Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung ke-1 menggunakan pipet lalu transfer ke tabung ke-2 yang berisi 9 mL akuades steril, lalu vortex selama 1 menit.
7. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. 5 pada tabung ke-2 hingga tabung ke-6.
8. *Plating* suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Ambil sebanyak 0,1 mL (100 μ L) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan ke-1 agar padat (NA / PDA).
- iii. Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. ii pada cawan ke-2 (10^{-5}) dan cawan ke-3 (10^{-6})

- v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- vi. Amati pertumbuhan koloni pada media.

Metode *pour plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 cawan kosong steril dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu 40-45 °C) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
- iii. Ambil sebanyak 1 mL (1000 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan ke-1, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama dengan nomor iii pada cawan ke-2 dan cawan ke-3.
- v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24– 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- vi. Amati pertumbuhan koloni pada media.

b. Isolasi mikroorganisme dari minuman

1. Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.
2. Siapkan 6 tabung reaksi masing – masing berisi 9 mL akuades steril, beri label tabung ke-1 (10^{-1}), tabung ke-2 (10^{-2}), tabung ke-3 (10^{-3}), tabung ke-4 (10^{-4}), tabung ke-5 (10^{-5}), dan tabung ke-6 (10^{-6}) (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
3. Ambil sebanyak 1 mL sampel minuman dengan 9 mL akuades steril di dalam tabung reaksi ke-1, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
4. Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung ke-1 menggunakan pipet lalu transfer ke tabung ke-2 yang berisi 9 mL akuades steril, lalu vortex selama 1 menit.
5. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. 5 pada tabung ke-2 hingga tabung ke-6.
6. *Plating* suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Ambil sebanyak 0,1 mL (100 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4})

- menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan ke-1 agar padat (NA / PDA).
- iii. Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
 - iv. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. ii pada cawan ke-2 (10^{-5}) dan cawan ke-3 (10^{-6})
 - v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
 - vi. Amati pertumbuhan koloni pada media

Metode *pour plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 cawan kosong steril dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-3 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
 - ii. Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu $40-45^{\circ}\text{C}$) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
 - iii. Ambil sebanyak 1 mL (1000 μL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan ke-1, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
 - iv. Lakukan pekerjaan yang sama dengan nomor iii pada cawan ke-2 dan cawan ke-3.
 - v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24– 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
 - vi. Amati pertumbuhan koloni pada media
- c. **Isolasi mikroorganisme dari tanah**
1. Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.
 2. Siapkan 6 tabung reaksi masing – masing berisi 9 mL akuades steril, beri label tabung ke-1 (10^{-1}), tabung ke-2 (10^{-2}), tabung ke-3 (10^{-3}), tabung ke-4 (10^{-4}), tabung ke-5 (10^{-5}), dan tabung ke-6 (10^{-6}) (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
 3. Timbang sampel tanah sebanyak 1 gr
 4. Larutkan 1 g sampel tanah dengan 9 mL akuades steril di dalam tabung reaksi ke-1, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
 5. Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung ke-1 menggunakan pipet lalu transfer ke tabung ke-2 yang berisi 9 mL akuades steril, lalu vortex selama 1 menit.

- Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. 5 pada tabung ke-2 hingga tabung ke-6.
- Platting* suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- Siapkan sebanyak 3 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- Ambil sebanyak 0,1 mL (100 μ L) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan ke-1 agar padat (NA / PDA).
- Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. ii pada cawan ke-2 (10^{-5}) dan cawan ke-3 (10^{-6})
- Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- Amati pertumbuhan koloni pada media

Metode *pour plate*

- Siapkan sebanyak 3 cawan kosong steril dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu 40-45 °C) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
- Ambil sebanyak 1 mL (1000 μ L) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan ke-1, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- Lakukan pekerjaan yang sama dengan nomor iii pada cawan ke-2 dan cawan ke-3.
- Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24– 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- Amati pertumbuhan koloni pada media

d. Isolasi mikroorganisme dari rambut

- Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.

2. Siapkan 1 tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
3. Masukkan 2 helai sampel rambut menggunakan pinset ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades steril, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
4. Platting suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- i. Siapkan sebanyak 1 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label nama sampel pada cawan (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Ambil sebanyak 0,1 mL (100 uL) suspensi dari tabung menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan agar padat (NA / PDA).
- iii. Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Inkubasi cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- v. Amati pertumbuhan koloni pada media

Metode *pour plate*

- i. Siapkan sebanyak 1 cawan kosong steril dan beri label nama sampel pada cawan (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu 40-45 °C) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
- iii. Ambil sebanyak 1 mL (1000 uL) suspensi dari tabung menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24– 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).
- v. Amati pertumbuhan koloni pada media

e. Isolasi mikroorganisme dari udara

1. Siapkan media cawan agar padat (NA / PDA) beri label nama sampel dan lokasi pengambilan sampel
2. Buka tutup cawan dan biarkan cawan dalam kondisi terbuka selama ±30 menit di lokasi yang telah ditentukan
3. Setelah itu tutup cawan dan pijarkan pinggir cawan dengan api Bunsen lalu *sealed*

pinggir cawan.

- Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA (isolasi bakteri), dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24– 48 jam untuk media PDA (isolasi fungi).

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Isolasi Bakteri (Media Na)

No	Sumber Isolasi	Hasil Pertumbuhan Koloni (Karakter morfologi koloni yang tumbuh)	Gambar / Foto
1	Bakso	<p>Cawan 10⁻⁴ Koloni 1: tepi..., bentuk... warna ... Koloni 2: tepi..., bentuk ..., warna</p> <p>Cawan 10⁻⁵ Koloni 1: tepi..., bentuk... warna ... Koloni 2: tepi..., bentuk ..., warna</p> <p>Cawan 10⁻⁵ Koloni 1: tepi..., bentuk... warna ... Koloni 2: tepi..., bentuk ..., warna</p>	<p>Gambar Cawan 10⁻⁴ Gambar Cawan 10⁻⁵ Gambar Cawan 10⁻⁶</p>
2	Air Isi Ulang		
3	Jamu		
4	Tanah		
5	Udara		
6	Rambut		

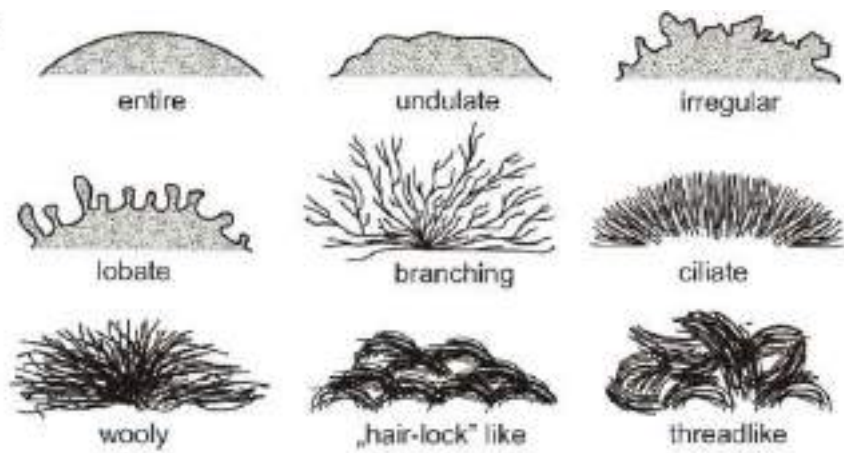
Tabel Hasil Pengamatan Isolasi Fungi (Media PDA)

No	Sumber Isolasi	Hasil Pertumbuhan Koloni (Karakter morfologi koloni yang tumbuh)	Gambar / Foto
1	Makanan		
2	Minuman		
3	Jamu		
4	Tanah		
5	Udara		
6	Rambut		

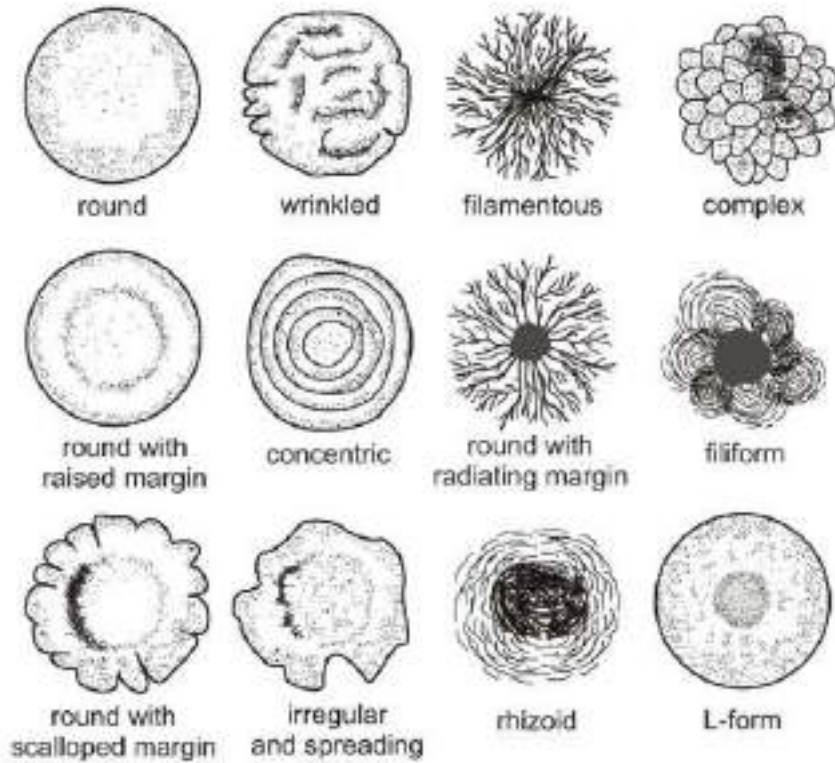
Lampiran 1

Morfologi Koloni Bakteri

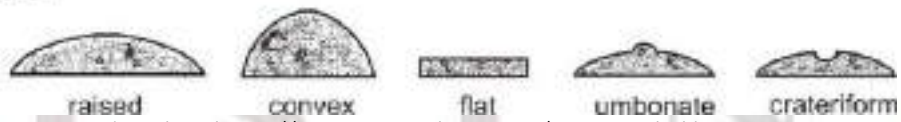
Margins



Forms



Elevation



(Sumber: <https://www.researchgate.net/JustynaRybak>)

BAB 6

PENENTUAN ANGKA KUMAN

Tujuan Praktikum

1. Mempelajari teknik penentuan angka kuman dan pengenceran berseri (serial dilution)
2. Menentukan CFU (*colony forming unit*) mikroba dalam suatu sampel

Teori

Menghitung atau menentukan jumlah mikroba dalam suatu produk / bahan (makanan, minuman, sediaan obat, sediaan kosmetik, dll) dilakukan untuk mengetahui sampai seberapa jauh produk / bahan tersebut tercemar oleh mikroba. Kualitas mikrobiologi suatu produk / bahan dapat diketahui dengan diketahuinya jumlah mikroba dalam produk / bahan tersebut. Suatu produk / bahan dengan kualitas mikrobiologi yang baik adalah jika tidak ditemukan mikroba di dalamnya atau pada produk tertentu ditemukan jumlah mikroba berada dibawah nilai standar yang telah ditetapkan oleh badan hukum yang berwenang. Kandungan mikroba pada suatu bahan juga sangat menentukan tingkat kerusakannya serta dapat ditentukan tingkat kelayakan untuk dikonsumsi.

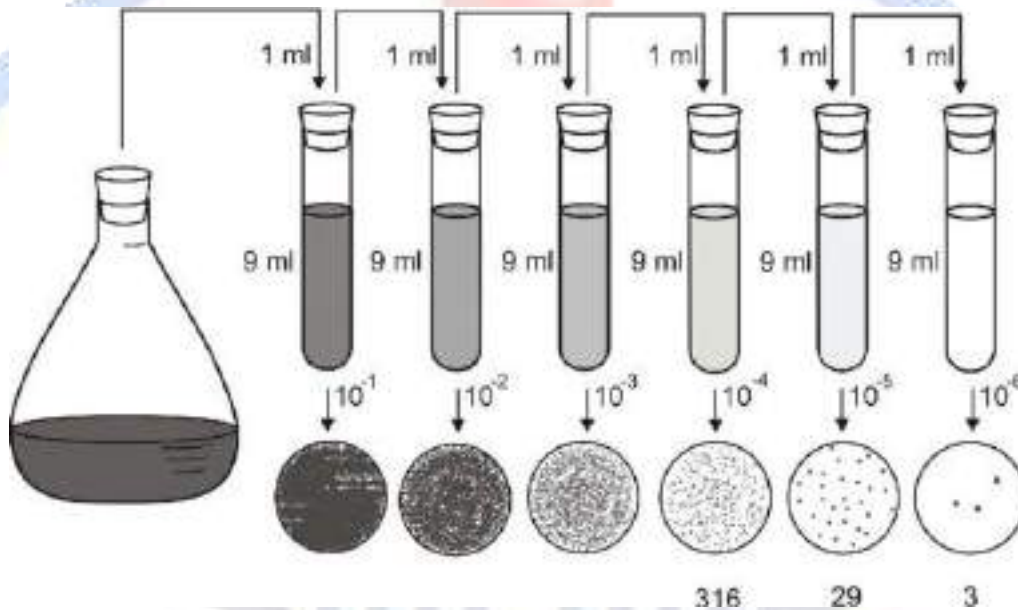
Pengukuran jumlah sel mikroba dibedakan menjadi dua cara yaitu perhitungan langsung dan perhitungan tidak langsung. **Perhitungan langsung** yaitu hasil perhitungan mikroba dapat langsung diketahui dan hasilnya menunjukkan jumlah mikroba baik hidup maupun yang mati. Sedangkan **perhitungan tidak langsung**, hasil perhitungan mikroba baru dapat diperoleh kemudian setelah dilakukan perlakuan terlebih dahulu. Hasil perhitungan tidak langsung akan menunjukkan mikroba yang masih hidup saja. Contoh perhitungan langsung dapat menggunakan alat hitung sel elektronik yaitu *colony counter*. Terdapat beberapa metode yang dapat diterapkan untuk perhitungan secara tidak langsung yaitu *total plate count*, MPN (most probable number), dan turbiditas menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Masing – masing metode memiliki kelebihan dan kelemahannya serta penggunaan metode dapat ditentukan berdasarkan jenis sampelnya.

Metode Total plate count atau disingkat TPC sangat umum diterapkan untuk penentuan jumlah mikroba dari berbagai sampel seperti sampel lingkungan, makanan, minuman, air kolam renang, jus, susu, produk farmasi, dll. Keuntungan metode TPC dibandingkan perhitungan secara langsung yaitu pada metode TPC hanya sel hidup yang akan tumbuh di cawan. Sehingga hal ini dapat menjadi indikator yang baik untuk mengetahui risiko terkena *foodborne diseases*. Satuan perhitungan total koloni dalam suatu sampel dapat berupa CFU/mL atau CFU/100 mL.

Pengenceran berseri (*serial dilution*) merupakan teknik yang sangat perlu dilakukan secara teliti dalam penentuan angka kuman menggunakan metode TPC. Pengenceran sampel diperlukan untuk mengurangi jumlah bakteri di dalam sampel sampai pada tingkat yang dapat dihitung. Formula untuk menghitung pengenceran dapat dinyatakan sebagai volume sampel per (volume sampel + volume pengencer). Contoh pertama, sebanyak 1 mL sampel disuspensikan dengan 9 mL larutan pengencer, maka pengencerannya disebut sebagai $1/(1+9)$ atau $1/10$ dan penulisan saintifiknya adalah 10^{-1} . Contoh ke-2, sebanyak 0,1 mL sampel disuspensikan ke dalam 9,9 mL larutan pengencer maka pengencerannya disebut sebagai $0,1/(0,1+9,9)$ atau $0,1/10$ atau $1/100$ dan penulisan saintifiknya adalah 10^{-2} . Tujuan dari *total plate count* adalah untuk mengetahui jumlah / konsentrasi bakteri dari suatu sampel.

Platting atau penanaman sampel / kultur dilakukan setelah menyelesaikan pengenceran

berseri. *Plating* dapat dilakukan dengan teknik *spread plate* atau *pour plate*. Materi mengenai teknik *plating* telah dijelaskan pada bab sebelumnya. Akurasi TPC dapat diperoleh dengan menghitung koloni dari dua atau tiga cawan dari setiap pengenceran yang dapat dihitung dan hitung rata-ratanya. Standarnya hanya cawan yang berisi antara 25 sampai 250 koloni yang dianggap sah dan dapat dihitung (Gambar 6.1). Cawan yang berisi koloni kurang dari 25 dianggap sebagai **TSUD** (terlalu sedikit untuk dihitung), sedangkan cawan yang berisi koloni lebih dari 250 dianggap sebagai **TBUD** (terlalu banyak untuk dihitung). Asumsinya adalah satu koloni berasal dari satu sel bakteri. Hasil *plating* TPC dapat dilihat pada Gambar 6.2.



Gambar 6.1 Tahap *plating* pada isolasi mikroorganisme
 Sumber: <https://www.researchgate.net/JustynaRybak>



Gambar 6.2 Hasil *plating* pada teknik *total plate count*
 (Sumber: Obenauf & Finazzo, 2022)

Rumus untuk menentukan unit koloni per mililiter (CFU) dalam suatu sampel adalah sebagai berikut:

$$CFU = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{volume} \times \text{Faktor Pengenceran}}$$

Keterangan:

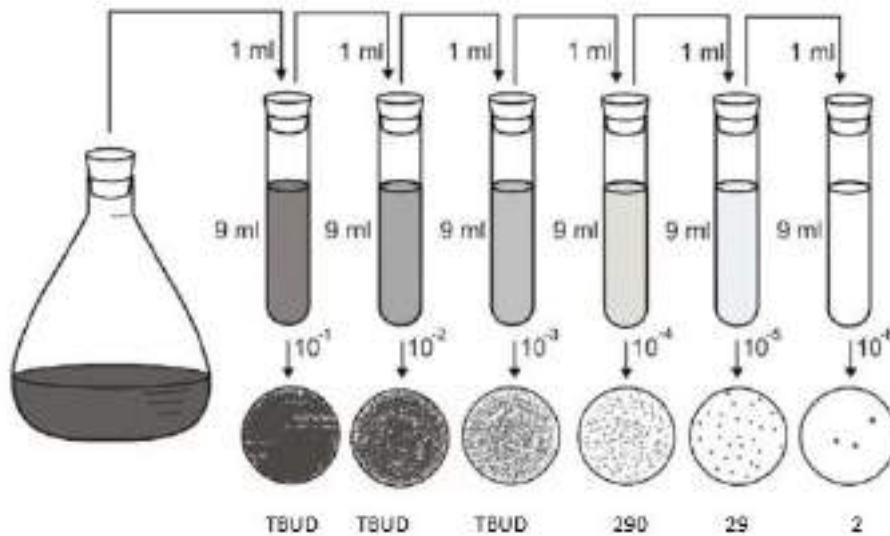
Jumlah koloni adalah jumlah koloni yang tumbuh pada cawan

Faktor pengenceran adalah tabung pengenceran ke-n yang dihitung jumlah koloninya pada

cawan: $\frac{1}{1 \times 10^n}$

Volume adalah volume suspensi yang ditanam pada cawan

Contoh perhitungan angka kuman menggunakan metode *total plate count*



Contoh 1 (teknik *pour plate*):

Jumlah koloni tumbuh: 29

Faktor pengenceran: $\frac{1}{1 \times 10^5}$

Volume suspense yang ditanam pada cawan: 1 mL

Maka: $CFU = \frac{29}{1 \times \frac{1}{10^5}} = \frac{29}{1 \times 10^{-5}} = 29 \times 10^5 = 2,9 \times 10^6$ CFU/mL

Contoh 2 (teknik *spread plate*):

Jumlah koloni tumbuh: 29

Faktor pengenceran: $\frac{1}{1 \times 10^5}$

Volume suspense yang ditanam pada cawan: 0,1 mL

Maka: $CFU = \frac{29}{0,1 \times \frac{1}{10^5}} = \frac{29}{10^{-1} \times 10^{-5}} = 29 \times 10^6 = 2,9 \times 10^7$ CFU/mL

Alat dan Bahan

Bahan: Media NA cawan dan Erlenmeyer dan media PDA cawan dan Erlenmeyer. Akuades steril dalam tabung reaksi, sampel / bahan isolasi (makanan, minuman, tanah, rambut,dll.)

Alat: cawan petri, batang sebar, pipet volumetrik+bulb, mikropipet *blue tip* dan *yellow tip*.

Prosedur Kerja

a. Penentuan TPC dari sampel makanan

1. Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.
2. Siapkan 6 tabung reaksi masing – masing berisi 9 mL akuades steril, beri label tabung ke-1 (10^{-1}), tabung ke-2 (10^{-2}), tabung ke-3 (10^{-3}), tabung ke-4 (10^{-4}), tabung ke-5 (10^{-5}), dan tabung ke-6 (10^{-6}) (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
3. Potong – potong kecil dan haluskan sampel makanan padat menggunakan mortar.
4. Timbang sampel makanan yang telah dihaluskan sebanyak 1 gr
5. Larutkan 1 g sampel makanan dengan 9 mL akuades steril di dalam tabung reaksi ke-1, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
6. Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung ke-1 menggunakan pipet lalu transfer ke tabung ke-2 yang berisi 9 mL akuades steril, lalu vortex selama 1 menit.
7. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. 5 pada tabung ke-2 hingga tabung ke-6.
8. *Platting* suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-3 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Ambil sebanyak 0,1 mL (100 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan ke-1 agar padat (NA / PDA).
- iii. Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. ii pada cawan ke-2 (10^{-5}) dan cawan ke-3 (10^{-6})
- v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA, dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA.
- vi. Hitung koloni yang tumbuh pada media cawan dan tentukan CFU nya !

Metode *pour plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 cawan kosong steril dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-3 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu 40-45 °C) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
- iii. Ambil sebanyak 1 mL (1000 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan ke-1, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga

- media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama dengan nomor iii pada cawan ke-2 dan cawan ke-3.
 - v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA, dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24–48 jam untuk media PDA.
 - vi. Hitung koloni yang tumbuh pada media cawan dan tentukan CFU nya !

b. Penentuan TPC dari sampel minuman

1. Bersihkan kedua tangan anda dan meja kerja dengan menyemprot alkohol 70% lalu lap permukaan dengan tisu kering. Kerjakan seluruh tahapan pekerjaan secara aseptik.
2. Siapkan 6 tabung reaksi masing – masing berisi 9 mL akuades steril, beri label tabung ke-1 (10^{-1}), tabung ke-2 (10^{-2}), tabung ke-3 (10^{-3}), tabung ke-4 (10^{-4}), tabung ke-5 (10^{-5}), dan tabung ke-6 (10^{-6}) (**sumbat tutup tabung tidak boleh dibuka**).
3. Ambil sebanyak 1 mL sampel minuman dengan 9 mL akuades steril di dalam tabung reaksi ke-1, lalu homogenisasi suspensi tersebut menggunakan vortex selama 1 menit.
4. Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung ke-1 menggunakan pipet lalu transfer ke tabung ke-2 yang berisi 9 mL akuades steril, lalu vortex selama 1 menit.
5. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. 5 pada tabung ke-2 hingga tabung ke-6.
6. *Plating* suspensi dengan metode *spread plate* dan *pour plate*

Metode *spread plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 media cawan agar padat (NA / PDA) dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).
- ii. Ambil sebanyak 0,1 mL (100 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke permukaan media cawan ke-1 agar padat (NA / PDA).
- iii. Sebar dan ratakan suspensi menggunakan batang sebar membentuk pola angka 8 hingga permukaan media menjadi kesat. Selanjutnya, tutup cawan dan pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama seperti no. ii pada cawan ke-2 (10^{-5}) dan cawan ke-3 (10^{-6})
- v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA, dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam untuk media PDA.
- vi. Hitung koloni yang tumbuh pada media cawan dan tentukan CFU nya !

Metode *pour plate*

- i. Siapkan sebanyak 3 cawan kosong steril dan beri label pada cawan ke-1 (10^{-4}), cawan ke-2 (10^{-5}), cawan ke-1 (10^{-6}) (**tutup cawan petri tidak boleh dibuka**).

- ii. Siapkan sebanyak 12-15 mL media agar padat (NA/PDA) yang masih cair (suhu 40-45 °C) pada Erlenmeyer atau sejenisnya.
- iii. Ambil sebanyak 1 mL (1000 uL) suspensi dari tabung ke-4 (10^{-4}) menggunakan mikropipet dan transfer ke cawan ke-1, lalu tuangkan media pada cawan tersebut dan campurkan suspensi dengan media dengan cara menggoyang – goyangkan cawan dalam kondisi tertutup membentuk pola angka 8 hingga suspensi dan media tercampur homogen. Selanjutnya diamkan cawan dalam kondisi tertutup hingga media memadat. Setelah media memadat, pijarkan secara melingkar bagian pinggir cawan pada api bunsen lalu *sealed* bagian pinggir cawan sebanyak 2x keliling.
- iv. Lakukan pekerjaan yang sama dengan nomor iii pada cawan ke-2 dan cawan ke-3.
- v. Inkubasi seluruh cawan di dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam untuk media NA, dan inkubasi seluruh cawan pada suhu ruang selama 24–48 jam untuk media PDA.
- vi. Hitung koloni yang tumbuh pada media cawan dan tentukan CFU nya !

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Perhitungan Koloni pada Media NA

Kelp.	Sampel	Volume	Jumlah koloni pada faktor pengenceran			CFU (CFU/mL)
			10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
	Bakso					
	Air isi ulang					
	Jamu					

Tabel Hasil Perhitungan Koloni pada Media PDA

Kelp.	Sampel	Volume	Jumlah koloni pada faktor pengenceran			CFU (CFU/mL)
			10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
	Bakso					
	Air isi ulang					
	Jamu					

BAB 7

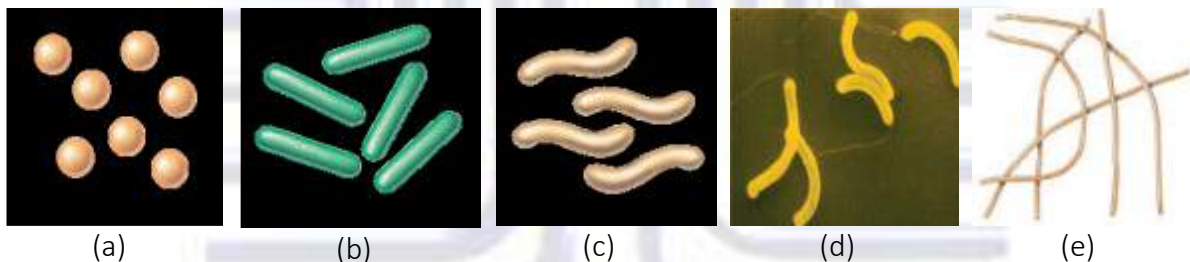
MORFOLOGI DAN PEWARNAAN BAKTERI

Tujuan Praktikum

1. Mengetahui dan membedakan bentuk dan susunan sel bakteri
2. Mengetahui perbedaan bakteri Gram positif dan Gram negatif
3. Membedakan prinsip teknik pewarnaan dan kegunaan jenis zat warna bakteri

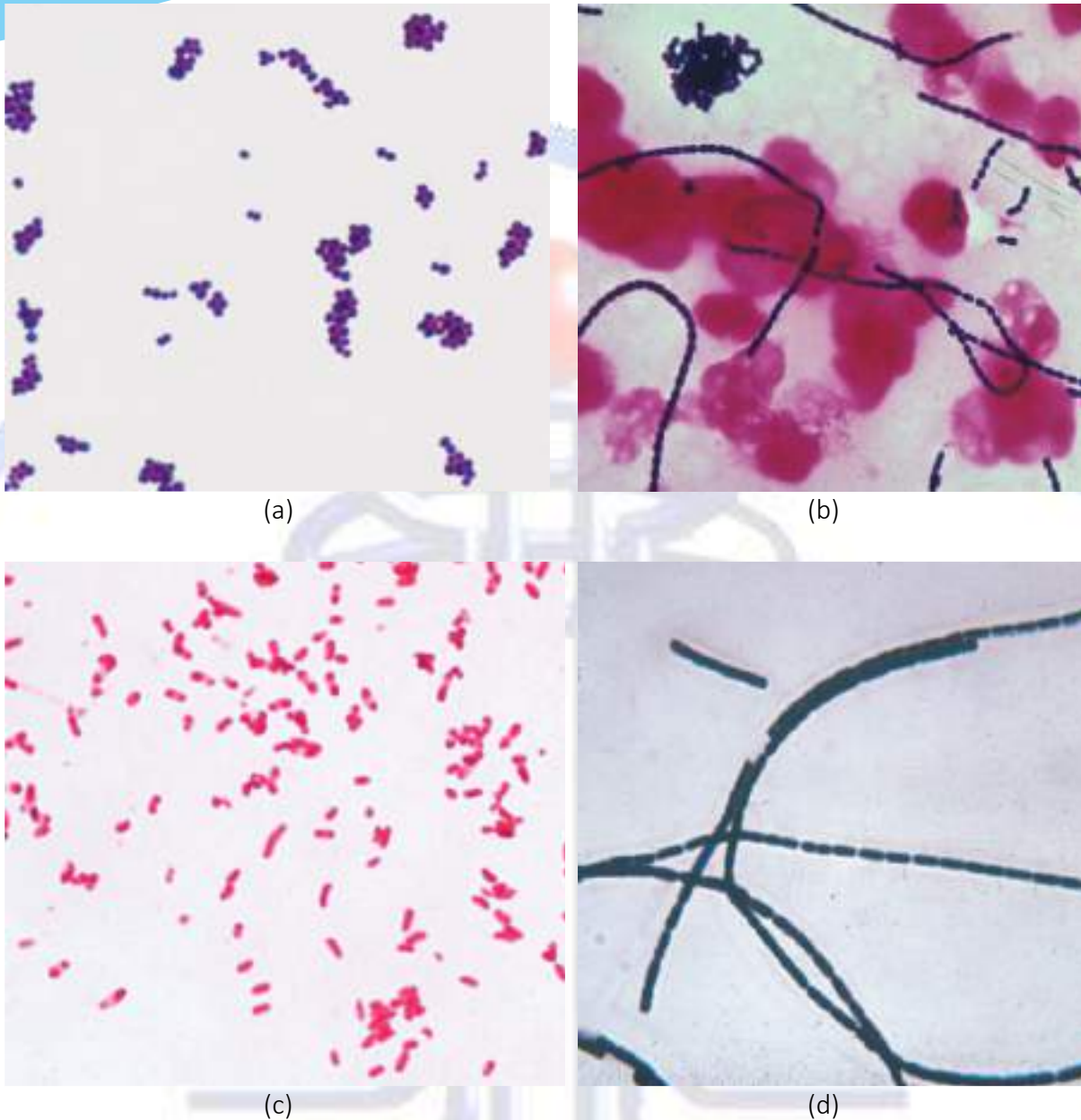
Teori

Bakteri merupakan mikroorganisme unisel. Spesies bakteri dapat dibedakan berdasarkan karakter morfologi (mikroskopik dan makroskopik) dan aktivitas biokimianya. Morfologi makroskopik bakteri merupakan karakter koloni bakteri yang tumbuh pada media agar padat meliputi bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan warna koloni. Karakter morfologi mikroskopik bakteri dapat dilihat pada Lampiran 1. Sedangkan, morfologi mikroskopik bakteri meliputi ukuran, bentuk, dan susunan sel. Bentuk dasar sel bakteri umumnya ada 5 tipe yaitu: kokus (*coccus*/bulat), basil (*bacillus*/batang), spiral, vibrio (batang melengkung), dan filamen (Gambar 7.1). Sebagaimana kita ketahui bahwa bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler, namun pada beberapa spesies bakteri tertentu ada yang hidupnya berkoloni sehingga susunan selnya membentuk suatu klaster setelah pembelahan selnya dan ini menjadi ciri khas bentuk bakteri tersebut. Susunan sel yang membentuk rantai disebut strepto contohnya adalah bentuk rantai kokus pada *Streptococcus pneumoniae* dan rantai basil pada *Bacillus anthracis*. Susunan sel kokus yang bergerombol seperti bentuk anggur disebut staphylococcus contohnya adalah *Staphylococcus aureus*. Contoh spesies bakteri dengan bentuk dan susunan selnya dapat dilihat pada Gambar 7.2.



Gambar 7.1 Bentuk Dasar Sel Bakteri. (a) kokus, (b) basil, (c) spiral, (d) vibrio, (e) filamen
(Sumber: Madigan *et al.*, 2019)

Pengamatan mikroskopik bakteri membutuhkan suatu teknik khusus yang disebut teknik pewarnaan. **Teknik pewarnaan** yaitu suatu teknik mewarnai bakteri menggunakan zat warna yang dapat menampakkan struktur tertentu dari mikroorganisme yang ingin diamati. Selain membutuhkan bantuan mikroskop juga membutuhkan zat pewarna sehingga memberikan efek yang kontras antara sel yang akan diamati dengan latarnya atau struktur tertentu sel. Pewarnaan perlu dilakukan pada pengamatan morfologi bakteri karena dinding sel bakteri bersifat tembus cahaya (transparan) dan sel bakteri tidak mengadsorpsi atau membiaskan cahaya. Zat warna bersifat mengadsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga bakteri terlihat kontras dengan sekelilingnya.



Gambar 7.2 Contoh Spesies Bakteri dengan bentuk selnya. (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Streptococcus pyogenes*, (c) *Vibrio cholerae*, (d) *Bacillus anthracis*
(Sumber: Carroll et al., 2016)

Zat warna merupakan zat yang tersusun oleh ion positif dan ion negatif, yang salah satunya berwarna (disebut: kromofor). Kemampuan zat warna mengikat komponen makroseluler contohnya asam nukleat tergantung pada muatan listrik kromofor (kromogen) dan komponen seluler yang diwarnai. Zat warna dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan muatan kromofornya yaitu pewarna basa dan pewarna asam.

Pewarna basa yaitu kromofor bermuatan kationik (+) dan memiliki afinitas kuat terhadap komponen seluler bermuatan (-), seperti asam nukleat dan dinding sel bakteri. Contoh zat warna basa yaitu *Methylene blue*, *Crystal Violet*, *Malachite Green*, *Safranin*, dan *Karbol Fuchsin*. Sedangkan **pewarna asam**, kromofornya bermuatan anionik (-) dan memiliki afinitas kuat terhadap komponen seluler bermuatan (+) seperti protein.. contohnya yaitu *eosin*, *Kongo Red*, dan tinta India (*Nigrosin*).

Teknik pewarnaan bakteri dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu pewarnaan sederhana dan pewarnaan diferensial. Pewarnaan sederhana yaitu pewarnaan yang hanya menggunakan satu jenis zat warna tujuannya untuk pengamatan bentuk dan susunan sel bakteri. Pewarnaan diferensial yaitu pewarnaan yang menggunakan minimal 2 jenis zat warna. Pewarnaan diferensial dibedakan menjadi dua kategori berdasarkan tujuannya yaitu 1). pewarnaan untuk menentukan kelompok suatu bakteri, contohnya pewarnaan Gram dan pewarnaan tahan asam; 2). pewarnaan untuk penampakan struktur sel, contohnya pewarnaan endospore, kapsul, dan flagel.

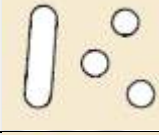



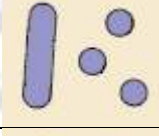
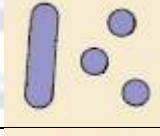


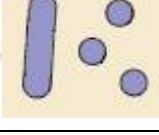
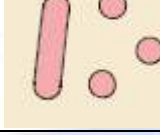
A. Teknik Pewarnaan Bakteri

1. Pewarnaan Sederhana

Pewarnaan sederhana bertujuan untuk mengetahui bentuk dan susunan sel bakteri. Olesan bakteri hanya diwarnai dengan satu jenis pewarna. Zat pewarna yang dapat digunakan adalah *methylene blue*, atau *chrystal violet*, atau *carbol fuchsin*.

2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan bertujuan untuk membedakan bakteri ke dalam dua kelompok yaitu Gram positif dan Gram negatif. Reaksi pewarna didasarkan pada perbedaan komposisi kimiawi penyusun dinding sel bakteri. Pewarnaan Gram menggunakan 4 zat pereaksi yaitu: *chrystal violet* (pewarna pertama), lugol/iodin (mordan), alkohol 96% (pemuca/*decolorization*), dan safranin (pewarna kedua). Proses pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 7.3.

Pereaksi	Gram positif	Gram negatif
Sel yang telah difiksasi		
Kristal violet		
Iodin/lugol		
Alkohol 96%		
Safranin		

Gambar 7.3 Proses Pewarnaan Gram Bakteri
(Sumber: Benson, 2002)

3. Pewarnaan Negatif

Pewarnaan negatif membutuhkan zat pewarna asam seperti tinta india / nigrosin. Zat pewarna tidak mewarnai permukaan sel tetapi sel bakteri yang tidak terwarnai akan tampak jelas dengan latar yang gelap. Preparat dibuat tanpa fiksasi panas artinya kondisi sel masih hidup sehingga bentuk dan ukuran sel secara alami dapat diamati.

4. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan ini digunakan untuk mewarnai endospora. Zat warna yang digunakan adalah: *malachite green* dan safranin. *Malachite green* untuk mewarnai spora diikuti dengan pemanasan karena spora berdinding tebal dan sulit ditembus pewarna. Safranin memiliki warna kontras dengan pewarna pertama sehingga sel vegetatif akan berwarna merah.

B. Apusan Bakteri

Apusan bakteri harus dibuat terlebih dahulu sebelum melakukan pewarnaan bakteri kecuali pewarnaan negatif. Keberhasilan suatu pewarnaan tergantung dari apusan bakteri yang dibuat. Apusan bakteri yang disiapkan dengan benar yaitu ketika apusan tahan (tidak hilang) terhadap satu atau beberapa kali pencucian selama pewarnaan. Apusan yang terlalu tebal dapat memberikan hasil palsu akibat retensi pewarna yang seharusnya terbilas atau akibat apusan yang terlalu tebal dapat menghalangi penetrasi pewarna. Apusan yang terlalu tipis juga memungkinkan sel yang ada terlalu sedikit sehingga apusan mudah hilang saat pencucian.

1. Persiapan kaca objek

Kaca objek yang akan digunakan harus bersih dari debu dan minyak. Kaca objek disemprot dengan alkohol 70% kemudian dikeringkan menggunakan tisu, jika perlu sebelumnya kaca objek dapat dicuci menggunakan sabun dan dikeringkan menggunakan tisu. **Perhatian:** hindari menyentuh dengan jari secara langsung bagian permukaan kaca objek saat mengeringkan dengan tisu, untuk itu pegang pada bagian tepi kaca objek.

2. Pelabelan kaca objek

Pelabelan yang tepat pada kaca objek itu penting. Inisial organisme dapat ditulis di kedua ujung permukaan kaca objek dan pastikan label tidak bersentuhan dengan zat pereaksi/reagen.

3. Persiapan apusan bakteri

Hindari pembuatan apusan yang terlalu tebal/kental karena hal ini dapat mengurangi penetrasi zat pewarna pada sel dan mengurangi jumlah cahaya yang teradsorpsi dan membuatnya sulit untuk divisualisasikan. Catatan: apusan hanya memerlukan sedikit saja kultur bakteri. Apusan yang bagus adalah yang bila dikeringkan tampak berwarna keputihan lapisan tipis atau film. Teknik pembuatan apusan dari media cair berbeda dengan media padat.

Kultur cair

Ambil sebanyak 1-2 loop penuh kultur dan tempatkan di Tengah permukaan kaca objek lalu sebar menggunakan ose loop secara merata.

Kultur padat

Apusan tidak dapat langsung dibuat dari kultur padat bakteri. Kultur padat harus diencerkan terlebih dahulu dengan cara diambil sebanyak 1-2 loop penuh akuades steril lalu ditempatkan pada permukaan kaca objek. Kemudian diambil seujung ose jarum atau seujung ose loop kultur padat lalu diratakan dan disebar kultur tersebut dengan pola melingkar menggunakan jarum ose hingga merata dan tidak menggumpal sehingga terbentuk film keputihan / semitransparan.

4. Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk mematikan sel secara cepat tanpa merusak bentuk dan struktur sel serta menempelkan sel pada kaca objek dan meningkatkan afinitas perekatan zat warna pada sel. Fiksasi dilakukan dengan cara melalukan kaca objek diatas api Bunsen (bukan membakar kaca objek) sebanyak 2-3 kali.

Alat dan Bahan

Bahan: zat warna dan pereaksi pewarnaan

Biakan bakteri: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*.

Alat: kaca objek, Bunsen, jarum ose loop/tegak, tray dan baki, mikroskop

Prosedur Kerja

A. Pembuatan Apusan Bakteri

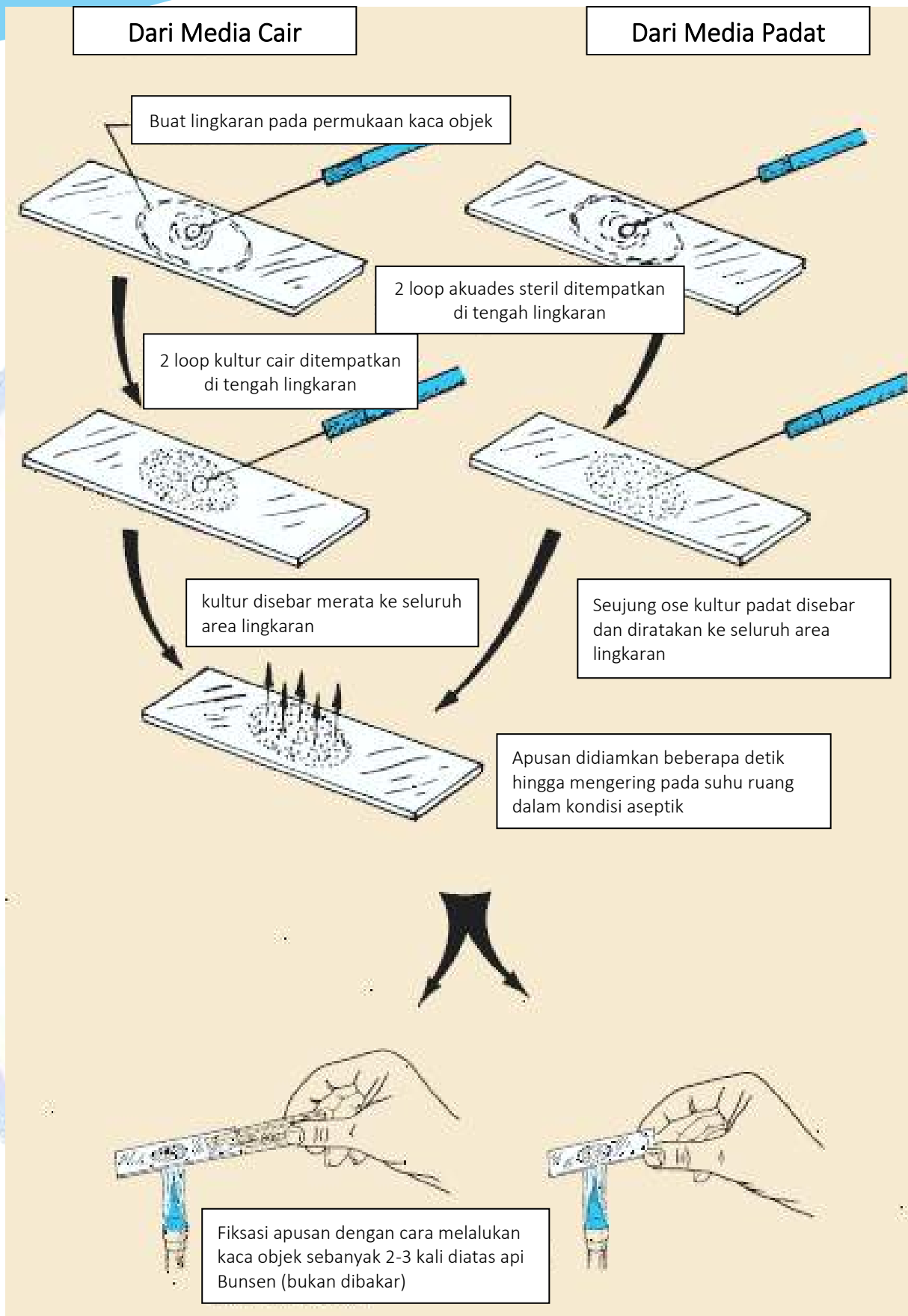
Tahap pembuatan apusan bakteri dapat dilihat pada Gambar 7.4.

Apusan Bakteri dari Kultur Cair

1. Beri label pada kaca objek yang bersih dengan inisial organisme.
2. Resuspensi sel-sel yang mengendap dalam media cari menggunakan vortex.
3. Tempatkan 1-2 loop penuh kultur pada kaca objek menggunakan loop steril,.
4. Dengan gerakan melingkar, sebarakan suspensi kultur ke suatu area kira-kira seukuran cincin.
5. Lakukan fiksasi dengan cara melalukan kaca objek diatas api bunsen (dengan udara panas kering) sebanyak 2-3 kali.

Apusan Bakteri dari Kultur Padat

1. Beri label pada kaca objek yang bersih dengan inisial organisme.
2. Tempatkan 1-2 loop penuh akuades steril pada kaca objek menggunakan loop steril,.
3. Dengan gerakan melingkar, sebarakan akuades steril ke suatu area kira-kira seukuran cincin.
4. Kemudian, ambil seujung ose loop atau seujung ose jarum kultur padat dan campurkan dengan akuades steril yang telah telah ditempatkan pada permukaan kaca objek.
5. Dengan gerakan melingkar, sebarakan suspense tersebut ke suatu area kira-kira seukuran cincin.
6. Lakukan fiksasi dengan cara melalukan kaca objek diatas api bunsen (dengan udara panas kering) sebanyak 2-3 kali.



Gambar 7.4 Tahap pembuatan apusan bakteri (Sumber: Benson, 2002)

B. Pewarnaan Sederhana

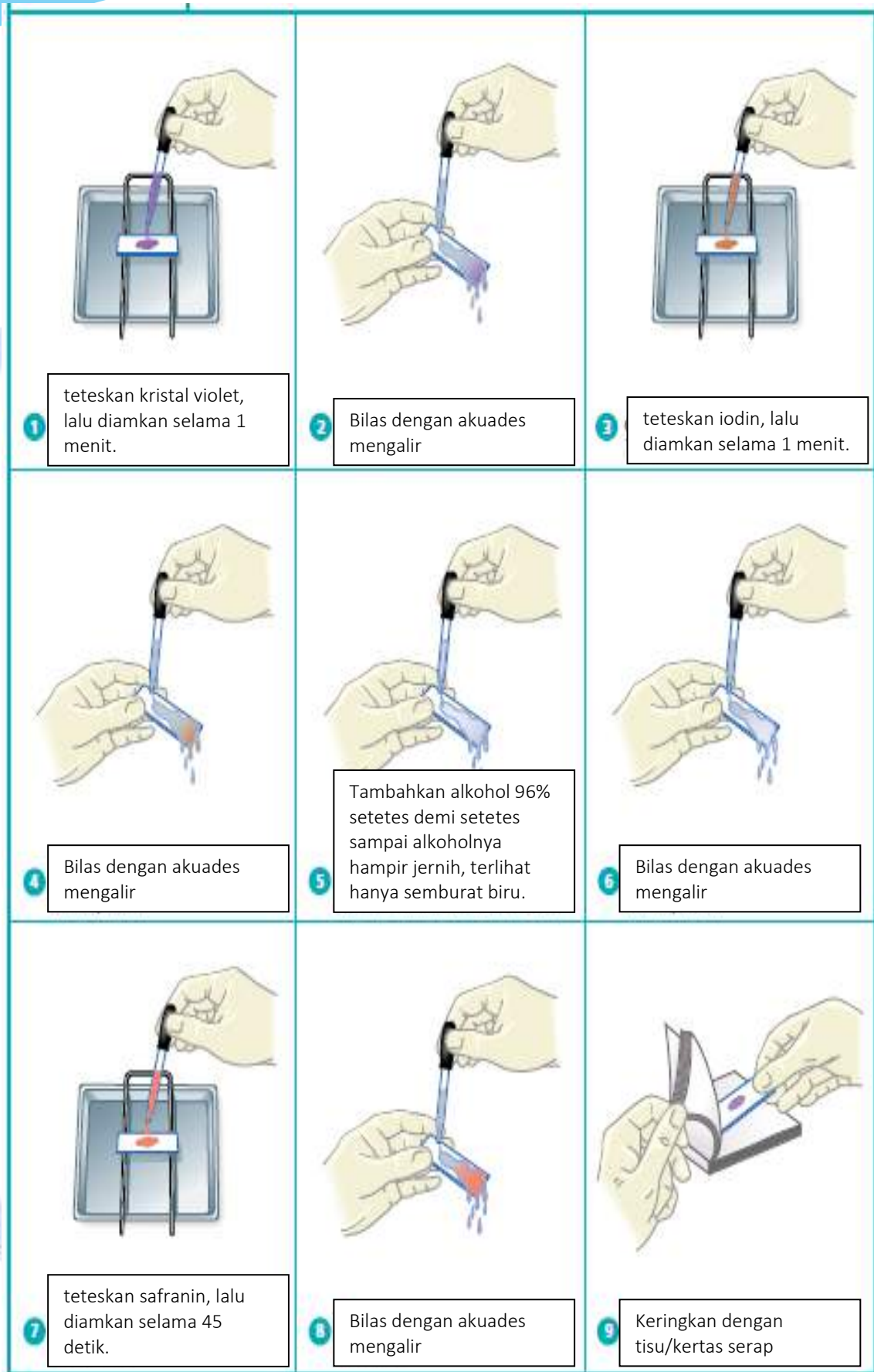
1. Siapkan apusan bakteri pada kaca objek
2. Tempatkan kaca objek apusan bakteri pada rak pewarnaan dan teteskan zat warna pada permukaan seluruh apusan bakteri, lalu diamkan selama 1 menit.
3. Bilas kaca objek dengan akuades mengalir untuk menghilangkan sisa zat warna, kondisikan posisi kaca objek miring sehingga air bilasan dapat mengalir ke baki penampung dan menghindari apusan ikut terbilas akibat genangan pada apusan.
4. Keringkan kaca objek menggunakan tisu dengan cara ditempelkan secara perlahan, **jangan menghapus apusan bakteri dengan tisu !!**
5. Amati dibawah mikroskop menggunakan mulai dari perbesaran 100x, 400x, dan 1000x (untuk perbesaran 1000x gunakan minyak imersi).



Gambar 7.5 Tahap pewarnaan sederhana
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

C. Pewarnaan Gram

1. Siapkan apusan bakteri pada kaca objek
2. Tempatkan kaca objek apusan bakteri pada rak pewarnaan dan teteskan kristal violet pada permukaan seluruh apusan bakteri, lalu diamkan selama 1 menit.
3. Bilas kaca objek dengan akuades mengalir untuk menghilangkan sisa zat warna, kondisikan posisi kaca objek miring sehingga air bilasan dapat mengalir ke baki penampung.
4. Beri tetesan iodine pada permukaan apusan, lalu diamkan selama 1 menit.
5. Bilas kaca objek dengan akuades mengalir untuk menghilangkan sisa zat warna, kondisikan posisi kaca objek miring sehingga air bilasan dapat mengalir ke baki penampung.
6. Pemucatan (*decolorization*) menggunakan alkohol 96%. Tambahkan alkohol 96% setetes demi setetes sampai alkoholnya hampir jernih, terlihat hanya semburat biru.
7. Bilas kaca objek dengan akuades mengalir untuk menghilangkan sisa zat warna, kondisikan posisi kaca objek miring sehingga air bilasan dapat mengalir ke baki penampung.
8. Beri tetesan safranin pada permukaan apusan, lalu diamkan selama 45 detik.
9. Bilas kaca objek dengan akuades mengalir untuk menghilangkan sisa zat warna, kondisikan posisi kaca objek miring sehingga air bilasan dapat mengalir ke baki penampung.
10. Keringkan kaca objek menggunakan tisu dengan cara ditempelkan secara perlahan, **jangan menghapus apusan bakteri dengan tisu !!**
11. Amati dibawah mikroskop menggunakan mulai dari perbesaran 100x, 400x, dan 1000x (untuk perbesaran 1000x gunakan minyak imersi).



Gambar 7.6 Tahap Pewarnaan Gram Bakteri
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

D. Pewarnaan Negatif

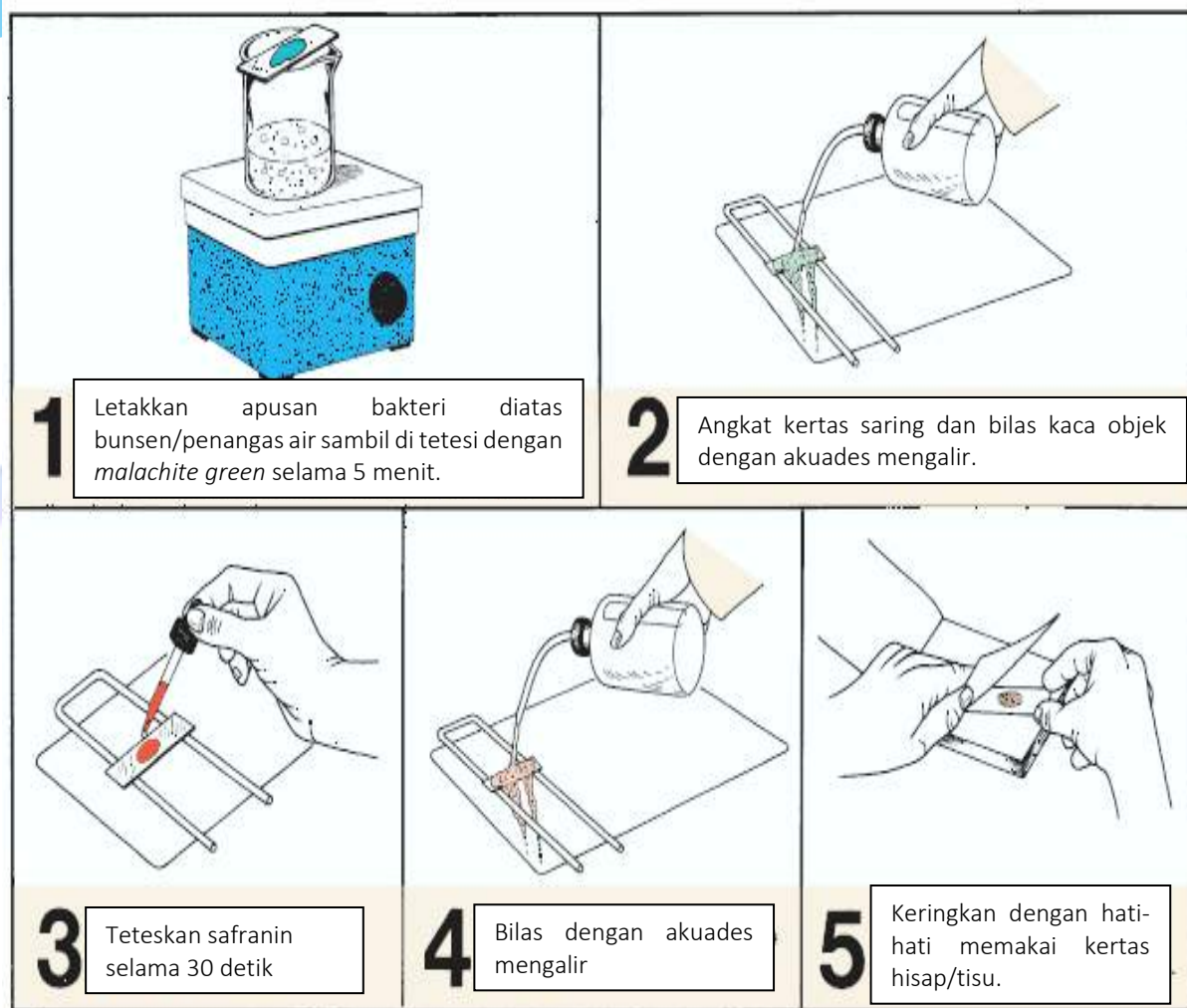
1. Siapkan kaca objek yang bersih.
2. Teteskan sebanyak 1 tetes nigrosin pada salah satu sisi ujung kaca objek.
3. Secara aseptik, tempatkan seujung ose loop biakan bakteri pada nigrosin tadi dan campurkan secara merata.
4. Tempatkan satu kaca objek lainnya diatas permukaan suspensi tersebut dengan kemiringan 45° lalu tarik kaca objek tersebut ke arah sisi ujung lain dari kaca objek pertama sehingga terbentuk lapisan tipis hitam pada permukaan kaca objek pertama.
5. Amati dibawah mikroskop menggunakan mulai dari perbesaran 100x, 400x, dan 1000x (untuk perbesaran 1000x gunakan minyak imersi).



Gambar 7.7 Tahap Pewarnaan Negatif
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

E. Pewarnaan Endospora

1. Siapkan apusan bakteri
2. Tutuplah apusan bakteri dengan sepotong kertas saring
3. Letakkan kaca objek apusan bakteri diatas bunsen/penangas air sambil di tetesi dengan *malachite green* selama 5 menit, dijaga jangan sampai kertas saring mengering.
4. Angkat kertas saring dan bilas kaca objek dengan akuades mengalir
5. Teteskan safranin selama 30-45 detik
6. Bilas kembali dengan akuades mengalir dan keringkan dengan hati-hati memakai kertas hisap/tisu
7. Amati di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi



1 Letakkan apusan bakteri diatas bunsen/penangas air sambil di tetesi dengan malachite green selama 5 menit.

2 Angkat kertas saring dan bilas kaca objek dengan akuades mengalir.

3 Teteskan safranin selama 30 detik

4 Bilas dengan akuades mengalir

5 Keringkan dengan hati-hati memakai kertas hisap/tisu.

Gambar 7.8 Tahap Pewarnaan Endospora
(Sumber: Benson, 2002)

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Pewarnaan Sederhana

Jenis Pewarnaan	Spesies	Foto	Keterangan
Pewarnaan sederhana	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	<i>Bacillus subtilis</i>		
Pewarnaan Gram	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	<i>Bacillus subtilis</i>		
Pewarnaan endospora	<i>Bacillus subtilis</i>		
Pewarnaan negatif	<i>Bacillus subtilis</i>		

BAB 8

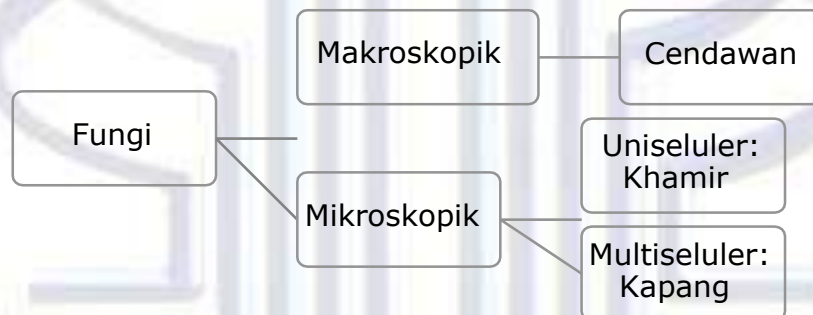
MORFOLOGI DAN PEWARNAAN FUNGI

Tujuan Praktikum

Untuk mengidentifikasi kelompok kapang dan khamir dengan mengenal ciri-ciri morfologi kapang dan khamir tersebut baik secara makroskopis maupun mikroskopis (agar dapat mengetahui genus dan spesies).

Teori

Kapang dan khamir merupakan makhluk hidup yang masuk dalam Kingdom Fungi. Fungi secara morfologi dibagi menjadi Fungi makroskopik dan mikroskopik. Fungi makroskopik dikenal dengan nama cendawan. Cendawan merupakan Fungi multiseluler yang sekilas tampak mirip tumbuhan, namun tidak mempunyai organ akar, batang dan daun, sehingga tubuhnya disebut TALUS (THALLUS). Talus tersusun atas benang-benang halus yang disebut HIFA. Hifa bercabang-cabang membentuk bangunan seperti jaring-jaring disebut MISELIUM. Fungi mikroskopik terbagi menjadi 2, yaitu kapang dan khamir. Kapang merupakan Fungi multiseluler yang memiliki hifa, sedangkan khamir merupakan Fungi uniseluler (Gambar 8.1).



Gambar 8.1 Pengelompokan fungi berdasarkan morfologi

Fungi dapat melakukan reproduksi secara seksual dan aseksual. Alat reproduksi Fungi berupa SPORA. Bila spora jatuh pada lingkungan yang sesuai, maka akan tumbuh menjadi hifa yang kemudian bercabang-cabang membentuk miselium. Pertumbuhan lebih lanjut dari miselium akan membentuk tubuh/talus jamur. Keberadaan spora seksual menentukan klasifikasi dari Fungi.

Morfologi Makroskopik Kapang Dan Khamir

Yang perlu diamati secara makroskopik :

- ✓ Warna dan permukaan koloni (granular; beludru; kapas; seperti tepung; menggunung; licin, ada/tidak ada tetes – tetes eksudat)
- ✓ Garis – garis radial dari pusat koloni ke arah tepi
- ✓ Ada tidaknya titik pertumbuhan
- ✓ Ada tidaknya lingkaran konsentris

Khamir/Yeast

Khamir merupakan Fungi mikroskopik uniseluler dengan bentuk sel bulat atau lonjong. Besar

selnya lebih besar dari sel bakteri. Khamir dapat ditemukan di alam, seperti pada air, tanah, dan debu. Umumnya, Fungi merupakan organisme aerob, akan tetapi banyak khamir yang mampu hidup dalam kondisi anaerob

Contoh spesies khamir:

- ✓ *Saccharomyces cerevisiae*
Mampu mengubah glukosa menjadi alkohol dan CO₂, berperan penting dalam industri minuman beralkohol (bir, anggur, champagne)
- ✓ *Candida albicans*
Penyebab penyakit keputihan pada wanita (kandidiasis vagina)
- ✓ *Malassezia furfur*
Fungi patogen penyebab infeksi mikosis superfisial nondermatofita

Kapang/Molds

Kapang merupakan Fungi mikroskopik multiseluler, tubuh/talus suatu kapang terdiri dari 2 bagian, yaitu MISELIUM dan SPORA. Miselium merupakan kumpulan beberapa filamen (benang) yang dinamakan hifa. Lembaran setiap hifa 5-10 µm (bandingkan dengan sel bakteri yang biasanya berdiameter 1µm). Kapang dapat bereproduksi secara seksual dan aseksual. Secara seksual : dengan peleburan nukleus dari 2 sel induknya. Beberapa spesies kapang

- ✓ *Rhizopus oligosporus* : kapang tempe
- ✓ *Penicillium chrysogenum* : kapang penghasil penisilin
- ✓ *Penicillium notatum* : kapang penghasil penisilin
- ✓ *Aspergillus flavus* : kapang penghasil aflatoksin (salah satu penyebab kanker hati)

Habitat

Terdapat dimana-mana: tanah, air, hewan, tumbuhan, manusia. Ada yang parasit dan ada yang saprofit.

Arti Beberapa Istilah :

- Konidia/ Konidium : Spora aseksual
- Kolumela : Badan steril tubuh buah kapang
- Konidiofar : Hifa yang menyamngga sel-sel pembentuk konidia
- Apofise : Penyangga kolumela
- Sporangium : Kotak spora/ sel atau organ yang membentuk spora didalamnya
- Sporangiofor : Hifa yang membawa satu sporangium atau lebih
- Metula: Cabang-cabang akhir konidiofor *Aspergillus* dan *Penicillium* yang ujungnya membentuk fialid
- Fialid : Badan tempat penyangga konidia
- Vesikel : Konidiofor yang melebar atau menggelembung
- Budding : Bertunas
- Rhizoid: Akar pada jamur untuk melekatkan diri pada substrat dan menyerap nutrisi
- Foot cell : Sel pendukung talus atau kapang
- Stolon : Hifa yang tumbuh secara horizontal
- Septum : Sekat pada hifa jamur

Alat dan Bahan

Bahan: laktofenol

Biakan Fungi: *Aspergillus brasiliensis*, *Penicillium notatum*, *Candida albicans*, *Malassezia*

furfur, *Rhodotorula* spp.

Alat: Jarum ose lurus, Bunsen, kaca objek, mikroskop.

Prosedur Kerja

1. Bersihkan gelas objek dengan alkohol 70% hingga bebas lemak
2. Teteskan larutan laktofenol di atas permukaan kaca objek
3. Ambil sedikit biakan kapang/khamir menggunakan jarum ose lurus dan campurkan dengan laktofenol pada kaca objek
4. Tutup kaca objek dengan kaca penutup
5. Amati di bawah mikroskop, mulai perbesaran 100x dan 400x

Hasil Pengamatan

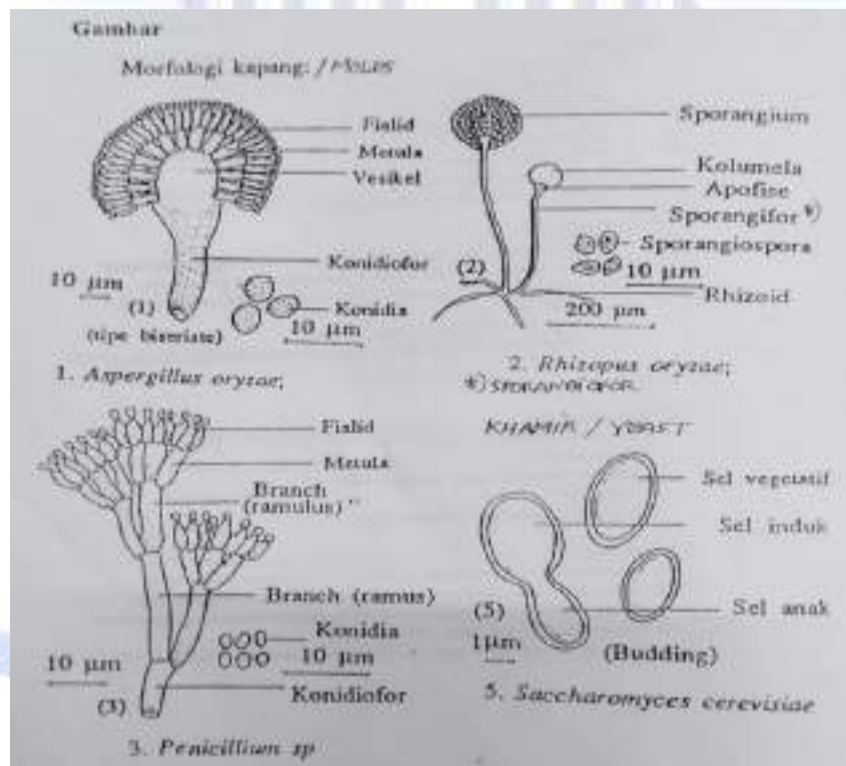
Tabel Hasil Pengamatan Makroskopik Fungi

No	Spesies	Foto Pengamatan	Keterangan
1	<i>Penicillium notatum</i>		
2	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		

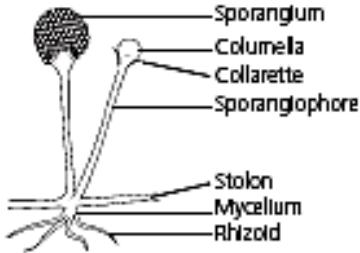
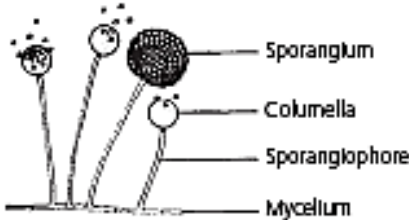
Tabel Hasil Pengamatan Mikroskopik Fungi

No	Spesies	Foto Pengamatan	Keterangan
1	<i>Penicillium notatum</i>		
2	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
3	<i>Candida albicans</i>		
4	<i>Malassezia furfur</i>		
5	<i>Rhodotorula</i> spp.		

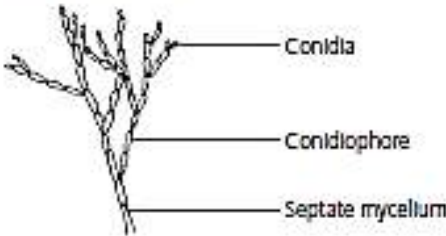
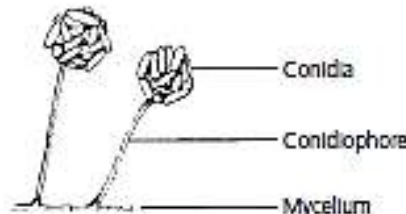
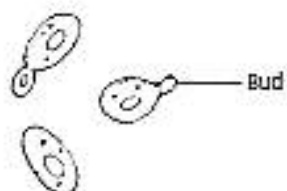
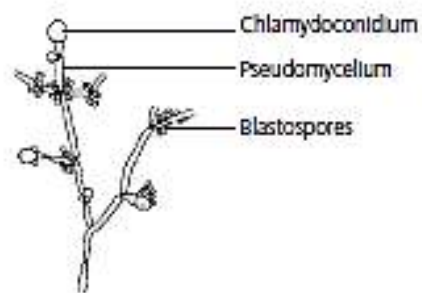
Lampiran



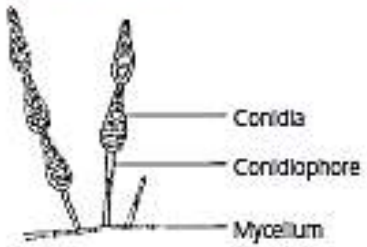
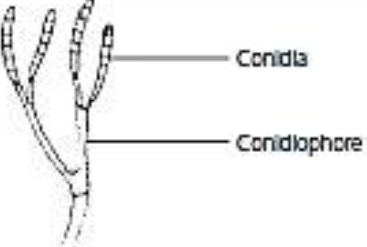
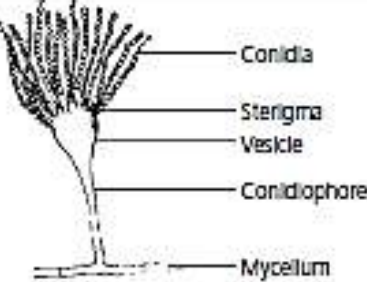
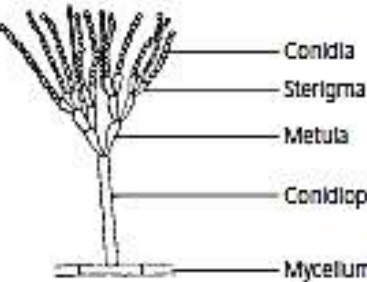
Gambar 8.2 Morfologi Mikroskopik Fungi

DIAGRAM	COLONIAL MORPHOLOGY	MICROSCOPIC APPEARANCE
<p>Molds</p>  <p>Sporangium Columella Collarette Sporangiophore Stolon Mycellium Rhizoid</p> <p>Rhizopus: Black bread mold; common laboratory contaminant</p>	<p>Rapidly growing white-colored fungus swarms over entire plate; aerial mycelium cottony and fuzzy</p>	<p>Spores are oval, colorless, or brown; nonseptate mycelium gives rise to straight sporangiophores that terminate with black sporangium containing a columella; rootlike hyphae (rhizoids) penetrate the medium</p>
 <p>Sporangium Columella Sporangiophore Mycellium</p> <p>Mucor: Food contaminant</p>	<p>Resembles the colonies of <i>Rhizopus</i> except that it lacks rhizoids and collarettes. Sporangiophore arises directly from mycelial mat. Note: Branching sporangiophores may occur with <i>Mucor</i>.</p>	<p>Spores are oval; nonseptate mycelium gives rise to single sporangiophores with globular sporangium containing a columella; there are no rhizoids</p>

Gambar 8.3a Morfologi Mikroskopik Fungi
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

DIAGRAM	COLONIAL MORPHOLOGY	MICROSCOPIC APPEARANCE
<p>Molds (continued)</p>  <p>Labels: Conidia, Conidiophore, Septate mycelium</p> <p>Cladosporium: Dead and decaying plants</p>	<p>Small, heaped colonies are greenish-black and powdery</p>	<p>Spores (conidia) develop at the end of complex conidiophores arising from a septate mycelium that is usually brownish</p>
 <p>Labels: Conidia, Conidiophore, Mycelium</p> <p>Cephalosporium: Antibiotic production</p>	<p>Rapidly growing compact and moist colonies becoming cottony with aerial hyphae that are gray or rose-colored</p>	<p>Single-celled conical or elliptical spores (conidia) held together in clusters at the tips of the conidiophores by a mucoid substance; erect, unbranched conidiophores arise from a septate mycelium</p>
<p>Yeast</p>  <p>Label: Bud</p> <p>Trufa: Cheese and food contaminant</p>	<p>Colonies are pink, moist, with unbroken, even edges</p>	<p>Cells are oval, colorless, and reproduce by budding</p>
 <p>Labels: Chlamydoconidium, Pseudomycelium, Blastospores</p> <p>Candida: Human pathogen</p>	<p>Colonies are small, round, moist, and colorless, with unbroken, even edges</p>	<p>Yeastlike fungus produces pseudomycelium</p>

Gambar 8.3b Morfologi Mikroskopik Fungi
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

DIAGRAM	COLONIAL MORPHOLOGY	MICROSCOPIC APPEARANCE
<p>Molds (continued)</p>  <p>Conidia Conidiophore Mycelium</p> <p>Alternaria: Normally found on plant material; also found in house dust</p>	<p>Grayish-green or black colonies with gray edges rapidly swarming over entire plate; aerial mycelium not very dense, appears grayish to white</p>	<p>Multicelled spores (conidia) are pear-shaped and attached to single conidiophores arising from a septate mycelium</p>
 <p>Conidia Conidiophore</p> <p>Fusarium: Found in soil; also likely in eye infections</p>	<p>Woolly, white, fuzzy colonies changing color to pink, purple, or yellow</p>	<p>Spores (conidia) are oval or crescent-shaped and attached to conidiophores arising from a septate mycelium; some spores are single cells, some are multicelled</p>
 <p>Conidia Sterigma Vesicle Conidiophore Mycelium</p> <p>Aspergillus: Plant and animal pathogens; some species used industrially</p>	<p>White colonies become greenish-blue, black, or brown as culture matures</p>	<p>Single-celled spores (conidia) in chains developing at the end of the sterigma arising from the terminal bulb of the conidiophore, the vesicle; long conidiophores arise from a septate mycelium</p>
 <p>Conidia Sterigma Metula Conidiophore Mycelium</p> <p>Penicillium: Antibiotic-producing citrus fruit contaminant; soil inhabitant</p>	<p>Mature cultures usually greenish or blue-green</p>	<p>Single-celled spores (conidia) in chains develop at the end of the sterigma arising from the metula of the conidiophore; branching conidiophores arise from a septate mycelium</p>

Gambar 8.3c Morfologi Mikroskopik Fungi
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

BAB 9

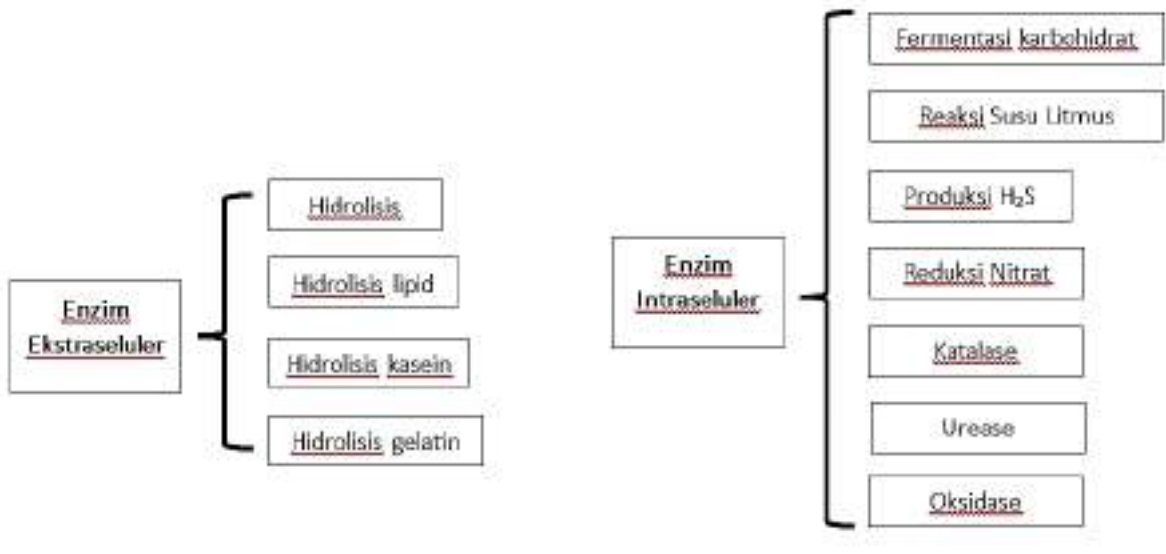
UJI AKTIVITAS BIOKIMIA

Tujuan Praktikum

1. Mempelajari teknik uji biokimia bakteri
2. Mempelajari aktivitas biokimia bakteri untuk identifikasi bakteri

Teori

Uji aktivitas biokimia merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu bakteri. Identifikasi bakteri perlu dilakukan untuk beberapa tujuan diantaranya yaitu 1). Agar dapat dibedakan bakteri patogen penyebab penyakit infeksi; 2). Agar dapat dibedakan bakteri fermentatif dan bakteri potensial yang berperan penting dalam industri seperti bakteri penghasil alkohol, vitamin, asam organik, enzim, dan antibiotik; 3). Untuk mengetahui taksonomi suatu bakteri. Aktivitas biokimia berkaitan dengan reaksi enzimatik yang terlibat dalam metabolisme bakteri. Enzim pada bakteri dibedakan menjadi dua tipe yaitu enzim ekstraseluler (eksoenzim) dan enzim intraseluler (endoenzim). Enzim ekstraseluler atau eksoenzim merupakan enzim yang dikeluarkan oleh sel dan umumnya bersifat hidrolitik yang dapat mendegradasi makromolekul seperti pati, lipid, kasein, gelatin, dll. Enzim intraseluler atau endoenzim merupakan enzim yang bekerja di dalam sel dan umumnya bertanggung jawab dalam sintesis bahan – bahan yang dibutuhkan sel dan menghasilkan energi.



Gambar 9.1 Uji Aktivitas biokimia berdasarkan tipe enzim yang berperan (Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)



Gambar 9.2 Uji Aktivitas biokimia untuk membedakan bakteri enterik
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

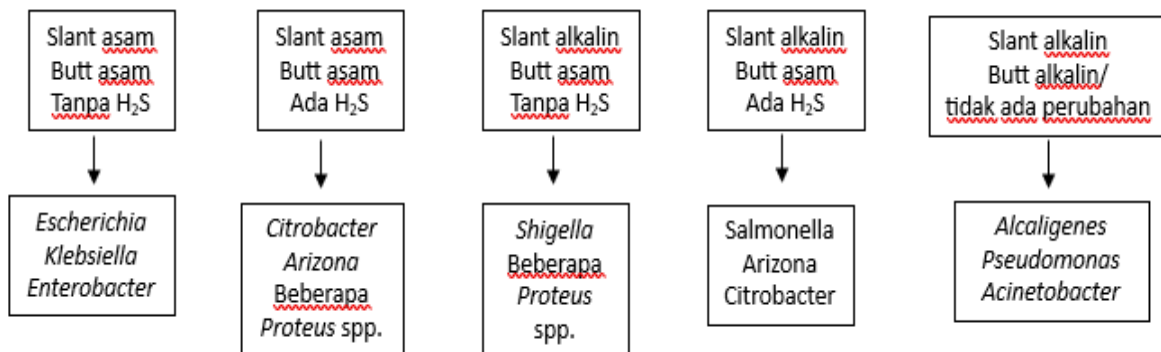
1. Uji TSIA (Triple Sugar-Iron Agar)

Uji TSIA dirancang untuk membedakan antara genus *Enterobacteriaceae* Gram negatif batang. Diferensiasi dilakukan berdasarkan perbedaan pola fermentasi karbohidrat dan produksi hidrogen sulfida (H_2S). Media agar miring TSIA mengandung laktosa dan sukrosa masing – masing 1% dan glukosa 0.1%. Selain itu, TSIA mengandung *phenol red* yang berfungsi sebagai indikator warna asam dan basa. *Phenol red* akan berubah warna dari jingga kemerahan menjadi kuning apabila adanya asam yang berasal dari hasil fermentasi karbohidrat. Media TSIA diinokulasi dengan cara ditusuk tegak lurus kemudian digores dari bagian *butt* menuju *slant* menggunakan ose jarum steril. Hasil diinkubasi akan menampilkan tiga kemungkinan pola pertumbuhan sebagai berikut:

- a. **Bagian permukaan miring (*slant*) berwarna merah (alkalin) dan bagian bawah (*butt*) berwarna kuning (asam) dengan atau tanpa gas (bagian agar bawah retak atau terangkat ke atas).** Hal ini menunjukkan bahwa bakteri hanya mampu memfermentasi glukosa, dimana konsentrasi glukosa di dalam media sangat kecil. Asam yang dihasilkan pada permukaan *slant* sangat sedikit sehingga teroksidasi dengan cepat dan penggunaan pepton dalam media menghasilkan produk alkali juga menyebabkan permukaan *slant* berwarna merah. Pada bagian *butt* berwarna kuning disebabkan oleh reaksi asam dapat dipertahankan karena berkurangnya tekanan oksigen dan pertumbuhan bakteri yang lebih lambat.
- b. **Bagian permukaan miring (*slant*) berwarna kuning (asam) dan bagian bawah (*butt*) berwarna kuning (asam) dengan atau tanpa gas (bagian agar bawah retak atau terangkat ke atas).** Hal ini menandakan bahwa terjadi fermentasi laktosa dan atau sukrosa, dimana konsentrasi kedua komponen ini sangat tinggi maka fermentasi terus berlangsung sehingga menghasilkan reaksi asam baik pada bagian *slant* maupun *butt*.
- c. **Bagian permukaan miring (*slant*) berwarna merah (alkalin) dan bagian bawah (*butt*) berwarna jingga kemerahan (tidak terjadi perubahan).** Hal ini menandakan tidak terjadi fermentasi karbohidrat tetapi yang terjadi adalah katabolisme pepton yang menghasilkan ammonia dan reaksi basa.



Gambar 9.3 Reaksi yang terjadi pada media TSI
(Sumber: <https://microbiologie-clinique.com>)



Gambar 9.4 Reaksi TSIa untuk membedakan bakteri enterik
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

Tabel 9.1 Penggolongan Bakteri Enterik

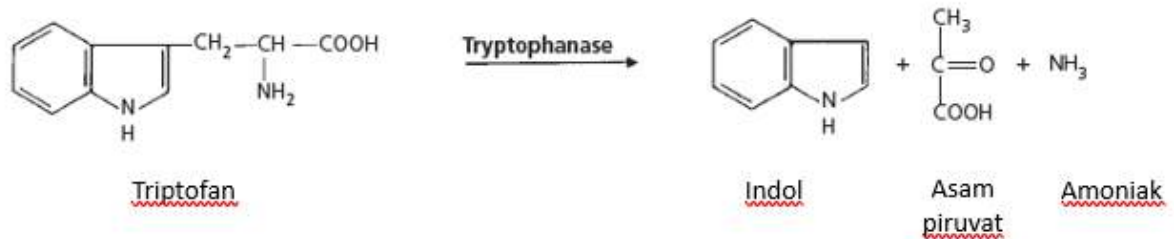
Bakteri Enterik <i>Lactose Fermenters</i>	Bakteri Enterik <i>Non Lactose Fermenters</i>	Bakteri Non Enterik
<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>

(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

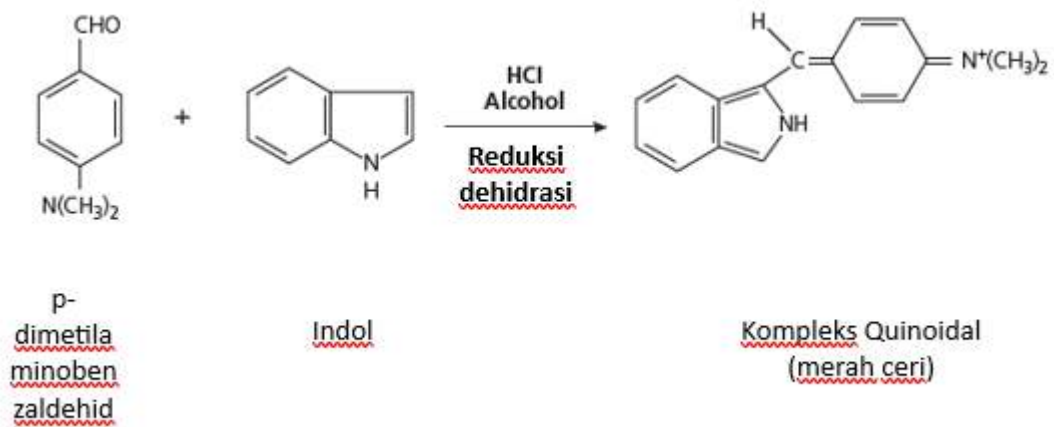
2. Uji Indol

Uji indol menggunakan media SIM yang mengandung kasein pankreas (kasein pepton), meat pepton, besi amonium sulfat sebagai sumber zat besi, dan natrium tiosulfat. Pepton mengandung asam amino, termasuk triptofan. Triptofan merupakan asam amino esensial yang dapat dihidrolisis oleh enzim triptofanase menghasilkan indol. Kemampuan bakteri menghasilkan enzim triptofanase menjadi penanda biokimia karena tidak semua bakteri

mampu menghasilkan triptofanase. Keberadaan indol dideteksi dengan cara menambahkan reagen Kovac setelah inkubasi. Penambahan reagen Kovac akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media yang mengandung indol. Cincin merah terbentuk akibat reaksi p-dimetilaminobenzaldehyd dengan indol yang menghasilkan senyawa kompleks Quinoidal berwarna merah ceri. Media yang tidak mengandung indol tidak mengalami perubahan (tidak terbentuk cincin merah).



Gambar 9.5 Reaksi Enzimatik Triptofan
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)



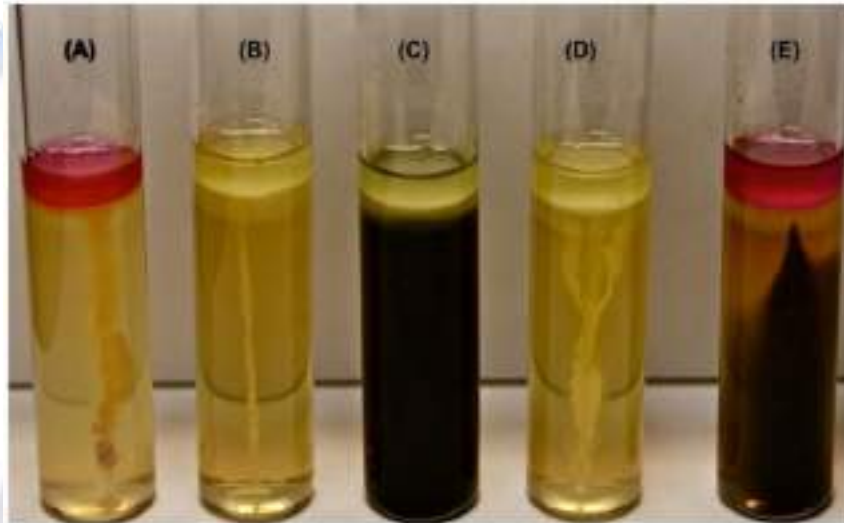
Gambar 9.6 Reaksi Indol dengan Reagen Kovac
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

SIM kepanjangan dari sulfida, indol, dan motilitas. Dengan sekali tusukan inokulasi ke dalam media semisolid ini, dapat diperoleh hasil dengan tiga karakteristik yaitu produksi indol, produksi H₂S, dan motilitas. Media SIM mengandung mengandung garam besi dan natrium tiosulfat sebagai substrat belerang. Ketika natrium tiosulfat direduksi, gas hidrogen sulfida (H₂S) yang dihasilkan bereaksi dengan garam besi sulfat (Ferri ammonium sulfat) dalam media membentuk endapan besi sulfida hitam (H₂S-positif).



Gambar 9.7 Reaksi Reduksi Tiosulfat
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

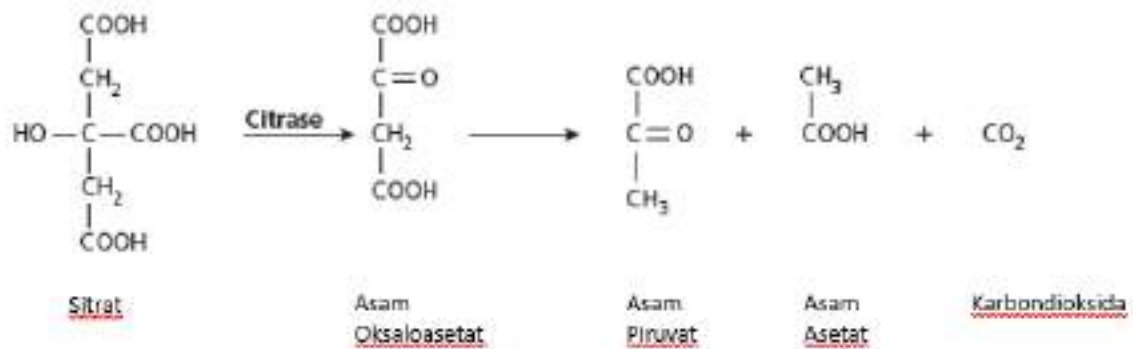
Media SIM ini bersifat semisolid kondisi agar yang agak cair memungkinkan bakteri bergerak lebih mudah. SIM diinokulasi menggunakan ose jarum dengan cara ditusukkan ke bagian bawah tabung dan dengan hati-hati menarik kembali ose jarum sepanjang garis goresan yang sama. Bakteri non-motil akan tumbuh dalam garis padat dan jelas di sepanjang garis tusukan. Bakteri motil akan bergerak menjauhi garis tusukan dan media tampak keruh serta garis tusukan tidak akan terlihat atau tidak jelas.



Gambar 9.8 Hasil Reaksi Media SIM. (a) *Escherichia coli*: motil, H₂S (-), Indol (+); (b) *Staphylococcus aureus*: non-motil, H₂S (-), Indol (-); (c) *Salmonella arizonae*: motil, H₂S (+), Indol (-); (d) *Enterobacter aerogenes*: motil, H₂S (-), Indol (-); (e) *Proteus vulgaris*: motil, H₂S (+), Indol (+).

3. Uji Pemanfaatan Sitrat

Uji pemanfaatan sitrat menggunakan media *Simmon's Citrate Agar*. Media ini mengandung sitrat sebagai satu – satunya sumber karbon, ammonium fosfat sebagai satu – satunya sumber nitrogen, dan bromtimol biru sebagai indikator pH. Sitrat adalah senyawa perantara pertama dalam siklus krebs. Kemampuan bakteri menggunakan sitrat tergantung dari kemampuan untuk mentransportasikan sitrat ke dalam sel. Begitu berada di dalam sel, *citrase*, atau *citrate lyase* memecah sitrat menjadi asetat dan oksaloasetat. Kemudian oksaloasetat didekarboksilasi membentuk piruvat dan karbon dioksida. Ammonium fosfat digunakan oleh bakteri sebagai sumber nitrogen dan menghasilkan amoniak. Amoniak yang dihasilkan bereaksi dengan karbondioksida yang dilepaskan ke medium hasil dari dekarboksilasi. Hal ini meningkatkan alkalinitas atau pH media. Bromtimol biru merupakan indikator pH yang berwarna hijau pada nilai pH netral dan berubah menjadi biru cerah atau biru Prusia dalam kondisi basa.



Gambar 9.9 Reaksi Degradasi Enzimatis Sitrat



Gambar 9.10 Hasil Uji Pemanfaatan Sitrat pada media *Simmon's Citrate Agar*. Tabung hijau di sebelah kiri adalah kontrol yang tidak diinokulasi bakteri. Tabung media berwarna biru prusia di sebelah kanan adalah sitrat-positif
(Sumber: Obenauf & Finazzo, 2022)

4. Uji Katalase

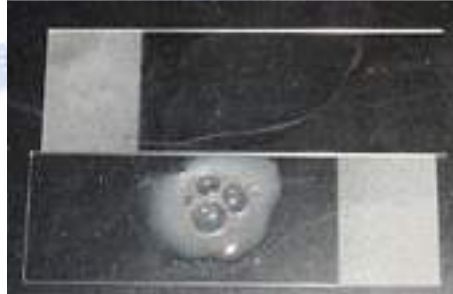
Selama respirasi aerobik, bakteri menghasilkan hidrogen peroksida (H₂O₂). Akumulasi H₂O₂ akan mengakibatkan kematian kecuali bakteri yang mampu mendegradasi secara enzimatik. Zat-zat tersebut diproduksi oleh bakteri yang bersifat aerob, anaerob fakultatif, dan mikroaerofil menggunakan jalur respirasi aerobik, di mana oksigen sebagai akseptor elektron terakhir. Bakteri yang mampu menghasilkan katalase dapat mendegradasi hidrogen peroksida dengan cepat sehingga tidak bersifat toksik bagi sel. Bakteri aerob yang tidak memiliki katalase dapat mendegradasi H₂O₂ menggunakan enzim superoksida dismutase.



Gambar 9.11 Reaksi Katalase

Ketidakmampuan bakteri anaerob obligat untuk mensintesis katalase, peroksidase, atau superoksida dismutase memungkinkan oksigen bersifat racun bagi bakteri ini karena H₂O₂ tidak dapat didegradasi saat bakteri ini dibiakkan dalam kondisi aerob. Produksi katalase dapat ditentukan dengan menambahkan substrat H₂O₂ pada kultur bakteri. Keberadaan katalase

ditandai dengan terbentuknya gelembung gas oksigen bebas O_2 . Hasil ini menunjukkan katalase positif (Gambar 9.12). Sedangkan, katalase negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gelembung gas oksigen bebas O_2 .



Gambar 9.12 Hasil Uji Katalase menggunakan H_2O_2 sebagai substrat
(Sumber: Cappucino & Welsh, 2018)

Alat dan Bahan

Bahan

TSIA Medium, SIM Medium, *Simmon's Citrate Agar Medium*, Larutan H_2O_2 3%.

Alat

Jarum Ose Bulat, Bunsen, kaca objek

Bakteri

Bacillus subtilis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Prosedur Kerja

1. Uji TSIA

Ambil sebanyak satu ose biakan bakteri menggunakan jarum ose lurus lalu inokulasikan ke dalam media TSIA tabung miring dengan cara ditusuk tegak lurus kemudian digores dengan pola zig-zag dari dalam tabung menuju luar tabung. Inkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Amati reaksi yang terjadi.

2. Uji SIM

Ambil sebanyak satu ose biakan bakteri menggunakan jarum ose lurus lalu inokulasikan ke dalam media SIM tabung tegak dengan cara ditusuk tegak lurus lalu tarik ke luar secara perlahan. Inkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. setelah inkubasi, beri tetesan reagen Kovac dan amati reaksi yang terjadi.

3. Uji Sitrat

Ambil sebanyak satu ose biakan bakteri menggunakan jarum ose loop lalu inokulasikan ke dalam media *Simmon's Citrate Agar* tabung miring dengan cara digores dengan pola zig-zag dari dalam tabung menuju luar tabung. Inkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Amati reaksi yang terjadi.

4. Uji Katalase

Bersihkan kaca objek, beri beberapa tetes larutan H_2O_2 3% diatas kaca objek. Kemudian ambil sedikit kultur bakteri menggunakan ose loop dan letakan didalam tetesan H_2O_2 3%. Amati ada

/ tidak adanya gelembung O₂ didalam tetesan H₂O₂ 3%.

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Biokimia

Uji		Bakteri			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
TSIA	Gas				
	asam				
	Laktosa/sukrosa				
	Glukosa				
	H ₂ S				
SIM	Indol				
	H ₂ S				
	Motil				
Sitrat	Sitrat				
Katalase	Katalase				

Keterangan:

(+): mampu memproduksi

(-): tidak mampu memproduksi

BAB 10

UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA

Tujuan Praktikum

1. Mempelajari teknik uji aktivitas antimikroba
2. Mengetahui efektifitas senyawa antimikroba uji dan menginterpretasikan hasilnya

Teori

Senyawa antimikroba adalah bahan atau zat yang dapat membunuh atau menghambat aktivitas mikroorganisme. Senyawa antimikroba terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya dan tujuan penggunaannya. Bahan antimikroba dapat berupa desinfektan, antiseptik, dan antibiotik. Antiseptik adalah bahan kimia yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme digunakan pada tubuh bagian luar (kulit). Contohnya, sabun cuci tangan yang mengandung triclosan, dan pembersih tangan yang mengandung alkohol. Desinfektan bekerja dengan menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikrob pada benda tak hidup, seperti meja, alat gelas, dan lain sebagainya, contohnya Hidrogen peroksida (H_2O_2). Antibiotik adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri tertentu dalam konsentrasi yang rendah. Antibiotik digunakan untuk menghentikan aktivitas mikrob pada jaringan tubuh makhluk hidup. Antibiotik yang efektif bagi banyak spesies bakteri, baik kokus, basil maupun spiril dikatakan mempunyai spektrum luas. Sebaliknya suatu antibiotik yang hanya efektif untuk spesies tertentu, disebut antibiotik yang spektrumnya sempit. Penisilin hanya efektif untuk memberantas terutama jenis kokus, oleh karena itu penisilin dikatakan mempunyai spectrum yang sempit. Tetrasiklin efektif bagi kokus, basil, dan jenis spiril tertentu. Oleh karena itu, tertasiklin dikatakan mempunyai spektrum yang luas. Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel dapat dibedakan atas beberapa kelompok, diantaranya merusak dinding sel, mengganggu permeabilitas sel, merusak molekul protein dan asam nukleat, menghambat aktivitas enzim, menghambat sintesa asam nukleat.

Salah satu metode yang digunakan untuk menguji aktivitas senyawa antimikroba adalah metode *Kirby-Bauer* atau dikenal sebagai metode difusi cakram. Metode ini sering digunakan untuk menentukan efektifitas suatu antibiotik terhadap mikroorganisme yang diisolasi dari sampel klinis. Metode ini dapat menentukan efektifitas suatu senyawa antimikroba terhadap mikroorganisme dengan cepat dengan cara mengukur diameter zona hambat yang mengelilingi kertas cakram. Kertas cakram berisi senyawa antimikroba yang diuji. Dalam metode ini, kertas cakram dengan ukuran seragam diisi (diresapi) dengan senyawa antimikroba yang berbeda dengan konsentrasi tertentu lalu diletakkan pada permukaan media cawan agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Media yang digunakan adalah media MHA (*Mueller Hinton Agar*). Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening (zona penghambatan) di sekeliling kertas cakram. Zona bening ini kemudian diukur dalam milimeter, kemudian besar diameter zona bening dibandingkan dan diinterpretasikan hasilnya. Hasil diameter zona bening antibiotik dapat dibandingkan dengan standar internasional yang berlaku seperti CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) dalam Manual Pengujian Sensitifitas Antimikroba yang dipublikasikan oleh ASM (*American Society of Microbiology*).

Diameter zona bening/hambat diinterpretasikan dan ditetapkan menjadi tiga kategori yaitu resisten, intermediet, dan sensitif. Selain itu, interpretasi diameter zona hambat juga dapat dibedakan menjadi 3 kategori lainnya yaitu sangat kuat, kuat, moderat, dan lemah. Interpretasi ini dapat digunakan untuk menguji efektifitas senyawa antimikrob selain antibiotik.

Tabel 10.1 Interpretasi Zona Hambat Senyawa Antimikrob

Diameter zona hambat (mm)	Interpretasi daya hambat
1-8	Lemah
9-14	Moderat
15-19	Kuat
>19	Sangat Kuat



Gambar 10.1 Uji Sensitivitas Antibiotik dengan metode Kirby-Bauer
(Sumber: Cappuccino & Welsh, 2018)

Alat dan Bahan

Alat: pinset steril, sedotan steril diameter 6 mm, tusuk gigi steril, *blank disc*, Bunsen, cawan petri steril.

Bahan: Media cawan Mueller Hinton Agar, cakram Penisilin-G 10 µg, cakram Ciprofloxacin 5 µg, *blank disc*, akuades steril, antiseptik (*Povidone*, *Betadine*, *Hand Sanitizer*, *Hand Wash*), dan desinfektan (*Lysol*, Klorin, hidrogen peroksida).

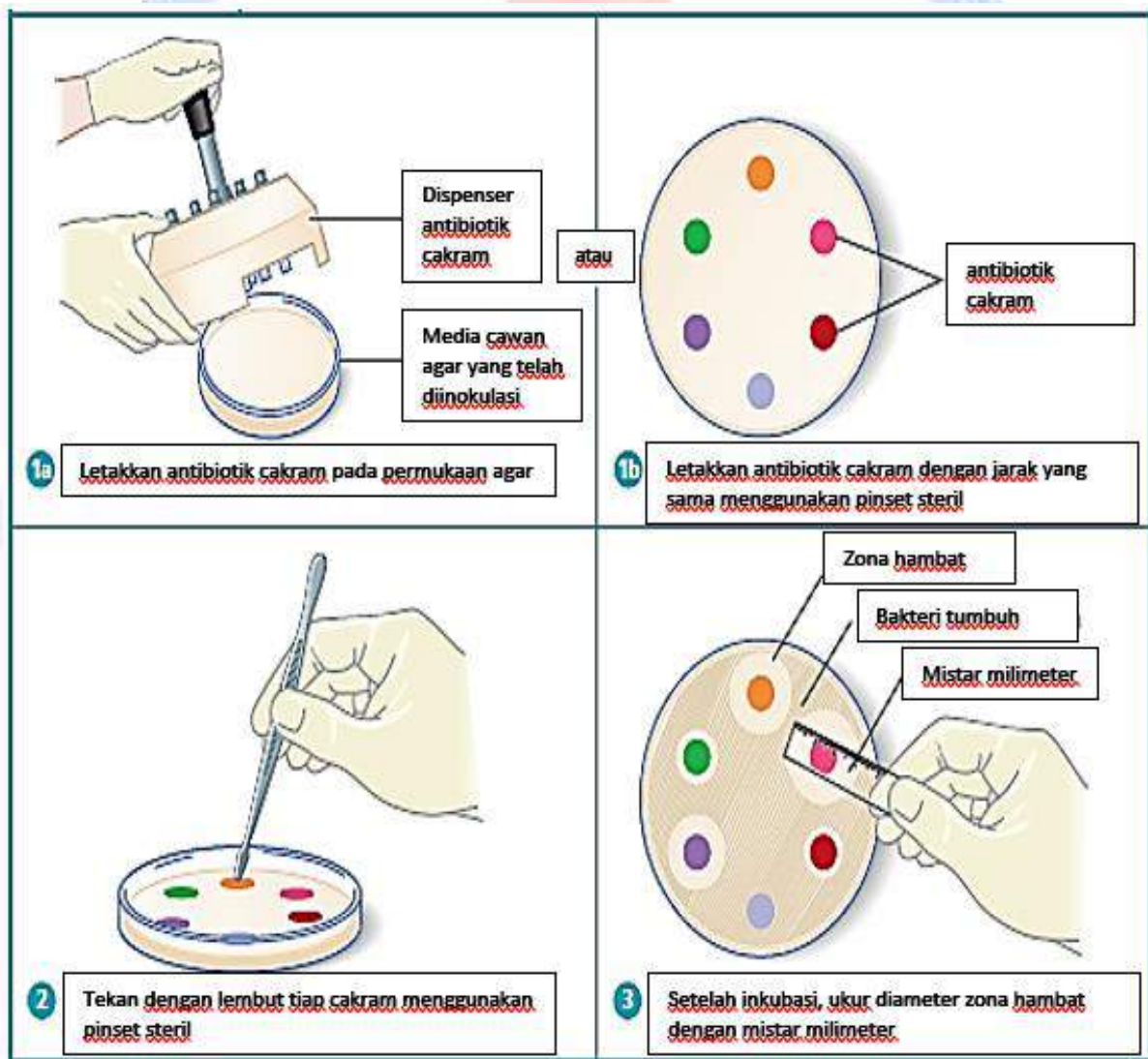
Bakteri: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Prosedur Kerja

A. Uji Antibiotik dengan Metode Difusi Cakram

1. Siapkan kultur cair bakteri uji dengan kerapatan sel sebanyak $1,5 \times 10^8$ CFU/mL atau nilai absorbansi 0,1 pada panjang gelombang 600 nm.
2. Beri label pada bagian bawah setiap media cawan MHA sesuai dengan nama bakteri uji dan zat antimikroba uji

3. Inokulasi kultur cair bakteri sebanyak 0,1 mL ke media cawan MHA dan sebar menggunakan batang sebar hingga merata, lalu diamkan selama 5 menit.
4. Letakkan antibiotik cakram pada permukaan media cawan MHA menggunakan pinset steril.
5. Tekan secara lembut cakram menggunakan pinset steril
6. Inkubasi media pada suhu 37 °C selama 24 jam
7. Setelah inkubasi, ukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekeliling cakram dan interpretasikan hasilnya.



Gambar 10.2 Prosedur uji aktivitas antimikroba dengan metode Kirby-Bauer

B. Uji Antiseptik Menggunakan Metode Difusi Cakram

1. Siapkan kultur cair bakteri uji dengan kerapatan sel sebanyak $1,5 \times 10^8$ CFU/mL atau nilai absorbansi 0,1 pada panjang gelombang 600 nm.
2. Siapkan kertas cakram yang berisi 20 uL antiseptik
3. Beri label pada bagian bawah setiap media cawan MHA sesuai dengan nama bakteri uji dan zat antimikroba uji
4. Inokulasi kultur cair bakteri sebanyak 0,1 mL ke media cawan MHA dan sebar menggunakan batang sebar hingga merata, lalu diamkan selama 5 menit.

5. Letakkan cakram antiseptik pada permukaan media cawan MHA menggunakan pinset steril.
6. Tekan secara lembut cakram menggunakan pinset steril
7. Inkubasi media pada suhu 37 °C selama 24 jam
8. Setelah inkubasi, ukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekeliling cakram dan interpretasikan hasilnya.

C. Uji Desinfektan Menggunakan Metode Difusi Sumur

1. Siapkan kultur cair bakteri uji dengan kerapatan sel sebanyak $1,5 \times 10^8$ CFU/mL atau nilai absorbansi 0,1 pada panjang gelombang 600 nm.
2. Beri label dan beri tanda pada bagian bawah setiap media cawan MHA sesuai dengan nama bakteri uji dan zat antimikroba uji
3. Inokulasi kultur cair bakteri sebanyak 0,1 mL ke media cawan MHA dan sebar menggunakan batang sebar hingga merata, lalu diamkan selama 5 menit.
4. Buat lubang dengan diameter 6 mm menggunakan *cork bored* atau sedotan steril pada media cawan MHA, lakukan secara aseptis.
5. Isi masing-masing lubang media dengan 20 – 60 µL desinfektan menggunakan mikropipet
6. Inkubasi media pada suhu 37 °C selama 24 jam
7. Setelah inkubasi, ukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekeliling cakram dan interpretasikan hasilnya.

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antibiotik

Bakteri	Diameter Zona Hambat (mm)	
	Penicilin-G (10µg)	Ciprofloxacin (5µg)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Test/ Report Group	Antimicrobial Agent	<i>Staphylococcus</i> spp. Indications	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				
				S	SD D	I	R	
MACROLIDES								
(26) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.								
A	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	All staphylococci	15 µg	≥18	–	14–17	≤13	
A			15 µg	≥18		14–17	≤13	
A			15 µg	≥23		14–22	≤13	
O	Dirithromycin		15 µg	≥19	–	16–18	≤15	
TETRACYCLINES								
(27) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.								
B	Tetracycline	All staphylococci	30 µg	≥19	–	15–18	≤14	
B	Doxycycline		30 µg	≥16	–	13–15	≤12	
B	Minocycline		30 µg	≥19	–	15–18	≤14	
FLUOROQUINOLONES								
(28) <i>Staphylococcus</i> spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. Therefore after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.								
C	Ciprofloxacin or Levofloxacin Moxifloxacin	All staphylococci	5 µg	≥21	–	16–20	≤15	
C			5 µg	≥19	–	16–18	≤15	
C			5 µg	≥24	–	21–23	≤20	
O	Enoxacin		10 µg	≥18	–	15–17	≤14	
O	Gatifloxacin		5 µg	≥23	–	20–22	≤19	
O	Grepafloxacin		5 µg	≥18	–	15–17	≤14	
O	Lomefloxacin		10 µg	≥22	–	19–21	≤18	
O	Norfloxacin		10 µg	≥17	–	13–16	≤12	
O	Ofloxacin		5 µg	≥18	–	15–17	≤14	
O	Sparfloxacin		5 µg	≥19	–	16–18	≤15	
Inv.	Fleroxacin		5 µg	≥19	–	16–18	≤15	
NITROFURANTOINS								
U	Nitrofurantoin		All staphylococci	300 µg	≥17	–	15–16	≤14

Gambar 10.3 Interpretasi Diameter Daya Hambat Bakteri *Staphylococcus* spp.

(Sumber: CLSI, 2020)

BAB 11

UJI STERILITAS SEDIAAN FARMASI

Tujuan Praktikum

1. Menguji sterilitas sediaan obat dan alat Kesehatan

Teori

Produk sediaan steril merupakan sediaan yang harus memenuhi persyaratan fisika, kimia serta harus memenuhi persyaratan bebas dari mikroorganisme baik bakteri maupun jamur. Uji sterilitas digunakan sebagai salah satu parameter untuk pelulusan produk dari pabrik, walaupun bukan untuk menjamin bahwa satu betas produk memenuhi syarat steril. Sediaan steril dibuat di fasilitas yang memiliki karakteristik lingkungan yang ketat untuk memperkecil risiko kontaminasi mikroba ke dalam produk. Pengujian produk steril juga memerlukan kondisi aseptik dalam laminar kelas A di ruangan kelas B atau dilakukan di isolator untuk menghindari terjadinya kontaminasi mikroba (hasil positif palsu). Oleh karena itu pengujian sterilitas hanya dapat dilakukan pengulangan pengujian jika terdapat kesalahan pada laboratorium penguji. Hasil uji sterilitas yang memberikan hasil tidak steril perlu direview apakah hasil yang diperoleh dihasilkan dari produk atau karena kesalahan laboratorium akibat personel atau pencemaran lingkungan selama pengujian. Metode uji sterilitas yang direkomendasikan dalam Farmakope Indonesia ada dua metode yaitu metode penyaringan membran dan metode inokulasi langsung ke dalam media. Metode penyaringan membran menjadi pilihan utama bila produk dapat difiltrasi untuk mengurangi resiko negatif palsu. Media yang digunakan pada metode inokulasi langsung yaitu media cair Tioglikolat dan *Soybean-Casein Digest Medium*. Tioglikolat terutama digunakan untuk pertumbuhan bakteri anaerob, termasuk juga untuk mendeteksi bakteri aerob, dan media *Soybean-Casein Digest Medium* sesuai untuk pertumbuhan kapang dan bakteri aerob.

Alat dan Bahan

Alat:

Sediaan obat : obat tetes mata, sediaan ampul, cairan infusa steril
Alat kesehatan : kasa steril, *disposable syringe*

Bahan:

Media cair tioglikolat

Prosedur Kerja

a. Sediaan Cair

1. Pipet sejumlah volume tertentu cairan dengan pipet atau jarum suntik steril secara aseptis
2. Inokulasi ke dalam media tioglikolat cair
3. Inkubasi pada suhu 37 °C untuk media tioglikolat cair selama 18-24 jam
4. Amati pertumbuhan yang terjadi.

b. Alat Kesehatan

1. Secara aseptis masukkan sebanyak 100 mg/kemasan ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair tioglikolat.
2. Inkubasi pada suhu 37 °C untuk media tioglikolat cair selama 18-24 jam.
3. Amati pertumbuhan yang terjadi.

c. Alat suntik steril (syringe)

1. Masukkan cairan pembilas ke dalam tabung *syringe* dan pasang jarumnya
2. Bilas syringe secara aseptis
3. Inokulasikan cairan pembilas kedalam media tioglikolat
4. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam
5. Amati pertumbuhan yang terjadi.

Hasil Pengamatan

Tabel Hasil Pengamatan Uji Sterilitas Sediaan Farmasi

Sampel	Hasil ((+) / (-))

Lampiran

Isi per wadah	Jumlah minimum yang digunakan (Kecuali dinyatakan lain)
Larutan	
Kurang dari 1 mL	Seluruh isi tiap wadah
1 - 40 mL	setengah isi tiap wadah, tetapi tidak kurang dari 1 mL
Lebih dari 40 mL, tidak lebih dari 100 mL	20 mL
Lebih dari 100 mL	10% isi wadah, tetapi tidak kurang dari 20 mL
Larutan antibiotik	1 mL
Sediaan larut dalam air lainnya atau dalam isopropil miristat	Seluruh isi tiap wadah, sebanding dengan tidak kurang dari 200 mg
Sediaan yang tidak larut, krim, dan salep, yang tersuspensi atau teremulsi	Gunakan isi tiap wadah yang sebanding dengan tidak kurang dari 200 mg
Zat Padat	
Kurang dari 50 mg	Seluruh isi tiap wadah
50 mg atau lebih, tetapi kurang dari 300 mg	Setengah isi tiap wadah, tetapi tidak kurang dari 50 mg
300 mg - 5 g	150 mg
Lebih besar dari 5 g	500 mg
Benang bedah dan peralatan bedah lainnya untuk penggunaan dokter hewan	3 potongan untuk helai (panjang tiap potong 30 cm)
Pembalut/ kapas/perban (dalam kemasan)	100 mg per kemasan
Benang bedah dan bahan sejenis yang dikemas untuk penggunaan sekali pakai	Seluruh alat
Alat Kesehatan lainnya	Seluruh alat, potong kecil-kecil atau diuraikan

Gambar 11.1 Jumlah minimum sampel yang digunakan tiap media
(Sumber: Kemenkes, 2020)

DAFTAR PUSTAKA

- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 30th Ed.* USA: CLSI.
- Ahern, H. 2018. *Microbiology: A Laboratory Experience*. New York: Open SUNY Textbooks, Milne Library
- Benson, H.J. 2001. *Microbiological Applications A Laboratory Manual in General Microbiology 8th Ed.* USA: The McGraw–Hill Companies.
- Cappuccino, J.G., & Welsh, C. 2017. *Microbiology A Laboratory Manual 11th Ed Global edition.* England: Pearson Education.
- Carroll, K.C., Hobden, J.A., Miller, S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., Detrick, B., Mitchell, T.G., McKerrow, J.H., & Sakanari, J.A. 2016. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Twenty-7th Ed.* USA: McGraw-Hill Education
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan. 2020. *Farmakope Indonesia Edisi 4.* Indonesia: Dirjen Kefarmasian dan Alat Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. 2019. *Brock Biology of Microorganisms, Global Edition. 15th Ed.* UK: Pearson Education
- Obenauf, S., Finazzo, S. 2022. *Laboratory manual for microbiology fundamentals: a clinical approach, 4th Ed.* New York: McGraw Hill LLC.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2002. *Microbiology.* 5th ed. USA: McGraw Hill Companies
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* Jerman: Springer Science & Business Media.