



PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

Disusun Oleh:

Apt. Ainun Wulandari, M.Sc

Rosario Trijuliamos Manalu, M.Si

Fathin Hamida, M.Si

Desy Muliana Wenas, M.Si

Saiful Bahri, M.Si

Vilya Syafriana, M.Si

BUKU PENUNTUN



**FAKULTAS FARMASI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL**

2020

BAB I

PENGENALAN ALAT

Terdapat beberapa alat laboratorium yang sering digunakan untuk menunjang kegiatan di laboratorium mikrobiologi. Alat-alat tersebut bisa terbuat dari kaca, porselain, plastik, kayu, dan besi baik yang menggunakan listrik maupun tidak. Berikut ini beberapa alat yang terdapat di laboratorium mikrobiologi.

1. Autoklaf

Fungsi : untuk sterilisasi basah (medium/larutan), alat gelas, metal berpanas tinggi.

Prinsip kerja : sterilisasi dilakukan menggunakan uap air jenuh dan tekanan tinggi (121°C + tekanan 2 atm, selama 15-20 menit)



Cara penggunaan :

- Cek apakah air dalam autoklaf dan wadah penampung uap air sudah sesuai dengan batas yang ditentukan. Gunakan air hasil destilasi untuk menghindari terbentuknya kerak.
- Masukkan medium/ larutan yang akan disterilisasi dalam keranjang, kemudian masukkan dalam autoklaf.
- Tutup dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari autoklaf.
- Hubungkan autoklaf dengan arus listrik.
- Nyalakan autoklaf dengan menekan titik power.
- Atur suhu, tekanan, dan waktu sterilisasi dengan menggunakan tombol yang terdapat pada autoklaf.
- Tekan tombol start untuk memulai sterilisasi. Perhitungan waktu dimulai sejak suhu sudah mencapai suhu dan tekanan yang telah ditentukan.

- Setelah selesai, proses akan berhenti secara otomatis.
- Jika tanda selesai berbunyi, tunggu tekanan turun mencapai nol dan suhu minimal di bawah 70°C, lalu keluarkan medium atau larutan yang sudah steril. Sebelum itu, tutup autoklaf tidak boleh dibuka.
- Matikan autoklaf dan cabut kabel penghubung arus listrik apabila sudah selesai digunakan.

2. Oven

Fungsi : untuk mensterilisasi alat-alat dari kaca atau peralatan gelas (sterilisasi kering)

Prinsip kerja : sterilisasi digunakan dengan menggunakan udara kering dengan suhu tinggi (160°C, selama 2 jam)



Cara penggunaan :

- Pastikan oven terhubung dengan arus listrik
- Bungkus peralatan gelas yang akan disterilisasi menggunakan kertas *yellow pages*, masukkan peralatan gelas ke dalam oven. Susun sedemikian rupa hingga memenuhi ruang dalam oven secara efektif.
- Atur suhu menggunakan tombol pengatur suhu dan nyalakan tombol power yang ada dala oven
- Catat waktu pada saat oven dinyalakan
- Setelah selesai sesuai dengan waktu/ lama sterilisasi yang diinginkan, matikan oven
- Setelah suhu turun hingga mencapai suhu kamar, keluarkan peralatan gelas yang telah steril dan simpan pada tempatnya

3. Inkubator

Fungsi: menyimpan dan ditumbuh biakan mikroorganisme pada suhu tertentu.

Prinsip kerja: menjaga suhu lingkungan biakan tetap konstan dengan cara pengaturan suhu.

Macam: *static incubator* (inkubator diam), *shaker/shaking incubator* (inkubator bergerak), dan *waterbath incubator* (inkubator dengan air sebagai pengantar suhu).



Cara penggunaan:

- Pastikan inkubator sudah terhubung dengan arus listrik.
- Nyalakan inkubator dengan menekan tombol power.
- Atur suhu dan rpm (bila menggunakan *shaker incubator*) sesuai dengan yang diinginkan.
- Masukkan biakan yang akan diinkubasi.
- Bila menggunakan *shaker incubator*, nyalakan *shaker* dengan menekan tombol yang terdapat pada alat.
- Inkubasikan biakan sesuai waktu yang diinginkan.
- Matikan inkubator bila telah selesai digunakan.

4. Laminar Air Flow (LAF)

Fungsi: untuk melakukan inokulasi, memindahkan atau men-subkultur biakan mikroorganisme. Instrumen laboratorium tersebut memiliki bentuk cukup besar dan menyerupai meja.

Prinsip kerja: menarik udara dari luar, dilakukan proses penyaringan udara hingga bersih dan dihembuskan di dalam ruang laminar air flow. Hembusan angin pada laminar air flow diharapkan bisa konstan atau stabil. Bentuk laminar air flow biasanya berupa kubus, hal tersebut dimaksudkan untuk memperluas meja kerja pengguna dan mengurangi kemungkinan turbulensi hembusan angin. Turbulensi bisa menyebabkan pengendapan debu atau kotoran di sekitar meja.

Terdapat 2 jenis LAF:

- *Vertical Laminar Air Flow*, jenis LAF ini menghembuskan udara dari atas ke bawah, kemudian keluar melalui bagian bawah ruang kerja.
- *Horizontal Laminar Air*, jenis LAF ini menghembuskan udara dari depan ke belakang.



Cara Penggunaan:

- Sambungkan steker pada sumber listrik dan tekan tombol Power.
- Pastikan semua tombol panel berfungsi dengan baik.
- Masukkan alat yang akan digunakan ke dalam LAF, nyalakan lampu UV minimal 30 menit dan tutup dengan kain hitam.
- Matikan lampu UV dan nyalakan lampu TL neon.
- Bersihkan meja, dinding dan kaca pada LAF dengan alkohol 70%.
- Masukkan bahan dan alat yang akan digunakan ke dalam LAF nyalakan blower dan LAF dapat digunakan.
- Setelah selesai pemakaian, bersihkan kembali alat dari sisa bahan atau alat yang digunakan.
- Matikan lampu TL dan blower setelah selesai pemakaian.

5. Timbangan / Neraca Analitik

Fungsi: mengukur berat (terutama yang berukuran kecil) suatu zat atau bahan yang akan digunakan pada pembuatan media untuk bakteri, jamur atau media tanam kultur jaringan dengan tingkat ketelitian yang tinggi.

Komposisi bahan penyusun media yang tidak tepat berpengaruh terhadap konsentrasi zat dalam media sehingga dapat mengakibatkan kekeliruan hasil penelitian. Kelebihannya yaitu memiliki tingkat ketelitian yang cukup tinggi dan dapat menimbang zat dengan batas 0,0001 g atau 0,1 mg, penggunaannya tidak begitu rumit jika dibandingkan dengan timbangan manual.



6. Jarum Tanam / Jarum Inokulum (Ose)

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan yang akan ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nikrom atau platinum yang dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) disebut *inoculating loop*/*transfer loop*/ ose bulat, dan yang berbentuk lurus disebut *inoculating needle*/*transfer needle*/ ose lurus.

Terdapat 2 jenis yaitu ose bulat dan ose lurus.

- Fungsi ose bulat : menginokulasi biakan dengan metode streak di permukaan media agar.
- Fungsi ose lurus/tajam : menginokulasi biakan dengan metode stab pada media agar tegak.



7. Pembakar Spirtus (Bunsen)

Fungsi : untuk mensterilisasi jarum tanam, pinset dan peralatan gelas yang digunakan saat bekerja.



8. Botol Pendingin

Fungsi: mendinginkan ose, batang L atau alat lain setelah dibakar agar tidak terlalu panas saat digunakan. Umumnya wadah berisi 70%.

9. Drigalsky Spatula dan Batang L

Fungsi : untuk meratakan (*spreader*) inokulum cair yang dimasukkan ke dalam cawan petri.



10. Pinset dan Skalpel

Pinset (a) berfungsi untuk mengambil secara menjepit benda/bahan yang akan diisolasi mikrobyanya.

Skalpel (b) berfungsi untuk mengiris, memotong, menyayat bagian inang yang akan diisolasi mikrobyanya.



A. Pinset



B. Skalpel

11. Cawan Petri

Fungsi: cawan berbahan gelas atau plastik yang digunakan sebagai wadah media kultur dalam bentuk lempengan agar.



Media cair dapat dituang ke dalam cawan bagian bawah, sedangkan cawan bagian atas berfungsi sebagai penutup. Cawan petri terdapat berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm, dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm dapat menampung media sebanyak 10 ml.

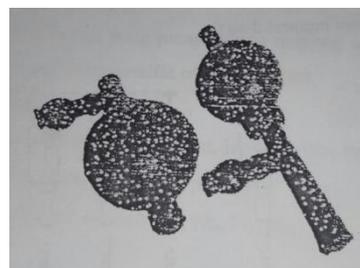
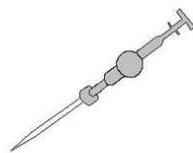
12. Pipet Tetes (Pasteur Pipette)

Fungsi : digunakan untuk memindahkan cairan dalam jumlah kecil.



13. Pipet Hisap / Volum dan Balon Hisap

Fungsi : pipet yang bekerja dengan cara dihisap sehingga cairan akan memasuki pipet sebanyak yang diinginkan. Pipet hisap digunakan untuk memindahkan cairan dalam jumlah relatif lebih banyak. Balon pipet digunakan untuk menghisap dan dimasukkan ke ujung pipet volum.



14. Tabung Reaksi

Fungsi : digunakan sebagai wadah media kultur berupa agar tegak dan agar miring, serta uji reaksi biokimia.



Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun media cair. Penutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Media padat dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan kemiringan media, yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi mikroba.

15. Erlenmeyer

Fungsi: menampung larutan, bahan atau media cair.

Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komponen media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair.



16. Gelas Beaker

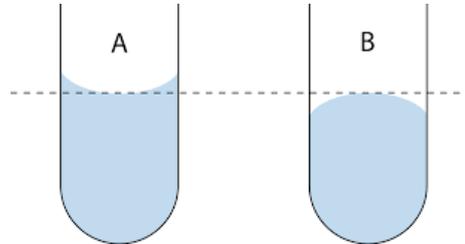
Fungsi: mengukur suatu cairan, preparasi media, atau menampung akuades.



17. Gelas Ukur

Fungsi: mengukur suatu cairan, seperti labu Erlenmeyer, tergantung volumenya.

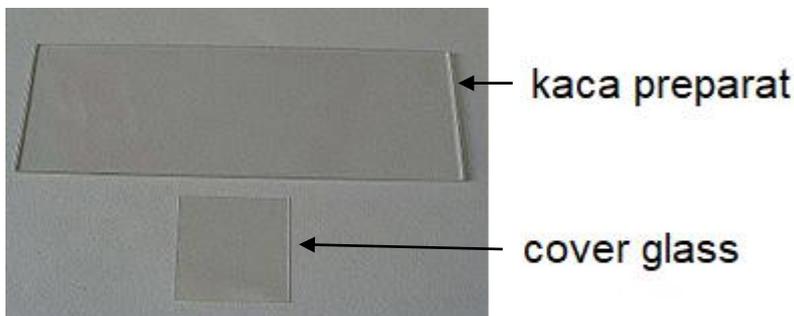
Sebaiknya volume suatu larutan yang mau diukur ditentukan berdasarkan meniscus cekung/cembung suatu cairan/larutan.



18. Kaca preparat (Glass slide) dan Cover glass

Kaca preparat (Glass slide/Object Glass) merupakan wadah yang digunakan untuk memeriksa mikroorganisme/sampel mikrobiologi (berukuran kecil) baik pemeriksaan menggunakan mikroskop maupun pemeriksaan Gram, atau tes biokimia.

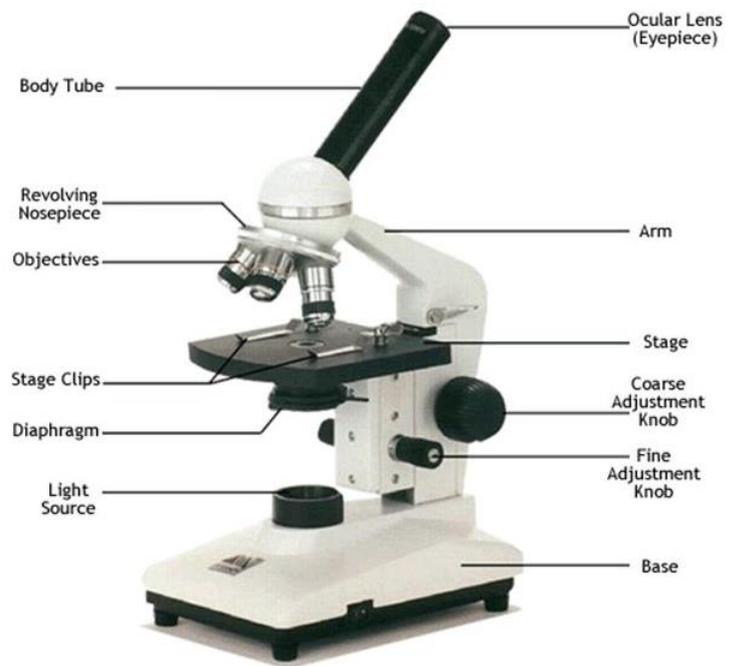
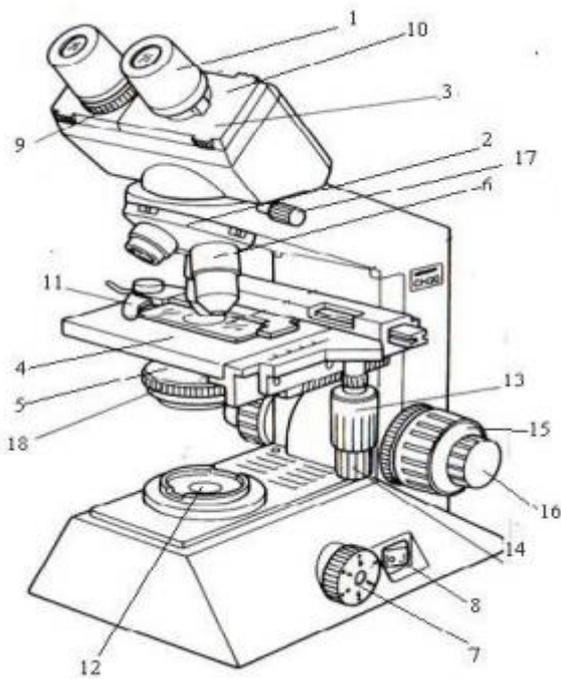
Cover glass / kaca penutup merupakan kaca tipis transparan yang digunakan untuk melindungi lensa objektif mikroskop dari kontak langsung dengan spesimen. Kaca penutup dapat menempel pada kaca preparat sehingga menutup spesimen, menjaga spesimen dari debu, penghambat dehidrasi dan oksidasi spesimen. Spesimen padat ditekan menjadi datar, sedangkan sampel cair dibentuk menjadi lapisan datar. Hal tersebut dapat membantu fokus pada mikroskop resolusi tinggi.



19. Mikroskop

Fungsi: untuk melihat objek atau mikroorganisme yang terlalu kecil untuk dilihat dengan mata kasar.





Keterangan :

1. Lensa okuler, untuk memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif
2. Revolving (pemutar lensa objektif), untuk memutar lensa objektif sehingga mengubah perbesaran
3. Tabung pengamatan/tabung okuler
4. Stage (meja benda), spesimen diletakkan di bagian ini
5. Diafragma untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. Lensa objektif, untuk memperbesar spesimen
7. Brightness adjustment knob (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
8. Tombol on-off
9. Diopter adjustmet ring (cincin pengatur diopter), untuk menyamakan fokus antara mata kanan dan kiri
10. Interpupillar distance adjustment knob (pengatur jarak interpupillar)
11. Specimen holder (penjepit spesimen)
12. Illuminator (sumber cahaya)
13. Vertical feed knob (sekrup pengatur vertikal), untuk menaikkan atau menurunkan object glass

14. Horizontal feed knob (sekrup pengatur horizontal) untuk menggeser ke kanan / kiri glas objek
15. Coarse focus knob (sekrup fokus kasar), untuk menaik-turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat
16. Fine focus knob (sekrup fokus halus), untuk menaik-turunkan meja benda secara halus dan lambat
17. Observation tube securing knob (sekrup pengencang tabung okuler)
18. Diaphragm adjustment knob (sekrup pengatur kondenser) untuk menaik-turunkan diafragma.

20. **Vortex**

Fungsi: menghomogenkan (mencampurkan) larutan dalam wadah kecil. Wadah kecil dapat berupa tabung reaksi, tabung sentrifuse, atau tabung ependorf.

Prinsip: Alat ini terdiri dari motor listrik dengan poros Penggerak dalam gerakan melingkar 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.



21. **Hotplate**

Fungsi: memanaskan campuran/sampel.

Sampel yang akan dipanaskan ditempatkan ke dalam erlenmeyer atau gelas kimia. Tombol yang diputar pada hotplate untuk menghidupkan dan mematikannya.



22. **Mikropipet dan Tip**

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume rendah ($\leq 1000 \mu\text{l}$). Berdasarkan ukuran volume, mikropipet terbagi 2 jenis yaitu *adjustable volume pipette*, 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*, mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya dan hanya tersedia satu pilihan volume misalnya mikropipet 10 μl , 20 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 μl .



Mikropipet



Tip

BAB II. STERILISASI

Suatu tahapan penting yang harus dilakukan selama melakukan praktikum mikrobiologi adalah sterilisasi, yang merupakan kegiatan membebaskan bahan atau alat dari segala macam bentuk kehidupan terutama mikroorganisme yang tidak kita inginkan. 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. Desinfeksi adalah perusakan, penghambatan, atau penghapusan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit atau masalah lain, misalnya seperti pembusukan dengan menggunakan bahan kimia. Berikut contoh sterilisasi :

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. Api

Api digunakan untuk mensterilisasi peralatan seperti jarum inokulasi, kaca objek, pinset, mulut tabung biakan, spatel, dan lain-lain. Sesudah dipijarkan atau kemudian dibakar kembali untuk menghilangkan sisa alkoholnya.

b. Sterilisasi panas kering

Memerlukan suhu 160°C selama 2 jam. Sterilisasi 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 dapat diterapkan dengan cara pemanasan dengan membuat uap air dengan tekanan (autoklaf) pada suhu yang tinggi. Pelepasan energi uap pada sterilisasi basah bertekanan mengakibatkan denaturasi atau koagulasi protein sel mikroba sehingga melemahkan aktivitas mikroba. Sterilisasi menggunakan autoklaf merupakan cara yang paling baik karena uap air panas dengan tekanan tinggi menyebabkan penetrasi uap air ke dalam sel-sel mikroba menjadi optimal sehingga langsung mematikan mikroba. Sterilisasi ini digunakan untuk alat yang terbuat dari kaca dan bahan/media, misalnya Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, PDA, NA.

3. Sterilisasi Uap

Sterilisasi dengan alat ini dilakukan pada suhu 100°C dan harus diulang 3 kali berturut-turut dengan selang waktu satu hari. Cara ini disebut juga dengan sterilisasi diskontiu atau sterilisasi bertingkat.

4. Penyaringan (Filtrasi)

Cara ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas atau termolabil yang akan rusak atau terurai oleh suhu tinggi. 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. Beberapa macam filter yang biasa digunakan antara lain :

a. Filter Chamberland-Pasteur

Filter ini berbentuk seperti lilian yang terbuat dari porselen berpori halus.

b. Fiber Gelas

Fiber ini berupa piringan yang terdiri dari butiran-butiran gelas yang pori-porinya sangat halus.

c. Filter Seitz

Lembaran filter ini terbuat dari asbes dengan ukuran pori tertentu. Filter ini diletakkan dalam bejana anti karat. Semua filter, anti karat dan labu hisap disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

Selain sterilisasi alat dan media, prosedur kerja mikrobiologi lainnya dikenal dengan teknik aseptis. Teknik aseptis bertujuan untuk mengurangi keberadaan mikroba kontaminan. Teknik aseptis dilakukan setiap kegiatan/pekerjaan yang berhubungan dengan mikroba, yaitu dengan menyemprot seluruh bagian dalam LAF dengan alkohol 70%, memijarkan jarum Ose di atas api Bunsen, memutar cawan petri saat dibuka dan mulut tabung reaksi saat dibuka sebelum atau sesudah digunakan di dekat api Bunsen.

Teknik Aseptis Meja Kerja dan Tangan

Alat dan Bahan

- a. Alkohol 70%
- b. Botol Semprot
- c. Kertas Tissue/ Kain Lap Bersih

Cara Kerja

1. Sebelum mulai bekerja, cucilah tangan dengan menggunakan air dan sabun, serta keringkan.
2. Semprot alkohol 70% pada bagian telapak dan punggung tangan, angin-anginkan.
3. Bersihkan meja yang akan digunakan dari barang atau alat yang tidak digunakan.
4. Semprotkan alkohol 70% pada permukaan meja kerja.
5. Bersihkan sisa semprotan alkohol menggunakan kertas tissue bersih dengan arah yang sama atau searah.

BAB III

MEDIUM PERTUMBUHAN

A. Definisi Medium

Medium adalah media pertumbuhan mikroorganisme yang mengandung semua zat yang diperlukan untuk pertumbuhannya, antara lain: senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak), mineral dan vitamin. Pembuatan medium harus memenuhi syarat-syarat berikut:

1. Medium harus memenuhi semua kebutuhan nutrient yang mudah digunakan oleh mikroorganisme
2. Medium tidak mengandung zat penghambat pertumbuhan
3. Medium harus steril
4. Medium harus memiliki tekanan osmosis, pH dll yang sesuai

Bahan-bahan yang diperlukan untuk pembuatan medium dapat dikelompokkan menjadi tiga macam, yaitu:

1. Bahan dasar
 - a. Air
 - b. Agar (berasal dari rumput laut) yang tidak terurai oleh mikroba, membeku pada suhu 15°C dan mencair pada suhu relative rendah (45°C)
 - c. Gelatin yaitu protein yang dapat diurai oleh mikroba, sifatnya seperti agar
 - d. Silica gel, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat khusus untuk menumbuhkan mikroba bersifat otonom obligat
2. Untuk nutrisi atau makanan
 - a. Sumber karbon, contoh: karbohidrat, lemak, asam organik
 - b. Sumber nitrogen, contoh: pepton, protein
 - c. Garam-garam mineral, contoh: K, Na, Fe, Mg
 - d. Vitamin
 - e. Bahan alami, contoh: sari buah, ekstrak sayur, susu, darah
3. Bahan tambahan, yaitu bahan yang sengaja ditambahkan ke dalam medium untuk tujuan tertentu, seperti: bahan indikator, antibiotik.

B. Penggolongan Medium

1. Menurut bahan yang digunakan :

- a. Medium alamiah atau substrat
Terdiri dari bahan-bahan alam, seperti : susu, nasi, jagung, dll
- b. Medium semi alamiah
Terdiri dari bahan alamiah ditambah dengan senyawa kimia, seperti :
Potato Dextrose Agar (PDA) Dan *Tauge Extract Agar (TEA)*, dll
- c. Medium buatan atau sintesis
Terdiri dari senyawa-senyawa kimia yang komposisi dan jumlahnya sudah ditentukan, seperti : *Nutrien Agar (NA)*, *Sabourraud Dextrose Agar (SDA)*, dll

2. Menurut kegunaannya :

- a. Medium umum
Medium yang dapat ditumbuhi oleh mikroorganisme secara umum atau dengan kata lain banyak jenis mikroorganisme yang dapat tumbuh pada media ini, contoh : NA, PDA.
- b. Medium selektif
Medium yang komposisinya sedemikian rupa, sehingga hanya jenis mikroorganisme tertentu yang dapat hidup. Contoh : *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, *Briliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)*
- c. Medium diferensial
Medium yang digunakan untuk membedakan jenis mikroorganisme satu dengan yang lain, disebabkan adanya satu reaksi/ ciri yang khas, dimana mikroorganisme mampu mengurai salah satu bahan dalam medium. Contoh : *Blood Agar (BA)*, *Eosin Methylen Blue Agar (EMBA)*
- d. Medium pengkayaan atau enrichment medium
Medium yang dipakai untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu dan diharapkan memiliki jumlah sel yang lebih banyak, umumnya dipakai sebelum proses fermentasi. Bertujuan untuk mengaktifkan mikroorganisme tersebut. Contoh : medium YMA (*Yeast Malt Agar*) untuk khamir

3. Menurut fisiknya :

a. Medium padat (agar)

Medium yang diberikan agar, sehingga pada suhu ruang akan mengeras.

Contoh : NA (*Natrien Agar*), PDA (*Potato Extrose Agar*), dll

b. Medium cair (broth)

Medium yang tidak diberi agar, sehingga bentuknya cair. Contoh: NA, PDB, dll

C. Preparasi Medium Dalam Tabung dan Cawan

1. Agar miring/ slant

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

2. Agar tegak/ deep

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

3. Agar cawan

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

4. Prinsip Dasar Pembuatan Medium

- Bahan : Nutrient Agar (NA)

Potato Dextrose Aga (PDA)

Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Simon Sitrat Agar (SSA)

- Cara kerja :

1. Timbang medium yang akan dibuat sesuai dengan takaran yang tertera dalam kemasan.

2. Larutkan kedalam aquadest sesuai dengan volume yang ditetapkan didalam Erlenmeyer atau beaker glass aduk sampai homogen.
3. Jika sediaan memerlukan pemanasan agar larut, panaskan diatas pemanas sambil diaduk sampai homogen.
4. Sterilkan didalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15-20 menit
5. Untuk membuat agar miring, letakkan tabung reaksi yang telah diisi dengan medium agar yang telah steril dalam posisi miring, dengan sudut kemiringan yang diinginkan dan biarkan sampai membeku.
6. Untuk membuat agar petri, medium di dalam Erlenmeyer yang telah disterilkan didinginkan sampai suhu kira-kira 50-60°C , kemudian tuangkan kedalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 15-20 ml medium.
7. Medium yang telah siap dan tidak akan segera dipakai sebaiknya disimpan didalam lemari pendingin (suhu 8-10°C).

5. Komposisi Media

1. Medium NA

- Beef extract : 3 gram
- Pepton : 5 gram
- Agar : 15 gram
- Aquadest : 1 liter

2. Medium PDA

- Potato Starch : 4 gram
- Dextrose : 40 gram
- Agar : 15 gram
- Aquadest : 1 liter

3. Medium PCA

- Tripton : 5 gram
- Yeast extract : 2,5 gram
- Glukosa : 1 gram
- Agar : 2 %
- Aquadest : 1 liter

4. Medium Mac Concey Agar (pH 7,4 ± 0,2)

- Pepton : 20 gram
- Lactose : 10 gram
- Bile salts : 5 gram
- Neutral red : 0,075 gram
- Agar : 12 gram

5. Baird Parker Medium (pH 6,8 ± 0,2)

- Trypone : 10 gram
- Lab lemco powder : 5 gram
- Yeast extract : 1 gram
- Sodium pyruvat : 10 gram
- Glycine : 12 gram
- Lithinum chloride : 5 gram
- Agar : 20 gram

6. Medium SIM (pH 7,3 ± 0,2)

- Triptone : 20 gram
- Peptone : 6,1 gram
- Ferrous Amonium Sulfat : 0,2 gram
- Sodium Thiosulfat : 0,2 gram
- Agar No. 1 : 3,5 gram

7. Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (pH 7,4±0,2)

- Lab Lemco Powder : 3 gram
- Yeast Extract : 3 gram
- Peptone : 20 gram
- Sodium Chloride : 5 gram
- Lactose : 10 gram
- Sucrose : 10 gram
- Dextrose : 1 gram
- Ferric Citrat : 0,3 gram
- Sodium Thiosulfat : 0,3 gram
- Agar : 12 gram
- Phenol Red : 0,024 gram

8. Bacillus Cereus Selective Agar

- Lab Lemco Powder : 3 gram

- Yeast Extract : 3 gram
- Peptone : 20 gram
- Sodium Chloride : 5 gram
- Lactose : 10 gram
- Sucrose : 10 gram
- Dextrose : 1 gram
- Ferric Citrat : 0,3 gram
- Sodium Thiosulfat : 0,3 gram
- Agar : 12 gram
- Phenol Red : qs

BAB IV

ISOLASI MIKROORGANISME

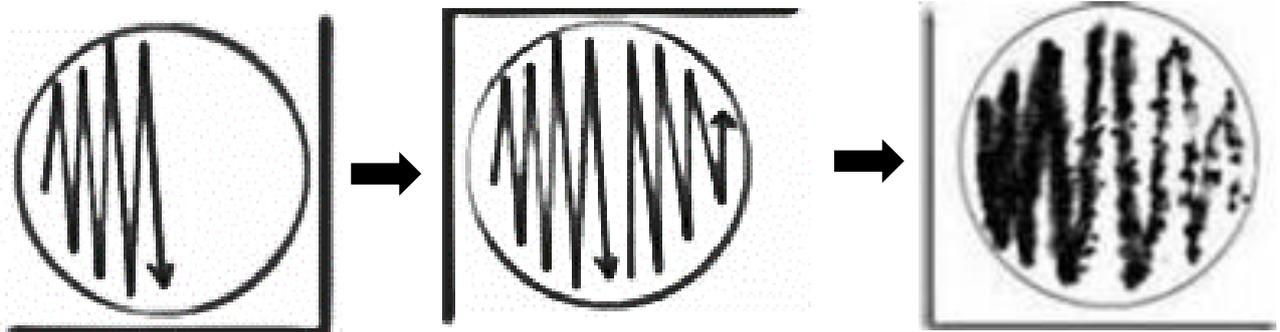
Mikroorganisme (Bakteri, Kapang, Khamir) terdapat dalam populasi yang besar dan beragam di alam ini, dimana dapat kita jumpai disetiap tempat kita berada (tanah, air dan udara) serta pada setiap bagian tubuh kita (rambut, tangan, kulit,dll). Mikroorganisme di alam terdapat dalam bentuk kumpulan massa sel yang disebut koloni. Untuk mempelajari suatu jenis koloni dan sifat mikroorganisme secara lebih mendalam, kita memerlukan teknik pembiakan mikroorganisme. Teknik tersebut disebut isolasi (seely & van den Mark, 1962:23).

Isolasi adalah suatu cara untuk memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan yang tidak tercampur dengan jenis lain. Jadi tujuan isolasi adalah mendapatkan biakan murni. Biakan murni merupakan biakan yang sel-selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal. Isolasi mikroorganisme dapat dilakukan dengan beberapa cara :

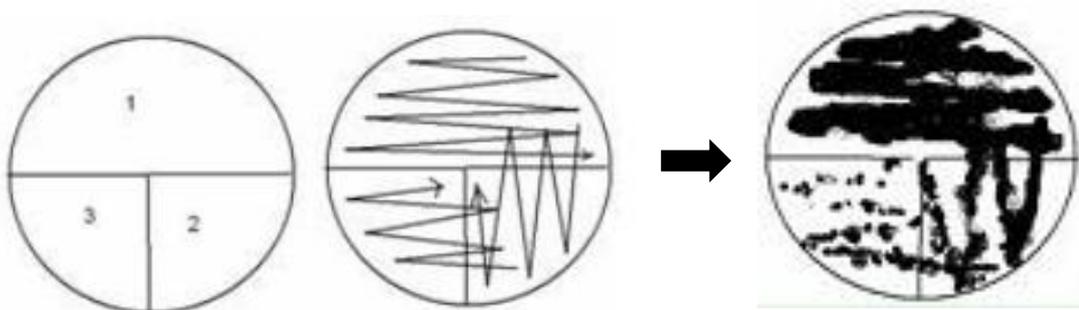
1. Metode Gores (*Streak Plate Methode*)

Menggoreskan sejumlah inokulum pada medium padat dengan menggunakan alat transfer (ose lurus atau bulat). Kultur murni dibuat dengan menggoreskan sejumlah inokulum pada medium padat dengan menggunakan alat transfer (ose tajam atau ose bulat). Metode gores dapat dibedakan menjadi 3 yaitu :

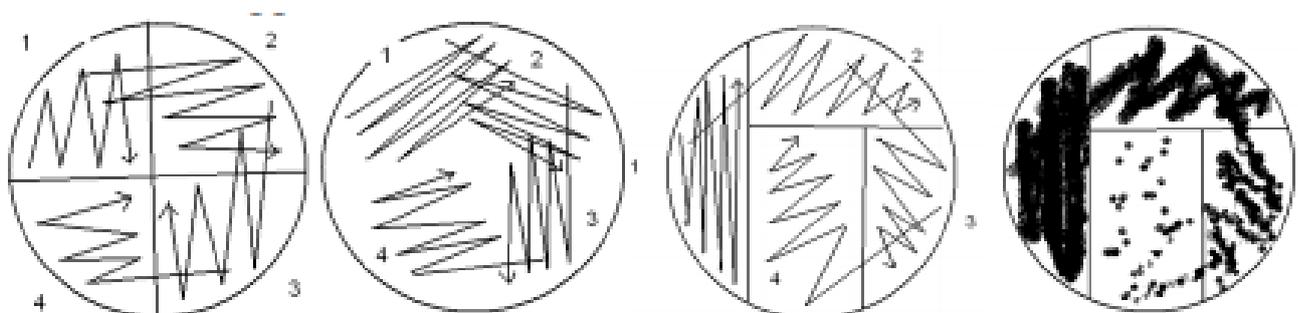
A. Goresan Sinambung



B. Goresan T



C. Goresan Kuadran



2. Metode Tuang (*Pour Plate Methode*)

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

3. Metode Sebar (*Spread Plate Methode*)

Menyebarkan sejumlah inokulum pada permukaan medium padat dengan menggunakan alat *spreader* misalnya drigalsky.

A. Isolasi Mikroorganisme dari Udara

1. Bahan dan Alat :

- Beberapa cawan petri berisi medium PCA

2. Cara Kerja :

- Siapkan cawan petri berisi medium PCA
- Tentukan ruangan atau daerah yang akan diisolasi
- Buka tutup cawan petri dan letakkan cawan selama ± 30 menit
- Setelah selesai, tutup cawan kembali dan inkubasi sesuai waktu yang ditentukan
- Amati pertumbuhan yang terjadi

3. Pengamatan Pertumbuhan

Kelompok	Area Isolasi	Bakteri	Khamir	Kapang	Keterangan
1	Laboratorium				
2	Kamar Mandi				
3	Mushola				

B. Isolasi Mikroorganisme dari Tubuh

1. Bahan dan Alat :

- Beberapa cawan petri berisi medium PCA
- Pembakar spiritus dan alkohol 70%
- Gunting dan pinset

2. Cara Kerja :

- Siapkan cawan petri berisi medium PCA
- Tentukan bagian tubuh yang akan diisolasi. Misalnya: cap jari tangan atau kaki, kerikan kulit, kuku, rambut, dll.
- Lewatkan bagian bibir cawan yang akan dibuka di atas api

- Bakar pinset/gunting yang akan digunakan diatas api beberapa saat, lalu dinginkan dengan alkohol 70%
- Tempelkan bagian tubuh yang akan diisolasi ke atas medium PCA
- Setelah selesai, tutup cawan kembali dan inkubasi sesuai waktu yang ditentukan
- Amati pertumbuhan yang terjadi.

3. Pengamatan Pertumbuhan :

Kelompok	Area Isolasi	Bakteri	Khamir	Kapang	Keterangan
1					
2					
3					

C. Isolasi Mikroorganisme dari Substrat Cair dan Padat

1. Substrat Cair

a. Cara sebar (*Spread Method*)

- Bahan dan Alat:
 - Sampel cair yang akan diperiksa
 - 1 cawan petri berisi medium PCA
 - Pembakaran spirtus dan alkohol 70%
 - Gunting dan pipet steril
 - *Spreader* (drigalsky, batang L)
- Cara kerja:
 - Masukkan 0,1ml/beberapa tetes sampel cair yang akan diperiksa keatas permukaan medium dalam cawan petri. Jika cairan terlalu pekat sebaiknya diencerkan dahulu dengan aquadest steril.
 - Dengan menggunakan *spreader*, tetesan tersebut disebar seluas mungkin diatas permukaan medium.
 - Inkubasi didalam inkubator dengan posisi terbalik selama 24-72 jam.
 - Amati pertumbuhan dan pindahkan koloni-koloni yang tumbuh ke dalam medium tabung yang sesuai.

b. Cara tuang (*Pour-Plate Method*)

- Bahan dan Alat:
 - Sampel cair yang akan diperiksa
 - 1 buah tabung medium PCA tegak
 - 1 buah cawan petri steril
 - Penangas Air
 - Pembakar spirtus dan alkohol 70%
 - Gunting dan pipet steril/ose

- Cara kerja:
 - Cairkan medium PCA tegak dalam tabung dalam penangas air, angkat dan turunkan suhunya sampai 38-40°C
 - Masukkan beberapa ose atau 0,1 mL sampel cair yang akan diperiksa kedalam medium yang telah mencair tadi
 - Tuang medium yang sudah diinokulasi kedalam cawan petri steril secara aseptik
 - Ratakan permukaan agar dalam cawan dengan menggoyang-goyangkan secara perlahan seperti membentuk angka 8, kemudian biarkan mengeras.
 - Inkubasi dengan posisi terbalik selama 24-72 jam.
 - Amati pertumbuhan dan pindahkan koloni-koloni yang tumbuh kedalam medium tabung yang sesuai.

2. Substrat Padat

a. Cara tabur (*Spread Method*)

- Bahan dan Alat:
 - Sampel padat yang akan diperiksa (tanah, tepung, daun, makanan)
 - 1 cawan petri berisi medium PCA
 - Mortir dan Penumbuknya
 - Spatel dan pisau laboratorium
 - Pembakar spirtus dan alkohol 70%

- Cara kerja:
 - Haluskan sampel yang akan diperiksa dalam mortir yang sebelumnya sudah steril dengan cara mencucinya dengan sedikit alkohol 70%
 - Bersihkan spatel, sterilkan dengan alkohol 70% dan lewatkan diatas nyala api.
 - Ambil sedikit sampel padat yang telah digerus dan taburkan secara merata diatas permukaan medium dalam cawan petri.
 - Inkubasi dengan posisi normal selama 24-72 jam.
 - Amati pertumbuhan dan pindahkan koloni-koloni yang tumbuh kedalam medium tabung yang sesuai.

- b. Cara suspensi:
 - Bahan dan Alat:
 - Sampel padat yang akan diperiksa
 - Mortir dan penumbuknya
 - 1 buah cawan petri yang berisi medium PCA
 - Aquadest steril
 - Pembakaran spirtus dan alkohol 70%
 - Pipet steril dan *spreader*

 - Cara kerja:
 - Ambil sedikit sampel padat dan masukkan kedalam aquadest steril, kocok hingga homogen
 - Ambil 0,1 ml suspensi dengan pipet dan teteskan keatas permukaan medium PCA
 - Dengan menggunakan *spreader*, tetesan tersebut disebar seluas mungkin diatas permukaan medium.
 - Inkubasi dengan posisi terbalik selama 24-72 jam
 - Amati pertumbuhan dan pindahkan koloni-koloni yang tumbuh ke dalam medium tabung yang sesuai.
 -

BAB V

MORFOLOGI DAN PEWARNAAN BAKTERI

Tujuan:

1. Mengetahui dan membedakan morfologi, bentuk dan susunan sel bakteri
2. Mengetahui perbedaan bakteri Gram positif dan negatif
3. Membedakan jenis zat pewarna bakteri dan kegunaannya

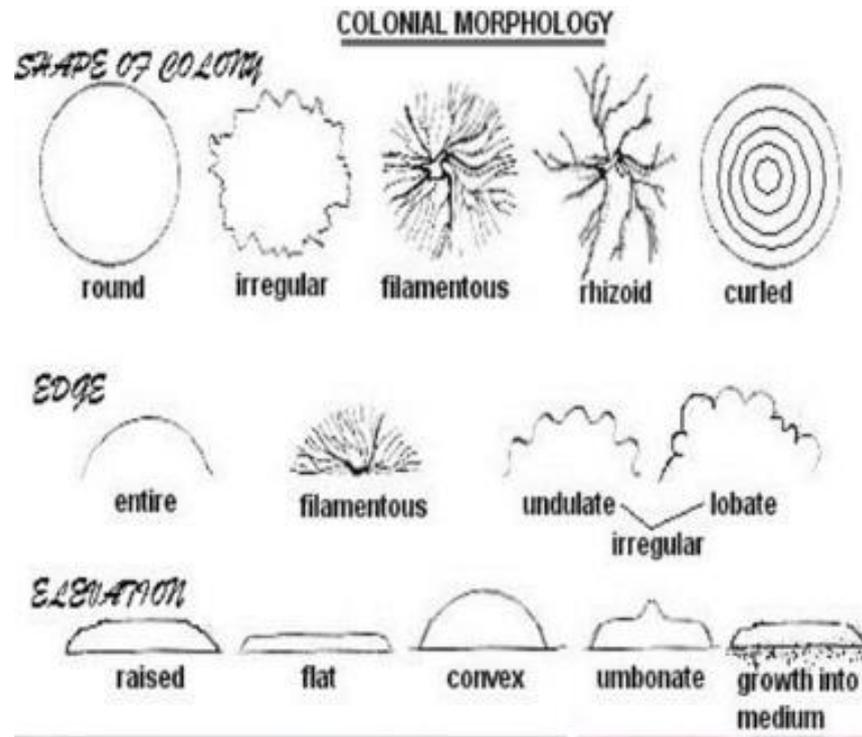
MORFOLOGI BAKTERI

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

PARAMETER PENGAMATAN MORFOLOGI KOLONI BAKTERI

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengamatan morfologi bakteri:

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



Beberapa tipe morfologi koloni bakteri berdasarkan bentuk, tepi dan elevasi koloni

PEWARNAAN BAKTERI

Dinding sel bakteri tidak bewarna sehingga sukar untuk diamati secara langsung. Untuk mempermudah pengamatan mikroskopik morfologi bakteri diperlukan pewarnaan. Proses pewarnaan sel bakteri lazim disebut pengecatan. Sel bakteri mengandung bermacam-macam komponen makroseluler seperti asam nukleat dan protein. Komponen ini akan bereaksi dengan zat warna asam atau basa.

Zat warna asam bersifat anionik (berarti kromogen bermuatan negatif) dan memiliki afinitas kuat terhadap komponen sel bermuatan positif seperti protein. Contoh zat warna asam yaitu nigrosin. Zat warna basa bersifat kationik (berarti bagian kromogen bermuatan positif) dan memiliki afinitas kuat terhadap komponen sel bermuatan negatif seperti asam nukleat. Contoh zat warna basa yaitu methylene blue, chrysal violet, safranin, dan carbol fuchsin.

A. Pembuatan Preparat Kering Olesan Bakteri

1. Bahan dan Alat
 - a. Biakan murni bakteri
 - b. Aquadest steril
 - c. Gelas objek
 - d. Jarum ose
 - e. Alkohol 70% dan pembakar spirtus

2. Cara Kerja
 - a. Bersihkan gelas objek dengan alkohol 70% sehingga bebas lemak.
 - b. Ambil beberapa ose aquadest steril dan letakkan di atas permukaan gelas objek.
 - c. Ambil sedikit biakan bakteri dengan jarum ose dan letakkan dalam tetesan aquadest, kemudian ratakan olesan tersebut sampai kira-kira selalu 1cm^2
 - d. Fiksasi olesan dengan cara melewatkan gelas objek di atas api spirtus.

3. Maksud dan Tujuan
 - a. Pembersihan gelas objek dengan alkohol 70% bertujuan untuk menghilangkan debu dan lemak yang menempel pada permukaan gelas objek.
 - b. Fiksasi mikroorganisme bertujuan untuk mematikan sel secara cepat tanpa merusak strukturnya dan menempelkan sel pada gelas objek sehingga tidak bergeser pada saat diamati.
 - c. Pembuatan olesan bakteri bertujuan untuk meratakan sel-sel bakteri diatas permukaan gelas objek sehingga tidak menggumpal pada saat olesan diwarnai dan diamati di bawah mikroskop.

B. Pewarnaan Negatif

Pewarnaan negatif, metode ini bukan untuk mewarnai bakteri tetapi mewarnai latar belakangnya menjadi hitam gelap. Pada pewarnaan ini sel bakteri kelihatan transparan (tembus pandang) dan latarnya berwarna hitam. Teknik ini berguna untuk menentukan morfologi dan ukuran sel. Pada pewarnaan ini olesan bakteri tidak mengalami fiksasi. Metode ini menggunakan zat warna nigrosin. Pewarnaan negatif

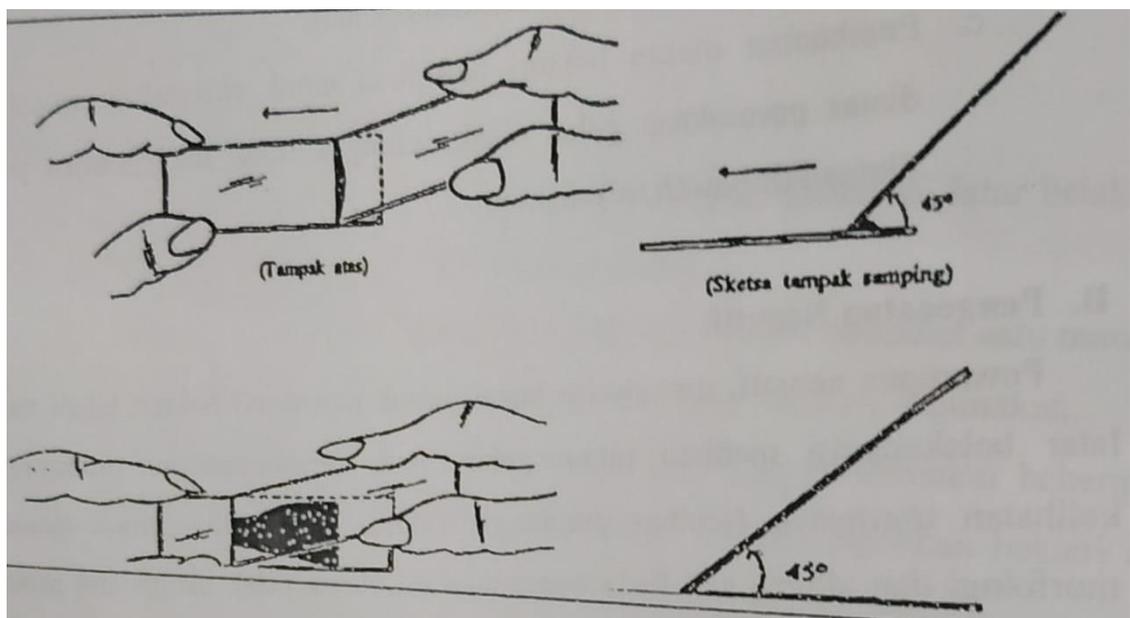
memerlukan pewarna asam seperti eosin atau nigrosin. Pewarna asam memiliki negatif charge kromogen pada permukaan bakteri. Oleh karena itu, sel tidak bewarna mudah dilihat dengan latar belakang berwarna.

1. Bahan dan Alat

- a. *Bacillus* sp.
- b. Larutan nigrosin/tinta cina.
- c. Gelas objek
- d. Jarum ose
- e. Alkohol 70% dan pembakaran spirtus

2. Cara kerja

- a. Bersihkan gelas objek dengan alkohol 70% sehingga bebas lemak.
- b. Teteskan larutan nigrosin di atas gelas objek.
- c. Ambil sedikit biakan bakteri dengan jarum ose dan letakkan dalam tetesan larutan nigrosin tersebut.
- d. Ratakan tetesan nigrosin dengan memakai gelas objek lain, kerjakan sesuai dengan Gambar.
- e. Biarkan preparat mengering.
- f. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi.
- g. Gambar dan catatlah apa yang terjadi.



C. Pewarnaan Sederhana

Pewarnaan sederhana menggunakan satu macam zat warna. Tujuannya hanya untuk melihat bentuk sel. Berbagai macam tipe morfologi bakteri (kokus, basil, spirillum dan sebagainya) dapat dibedakan dengan menggunakan pewarnaan sederhana. Zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat basa (bermuatan positif). Asam nukleat dan beberapa komponen dinding sel bakteri bermuatan negatif dapat terikat kuat dengan kromogen bermuatan positif pada zat pewarna basa. Zat pewarna yang biasa digunakan pada pewarnaan sederhana yaitu methylene blue, crystal violet, dan safranin.

1. Bahan dan Alat

- a. *Micrococcus luteus*
- b. Aquadest steril
- c. Larutan Kristal violet
- d. Gelas objek
- e. Jarum ose
- f. Alkohol 70% dan pembakaran spiritus.

2. Cara kerja

- a. Buat preparat kering olesan bakteri
- b. Teteskan larutan kristal violet diatas preparat olesan tersebut sebanyak 1-2 tetes, biarkan 1-2 menit.
- c. Cuci dengan air mengalir sampai sisa cat tercuci habis, kemudian keringkan dengan hati-hati memakai kertas hisap.
- d. Amati dibawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi
- e. Gambar dan catatlah apa yang diamati.

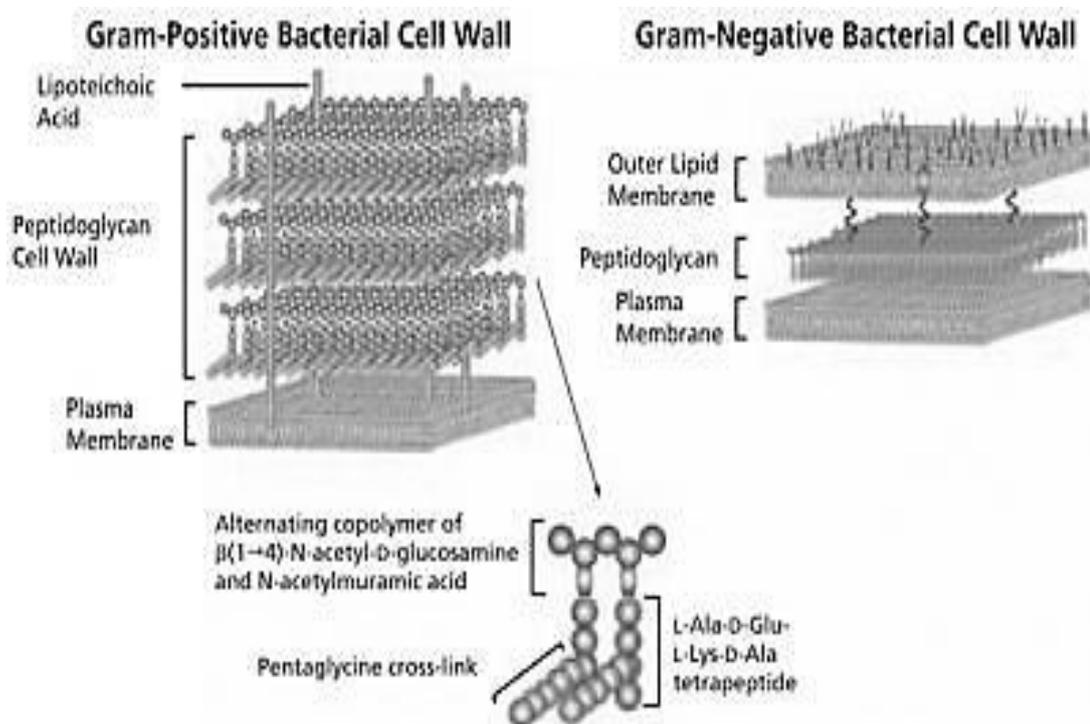
D. Pewarnaan Gram

Dengan metode pewarnaan Gram, bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu bakteri Gram Positif dan Gram Negatif berdasarkan reaksi atau sifat bakteri terhadap cat tersebut. Reaksi atau sifat bakteri tersebut ditentukan oleh komposisi

dinding selnya. Oleh karena itu, pewarnaan Gram tidak bisa dilakukan pada bakteri yang tidak mempunyai dinding sel seperti *Mycoplasma* sp. Contoh bakteri yang tergolong bakteri tahan asam, yaitu dari genus *Mycobacterium* dan beberapa spesies tertentu dari genus *Nocardia*. Bakteri dari kedua genus ini diketahui memiliki sejumlah besar zat lipodial (berlemak) di dalam dinding selnya sehingga menyebabkan dinding sel tersebut relative tidak permeabel terhadap zat-zat warna yang umum sehingga sel bakteri tersebut tidak terwarnai oleh metode pewarnaan biasa, seperti pewarnaan sederhana dan Gram.

Dalam pewarnaan Gram diperlukan 4 (empat) reagen yaitu :

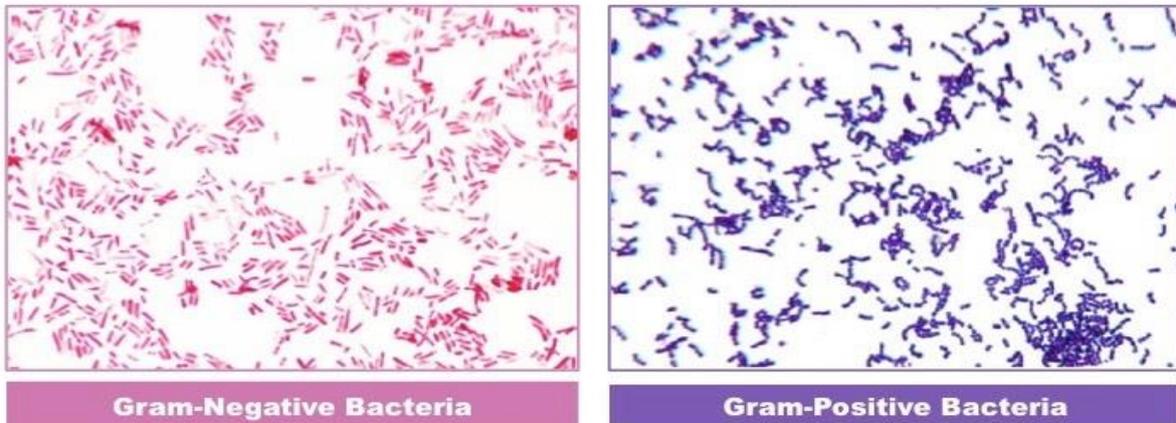
- Zat warna utama (violet kristal)
- Mordan (larutan Iodin) yaitu senyawa yang digunakan untuk mengintensifkan warna utama.
- Peluntur zat warna (alkohol 96%/aseton) yaitu solven organik yang digunakan untuk melunturkan zat warna utama.
- Zat warna kedua/cat penutup (safranin) digunakan untuk mewarnai kembali sel-sel yang telah kehilangan zat warna utama setelah perlakuan dengan alkohol.



Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif



Prosedur Pewarnaan Gram Bakteri



Hasil Pewarnaan Gram Bakteri

1. Bahan dan Alat
 - a. *Staphylococcus aureus* dan *Escheria coli*
 - b. Aquadest Steril
 - c. Gelas Objek
 - d. Larutan Hucker's Kristal Violet (Gram A)
 - e. Larutan Mordan Lugol's Iodine (Gram B)
 - f. Larutan Alkohol 96%/Aseton (Gram C)
 - g. Larutan Safranin (Gram D)
 - h. Jarum Ose

- i. Alkohol 70% dan pembakar spiritus.
2. Cara kerja
- a. Siapkan preparat oleskan bakteri
 - b. Teteskan larutan Gram A sebanyak 3-3 tetes, biarka selama 1 menit
 - c. Cuci dengan air mengalir, kemudia keringkan dengan kertas hisap
 - d. Teteskan larutan Gram B, biarkan selama 1 menit
 - e. Cuci dengan air dan keringkan
 - f. Tetesi dengan larutan Gram C selama 30 detik
 - g. Cuci dengan air dan keringkan
 - h. Tetesi dengan larutan Gram D selama 30 detik, cuci dengan air dan keringkan dengan kertas hisap
 - i. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi
 - j. Gambar dan catatlah apa yang di amati.

E. Pewarnaan Diferensial

1. Pewarnaan Spora

- a. Bahan dan Alat
 1. Bacillus subtilis
 2. Larutan Malachite Green
 3. Larutan safranin
 4. Kertas hisap
 5. Gelas objek
 6. Jarum ose
 7. Alkohol 70% dan pembakar spirtus
- b. Cara kerja
 1. Buat preprat olesan bakteri
 2. Tutuplah preparat olesan tadi dengan sepotong kertas hisap
 3. Letakkan preparat diatas pembakar spirtus sambil di tetesi dengan larutan malachite green selama 5-10 menit, jaga jangan sampai larutan kering
 4. Angkat kertas hisap dan cuci preparat dengan air mengalir

5. Teteskan safranin selama 30-45 detik
6. Cuci kembali dengan air mengalir dan keringkan dengan hati-hati memakai kertas hisap
7. Amati di bawah mikroskop pada pembesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi
8. Gambar dan catatlah apa yang di amati

2. Pewarnaan Kapsul

a. Bahan dan Alat

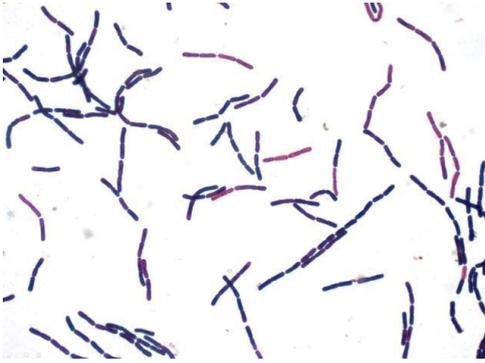
1. *Proteus vulgaris*
2. Larutan CuSO_4 20%
3. Larutan Kristal violet 1%
4. Kertas hisap
5. Gelas objek
6. Jarum ose
7. Alkohol 70% dan pembakaran spiritus

b. Cara kerja

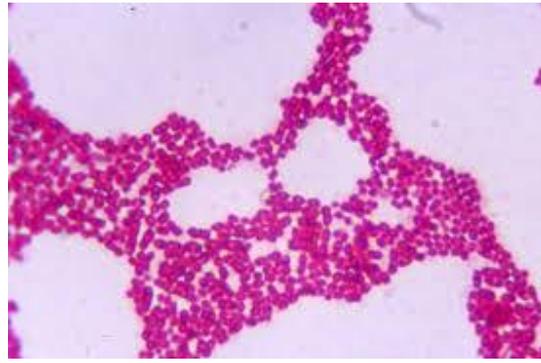
1. Buat preparat olesan bakteri
2. Tetesi preparat olesan tadi dengan larutan kristal violet dan panaskan di atas penangas air selama 5 menit
3. Bilas dengan larutan CuSO_4 20%
4. Keringkan dengan kertas hisap
5. Amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak imersi
6. Gambar, catat dan ukurlah tebal kapsul yang terwarnai.

BEBERAPA MORFOLOGI BAKTERI

1. *Bacillus* sp.



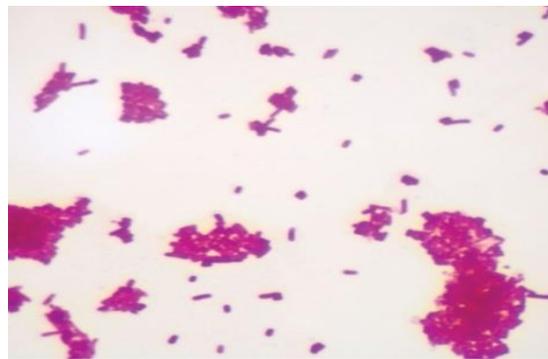
2. *Micrococcus luteus*



3. *Staphylococcus aureus*



4. *Escherichia coli*



BAB VI

AKTIVITAS BIOKIMIA MIKROORGANISME

Tujuan:

- Mengetahui dan memahami beberapa aktivitas biokimia mikroorganisme (bakteri)
- Mengetahui dan memahami tahap-tahap identifikasi bakteri melalui sifat biokimia bakteri

1. Fermentasi Karbohidrat

Berbagai macam karbohidrat dapat difermentasi oleh bakteri. Karena spesies, genus, atau kelompok taksonomi bakteri tertentu mempunyai pola fermentasi yang khas, maka sifat-sifat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat ini merupakan salah satu sifat penting dalam identifikasi. Sifat-sifat memfermentasi karbohidrat dapat diketahui dengan menginokulasi bakteri ke dalam tabung berisi medium karbohidrat. Hasil akhir fermentasi biasanya berupa asam dan gas, atau asam saja. Terjadinya asam dapat diketahui dengan adanya perubahan warna indikator, sedangkan gas yang tertampung dalam tabung Durham (jika media yang digunakan berupa cairan).

TSIA (Triple Sugar-Iron Agar) merupakan media agar miring yang dapat digunakan untuk uji fermentasi karbohidrat. 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 digores dan ditusuk tegak lurus menggunakan ose jarum steril lalu diinkubasi yang kemudian akan menampilkan tiga kemungkinan hasil sebagai berikut:

- a. **Bagian agar miring (slant) berwarna merah (alkalin) dan bagian agar bawah (butt) berwarna kuning (asam) dengan atau tanpa gas (bagian agar bawah retak atau terangkat ke atas).** Hal ini menandai bahwa bakteri hanya mampu memfermentasi glukosa, dimana konsentrasi glukosa di dalam media sangat kecil sehingga tekanan oksigen rendah dan pertumbuhan bakteri lambat. Disamping itu pepton juga digunakan sehingga bereaksi alkalin.

- b. **Bagian agar miring (slant) berwarna kuning (asam) dan bagian agar 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 asam baik pada bagian slant maupun butt.
- c. **Bagian agar miring (slant) berwarna merah (alkalin) dan bagian agar bawah (butt) berwarna jingga kemerahan (tidak terjadi perubahan).** Hal ini menandakan tidak terjadi fermentasi karbohidrat tetapi yang terjadi adalah katabolisme pepton yang menghasilkan reaksi alkalin akibat produksi ammonia.

2. Produksi H₂S

H₂S diproduksi oleh beberapa jenis bakteri melalui pemecahan asam amino yang mengandung unsur belerang (S) seperti sistin dan metionin; H₂S dapat juga diproduksi melalui reduksi senyawa-senyawa belerang anorganik misalnya; tiosulfat, sulfat atau sulfat. H₂S yang terjadi dapat diamati dengan menambahkan garam-garam logam berat kedalam medium. H₂S akan bereaksi dengan senyawa-senyawa ini membentuk logam sulfida yang berwarna hitam.

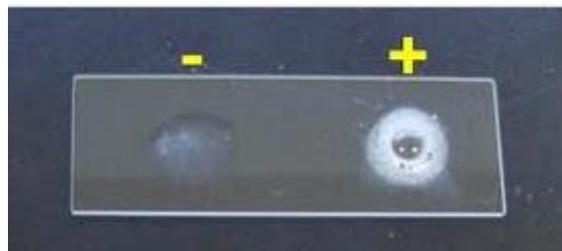
Uji produksi H₂S dapat diamati pada media TSIA dan media SIM. Media TSIA mengandung Na-tiosulfat sebagai substrat untuk produksi H₂S dan adanya ferrosulfat yang tak berwarna sebagai produk akhir. Setelah inkubasi hanya bakteri yang mampu menghasilkan H₂S (warna hitam pada bagian bawah agar) akibat endapan ferrosulfida.

3. Produksi Indol

Asam amino diperoleh sebagai hidrolis, protein, pepton, dan peptide. Triptofan merupakan asam amino yang penting untuk mengetahui jenis bakteri tertentu, karena beberapa bakteri mampu menghidrolisis asam amino ini oleh enzim triptofanase yang dihasilkannya. Hasil hidrolisis triptofan adalah senyawa indol yang dapat diamati dengan test klorimeter.

4. Uji Katase

Dengan banyaknya oksigen bebas dilingkungannya, kebanyakan bakteri akan memproduksi H_2O_2 yang bersifat toksik terhadap bakteri yang masih hidup. Oleh karena itu, untuk menjaga kelangsungan hidupnya, sejumlah bakteri mampu menghasilkan enzim katalase yang memecah H_2O_2 menjadi air dan oksigen, sehingga sifat toksiknya hilang.



Uji katalase reaksi positif (kanan) menunjukkan gelembung gas dan reaksi negatif (kiri) menunjukkan tidak adanya gelembung gas

5. Uji Penggunaan Sitrat

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dengan aktivitas enzimatik berupa enzim sitrat permease. Medium untuk uji ini menggunakan medium Simon Citrate Agar (SCA) yang merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH_4^+ sebagai sumber N dan indikator BTB (Brom Timol Blue) yang merupakan indikator pH. Bila mikroba mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

Selain 5 uji diatas terdapat beberapa uji lain yang dapat mengetahui aktivitas biokimia dan mikroorganisme, antara lain: uji MRVP, uji Voges-Proskauer, uji deminase, uji motilitas, uji oksidasi fermentasi, uji pencairan gelatin, dan uji proteolitik.

BAHAN, ALAT DAN BAKTERI

Bahan

- TSIA Medium
- SIM (Sulfida, Indol, Motility) Medium
- Simon Sitrat Agar Medium
- Larutan H₂O₂ 3%

Alat

- Jarum Ose Bulat
- Api Spirtus
- Gelas Objek

Bakteri

- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Proteus mirabilis*

PROSEDUR KERJA

1. Untuk uji katalase

Bersihkan gelas objek, teteskan beberapa tetes larutan H₂O₂ 3% diatas gelas objek tersebut. Ambil sedikit biakan *B.subtilis* dengan ose, letakan didalam tetesan H₂O₂. Lakukan hal yang sama untuk biakan *E.coli*, amati adanya gelembung-gelembung O₂ didalam tetesan H₂O₂.

2. Untuk Uji Fermentasi KH, H₂S dan Indol

Inokulasi tabung reaksi yang berisi medium TSIA dan SIM masing-masing dengan biakan *B.subtilis*, *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, dan *P.mirabilitis*. Dengan metode stab (tusukan lurus), inkubasi selama 24-48 jam, pada suhu 37°. Amati perubahan yang terjadi. Untuk uji Indol perlu ditambahkan reagen kovack/Ehrlich pada medium SIM setelah diinkubasi selama 24-48 jam, usahakan kocok perlahan dan



biarkan tabung perada pada posisi tegak. Adanya indol dapat diketahui dengan timbulnya warna merah tua pada lapisan atas permukaan medium.

3. Untuk Uji Penggunaan Sitrat

Inokulasi tabung reaksi yang berisi medium SSA masing-masing dengan biakan *B.subtilis*, *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, dan *P.mirabilis*. Dengan metode streak (gores), biarkan satu tabung tidak diinokulasi. Inkubasi selama 24-48 jam, pada suhu 37°. Amati pertumbuhan dan perubahan warna yang terjadi, bandingkan dengan control.

BAB VII

UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA

Pendahuluan

Antimikroba adalah bahan atau zat yang dapat membunuh atau menghambat aktivitas mikroorganisme dengan bermacam-macam cara. Senyawa antimikroba terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya dan tujuan penggunaannya. Bahan antimikroba dapat berupa desinfektan, antiseptic, sterilizer, sanitizer, dan sebagainya. 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. Oleh karena itu, antimikroba dibagi menjadi dua macam yaitu antibiotik dan desinfektan.

Antibiotik adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri walaupun dalam konsentrasi yang rendah. Antibiotik digunakan untuk menghentikan aktivitas mikroba pada jaringan tubuh makhluk hidup sedangkan desinfektan bekerja dengan menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroba pada benda tak hidup, seperti meja, alat gelas, dan lain sebagainya. Pembagian kedua kelompok antimikroba tersebut tidak hanya didasarkan pada aplikasi penerapannya melainkan juga terhadap konsentrasi mikroba yang digunakan.

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 tetrasiklin dikatakan mempunyai spectrum yang luas.

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba, metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat diatas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri diatas media agar, diisi dengan larutan

yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling silinder.

Tujuan

Praktikum ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba dari bahan-bahan yang diujikan dengan metode difusi.

Alat dan Bahan

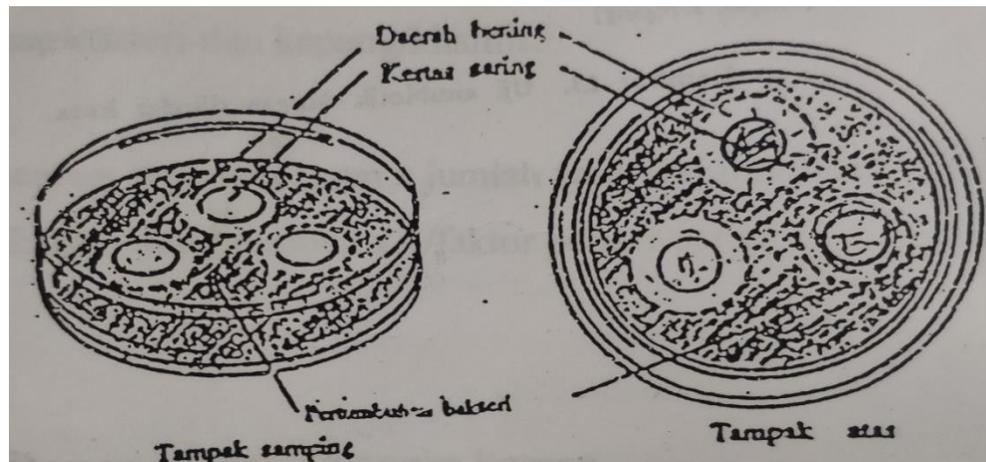
Alat-alat yang digunakan yaitu pipet 1ml, cawan petri, kertas cakram/saring steril, spreader drigalsky, pinset, dan spirtus.

Bahan-bahan yang digunakan ialah antibiotic-antiseptik dan desinfektan, PCA (Plate Count Agar), alcohol 70%, aquadest, bakteri *E.coli*, *Bacillus*, dan *Staphylococcus*.

Cara Kerja

A. Metode Difusi dengan Kertas Saring

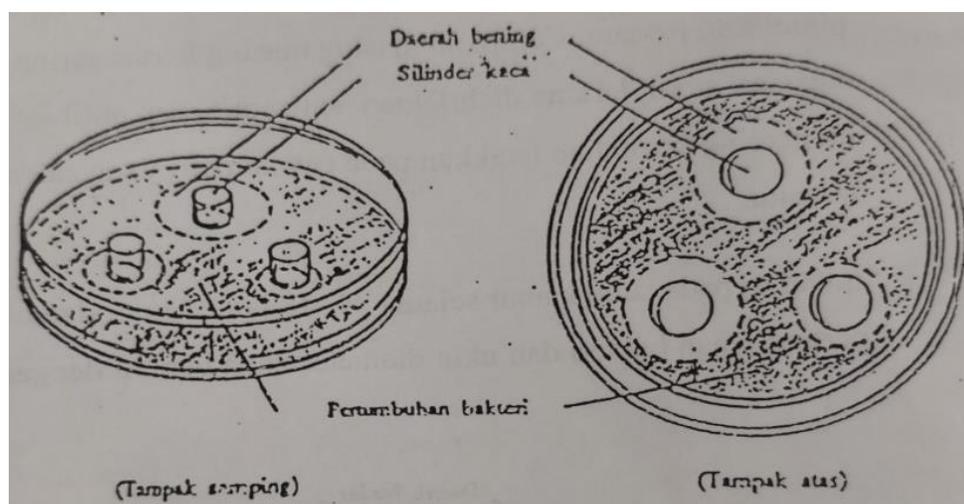
1. Inokulasikan suspensi biakan *B.subtilis*, *E.coli*, dan *S.aureus* masing-masing di atas permukaan agar pada ketiga cawan petri, masing-masing sebanyak 0,1 ml dan sebarkan dengan menggunakan spreader drigalsky.
2. Pinset dipijar diatas nyala api spirtus, ambil kertas saring steril dengan pinset satu persatu. Celupkan masing masing kertas saring kedalam aquadest seteril, larutan desinfektan, antiseptic, dan antibiotic. Biarkan mengering kemudian letakan pada cawan petri yang sama dengan jarak tertentu.
3. Inkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Amati daerah hambat pertumbuhan bakteri dan ukur diameter zona bening dengan jangka sorong.



Uji antibiotik dengan kertas saring

B. Metode Difusi dengan Silinder Kaca

1. Media agar dicairkan, didinginkan sampai suhu kurang lebih 40°C.
2. Teteskan 0,1 ml suspensi inoculum kedalam cawan petri steril.
3. Tuang agar secara aseptik ke dalam setiap cawan petri yang sudah ditetesi.
4. Letakan 4 buah silinder kaca steril diatas medium agar dengan menggunakan pinset steril. Masukkan ke masing masing silinder kaca dengan menggunakan pipet, ukur sebanyak :
 - 0,25 ml larutan desinfektan
 - 0,25 ml larutan antiseptic
 - 0,25 ml antibiotic
 - 0,25 ml aquadest steril
5. Inkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam
6. Amati daerah hambat pertumbuhan bakteri dan ukur diameter zona bening.



Uji antibiotik dengan silinder kaca

BAB VIII

PENENTUAN ANGKA KUMAN

Pendahuluan

Penentuan banyaknya mikroba dalam suatu bahan (makanan, minuman, dll) dilakukan untuk mengetahui sampai seberapa jauh bahan itu tercemar oleh mikroba. Dengan mengetahui jumlah mikroba, maka dapat diketahui kualitas mikrobiologi dari bahan tersebut. Kandungan mikroba pada suatu bahan juga sangat menentukan tingkat kerusakannya serta dapat ditentukan oleh tingkat kelayakan untuk dikonsumsi.

Tujuan dari penentuan angka kuman :

- Untuk menghitung jumlah kuman aerob yang terdapat dalam produk obat, obat tradisional, makanan, kosmetik, dan alat kesehatan.
- Untuk menentukan jumlah populasi mikroorganisme dalam suatu kultur atau sample.
- Mempelajari teknik pengenceran kuman untuk penentuan angka kuman.

Prinsip dari penentuan angka kuman :

Sediaan yang telah dihomogenkan dan diencerkan dengan pengenceran yang sesuai ditanam pada media agar (PCA = Plate Count Agar), setelah inkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Satuan perhitungan jumlah mikroba dikenal dengan istilah **Coloni Forming Units (CFU)** untuk perhitungan bakteri dan kapang /khamir. **Faktor pengenceran** = pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan. **CFU** = jumlah koloni yang tumbuh x 1/faktor pengenceran atau

Rumus penentuan angka kuman

$$\text{CFU} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Volume inokulum}}$$

Teori ;

Penentuan angka kuman ada 2, yaitu :

1. Penentuan angka kuman dengan mengukur jumlah sel.

Umumnya untuk organisme unisel bakteri dan khamir. Ada dua cara penentuan angka kuman dengan mengukur jumlah sel, yaitu:

a) Secara langsung (Counting Chamber)

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

❖ Dengan ruang hitung

Yaitu cara mikroskopis dengan menggunakan ruang/cawan hitung khusus.

Contoh: Slide Petroff Hauser Haemocytometer

Larutan yang akan diperiksa dimasukkan kedalam ruang hitung Haemocytometer yang telah diketahui volumenya. Ruang hitung tersebut telah terbagi menjadi 9 kotak besar. Satu kotak besar terdiri dari 25 kotak sedang yang setiap kotaknya terbagi lagi menjadi 16 kotak kecil yang luas maupun volumenya sudah ditentukan. Dengan menghitung mikroorganisme yang berada dalam kotak-kotak tersebut dan mengkalikannya dengan volumenya, maka jumlah mikroorganisme permililiter dapat diketahui

❖ Metode breed dengan cara film organisme dikeringkan, difiksasi, lalu ditentukan jumlahnya.

❖ Dengan preparat olesan (Smear Count)

Membuat preparat oles dari sejumlah volume tertentu dari larutan sampel dan disebar di atas gelas objek dalam luas tertentu pula (misalnya: 1cm^3) lalu preparat olesan difikasi, diwarnai, dihitung dibawah mikroskop. Dengan mengetahui luas bidang pandang mikroskop dan jumlah mikroorganisme yang ada dibidang tersebut, maka jumlah mikroorganisme per milimeter sampel dapat diketahui.

a) Secara tidak langsung

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

- a. Menghitung jumlah mikroba (*Total Plate Count = Angka Lempeng Total*)

Metode penghitungan koloni pada plate agar (*Agar Plate Count*), yaitu metode penemuan angka kuman (enumerasi) sel hidup (*viable*) yang paling umum digunakan. Metode ini didasari oleh hubungan teoritis bahwa satu sel bakteri menghasilkan satu koloni yang tumbuh dalam plate agar bersesuaian dengan jumlah bakteri asalnya. Keterbatasan luar bidang permukaan plate agar pada petri menghasilkan prosedur plate count didahului dengan pengenceran sampel. Jumlah deret pengenceran dalam Satu seri tergantung pada kekeruhan sampel awal semakin keruh sampel semakin banyak pengenceran yang diperlukan.

- b. Memperkirakan jumlah terkecil mikroba yang ada (*MPN = Most Probably Number*)
- c. Cara kekeruhan (*turbiditas*)

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

2. Penentuan angka kuman dengan mengukur massa sel

Digunakan untuk semua tipe mikroorganisme termasuk yang punya filament (benang-benang panjang) seperti jamur yang tidak dapat dihitung dengan mengukur jumlah sel. Penentuan angka kuman dengan mengukur massa sel dapat memperkirakan total protoplasma seluler per milliliter kultur. Metode yang paling umum digunakan adalah :

- a) Metode perkiraan kimiawi

Dengan mengukur jumlah senyawa yang karakteristik disalam sel. Misalnya : Nitrogen seluler, protein, fosfor, DNA, dll.

- b) Metode dengan mengukur berat kering sel (*miselia*)

Dengan cara larutan yang diperiksa disentrifuge, kemudian endapannya dikeringkan untuk kemudian ditimbang.

- c) Metode dengan mengukur volume sel
Dengan mengukur volume total dari endapan sel yang telah disentrifuge
- d) Metode tubidimetrik
Didasari pada fakta bahwa suatu cahaya bersesuaian dengan total massanya dalam kultur tersebut.

Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung

- 1) Satu koloni dihitung 1 koloni
- 2) Duakoloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni
- 3) Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni
- 4) Dua koloni yang berhimpitan dan masih bisa dibedakan dihitung 2 koloni
- 5) Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah cawan) tidak dihitung
- 6) Koloni yang besarnya kurang dari setengah cawan dihitung 1 koloni

Standar Perhitungan

Cawan yang dipilih adalah yang mengandung jumlah koloni 30-300 koloni, beberapa koloni yang bergabung menjadi satu koloni dihitung sebagai satu koloni, maupun koloni yang bersekatan. Hasil yang dilaporkan terdiri dari dua angka yaitu angka pertama didepan koma dan angka kedua dibelakang koma. Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Contoh : jika jumlah yang dibutuhkan 1 ml dan tiap perlakuan dilakukan 1 kali

Sampel	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
A	234	28	1	$2,2 \times 10^4$
B	700	125	10	$1,3 \times 10^3$

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

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
16	28	1	$< 3,0 \times 10^{-5}$ ($1,6 \times 10^{-5}$)

Jika semua pengenceran menghasilkan angka lebih dari 300 koloni pada cawan petri, maka hanya koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan lebih dari sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
TBUD	TBUD	TBUD	$> 3,0 \times 10^5$ ($3,6 \times 10^5$)

Jika semua pengenceran menghasilkan range antara 30-300 koloni pada cawan petri. Perbandingan sel pengenceran tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata-rata dari kedua pengenceran tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil pengenceran tertinggi dan terendah lebih dari 2, maka yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

Sampel	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
A	293	41	4	$3,5 \times 10^4$ (Rata2 $41.000/29.300 = 1,4$ (<2))
B	140	32	2	$1,4 \times 10^3$ (Rata2 $321.000/14.000 = 2,3$ (>2))

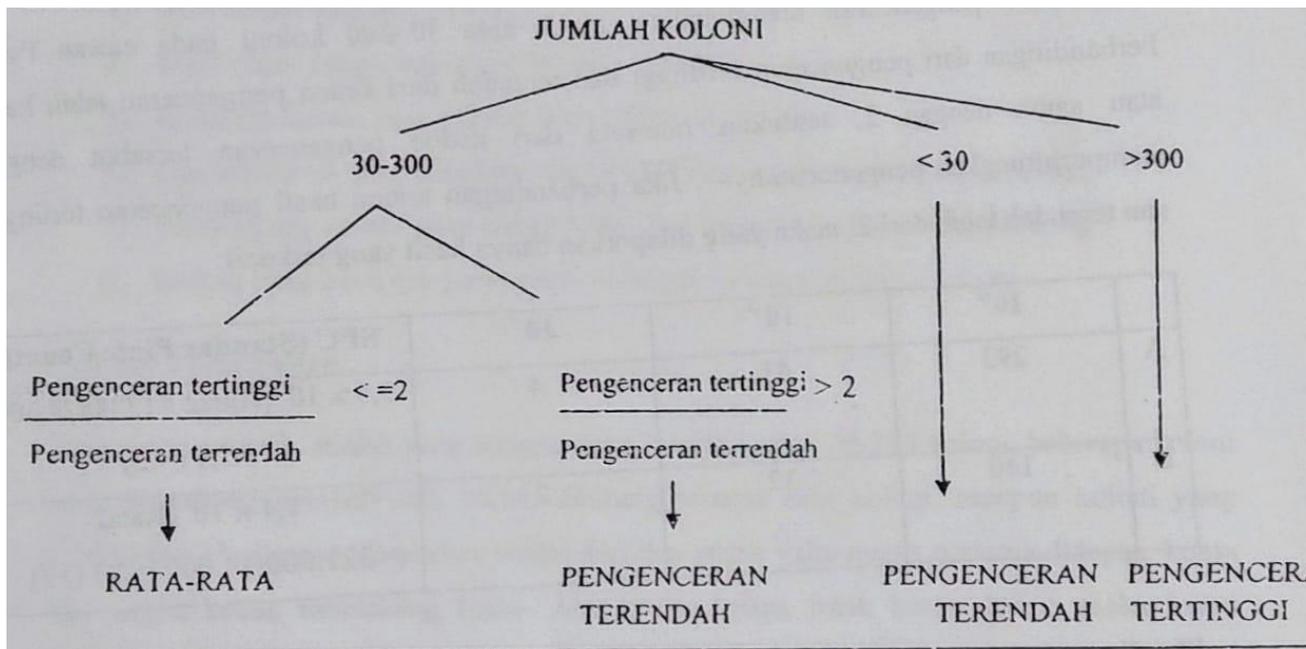
Jika digunakan dua cawan petri (duplo) perpengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tidak memenuhi syarat 30-300 koloni. Berikut contoh duplo dengan volume jumlah yang ditumbuhkan 1 ml.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
175	16	4	$1,9 \times 10^4$
208	17	2	Rata-rata pengenceran 10^{-2}

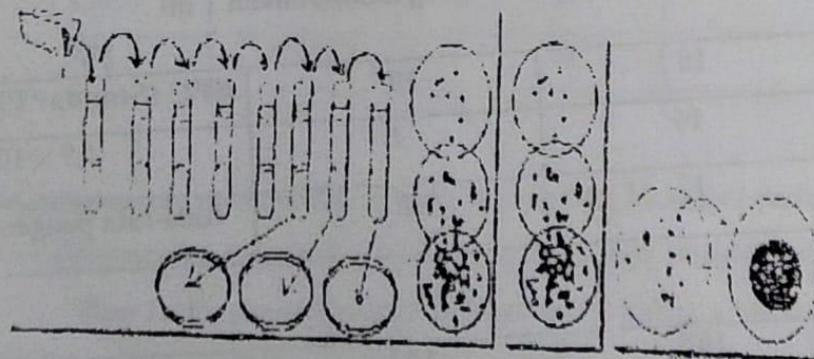
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
175	16	4	$1,9 \times 10^4$
208	17	2	Rata-rata pengenceran 10^{-2} karena perbandingan pengenceran 10^{-2} dan $10^{-3} = 2,4$

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC (Standar Plate Count)
-----------	-----------	-----------	----------------------------

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



Bagan Untuk Mempersiapkan syarat SPC



Pengenceran bertingkat dr sampel padat



Bahan :

- 1) Medium petri PCA
- 2) Pipet volume
- 3) Vortex
- 4) Aquadest steril
- 5) Speader drigalsky

Cara kerja

Sampel bahan padat

1. Timbang 1 gram sampel padat lalu masukkedalam aqusdest steril 9 ml (pengenceran 10^{-1}) secara aseptis dan divortex. Lalu diambil 1 ml larutan masukan dalam 9 ml aquadest steril yang baru (pengenceran 10^{-2})
2. Demikian seterusnya sampai tingkat pengenceran yang diinginkan.
3. Dari masing-masing 3 pengenceran terakhir dipipet 0,1 ml untuk ditanam secara *sprade plate* pada medium petri PCA masing-masing duplo.
4. Inkubasi selama 24 jam
5. Hitung jumlah koloni yang tumbuh dengan satuan CFU (*Coloni Forming Unit*)

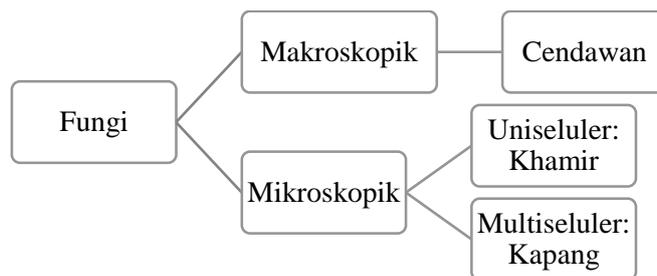
Sample bahan cair

1. Timbang 1 gram sampel cair lalu masukan ke dalam aqusdest steril 9 ml (pengenceran 10^{-1}) secara aseptis dan divortex. Lalu diambil 1 ml larutan masukan dalam 9 ml aquadest steril yang baru (pengenceran 10^{-2})
2. Demikian seterusnya sampai tingkat pengenceran yang diinginkan.
3. Dari masing-masing 3 pengenceran terakhir dipipet 0,1 ml untuk ditanam secara *sprade plate* pada medium petri PCA masing-masing duplo.
4. Inkubasi selama 24 jam
5. Hitung jumlah koloni yang tumbuh dengan satuan CFU (*Coloni Forming Unit*)

BAB IX

MORFOLOGI KAPANG DAN KHAMIR

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 9.1).



Gambar 9.1. Pembagian Fungi secara 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 koloni
- Banyak koloni
- Ada tidaknya zona 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

1. *Saccharomyces cerevisiae*
Mampu mengubah glukosa menjadi alkohol dan CO₂, berperan penting dalam industri minuman beralkohol (bir, anggur, champagne)
2. *Candida albicans*
Penyebab penyakit keputihan pada wanita (KANDIDIASIS VAGINA)

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

1. *Rhizopus oligosporus* : kapang tempe
2. *Penicillium chrysogenum* : kapang penghasil penisilin
3. *Penicillium notatum* : kapang penghasil penisilin
4. *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

- Sporagium : 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

Tujuan :

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)

MORFOLOGI MIKROSKOPIS KAPANG dan KHAMIR

A. Kapang

1. Bahan dan alat

- a. *Rhizopus oryzae*
- b. *Aspergillus oryzae*
- c. *Penicillium chrysogenum*
- d. Gelas objek dan gelas penutup
- e. Larutan laktofenol
- f. Jarum tanam atau sonde
- g. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

2. Cara kerja

- a. Bersihkan gelas objek dengan alkohol 70% hingga bebas lemak

- b. Tetskan larutan laktofenol di atas permukaan gelas objek
- c. Ambil sedikit biakan kapang dan uraikan dengan jarum sonde (preparat)
- d. Tutup gelas objek dengan gelas penutup
- e. Amati di bawah mikroskop, mulai perbesaran terkecil hingga 1000x

B. Khamir

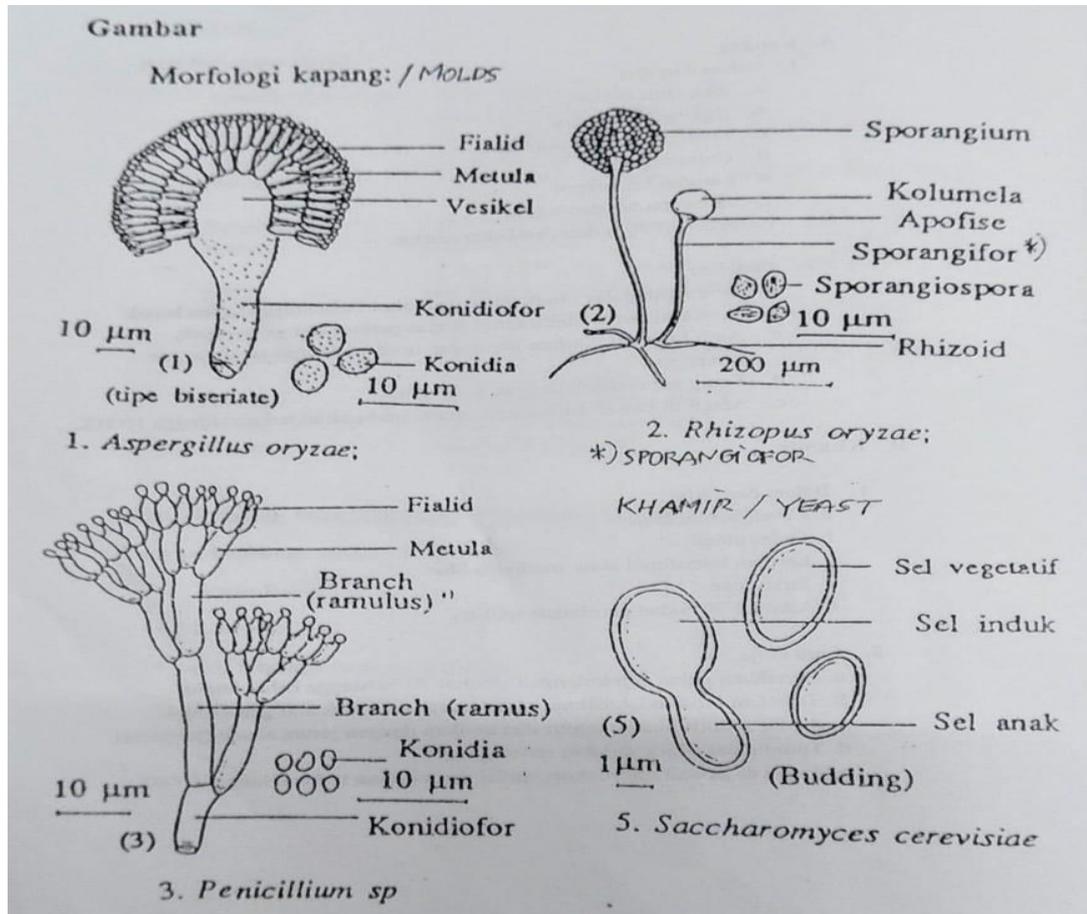
1. Bahan dan alat

- a. *Candida albicans*
- b. *Saccharomyces cerevisiae*
- c. Gelas objek dan gelas penutup
- d. Larutan laktofenol
- h. Jarum ose
- e. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

2. Cara kerja

- a. Bersihkan gelas objek dengan alkohol 70% hingga bebas lemak
- b. Tetskan larutan laktofenol di atas permukaan gelas objek
- c. Ambil sedikit biakan khamir dan uraikan dengan jarum ose (preparat)
- d. Tutup gelas objek dengan gelas penutup

e. Amati di bawah mikroskop, mulai perbesaran terkecil hingga 1000x



Gambar 9.2. Morfologi kapang dan khamir

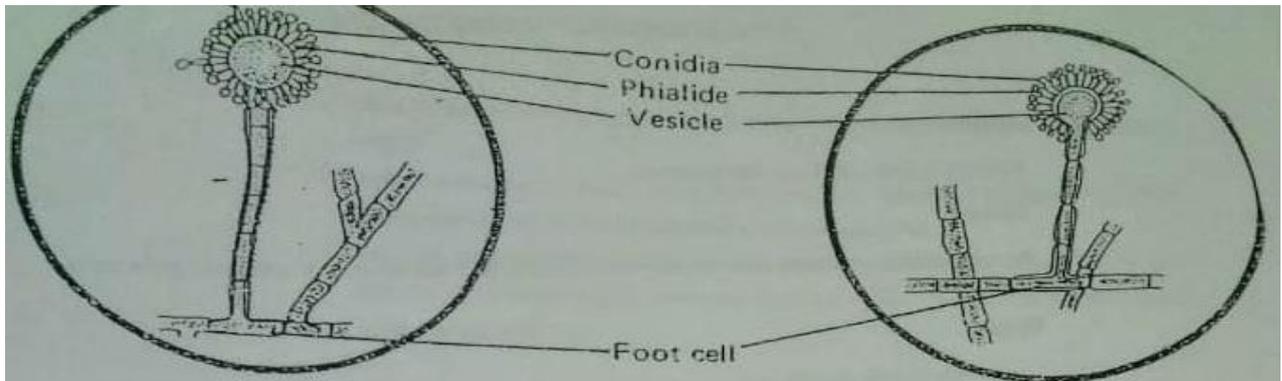


Figure 10-4. *Aspergillus flavus*.

Figure 10-5. *Aspergillus niger*.

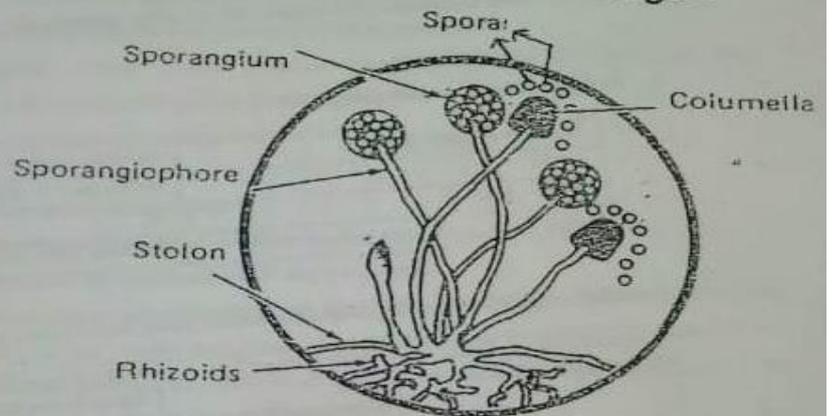
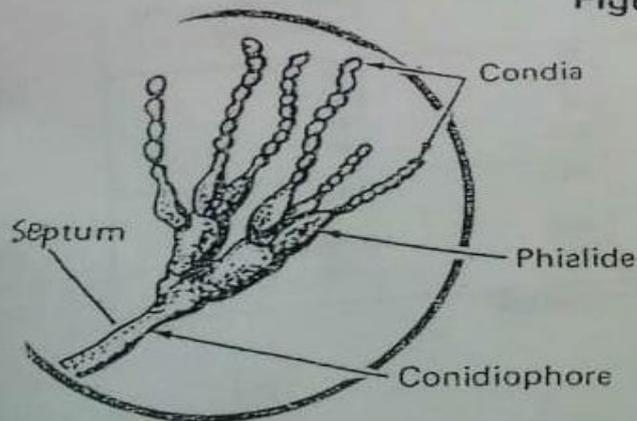


Figure 10-7. *Rhizopus nigricans*.



10-6. *Penicillium notatum*.

BAB X

UJI STERILITAS SEDIAAN FARMASI

Tujuan :

Menguji sediaan obat dan alat kesehatan

Prinsip :

Pertumbuhan jasad renik pada media tertentu yang dinokulasi dan di inkubasi pada suhu yang sesuai

Bahan :

1. Media cair thioglikolat
2. Saboroud Dextrose Cair/ Tryptic Soy Broth
3. Nutrien Broth
4. Sediaan obat : tetes mata, injeksi, infuse, dll
5. Alat kesehatan : kasa steril, disposable syringe, dll

Jumlah sampel untuk pengujian

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

Jumlah cuplikan yang dipakai dan media yang digunakan pada pengujian

Volume contoh pada wadah (ml)	Volume cuplikan yang diinokulasikan kedalam tiap wadah (ml)	Volume media thioglikolat tiap tabung (ml)	Volume media cair Saboroud/Tryptic Soy Broth tiap-tiap tabung (ml)
<1	Seluruh isi	15	15
1-10	1/5	15	15
10-<50	5	40	40
50-<100	10	80	80
50-<100 (sediaan iv)	Seluruh isi	100*	100
100-500	Seluruh isi	100*	100
>500	500	100*	100

Ket : * volume media yang dipakai pada media penyariran

Pengujian langsung :

a. Sediaan Cair

1. Pipet sejumlah volume tertentu cairan dengan pipet atau jarum sentik steril secara aseptis
2. Inokulasi dalam media thioglikolat cair dan Saboroud Dextrose Cair atau Tryptic Soy Broth dalam tabung reaksi, campur hati-hati
3. Inkubasi pada temperatur 37°C untuk media thoglikolat cair selama 18-24 jam dan 25-18°C untuk media Saboroud Dextrose Cair/ Tryptic Soy Broth selama tidak kurang dari 7 hari

b. Alat Kesehatan

Kasa, perban, pembalut, benang bedah dan bahan sejenisnya

1. Dengan cara aseptis diambil 100-500 mg dari bagian yang paling dalam dari contoh atau keseluruhan contoh bila ukurannya kecil
2. Bila sample dalam bentuk kemasan tunggal diambil 250-500 mg atau keseluruhan sampel bla ukuran kecil
3. Prosedur dilakukan sama seperti sediaan cair

c. Alat suntik steril atau siap pakai

1. Masukkan cairan pembilas kedalam wadah dan pasang jarumnya
2. Bilas wadah melalui jarum suntik secara aseptis
3. Masukkan cairan pembilas kedalam media thioglikolat dan/ Saboroud Dextrose Cair/ Tryptic Soy Broth dan inkubasi pada 37°C, untuk media thioglikolat cair selama 18-24 jam dan 25-28°C untuk media Saboroud Dextrose Cair/ Trptic Soy Broth selama tidak kurang dari 7 hari