

Prof. Dr. Hj. **Marlina**, MS., Apt  
Prof. Dr. **Akmal Djamaan**, MS., Apt  
Dr. **Rustini**, M.Si., Apt  
**Ivan Pratama**, S.Farm., Apt



FAKULTAS  
**FARMASI**



# PANDUAN PRAKTIKUM **MIKROBIOLOGI FARMASI**



**Program Studi Sarjana Farmasi**  
**Fakultas Farmasi Universitas Andalas**  
**Padang, 2019**

# **TIM MIKROBIOLOGI FARMASI 2019**

## **DOSEN PENGAMPU**

1. Prof. Dr. Hj. Marlina, MS., Apt
2. Prof. Dr. Akmal Djamaan, MS., Apt
3. Dr. Rustini, M.Si., Apt
4. Dr. Friardi, S.Si., Apt
5. Fithriani Armin, M.Si., Apt

## **KEPALA LABORATORIUM**

Prof. Dr. Hj. Marlina, MS., Apt

## **ANALIS LABORATORIUM**

Ulfa Farizha

## **ASISTEN LABORATORIUM**

1. Ivan Pratama, S.Farm., Apt
2. Zahra Hajjil Baiti, S.Farm., Apt
3. Annisa Dewi Fajar
4. Arini Intan Mutia
5. Hanny Tri Gustia
6. Hayyatun Nufus
7. Marhani Dwithania
8. Vivi Dwi Maryeti
9. Dian Nofida
10. Fitra Rahmatu
11. Keke Estera
12. Monica Martha Dina
13. Valdy Filando Sardi
14. Vega Handayana
15. Widi Novella Desti

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa akhirnya diktat panduan praktikum ini pun dapat kami wujudkan.

Maksud dari pembuatan diktat ini adalah untuk membantu mahasiswa yang sedang melaksanakan praktikum Mikrobiologi Farmasi di jenjang Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Diktat Panduan Praktikum ini dibuat berdasarkan percobaan dimana alat dan bahan-bahan yang diperlukan disesuaikan dengan fasilitas yang ada di laboratorium Mikrobiologi Farmasi. Diktat ini juga disusun berdasarkan pembaharuan kurikulum S1 Farmasi Unand, dan sangat diharapkan mampu menambah keterampilan mahasiswa secara praktek serta menjadi pembelajaran kedepannya dalam menghadapi UKAI metode OSCE. Disamping panduan praktikum ini, sangat diharapkan mahasiswa membaca buku-buku referensi yang ada sebelum melaksanakan praktikum.

Kritik dan saran dari segala pihak akan sangat diterima dengan senang hati demi penyempurnaan diktat penuntun praktikum ini.

Padang, Februari 2019

Penyusun

Tim Pengelola Praktikum

Mikrobiologi Farmasi

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
TIM MIKROBIOLOGI FARMASI .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
TATA TERTIB PRAKTIKUM.....	v
1. Penyiapan Medium Pembenihan .....	1
2. Isolasi Mikroba dari Obat, Makanan, Kosmetika, Lingkungan dan Tubuh Manusia .....	7
3. Identifikasi Bakteri dengan Metode Pewarnaan Gram.....	11
4. Identifikasi Bakteri Secara Biokimia.....	18
5. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	24
6. Uji Cemarkan Mikroba dengan Metode Angka Lempeng Total (ALT) .....	30
7. Penetapan Potensi Antibiotik dengan Metode Difusi ( <i>Kirby Bauer Method</i> )....	34
8. Uji Efektivitas Pengawet Antimikroba.....	37
9. Penentuan Koefisien Fenol Dari Povidone Iodium .....	41
10. Uji Sterilitas Sediaan Farmasi .....	45
LAMPIRAN .....	49
Penggunaan Alat.....	49
Larutan Pengencer Mikrobiologi.....	52
Pereaksi Mikrobiologi .....	55

## TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

Setiap praktikan selalu akan berhubungan dengan mikroorganisme selama melakukan praktikum mikrobiologi, maka perlu diketahui beberapa aturannya. Untuk mencegah kemungkinan timbulnya hal-hal yang tidak diinginkan maka setiap praktikan harus mentaati peraturan-peraturan yang telah ditentukan dan menjalankan petunjuk-petunjuk yang diberikan oleh pengawas.

1. Setiap praktikan harus hadir tepat pada waktu yang telah ditentukan dan telah menggunakan jas lab yang bersih serta semua perlengkapan harus disiapkan.
2. Setiap praktikan harus telah mempelajari teori-teori terutama yang menyangkut objek yang akan dilaksanakan pada hari itu.
3. Setiap praktikan diharuskan membersihkan meja kerja sebelum dan sesudah praktikum dengan larutan desinfektan. Demikian juga setiap ada percikan atau tumpahan suatu bahan mikroorganisme.
4. Semua alat dan bahan harus disterilkan sebelum dipakai.
5. Jangan sekali-sekali meletakkan pipet bekas atau jarum inokulasi begitu saja di atas meja kerja.
6. Tidak boleh sama sekali memipet melalui mulut terutama suspensi mikroba.
7. Kurangi bercakap-cakap selama praktikum agar tidak merugikan pekerjaan sendiri atau rekan lainnya.
8. Tidak boleh makan, minum dan merokok atau memasukkan sesuatu ke dalam mulut di ruang laboratorium mikrobiologi
9. Selalu mencuci tangan dengan antiseptik seperti lisol, natrium hipoklorida, methanol, dll, kemudian dengan sabun setiap akan bekerja dan sewaktu siap bekerja.
10. Setiap mengerjakan praktikum dan pengamatan harus dicatat dan diamati secara hati-hati dan cermat.
11. Semua praktikan bertanggung jawab terhadap kebersihan dan keamanan ruang praktikum, serta alat-alat yang digunakan.
12. Semua praktikan diwajibkan membersihkan dan mengembalikan semua alat dan bahan ke tempat semula setelah praktikan selesai. Selain dari itu juga dipastikan nyala api dan lampu sudah padam, serta menutup kran air dan gas.
13. Setiap praktikan tidak dibenarkan melakukan percobaan lain diluar objek praktikum yang dilaksanakan pada hari itu.

# OBJEK I

## PENYIAPAN MEDIUM PEMBENIHAN

### 1.1 Tujuan Praktikum

1. Praktikan dapat memahami dan mengetahui komposisi dan sifat media
2. Praktikan dapat memahami syarat-syarat media yang baik
3. Praktikan dapat dapat membuat media sesuai dengan ketentuan
4. Praktikan dapat memahami cara sterilisasi media
5. Praktikan dapat membuat persiapan dan pembuatan medium pembenihan hingga siap digunakan

### 1.2 Teori Dasar

Media adalah campuran nutrien atau zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan. Media selain untuk menumbuhkan mikroba juga dibutuhkan untuk isolasi & inokulasi mikroba serta untuk uji fisiologi dan biokimia mikroba. Media yang baik untuk pertumbuhan mikroba adalah yang sesuai dengan lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut, yaitu: susunan makanannya dimana media harus mengandung air untuk menjaga kelembaban dan untuk pertukaran zat atau metabolisme, juga mengandung sumber karbon, mineral, vitamin dan gas, tekanan osmose yaitu harus isotonik, derajat keasaman/pH umumnya netral tapi ada juga yang alkali, temperatur harus sesuai dan steril (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu: sumber energi misalnya gula, sumber nitrogen, juga ion inorganik esensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin. Media pertumbuhan mengandung unsur makro yang dibutuhkan mikroba seperti karbon (C), Hidrogen (H), oksigen (O), Nitrogen (N), dan Phospor (P). selain itu media juga mengandung unsur mikro seperti besi (Fe), dan Magnesium (Mg). media juga dapat mengandung bahan tambahan lain seperti indikator phenol red. Sifat media pembenihan yang ideal adalah mampu memberikan pertumbuhan yang baik jika ditanami kuman, mendorong pertumbuhan cepat, murah, mudah dibuat kembali, dan mampu memperlihatkan sifat khas mikroba yang diinginkan (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Berdasarkan bentuknya media dibedakan menjadi:

1. Media cair

Media cair digunakan untuk pembenihan diperkaya sebelum disebar ke media padat, tidak cocok untuk isolasi mikroba dan tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni kuman. Contoh media cair Nutrient broth (NB); Pepton dilution fluid (PDF); Lactose Broth (LB); Mac Conkey Broth (MCB), dan lain-lain. Pepton merupakan protein yang diperoleh dari peruraian enzim hidrolitik seperti pepsin, tripsin, papain. Pepton mengandung Nitrogen dan bersifat sebagai larutan penyangga, beberapa kuman dapat tumbuh dalam larutan pepton 4% (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

2. Media semi padat

Adalah media yang mengandung agar sebesar 0.5 % (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

3. Media padat

Media padat mengandung komposisi agar sebesar 15 %. Media padat digunakan untuk mempelajari koloni kuman, untuk isolasi dan untuk memperoleh biakan murni. Contoh media padat Nutrient Agar (NA); Potato Detrose Agar (PDA); Plate Count Agar (PCA), dan lain-lain (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Berdasarkan tujuan penggunaannya media dibedakan menjadi:

1. Media isolasi

Media yang mengandung unsur esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

2. Media diperkaya

Media diperkaya merupakan media yang mengandung bahan dasar untuk pertumbuhan mikroba dan zat-zat tertentu yang ditambahkan seperti serum, kuning telur, dan lain-lain (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

3. Media selektif

Media selektif merupakan media cair yang ditambahkan zat tertentu untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu dan diberikan penghambat untuk mikroba yang

tidak diinginkan. Contoh media yang ditambahkan ampisilin untuk menghambat mikroba lainnya (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Jenis media dan fungsinya dijabarkan sebagai berikut ini:

Jenis	Nama	Fungsi
Cair	Kaldu nutrisi (Nutrient Broth)	Media pengayaan dan pembiakan
	Kaldu darah	Media pengayaan
	Air pepton (Pepton Dillution Fluid (PDF))	Media pembiakan bakteri enterik
	Kaldu empedu	Media untuk melihat fermentasi gula
	Gula pepton (kaldu gula) dengan gula yang digunakan glukosa atau laktosa	Untuk melihat gerakan bakteri
Semi Padat	0.5% agar	Untuk melihat gerakan bakteri
Padat	Agar nutrisi (Nutrient Agar)	Untuk mempelajari koloni bakteri
	Agar darah	Untuk melihat koloni bakteri dan sifat hemolisis
	Agar endo	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan bakteri peragi laktosa
	EMBA (Eosin Methylene Blue Agar)	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan bakteri peragi laktosa
	SS Agar (Salmonella-Shigella Agar)	Media pembiakan bakteri Shigella dan Salmonella
	TCBS (Thiosulphate Citrate Bile)	Media pembiakan vibrio
	Agar darah telurit	Media pembiakan <i>Corynebacterium diptheriae</i>
Agar Miring	Lowenstein-Jensen	Media pembiakan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	TSIA (Triple Sugar Iron Agar)	Media untuk melihat kemampuan bakteri dalam meragi gula dan membentuk H <sub>2</sub> S
	Agar nutrisi (Nutrient Agar)	Untuk peremajaan koloni murni

Tabel pembagian jenis medium (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

### 1.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Pembuatan Medium Agar Kaldu (MAK)

a. Bahan (untuk biakan bakteri secara umum)

- Daging tanpa lemak 500 g
- Pepton 5 g

- Agar 15 g
- Akuades 1000 ml

b. Alat yang diperlukan

- Corong
- Kertas Koran
- Kain kasa
- Beaker glass
- Pipet
- Oven
- Kapas
- Erlenmeyer
- Autoklaf
- Timbangan Analitik

c. Cara Kerja

- Daging dibersihkan dari lemak dan dicuci
- Daging digodong dengan akuades sebanyak 1 liter, biarkan mendidih selama 25 menit
- Air godongan disaring, air saringannya (kaldu) disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Endapan dibuang, kaldu dicairkan dan disaring lagi
- Larutkan pepton dan agar-agar kedalam kaldu sampai rata, masukkan kedalam tabung sesuai dengan kebutuhan, sumbat dengan kapas.
- Sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit.

## 2. Pembuatan Media Agar Kentang Dekstrosa (MAKD)

a. Bahan (untuk biakan jamur secara umum)

- Kentang yang baik 200 g
- Dekstrosa 10 g
- Agar 15 g
- Akuades 1000 ml

b. Cara Kerja

- kentang dicuci sampai bersih, dipotong kecil-kecil kemudian dimasak selama 1 jam. Volume air dijaga supaya tetap dengan menambahkan air terus menerus.
- Air disaring, kedalamnya dimasukkan dekstrosa dan agar-agar samapai larut dengan baik
- Tuangkan kedalam tabung sesuai dengan kebutuhan, sumbat dengan kapas.
- Sterilkan dalam autoklaf selama 15 menit.

### **3. Pembuatan Media NA dan PDA**

1. Tentukan kelarutan medium sesuai pada labelnya (misal: 25 gr NA dilarutkan dalam 1 L aquades)
2. Timbang 25 gr NA dengan teliti menggunakan timbangan digital, masukan dalam Erlenmeyer 1 L
3. Tambahkan 1 L aquadest
4. Hangatkan media diatas hot plate hingga muncul gelembung dan semua serbuk NA sudah larut.
5. Lakukan hal yang sama dengan PDF
6. Tutup dengan sumbat steril
7. Medium siap disterilkan.

### **4. Sterilisasi Media**

Cara mengerjakannya:

1. Sebelum melakukan sterilisasi periksa terlebih dahulu banyaknya air dalam autoklaf
2. Masukan media yang akan disterilkan, kemudian tutup dengan sekrup pengaman.
3. Nyalakan api dan biarkan katup uap/ udara tetap terbuka sehingga semua udara didalam autoklaf diganti dengan uap, tutup katup uap/udara.
4. Pergantian udara dengan uap ini diikuti oleh peningkatan tekanan dan suhu. Pada saat tekanan mencapai 15 lbs dan suhu meningkat hingga 121°C, proses sterilisasi dimulai. Waktu yang diperlukan untuk mensterilisasi media sekitar 15-20 menit.
5. Setelah proses sterilisasi, api dimatikan dan tekanan dibiarkan turun sehingga mencapai 0 (nol). Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekan mencapai 0 (nol), karena cairan dalam tabung atau labu dapat tumpah keluar disebabkan penurunan suhu yang mendadak.
6. Buka tutup autoklaf, kemudian ambil labu atau tabung dengan sarung tangan tahan panas. Perhatikan bahwa peralatan dan cairan yang baru dikeluarkan dari autoklaf bersuhu tinggi sehingga dapat menimbulkan luka bakar.
7. Simpan semua alat dan bahan di dalam lemari aseptis

8. Medium yang tidak digunakan pada hari yang sama dapat disimpan di lemari pendingin setelah suhunya sudah tidak lagi panas.



Gambar autoklaf sederhana

#### **1.4 Tugas untuk Praktikan**

1. Sebelum praktikum pelajari mengenai;
  - a. Sterilisasi
  - b. Medium pembenihan mikroba
2. Pahami bagian-bagian autoklaf, inkubator dan mikroskop!
3. Pelajarilah teknik sterilisasi dengan autoklaf!

## **OBJEK II**

### **ISOLASI MIKROBA DARI OBAT, MAKANAN, KOSMETIKA, LINGKUNGAN DAN TUBUH MANUSIA**

#### **2.1 Tujuan Praktikum**

1. Praktikan dapat mengetahui cara-cara dan teknik isolasi mikroba dari berbagai sumber.
2. Praktikan dapat mengisolasi bakteri dari berbagai sumber secara baik dan benar.
3. Praktikan dapat memahami aplikasi mikrobiologi secara umum dibidang farmasi.

#### **2.2 Teori Dasar**

Untuk menanam suatu mikroba perlu diperhatikan faktor-faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen (gas, O<sub>2</sub> atau udara). Cara menumbuhkan mikroba yang anaerob sangat berbeda dengan yang aerob. Mengisolasi suatu mikroba ialah memisahkan mikroba tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Untuk isolasi harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroba pada medium biakan serta syarat-syarat lain untuk pertumbuhannya. Mikroba jarang terdapat di alam dalam keadaan murni, kebanyakan merupakan campuran bermacam-macam spesies mikroba (Tim Mikrobiologi Farmasi, 2016).

Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikroba adalah:

##### **1. *Spread plate method* (cara tebar/sebar)**

Teknik *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikrobial yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung (Tim Mikrobiologi Farmasi, 2016).

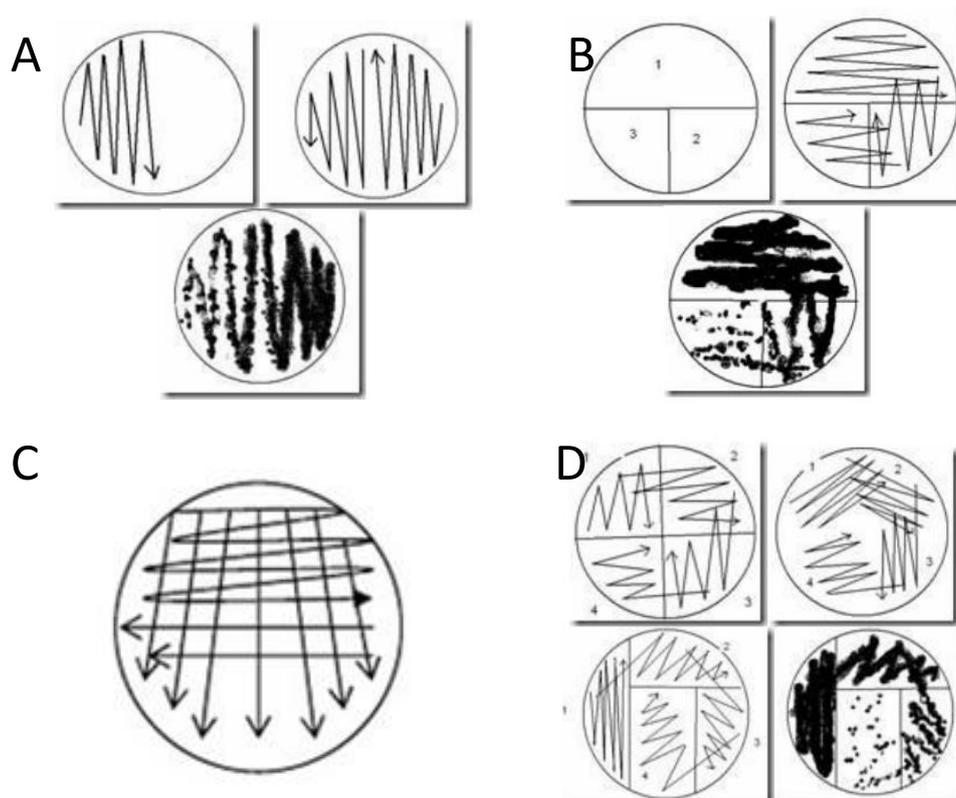
##### **2. *Streak plate method* (cara gores)**

Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini

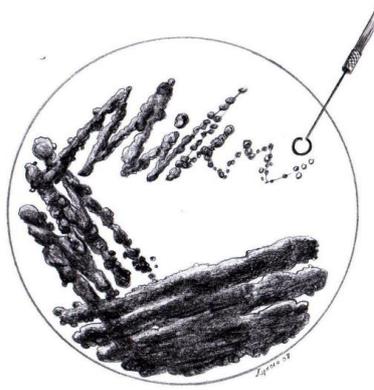
dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Tim Mikrobiologi Farmasi, 2016).

3. *Pour plate method* (cara tabur).

Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Tim Mikrobiologi Farmasi, 2016).



Gambar teknik penggoresan pada metode streak plate: A. metode sinambung, B. goresan T, C. radian, D. kuadran



Gambar contoh hasil metode *streak plate*

### **Total Count**

Yang dimaksud dengan total count yaitu, kalau perhitungan jumlah berdasarkan kepada jenis, tetapi secara kasar terhadap golongan atau kelompok besar mikroorganisme umum seperti bakteri, fungi, mikroalgae, ataupun terhadap kelompok bakteri tertentu.

Total count bakteri misalnya ditentukan berdasarkan penanaman bahan dalam jumlah pengenceran tertentu kedalam media yang umum untuk bakteri. Setelah masa inkubasi pada temperatur kamar selama waktu maksimal 4 x 24 jam, perhitungan koloni dilakukan. Dianggap bahwa tiap koloni berasal dari sebuah sel yang mewakili dan terdapat didalam bahan yang dianalisa.

### **2.3 Prosedur Percobaan**

1. Buat suspensi sampel 10% dalam labu Erlenmeyer 250 ml. Jika dalam bentuk padat: 10 gram dalam 100 ml akuades, cair: 10 ml dalam 100 ml
2. Cairkan media dalam penangas air sampai suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$
3. Buat pengenceran  $10^{-1}$  s/d  $10^{-4}$  dari sampel, tandai setiap tabung dengan tingkat pengencerannya.
4. Pipet 1 ml cairan dari pengenceran  $10^{-3}$  dari  $10^{-4}$ , masukan kedalam cawan petri yang telah ditandai
5. Tuangkan agar kedalam cawan dan goyang cawan dengan gerakan searah jarum jam 5 kali gerakan dan berlawanan arah jarum jam sebanyak 5 kali.
6. Biarkan lempengan agar membeku (10 menit) setelah membeku, balik lempengan agar dan masukan kedalam incubator ( $30-37^{\circ}\text{C}$ ) selama 24 - 48 jam.
7. Amati pertumbuhan koloni bakteri, catat semua pengamatan

## **2.4 Tugas untuk Praktikan**

1. Hitung jumlah koloni pada lempengan agar.
2. Gunakan lempengan agar yang mempunyai 30 – 300 koloni
3. Tentukan jumlah mikroorganisme hidup dengan cara mengalikan jumlah koloni dengan faktor pengenceran.
4. Laporkan hasil perhitungan dalam laporan akhir.

# **OBJEK III**

## **IDENTIFIKASI BAKTERI**

### **DENGAN METODE PEWARNAAN GRAM**

#### **3.1 Tujuan Praktikum**

1. Praktikan dapat mengetahui dan memahami macam-macam pewarnaan
2. Praktikan dapat melakukan pewarnaan gram
3. Praktikan dapat mengetahui perbedaan jenis bakteri berdasarkan hasil pewarnaan gram

#### **3.2 Teori Dasar**

Mikroorganisme sulit dilihat dengan mikroskop cahaya, karena tidak mengabsorpsi maupun tidak membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme atau latar belakangnya. Zat warna yang mengabsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras mikroorganisme dengan sekelilingnya ditingkatkan. Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan struktur sel seperti spora, flagella dan bahan inklusi yang mengandung zat pati dan granula fosfat. Pewarnaan yang digunakan untuk melihat salah satu struktur sel disebut pewarnaan khusus, sedangkan pewarnaan yang digunakan untuk memilah organisme disebut pewarnaan diferensial seperti pewarnaan gram yang membedakan bakteri menjadi gram positif dan gram negatif. Pewarnaan differensial lainnya ialah pewarnaan Ziehl-Neelsen yang memilah bakteri menjadi dua kelompok tahan asam dan tidak tahan asam (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Zat warna yang digunakan dalam pewarnaan bersifat basa atau asam. Pada zat yang basa, bagian yang berperan dalam memberikan warna disebut kromofor dan mempunyai muatan positif. Sebaliknya, pada zat warna asam, bagian yang memberikan zat warna mempunyai muatan negatif. Zat warna yang basa lebih banyak digunakan karena muatan negatif banyak ditemukan pada dinding sel, membran sel sitoplasma sewaktu proses pewarnaan. Muatan positif pada zat warna basa akan berikatan dengan muatan negatif dalam sel, sehingga mikroorganisme lebih jelas terlihat (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Zat warna bermuatan negatif lazimnya tidak digunakan untuk mewarnai mikroorganisme, namun biasanya dimanfaatkan untuk mewarnai latar belakang sediaan

pewarnaan. Zat warna asam yang bermuatan negatif ini tidak dapat berikatan dengan muatan negatif yang terdapat struktur sel. Kadangkala zat warna negatif ini digunakan untuk mewarnai bagian sel yang bermuatan positif. Perlu diperhatikan bahwa muatan dan daya ikat zat warna terhadap struktur sel dapat berubah tergantung PH sewaktu proses pewarnaan (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Prosedur pewarnaan yang menghasilkan pewarnaan mikroorganisme disebut pewarnaan positif, maupun zat warna asam yang bermuatan negative. Sebaiknya pada pewarnaan negatif latar belakang disekeliling mikroorganisme diwarnai untuk meningkatkan kontras dengan mikroorganisme yang tak warna (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

- **Preparat Ulas**

Sebelum dilakukan pewarnaan dibuat ulasan bakteri atas kaca objek. Ulasan ini kemudian difiksasi. Jumlah bakteri yang terdapat dalam ulasan haruslah cukup banyak sehingga dapat dilihat bentuk dan penataannya sewaktu diamati. Kesalahan yang sering sekali dibuat adalah menggunakan suspensi tersebut berasal dari biakan media padat. Sebaliknya bila suspensi bakteri terlalu encer, maka akan diperoleh kesulitan sewaktu mencari bakteri pada preparat.

- **Fiksasi Preparat**

Untuk pengamatan morfologi sel mikroorganisme, maka seringkali setelah pembuatan preparat ulas dilakukan fiksasi. Fiksasi dapat dilakukan dengan cara melewatkan preparat diatas api atau merendamnya dalam methanol. Fiksasi digunakan untuk:

- a) Mengamati bakteri oleh karena sel bakteri lebih jelas terlihat diwarnai
- b) Melekatkan bakteri pada gelas objek
- c) Mematikan bakteri

## **1. Pewarnaan Sederhana / Positif**

Pada pewarnaan sederhana hanya digunakan 1 macam zat warna untuk meningkatkan kontras antara mikroorganisme dan sekelilingnya lazimnya, prosedur pewarnaan ini menggunakan zat warna basah seperti Kristal violet, biru metilen, karbol fuksin, safranin atau hijau malakit. Kadangkala digunakan zat warna negatif untuk pewarnaan sederhana, zat warna asam yang sering digunakan adalah nigrosin dan merah kongo. Prosedur pewarnaan mudah dan cepat sehingga pewarnaan ini sering digunakan

untuk melihat bentuk, ukuran dan penataan mikroorganismenya. Pada bakteri dikenal berbagai bentuk yaitu bulat (kokus) batang (basilus) dan spiral. Dengan pewarnaan sederhana dapat juga dilihat penataan seperti rantai (streptokokus) buah anggur (stafilokokus), pasangan (diplokokus) bentuk kubus yang terdiri dari 4 atau 8 kokus (sarcina).

## 2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884. Pewarnaan gram memilah bakteri menjadi kelompok gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna Kristal violet yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat, sedangkan bakteri gram negative berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian mengambil zat warna kedua yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan ini disebabkan perbedaan struktur kedua kelompok bakteri tersebut.

Prinsip dasar teknik pewarnaan bakteri adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarnaan yang disebut kromogen. Terjadi ikatan ion karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarnaan. Berdasarkan adanya muatan ini maka dapat dibedakan pewarna asam dan pewarna basa. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan gram. Bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna metil ungu gelap setelah dicuci dengan alkohol. Bakteri gram negatif memiliki 3 lapisan dinding sel. Lapisan terluar yaitu lipopolisakarida (lipid) kemungkinan tercuci oleh alkohol, sehingga pada saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah. Bakteri gram positif memiliki selapis dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah pewarnaan dengan kristal violet, pori-pori dinding sel menyempit akibat dekolorisasi oleh alkohol sehingga dinding sel tetap menahan warna ungu. Pewarna bereaksi secara kimiawi dengan protoplas bakteri, apabila sel belum mati, proses pewarnaan akan membunuhnya.

Pewarnaan Gram dapat membedakan bakteri menjadi dua golongan utama Gram positif dan Gram negatif. Dasar dari teknik adalah bakteri diberi warna dasar kristal violet dan diberikan larutan iodine kemudian dilunturkan oleh alkohol, sebagian kuman berwarna ungu, karena sel mengikat senyawa kristal violet-iodine dan sebagian kuman lain kehilangan warna dasar dan mengambil warna kedua safranin/fuchsin yang berwarna merah. Kuman yang mempertahankan warna dasar ungu disebut kuman Gram positif dan kuman yang mengambil warna kedua merah disebut kuman Gram negatif. Untuk melakukan pewarnaan, bakteri dibuat pulasan lebih dahulu di atas kaca objek. Sebelum dilakukan pewarnaan dibuat ulasan bakteri di atas kaca objek. Pada pembuatan pulasan perlu diperhatikan ketebalan dari bakteri yang dipulas, tidak terlalu padat atau tipis agar tidak mengganggu pengamatan dan diperoleh hasil yang baik.

Pewarnaan gram memberikan hasil yang baik, bila digunakan biakan segar yang berumur 24-48 jam. Bila digunakan biakan tua, terdapat kemungkinan penyimpangan hasil pewarnaan gram. Pada biakan tua, banyak sel mengalami kerusakan pada dinding sel. Kerusakan pada dinding sel ini menyebabkan zat warna dapat keluar sewaktu dicuci dengan larutan pemucat. Ini berarti bahwa bakteri gram positif dengan dinding yang rusak tidak lagi dapat mempertahankan kompleks warna Kristal violet yodium sehingga terlihat sebagai bakteri gram negatif.

### **3. Pewarnaan Negatif**

Beberapa mikroba sulit diwarnai dengan zat warna yang bersifat basah, tapi mudah dilihat dengan pewarnaan negatif. Pada metode ini mikroba dicampur dengan tinta cina atau nigrosin, kemudian digesekkan diatas kaca objek. Zat warna tidak akan mewarnai lingkungan sekitar bakteri. Dengan mikroskop, mikroba kan terlihat berwarna dengan latar belakang hitam. Pada metode ini preparat tidak dipanaskan diatas api melainkan dikeringkan diudara.

### **4. Preparat Tetesan Bergantung**

Pada preparat tetes bergantung atau preparat basah diamati mikroba yang hidup, sedangkan preparat yang diwarnai mikroba tersebut mati. Preparat tetes bergantung pada preparat basah digunakan untuk mengamati pergerakan mikroba. Preparat tetes bergantung lebih menguntungkan dibandingkan preparat basah oleh karena tidak cepat kering.

### 3.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Cara membuat preparat ulas

##### a. Biakan cair

- Bersihkan kaca objek dengan sepotong kapas yang dibasahi dengan alcohol
- Tulis kode organisme pada sudut kaca objek dengan spidol
- Kocok tabung yang berisi suspensi bakteri kemudian dipindahkan 2 mata ose suspensi kebagian tengah kaca objek
- Ulaskan suspensi diatas kaca objek
- Biarkan preparat mengering di udara sebentar
- Fiksasi diatas api untuk membunuh dan melekatkan bakteri pada kaca objek

##### b. Biakan padat

- Bersihkan kaca objek dengan kapas yang diberi alcohol
- Tulis kode organisme pada sudut kaca objek dengan spidol
- Teteskan 2 mata ose NaCl-faali dibagian tengah kaca objek
- Sentuhkan ose pada biakan bakteri, kemudian dicampur dengan NaCl-faali sehingga merata. Ulaskan campuran ini diatas kaca objek
- Biarkan preparat mengering di udara sebenta
- Fiksasi diatas api

#### 2. Cara pewarnaan sederhana / positif

Bahan yang diperlukan:

- Kultur bakteri
- Zat warna, larutan biru metilen, larutan karbol fuksin-basa, Kristal violet
- Kaca objek yang bersih

Cara mengerjakan:

- Buat preparat ulas
- Beri larutan zat warna. Larutan zat warna yang digunakan adalah larutan biru metilen atau larutan karbol fuksin basa
- Biarkan zat warna selama 30 detik
- Cuci dan keringkan hati-hati dengan kertas saring
- Periksa dengan mikroskop 100 x pembesaran bila preparat ulas dan teknik pewarnaan dilakukan dengan benar, maka mikroorganisme berwarna dengan larutan biru metilen, dan warna merah dengan larutan karbol fuksin basa.

- Laporkan hasil pengamatan.

### **3. Cara Pewarnaan Gram**

Cara mengerjakan:

- Buat preparat ulas, kemudian fiksasi diatas api
- Beri larutan Kristal violet selama 1 menit
- Cuci dengan air
- Beri larutan lugol selama 1 menit
- Beri larutan pemucat selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena pemucatan yang terlalu lama akan memberikan hasil pewarnaan yang menyimpang.
- Beri larutan safranin selama 1 menit.
- Cuci preparat dengan akuades.
- Kemudian keringkan area sekitar preparat dengan tisu.
- Periksa dengan mikroskop 100 X dan laporkan hasil pengamatan.

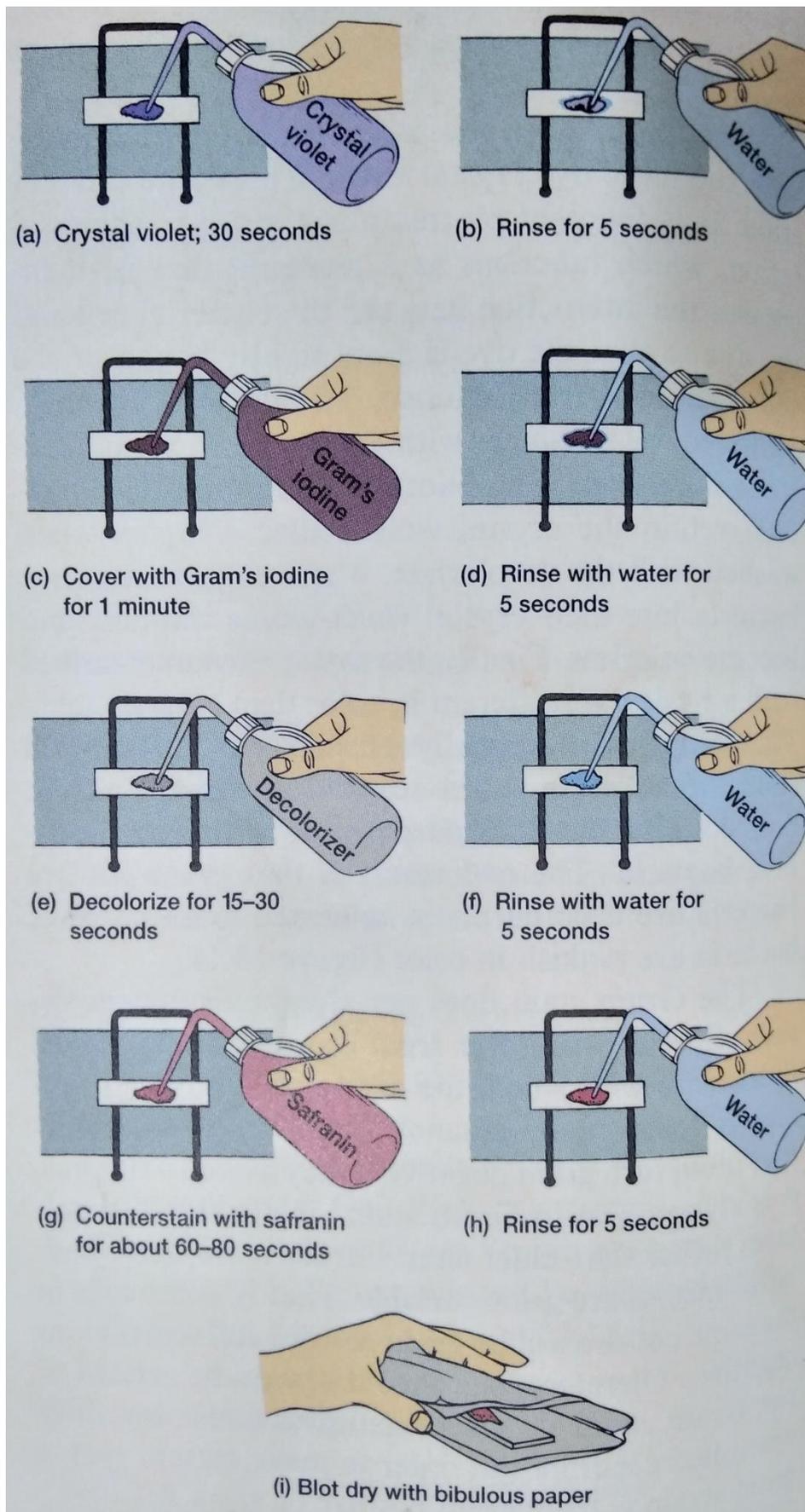
### **4. Pewarnaan Negatif**

Cara mengerjakan:

- Ambil 2 kaca objek, beri 1 tetes tinta cina pada bagian ujung kanan salah satu kaca objek
- Ambil kotoran gigi dengan tusuk gigi, kemudian campur dengan tinta diatas objek
- Tempatkan salah satu sisi kaca objek yang lain pada campuran ini, kemudian gesekkan kesamping kiri
- Biarkan preparat mongering diudara. Preparat tidak boleh dipanaskan diatas api
- Periksa dengan mikroskop 100 x dan laporkan hasil pengamatan.

#### **3.4 Tugas untuk Praktikan**

Coba identifikasi secara morfologi dan kelompok gram bakteri pada kelompok saudara.



Gambar proses pewarnaan gram

## **OBJEK IV**

### **IDENTIFIKASI BAKTERI SECARA BIOKIMIA**

#### **4.1 Tujuan Praktikum**

1. Praktikan mampu melakukan identifikasi bakteri secara biokimia.
2. Praktikan mampu mengidentifikasi karakteristik biokimiawi dari bakteri yang telah dilakukan uji biokimia.

#### **4.2 Teori Dasar**

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni selama reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi maupun yang menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel dan untuk kegiatan selular, seperti pergerakan. Suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, sehingga perlu diteliti sifat-sifat biokimia dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Ciri fisiologi ataupun biokimia merupakan kriteria yang amat penting di dalam identifikasi spesimen bakteri yang tidak dikenal karena secara morfologis biakan ataupun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa, tanpa hasil pengamatan fisiologis yang memadai mengenai kandungan organik yang diperiksa maka penentuan spesiesnya tidak mungkin dilakukan. Karakterisasi dan klasifikasi sebagian mikroorganisme seperti bakteri berdasarkan pada reaksi enzimatik maupun biokimia. Mikroorganisme dapat tumbuh pada beberapa tipe media yang memproduksi tipe metabolit yang dapat dideteksi dengan reaksi antara mikroorganisme dengan reagen test yang dapat menghasilkan perubahan warna reagen (Cowan, 2004).

Mikroba tumbuh dan berkembang biak dengan menggunakan berbagai bahan yang terdapat di lingkungannya. Nutrien yang terdapat di lingkungan sekelilingnya terdiri dari molekul sederhana seperti  $H_2S$  dan  $NH_4^+$  atau molekul organik yang kompleks seperti protein dan polisakarida. Mikroba mengoksidasi nutrien ini untuk memperoleh energi dan prekursor untuk sintesis dinding sel, membran dan flagella. Penggunaan nutrien tergantung aktivitas metabolisme mikroba. Percobaan-percobaan dalam uji biokimiawi mencakup berbagai uji untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroba. Pengamatan

aktivitas metabolisme diketahui dari kemampuan mikroba untuk menggunakan dan menguraikan molekul kompleks, seperti zat pati, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu pengamatan juga dilakukan pada molekul yang sederhana seperti asam amino dan sakarida. Hasil dari berbagai uji ini digunakan untuk pencirian dan identifikasi mikroba (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Pada identifikasi bakteri mula-mula diamati morfologi sel individual secara mikroskopik dan pertumbuhannya pada bermacam-macam medium. Karena suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, maka perlu diteliti pula sifat-sifat biokimiawi dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Bakteri-bakteri yang morfologinya sama mungkin berbeda dalam kebutuhan nutrisi dan persyaratan ekologi lainnya (temperatur, pH dsb) (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

### **4.3 Prosedur Percobaan**

#### **1. Alat dan Bahan**

- Isolat murni bakteri uji dalam media NA miring
- Media NA
- Jarum ose
- Pipet volume steril
- Gelatin
- Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
- Reagen uji oksidase: tetramethyl-paraphenyldiamine
- Reagen uji katalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% atau 30%
- Bahan untuk test O-F: media O-F yang mengandung 0,5-1% karbohidrat, paraffin cair
- Bahan uji sitrat: Simmons Citrate Agar yang mengandung indikator Brom Thymol Blue (BTB)
- Bahan uji dekarboksilase lisin: media Lysin Iron Agar (LIA) yang mengandung Lisin dan indikator Cresol Purple-BCP, media tanpa Lisin
- Bahan uji indol: media pepton 1% atau tryptone water, reagen kovacs
- Bahan uji MR-VP: media MR-VP, larutan 40% KOH, larutan 5% alpha-naphtol
- Bahan untuk uji urease: media Urea Broth, indikator Phenol Red

## 2. Uji Oksidase

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

## 3. Uji Katalase

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

## 4. Uji O-F (Oksidasi Fermentasi)

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

## 5. Uji Sitrat

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

## **6. Uji Dekarboksilase Lisin**

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

## **7. Uji Hidrolisis Gelatin**

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

## **8. Uji H<sub>2</sub>S dan Fermentasi Gula-gula**

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

## **9. Uji Indol**

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

#### **10. Uji MR (Methyl Red)**

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

#### **11. Uji VP (Voges Proskauer)**

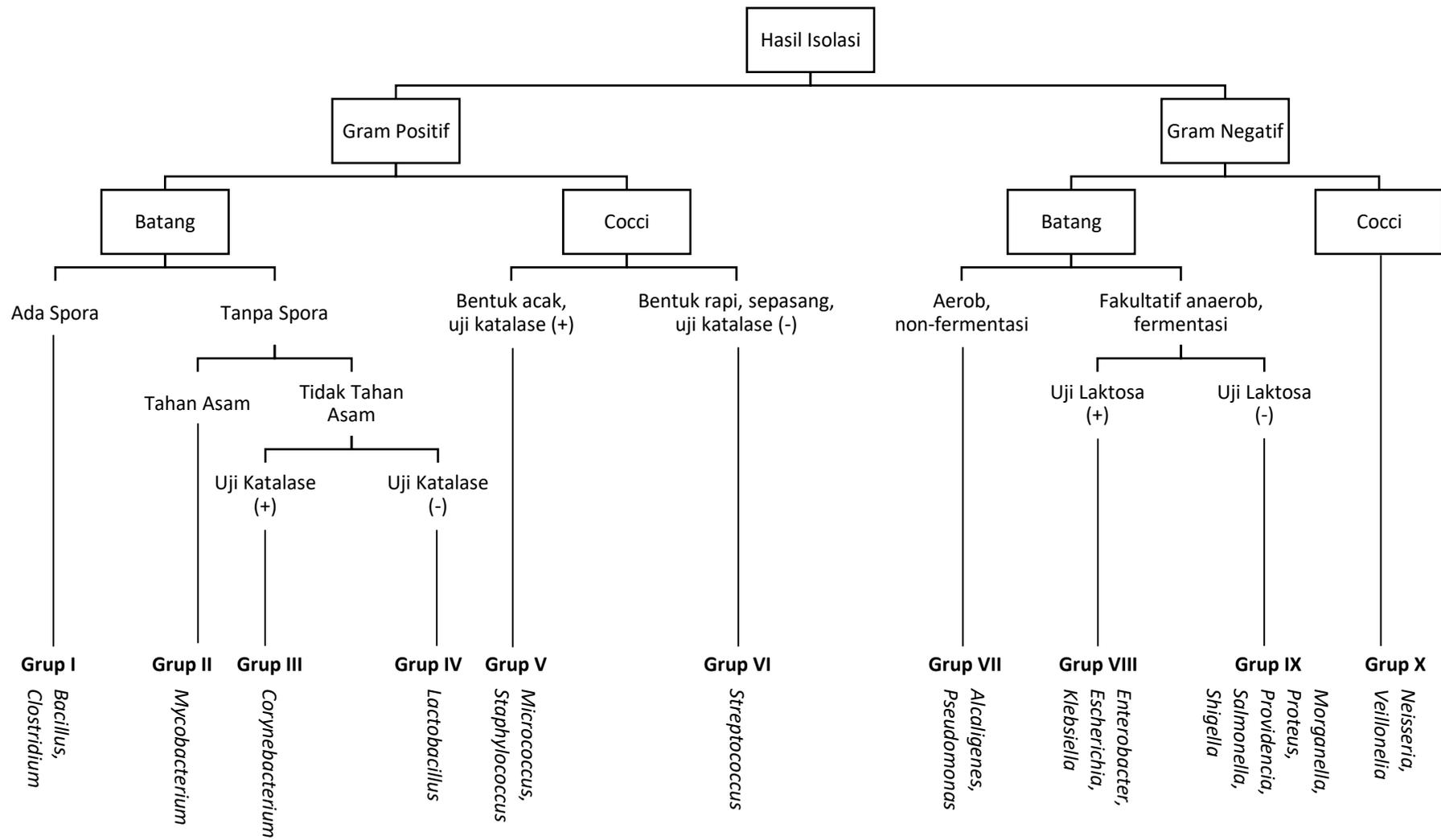
- Inokulasikan media Urea Broth yang mengandung indikator fenol merah dengan 1 tetes kultur murni bakteri.
- Amatilah perubahan warna menjadi merah (phenol red) setelah 24 jam pada suhu kamar. Bandingkan dengan kontrol.

#### **12. Uji Urease**

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

### **4.4 Tugas untuk Praktikan**

Bandingkan dan amati hasil pengujian dan buatlah dalam bentuk kolom.



## OBJEK V

### *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)*

#### 5.1 Tujuan Praktikum

1. Praktikan mampu menjelaskan tentang proses yang terjadi selama PCR
2. Praktikan mampu menggunakan PCR secara umum
3. Praktikan mampu menjelaskan aplikasi PCR khususnya di bidang farmasi

#### 5.2 Teori Dasar

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polimerase.

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah:

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara  $10^5 - 10^6$  molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (18-28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60%.
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- d. Enzim DNA Polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari *Eubacterium* yang disebut *Thermus aquaticus*,

- spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
- e. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20° C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat:

### **1. Denaturasi**

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polimerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

### **2. Annealing (penempelan primer)**

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR.

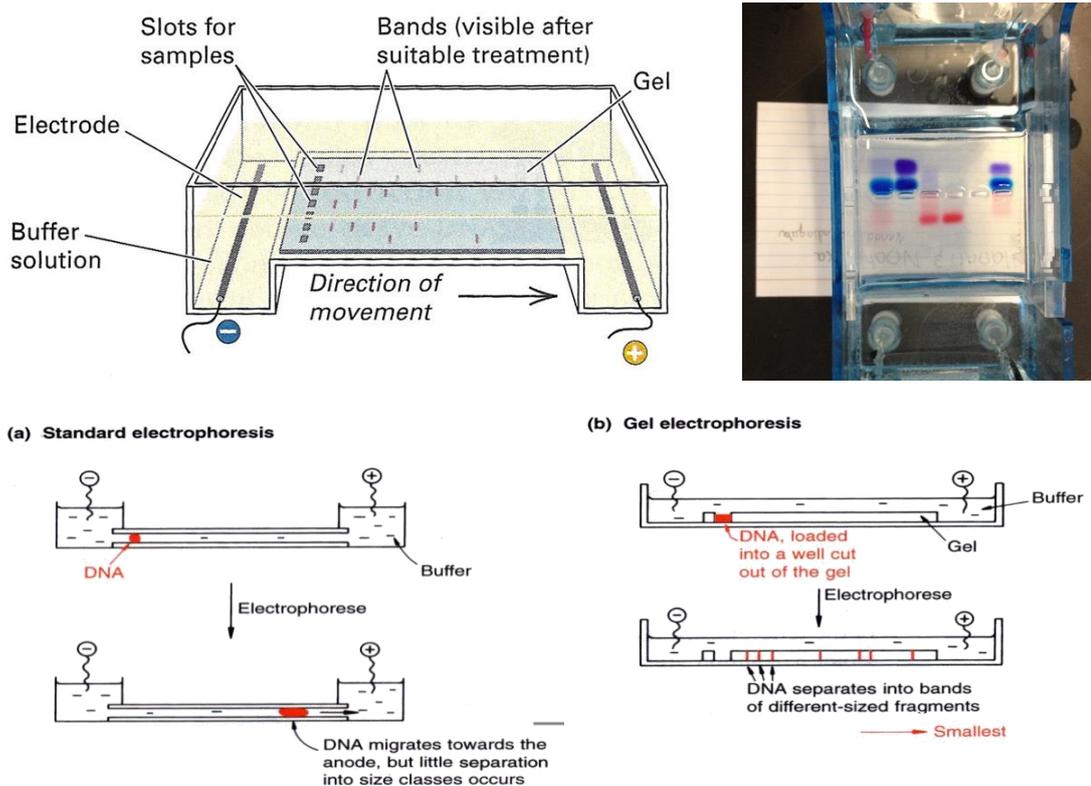
Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan

yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

### 3. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif.



Gambar metode elektroforesis

### 5.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Alat dan bahan

- Suspensi sampel
- Vortex
- Sentrifus
- Pipet mikro
- Tube eppendorf

#### 2. Isolasi RNA

- Hangatkan sampel jika sampel dari lemari pendingin
- Vortex suspensi sampel agar homogen
- Ambil 1.5 ml suspensi kultur bakteri
- Sampel disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm 10 menit
- Ambil pellet dan diresuspensikan dengan 500  $\mu$ L reagen TRIzol dan dihomogenkan selama 30 detik
- Sampel didiamkan pada suhu ruangan selama 5 menit, + *chloroform* 100  $\mu$ L, lalu *shake* dengan cara membolak-balikkan tube selama 15 detik
- Diamkan selama 3 menit, kemudian sentrifus pada 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.
- Setelah disentrifus terbentuk lapisan cairan, kemudian ambil cairan yang jernih saja karena cairan ini yang mengandung RNA, pisahkan cairan tersebut ke *microtube* yang telah dilabel.
- Cairan jernih tersebut, ditambah isopropanol 250  $\mu$ L, *shake* sampel lalu inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan.
- Sentrifus 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.
- Terbentuk presipitat RNA seperti butir gel yang berwarna putih mengendap pada bagian bawah *tube*. Tuang supernatan, kemudian kering-anginkan.
- Cuci *pellet* RNA dengan etanol 75 %, bolak-balikkan *tube*, lalu sentrifus pada 10000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C.
- Buang etanol dan keringkan *pellet* RNA dengan cara membiarkan *tube* terbuka selama 15 menit, setelah kering larutkan *pellet* dengan 200  $\mu$ L *autoclave water*.

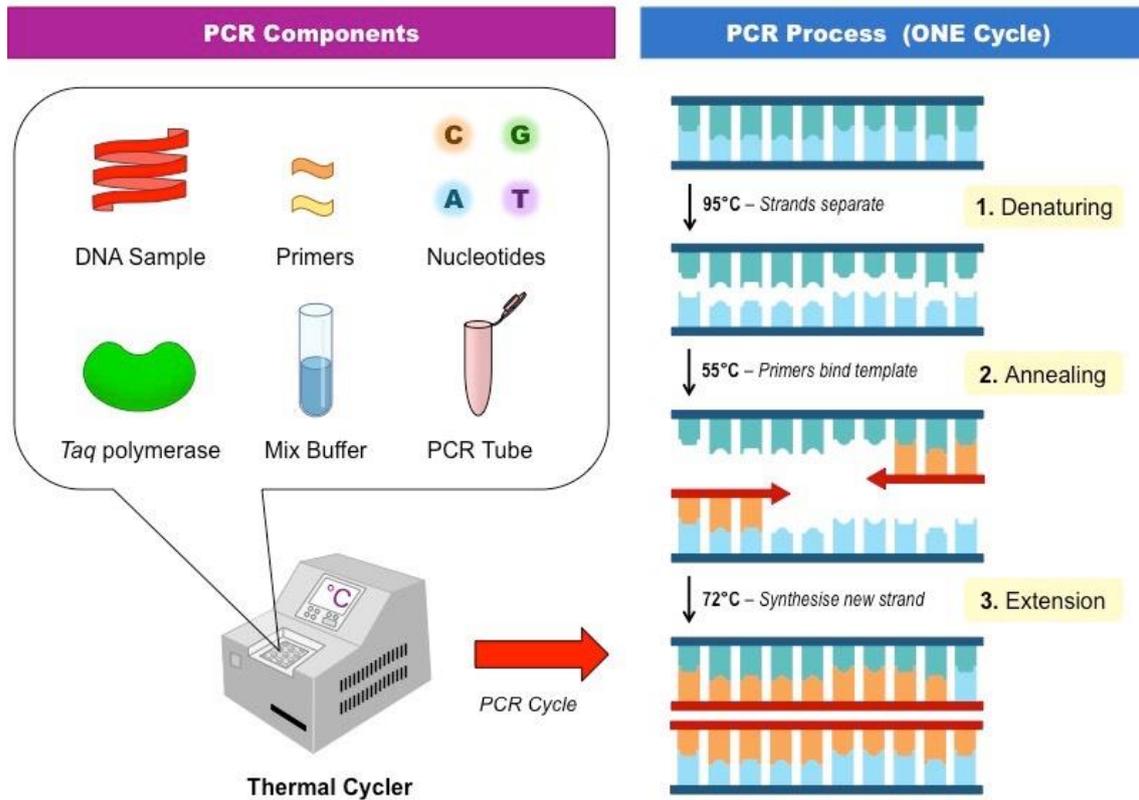
### 3. Sintesa DNA

- Sintesis menggunakan *iScript cDNA Syntesis Kit* pada alat *Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cyclers*.
- Siapkan kit sintesis DNA yang terdiri dari *reaction mix*, *reverse transcriptase*, dan *nuclease free water (NFW)*.
- Dibuat campuran *nuclease free water* dan isolat RNA dalam *microtube* dengan volume total adalah 7,5  $\mu\text{L}$ .
- Dibuat campuran total dari *reaction mix* dengan enzim (*Reverse transcriptase*).
- Dimasukkan 2,5  $\mu\text{L}$  campuran total kedalam masing masing *microtube* yang telah berisi campuran sampel dengan *nuclease free water*.
- Dilakukan sintesis DNA dengan cara memasukkan sampel yang telah disiapkan kedalam alat RT-PCR *termal cyclers C1000* (Bio-Rad) selama 45 menit
- Setelah selesai, keluarkan sampel dan cDNA siap digunakan.
- Siapkan komponen qPCR yang terdiri dari *nuclease free water*, primer *forward* dan *reverse*, *evagreen*, *cDNA template* (cDNA yang siap digunakan).
- Volume untuk masing-masing komponen:

<i>Nuclease free water</i>	: 3 $\mu\text{L}$	<i>Evagreen</i>	: 5 $\mu\text{L}$
Primer ( F )	: 0,5 $\mu\text{L}$	<i>cDNA template</i>	: 1 $\mu\text{L}$
Primer ( R )	: 0,5 $\mu\text{L}$		

- Dibuat campuran total (*mix PCR*) dari komponen qPCR (*nuclease free water*, primer *forward* dan *reverse*, *evagreen*) kecuali *DNA template*.
- Dibuat standar dari *nuclease free water* dengan DNA.
- Ditambahkan *mix qPCR* masing masing 9  $\mu\text{L}$  kedalam 1  $\mu\text{L}$  *DNA template*.
- Disusun sampel, standar, NTC (*no template control*) dan kontrol negatif pada *plate qPCR*.
- Set alat qPCR.
- Dimasukkan sampel, standar, NTC (*no template control*) dan kontrol negatif, sesuai susunan *plate PCR* yang telah dibuat kedalam alat. Tunggu selama

kurang lebih 1 jam. Hasil akan terlihat pada kurva amplifikasi yang dihasilkan pada komputer.



Gambar proses PCR

**OBJEK VI**  
**UJI CEMARAN MIKROBA**  
**DENGAN METODE ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT)**

**6.1 Tujuan Praktikum**

1. Praktikan mampu melakukan penentuan Angka Lempeng Total (ALT) sebagai salah satu bentuk uji cemaran mikroba.
2. Praktikan mampu menghitung jumlah mikroba aerob mesofil yang terdapat dalam sampel.
3. Praktikan memahami bahwa sampel yang diuji tidak boleh mengandung mikroba melebihi batas yang ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan manusia.

**6.2 Teori Dasar**

Angka Lempeng Total (ALT) adalah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C (SNI, 1992). Uji ALT (Angka Lempeng Total) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai, dan pengujian dilakukan secara duplo. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total (ALT) dalam tiap gram contoh bahan (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25°C dan dinyatakan dalam satuan koloni/mL (Soekarto, 2008). Uji AKK (Angka Kapang Khamir) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan kapang dan khamir setelah cuplikan diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

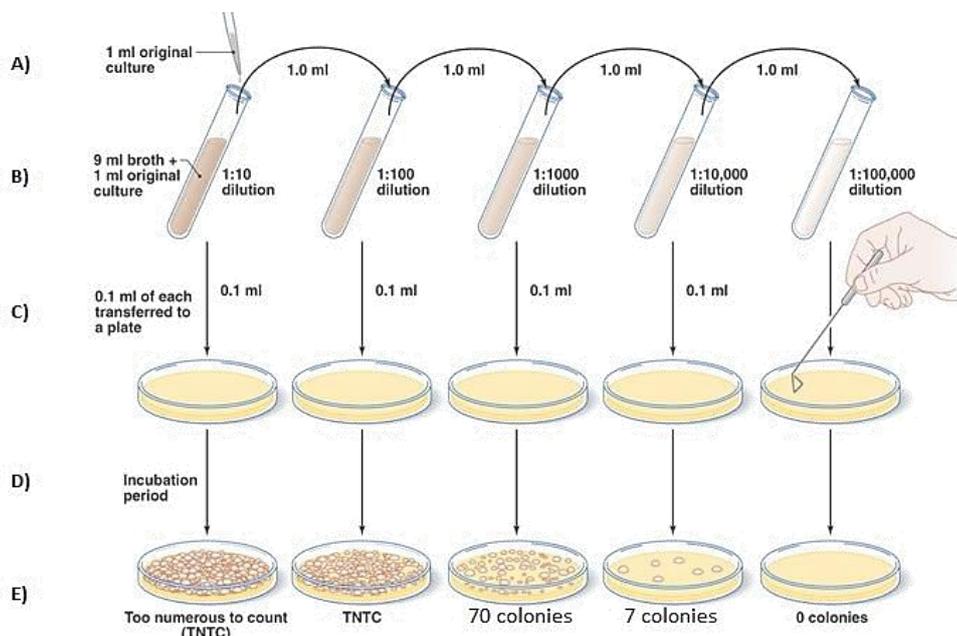
### 6.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Alat dan bahan

- Tabung reaksi
- Pipet volumetric
- Cawan petri
- Media Plate Count Agar (PCA)
- Larutan Pepton Dilution Fluid (PDF)
- Stomacher atau blender
- Colony counter

#### 2. Cara pengerjaan

- Ditimbang sejumlah 25 gr cuplikan kedalam kantong plastik stomacher steril, ditambahkan 25 ml PDF, dihomogenkan menggunakan stomacher selama 30 detik, hingga diperoleh suspensi homogen dengan pengenceran  $10^{-1}$ .
- Disiapkan 5 buah tabung yang masing-masing telah diisi dengan 9 ml pengenceran PDF.
- Dari suspensi dengan pengenceran  $10^{-1}$  dipipet sebanyak 1 ml kedalam tabung PDF pertama hingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$  dan dikocok hingga homogen.
- Dibuat pengenceran selanjutnya berturut-turut hingga  $10^{-6}$ .



Gambar skema pengenceran

- Dari setiap pengenceran dipipet 1 ml kedalam cawan petri dituangkan 15-20 ml media PCA ( $45 \pm 1^\circ$ ), cawan petri segera digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata.
- Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat uji kontrol (blanko) pada satu cawan diisi 1 ml pengenceran dan media agar dan cawan lain hanya diisi media agar.
- Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu  $35-37^\circ$  selama 24-48 jam dengan posisi dibalik.
- Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

### 3. Perhitungan

- Diambil cawan petri dari dua pengenceran terkecil dan harus menunjukkan jumlah koloni antara 30-300.
- Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya.
- Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total dalam tiap gram contoh.
- Untuk beberapa kemungkinan lain dalam perhitungan Angka Lempeng Total dapat diikuti petunjuk sebagai berikut:
  - a. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, dihitung rata-rata dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
  - b. Bila pada cawan petri dari kedua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil rata-rata.
  - c. Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapati jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni yang seharusnya, maka dipilih pengenceran terendah (misalnya pada pengenceran  $10^{-2}$  diperoleh 140 koloni dan pada pengenceran  $10^{-3}$  diperoleh 32 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran  $10^{-2}$  yaitu 140).
  - d. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan.

- e. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Lempeng Total dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.
- f. Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 300, maka cawan dengan tingkat pengenceran tertinggi dibagi dalam beberapa sektor (2,4 dan 8). Jumlah koloni dikalikan dengan faktor pembagi dan faktor pengencerannya, hasil dilaporkan sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan.
- g. Bila jumlah koloni lebih dari 200 pada 1/8 bagian cawan, maka jumlah koloni adalah  $200 \times 8 \times$  faktor pengenceran. Angka Lempeng Total perkiraan dihitung sebagai lebih besar dari jumlah koloni yang diperoleh.

## OBJEK VII

### PENETAPAN POTENSI ANTIBIOTIK DENGAN METODE DIFUSI (*KIRBY BAUER METHOD*)

#### 7.1 Tujuan Praktikum

1. Praktikan memahami prosedur uji potensi antibiotik.
2. Praktikan mampu melakukan uji potensi antibiotika dengan metode difusi.
3. Praktikan mendapatkan keterampilan dalam menggunakan metoda ini untuk melihat hubungan dosis dengan diameter daerah hambatan pertumbuhan mikroba.
4. Praktikan mampu menentukan sifat suatu antibiotika berdasarkan sifat membunuh mikroba-nya.
5. Praktikan memahami hubungan antara perubahan konsentrasi antibiotic dan sifat bakterisida atau bakteriositik.

#### 7.2 Teori Dasar

Uji potensi antimikroba dapat dilakukan dengan 2 macam metode, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Cara pengujian potensi (daya atau kekuatan) senyawa antimikroba ada bermacam-macam, tergantung pada sifat dan bentuk sediaan senyawa antimikroba. Pada umumnya digunakan cara pengenceran, *cylinder diffusion plate method*, *paper disk diffusion method* dan *agar dillution plate method*. Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Metode difusi dapat dilakukan secara *paper disk* dan secara sumuran. Pada metode difusi secara *paper disk*, kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan di atas permukaan media agar yang telah ditanam mikroba uji, setelah itu hasilnya dibaca (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

Penghambatan pertumbuhan mikroba oleh antibiotik terlihat sebagai zona jernih di sekitar pertumbuhan mikroba. Metode difusi secara sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang telah ditanami mikroba uji. Sumuran dibuat tegak lurus terhadap permukaan media. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran ini dan diinkubasikan, setelah itu hasilnya dibaca seperti pada difusi secara *paper disk*. Luasnya zona jernih merupakan petunjuk kepekaan mikroba terhadap antibiotik. Selain

itu, luasnya zona jernih juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media (Yusmaniar, *et al.*, 2017).

### 7.3 Prosedur Percobaan

Bahan dan alat:

- Sediaan antibiotika (Amoksisilin/Tetrasiklin/Eritromisin)
- Bakteri uji: *E. Coli* & *Staphylococcus aureus*
- Medium NA dan NB
- Kapas, kertas cakram steril, inkubator, oven, autoklaf, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, spektronik 20.

Cara mengerjakan:

- Sterilkan semua alat dan bahan yang akan digunakan menurut ketentuannya.
- Sehari sebelumnya, ditumbuhkan bakteri dalam medium NB selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Buat larutan stok sediaan antibiotika dengan konsentrasi 200mg/ml.
- Buat pengenceran sehingga konsentrasinya 1, 10 dan 50mg/ml.
- Siapkan tabung reaksi yang berisi akuades steril, buat suspensi bakteri, lalu ukur kekeruhan dengan spektronik 20% pada panjang gelombang 530 nm, sehingga memberikan transmittan 25% T.
- Siapkan cawan petri, beri tanda dengan konsentrasi antibiotika, jenis antibiotika & tanggal pengerjaan.
- Encerkan medium NA sampai suhu 45°C, tuang ke dalam cawan petri.
- Tambahkan 0,05 ml suspensi bakteri, goyang-goyang lalu biarkan memadat
- Letakkan 4 buah kertas cakram steril pada permukaan agar, kemudian ditetesi dengan 10 µl sediaan antibiotika dengan masing-masing konsentrasi. Inkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Ukur diameter daerah hambatan dan tentukan harga KHM masing-masing antibiotika.
- Buat kurva hubungan konsentrasi VS diameter hambatan atau log konsentrasi VS diameter daerah hambatan.

### Penentuan Sifat Kerja Antibiotika

Bahan dan alat:

- Bahan uji: *Staphylococcus aureus*
- Antibiotika: Ampisilin & Tetrasiklin
- Medium NA dan NB
- Alat: tabung reaksi, cawan petri, pinset, pipet ukur, jarum ose, inkubator, kertas cakram, kapas dan lain-lain.

Cara mengerjakan:

- Sterilkan alat dan medium dalam autoklaf
- Sehari sebelumnya, buat inokulen bakteri dalam air kaldu, inkubasi pada 37°C selama 24 jam.
- Ukur transmittan bakteri dan atur pada t 25%
- Siapkan media NB dalam tabung reaksi masing-masing antibiotika yang diuji terhadap satu bakteri uji
- Kedalam masing-masing tabung ditambahkan suspensi bakteri 5 tetes sehingga absorban (A) awal 0,06-0,07. Inkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 30 menit
- Ukur A pada tabung pertama dan kedalam 5 tabung lainnya tambahkan 0,5 larutan antibiotika dengan satu konsentrasi tertentu (100g/ml dan 200g/ml)
- Ukur absorban
- Pengerjaan yang sama dilakukan terhadap tabung kontrol

Pengamatan:

1. Buat tabel data A pada waktu pengukuran 36 menit
2. Buat masing-masing kurva pertumbuhan pada kertas semilog untuk tiap bakteri.

## OBJEK VIII

### UJI EFEKTIVITAS PENGAWET ANTIMIKROBA

#### 8.1 Tujuan Praktikum

1. Praktikan dapat melakukan uji efektifitas pengawet terhadap sediaan farmasi.
2. Praktikan memahami bagaimana suatu pengawet dapat menghambat dan/atau membunuh mikroba.
3. Praktikan dapat menentukan apakah suatu sediaan farmasi membutuhkan pengawet atau tidak.

#### 8.2 Teori Dasar

Pengawet adalah zat antimikroba yang ditambahkan pada sediaan non-steril untuk melindungi sediaan terhadap pertumbuhan mikroba yang ada atau mikroba yang masuk secara tidak sengaja selama ataupun sesudah proses produksi. Dalam sediaan steril dosis ganda, pengawet ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba yang mungkin masuk pada pengambilan berulang. Pengawet tidak boleh digunakan sebagai pengganti cara produksi yang baik atau semata-mata untuk menurunkan populasi mikroba “*viabel*” dari produk tidak steril atau mengontrol “*bioburden*” pra-sterilisasi dari formulasi sediaan dosis ganda pada waktu diproduksi. Pengawet sesuai bentuk sediaan dalam farmakope memenuhi syarat untuk *Bahan Tambahan* dalam *Ketentuan Umum* (FI V, 2014).

Semua bahan antimikroba yang digunakan pada dasarnya toksik. Untuk melindungi konsumen secara maksimum, kadar pengawet yang efektif dalam kemasan akhir produk hendaknya di bawah tingkat toksik bagi manusia. Kadar pengawet yang ditambahkan dapat dikurangi apabila bahan aktif dalam formulasi secara intrinsik mempunyai aktivitas antimikroba. Untuk semua produk injeksi dosis ganda atau produk lain yang mengandung pengawet, harus menunjukkan efektivitas antimikroba baik sebagai sifat bawaan dalam produk maupun yang dibuat dengan penambahan pengawet. Efektivitas antimikroba juga harus ditunjukkan untuk semua produk dosis ganda sediaan topikal, oral dan sediaan lain seperti tetes mata, telinga, hidung, irigasi dan cairan dialysis. Pengujian berikut dimaksudkan untuk menunjukkan efektivitas pengawet. Penambahan pengawet harus dinyatakan pada etiket. Pengujian dan kriteria untuk efektivitas berlaku hanya pada produk di dalam wadah asli belum dibuka yang didistribusikan oleh produsen (FI V, 2014).

Tabel kategori sediaan farmasi yang dapat dijadikan sampel (FI V, 2014).

Kategori	Uraian Sediaan
1	Injeksi, sediaan parenteral lain termasuk emulsi, sediaan tetes telinga, sediaan steril tetes hidung, dan sediaan optalmik yang dibuat dengan dasar atau pembawa air
2	Sediaan topikal yang dibuat dengan dasar atau pembawa air, sediaan tetes hidung non-steril, dan emulsi, termasuk sediaan yang dioleskan ke membran mukosa
3	Sediaan oral selain antasida, dibuat dengan dasar atau pembawa air
4	Antasida yang dibuat dengan pembawa air

### Mikroba Uji

Mikroba hidup yang digunakan untuk pengujian tidak boleh lebih dari lima pasase dari biakan ATCC asli. Gunakan biakan mikroba berikut:

- *Candida albicans* (ATCC No. 10231)
- *Aspergillus niger* (ATCC No. 16404)
- *Escherichia coli* (ATCC No. 8739)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027) dan
- *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538) (FI V, 2014).

Tabel kondisi penyiapan inokulasi (FI V, 2014)

Mikroba	Media yang Sesuai	Suhu Inkubasi	Waktu Inkubasi Inokula	Waktu Inkubasi Rekoverti Mikroba
<i>Escherichia coli</i> (ATCC No. 8739)	Soybean-Casein Digest Broth; Soybean-Casein Digest Agar	32.5°C ± 2.5°	18 – 24 jam	3 – 5 hari
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC No. 9027)	Soybean-Casein Digest Broth; Soybean-Casein Digest Agar	32.5°C ± 2.5°	18 – 24 jam	3 – 5 hari
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC No. 6538)	Soybean-Casein Digest Broth; Soybean-Casein Digest Agar	32.5°C ± 2.5°	18 – 24 jam	3 – 5 hari
<i>Candida albicans</i> (ATCC No. 10231)	Sabouraud Dextrose Broth; Sabouraud Dextrose Agar	22.5°C ± 2.5°	44 – 52 jam	3 – 5 hari
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC No. 16404)	Sabouraud Dextrose Broth; Sabouraud Dextrose Agar	22.5°C ± 2.5°	6 – 10 hari	3 – 7 hari

### 8.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Alat dan bahan

- Sediaan uji (larutan steril seperti cuci mata, tetes mata, dsb)
- Mikroba uji
- Media *Soybean-Casein Digest* atau *Sabouraud Dextrose Agar*
- Larutan NaCl fisiologis
- Colony counter
- Tabung reaksi, cawan petri

#### 2. Cara pengerjaan

- Inokulasikan masing-masing mikroba spesifik dari stok-biakan segar pada permukaan media agar yang sesuai
- Kondisi biakan untuk inokula dalam media yang sesuai yaitu *Soybean-Casein Digest* atau *Sabouraud Dextrose Agar*.
- Untuk memanen biakan bakteri dan *C.albicans* gunakan *salin LP* steril, cuci biakan yang tumbuh di permukaan, kumpulkan dalam wadah yang sesuai dan tambahkan *salin LP* steril secukupnya hingga diperoleh suspensi dengan jumlah mikroba lebih kurang  $1 \times 10^8$  koloni/ml.
- Untuk memanen biakan *A.niger* gunakan *salin LP* steril yang mengandung 0,05% *polisorbate 80 P* dan tambahkan *salin LP* steril secukupnya hingga diperoleh suspensi dengan jumlah mikroba lebih kurang  $1 \times 10^8$  koloni/ml.
- Cara lain, mikroba stok-biakan dapat ditumbuhkan dalam media cair yang sesuai (misalnya *Soybean Casein Digest Broth* atau *Sabouraud Dextrose Broth*) dan sel mikroba dipanen dengan cara sentrifus kemudian dicuci dan disuspensikan kembali dalam *salin LP* steril secukupnya hingga diperoleh suspensi dengan jumlah mikroba lebih kurang  $1 \times 10^8$  koloni per ml.
- Pengujian dapat dilakukan dalam tiap 5 wadah asli bila volume sediaan tiap wadahnya mencukupi dan wadah sediaan dapat ditusuk secara aseptik (dengan jarum dan alat suntik melalui tutup karet elastomerik), atau dalam lima wadah bakteriologi bertutup steril, berukuran mencukupi untuk volume sediaan yang dipindahkan.
- Inokulasi tiap wadah dengan satu inokula baku. Volume suspensi inokula yang digunakan antara 0,5% dan 1,0% dari volume sediaan.

- Kadar mikroba uji yang ditambahkan pada sediaan (*Kategori 1, 2, dan 3*) seperti halnya kadar akhir sediaan uji setelah diinokulasi antara  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  koloni/ml. Untuk sediaan *Kategori 4* (antasida) kadar akhir sediaan uji setelah inokulasi antara  $1 \times 10^3$  dan  $1 \times 10^4$  koloni/ml.
- Inkubasi wadah yang sudah diinokulasi pada  $22,5^\circ \pm 2,5^\circ\text{C}$ .
- Ambil sampel dari tiap wadah pada interval yang sesuai seperti pada *Tabel 3*
- Catat setiap perubahan penampilan yang diamati pada interval tersebut.
- Tetapkan dengan prosedur angka lempeng total jumlah koloni yang ada dari setiap sediaan uji untuk interval yang digunakan.
- Dengan menggunakan jumlah koloni/ml terhitung pada awal pengujian, hitung perubahan dalam nilai log jumlah koloni/ml untuk setiap mikroba yang digunakan pada setiap interval uji dan nyatakan sebagai log reduksi.

### 3. Interpretasi hasil

- Persyaratan untuk efektivitas antimikroba dipenuhi jika kriteria spesifik pada tabel dibawah ini dipenuhi: Tidak terjadi peningkatan lebih tinggi dari log 0,5 unit terhadap nilai log mikroba awal.

Jenis Mikroba	Kategori 1	Kategori 2	Kategori 3	Kategori 4
Bakteri	Hari 7 $\geq 1$ log reduksi dari jumlah koloni awal.  Hari 14 $\geq 3$ log reduksi dari jumlah koloni awal  Hingga hari ke-28 tidak ada peningkatan	-  Hari 14 $\geq 2$ log reduksi dari jumlah koloni awal  Hingga hari ke-28 tidak ada peningkatan	-  Hari 14 $\geq 1$ log reduksi dari jumlah koloni awal  Hingga hari ke-28 tidak ada peningkatan	-  -  Hari 14, 28 koloni tidak bertambah dari jumlah awal
Kapang dan Khamir	Hari 7, 14, 28 koloni tidak bertambah dari jumlah awal	Hari 14, 28 koloni tidak bertambah dari jumlah awal	Hari 14, 28 koloni tidak bertambah dari jumlah awal	Hari 14, 28 koloni tidak bertambah dari jumlah awal

## OBJEK IX

### PENENTUAN KOEFISIEN FENOL DARI POVIDONE IODIUM

#### 9.1 Tujuan Praktikum

1. Praktikan mampu melakukan uji penentuan koefisien fenol dari suatu sampel seperti desinfektan
2. Praktikan mampu menentukan besaran koefisien fenol suatu sampel seperti desinfektan

#### 9.2 Teori Dasar

Koefisien fenol dari suatu zat desinfektan ialah perbandingan antara enceran terbesar dari zat tersebut dengan enceran fenol, yang dapat mematikan bakteri dalam 10 menit, akan tetapi tidak mematikan dalam 5 menit. Sebagai bakteri seringkali dipakai *Salmonella typhi* ATCC 6539 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Contoh:

- Enceran terbesar dari suatu desinfektan, yang mematikan *S. aureus* dalam 10 menit, akan tetapi tidak mematikan dalam 5 menit, misalnya 1 : 350
- Enceran terbesar dari fenol dengan hasil yang sama ialah 1 : 90
- Koefisien fenol dari zat desinfektan tersebut ialah:  $350 / 90 = 3,89 = 3,9$

Zat-zat antimikroba yang dipergunakan untuk disinfeksi harus diuji keefektifannya. Cara untuk menentukan daya sterilisasi zat-zat tersebut adalah dengan melakukan tes koefisien fenol. Uji ini dilakukan untuk membandingkan aktivitas suatu produk (desinfektan) dengan daya bunuh fenol dalam kondisi tes yang sama. Berbagai pengenceran fenol dan produk yang dicoba dicampur dengan suatu volume tertentu biakan *Salmonella typhosa* atau *Staphylococcus aureus*. Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan bakteri dalam konsentrasi kecil. Berdasarkan hal ini maka perlu diketahui MIC (Minimum Inhibitor Concentration) dan MKC (Minimum Killing Concentration) bahan antimikroba terhadap mikroorganisme. Dalam praktikum MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah bahan antimikroba yang menghambat pertumbuhan. MIC merupakan petunjuk konsentrasi yang harus digunakan jika akan

membunuh mikroorganisme tertentu, seperti antiseptika desinfektan, obat antimikroba, dan bahan antibiotik.

### 9.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Keperluan

- Biakan *Salmonella typhii* dalam Nutrient Broth, atau biakan *Staphylococcus aureus* dalam Nutrient Broth yang berumur 22-26 jam hasil inkubasi pada 37°C
- Biakan ini selama 4 hari sebelumnya, tiap-tiap harus dipindahkan kedalam Nutrient Broth (kaldu) baru
- 24 tabung reaksi terisi dengan 10 ml Nutrient Broth steril
- 10 tabung reaksi steril (160 + 16 mm)
- 10 labu erlenmeyer 50 ml steril (atau alat sejenis)
- 200 ml air suling steril (disuling dengan alat-alat dari gelas)
- 1 pipet steril dari 1 ml
- 5 pipet steril dari 10 ml
- Larutan 5 % fenol
- Larutan 1 % Povidon Iodium

#### 2. Persiapan

- 5 tabung reaksi steril berturut-turut diberi tanda “fenol 1:70”, “fenol 1:80”, “fenol 1:90”, “fenol 1:100”, “fenol 1:110”.
- 5 tabung reaksi steril lainnya berturut-turut diberi tanda “PV 1:300”, “PV 1:350”, “PV 1:400”, “PV 1:450”.
- Tempatkan tabung-tabung tersebut dalam 2 deretan diatas rak. Masukkanlah dengan pipet steril dari 1 ml ke dalam masing-masing tabung itu 0,5 ml biakan *Salmonella typhii* atau *Staphylococcus aureus* pada dasarnya tanpa membasahi dindingnya.
- 10 labu erlenmeyer dari 50 ml steril diberi tanda-tanda seperti tabung reaksi diatas (1). Kedalam tiap-tiap erlenmeyer itu kemudian pipet steril dimasukkan air suling steril dalam jumlah seperti tercantum dalam daftar dibawah ini.

### Enceran Fenol

Enceran	Air Suling Steril (ml)	Fenol 1 : 20 (5%) (ml)
Fenol 1 : 70	10	4
Fenol 1 : 80	12	4
Fenol 1 : 90	14	4
Fenol 1 : 100	16	4
Fenol 1 : 110	18	4

### Enceran Povidon Iodium

Enceran	Air Suling Steril (ml)	PVI 1 : 100 (1%) (ml)
PVI 1 : 250	6	4
PVI 1 : 300	8	4
PVI 1 : 350	10	4
PVI 1 : 400	12	4
PVI 1 : 450	14	4

- Campurlah enceran-enceran tersebut dengan baik
  - 5 tabung reaksi terisi Nutrient Broth berturut-turut diberi tanda:  
*“Fenol 1 : 70,5 menit”----- “Fenol 1 : 110, 5 menit”*
  - 5 tabung reaksi terisi Nutrient Broth berturut-turut diberi tanda:  
*“Fenol 1 : 70, 10 menit”----- “Fenol 1 : 110, 10 menit”*
  - 5 tabung reaksi terisi Nutrient Broth berturut-turut diberi tanda:  
*“PVI 1 : 250, 5 menit”----- “PVI 1 : 450, 5 menit”*
  - 5 tabung reaksi terisi Nutrient Broth berturut-turut diberi tanda:  
*“PVI 1 : 250, 10 menit”----- “PVI 1 : 450, 10 menit”*
- Tabung-tabung tersebut ditempatkan dalam 2 deretan diatas rak lain.

### 3. Percobaan

- Masukkanlah dengan pipet steril 5 ml enceran “Fenol 1 : 110” ke dalam tabung yang diberi tanda sama dan yang sudah mengandung 0,5 ml biakan bakteri dan campurlah.
- Lihatlah pada saat itu pada “Stopwatch” yang sebelumnya telah dijalankan.

- Masukkanlah tepat 30 detik kemudian dengan pipet itu juga 5 ml enceran “fenol 1 : 100” kedalam tabung yang diberi tanda sama; tepat 30 detik setelah itu dengan enceran “fenol 1 : 90” dan seterusnya berturut-turut hingga “fenol 1 : 70”.
- Tepat 5 menit setelah tabung dengan tanda “fenol 1 : 110” diisi dengan enceran fenol, maka Ose dari cairan ini dimasukkan dalam tabung terisi Nutrient Broth yang telah diberi tanda “Fenol 1 : 110, 5 menit”.
- Lakukanlah penanaman dengan cara yang sama pada lain-lain tabung terisi dengan Nutrient Broth dan telah diberi tanda “Fenol 1 : 110” diisi dengan enceran fenol, maka pekerjaan seperti tersebut diatas dilakukan dengan tabung terisi Nutrient Broth dan diberi tanda “Fenol 1 : 110, 10 menit”, “Fenol 1 : 100, 10 menit” dan seterusnya.
- Pada tabung-tabung dengan Povidon Iodium dilakukan pekerjaan yang sama seperti dengan tabung-tabung fenol.
- Setelah selesai maka tabung-tabung terisi dengan Nutrient Broth diinkubasi pada suhu 37°C.
- Catatlah setelah 48 jam, dalam tabung mana ada pertumbuhan bakteri (+) dan dalam tabung mana keadaan tetap steril (0).

## **OBJEK X**

### **UJI STERILITAS SEDIAAN FARMASI**

#### **10.1 Tujuan Praktikum**

1. Praktikan mampu melakukan uji sterilitas pada sediaan farmasi yang dipersyaratkan harus steril menurut Farmakope Indonesia ed. V.
2. Praktikan dapat menentukan apakah suatu sediaan farmasi steril atau tidaknya dalam skala lab (bukan jaminan sterilitas menurut FI ed. V).

#### **10.2 Teori Dasar**

Sterilisasi adalah suatu proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada, sehingga jika ditumbuhkan di dalam suatu medium, tidak ada lagi jasad renik yang dapat berkembang biak. Sterilisasi harus dapat membunuh jasad renik yang paling tahan panas, yaitu spora bakteri. Steril menunjukkan kondisi yang memungkinkan terciptanya kebebasan penuh dari mikroorganisme dengan keterbatasan tertentu. Sedangkan aseptis menunjukkan proses atau kondisi terkendali dimana tingkat kontaminasi mikroba dikurangi sampai suatu tingkat tertentu dimana mikroorganisme dapat ditiadakan pada suatu produk.

Pada sediaan farmasi (air, padat, dan semi padat) dipersyaratkan terbebas dari mikroorganisme, terutama pada sediaan steril seperti sediaan parenteral (injeksi dan infus), obat tetes mata, obat luka bakar dan luka terbuka. Selain itu beberapa alat kesehatan juga dipersyaratkan untuk steril, misalnya berbagai alat kesehatan yang digunakan untuk bedah (kain kassa, kapas, dan benang bedah), selang infus, jarum suntik dan lain lain. Untuk menjamin sediaan farmasi terutama sediaan steril dan alat kesehatan terbebas dari mikroorganisme (steril), perlu dilakukan uji sterilitas.

Uji sterilitas adalah suatu pengujian yang dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya mikroorganisme hidup atau yang mempunyai daya hidup dalam suatu sediaan yang telah disterilkan. Prinsip uji sterilitas adalah menginokulasikan atau membiakan mikroorganisme yang terdapat didalam sediaan uji pada media perbenihan yang sesuai. Jika perkembangan mikroba terdeteksi dalam uji sterilitas, maka hal ini dapat mencerminkan pembacaan positif yang salah (*false-positive reading*) karena masalah kontaminasi aksidental dari media kultur

pada saat uji sterilitas berlangsung. Masalah kontaminasi aksidental adalah hal serius, merupakan batasan yang masih tidak dapat dihindari dari uji sterilitas.

Food and Drug Administration (FDA) menerbitkan pedoman mengenai prinsip umum dari proses validasi. Konsep umum dan elemen kunci dari proses validasi yang betul-betul dapat diterima oleh FDA telah diuraikan. Titik utama yang ditekankan pada pedoman adalah ketidakcukupan kepercayaan dari uji sterilitas sediaan akhir dalam memastikan sterilitas dari kumpulan sediaan parenteral steril. Arti yang lebih besar harus ditempatkan pada validasi proses semua sistem yang terlibat dalam produksi hasil akhir.

Ada beberapa metode uji sterilitas

1. *Direct inoculation of culture medium*

Meliputi pengujian langsung dari sampel dalam media pertumbuhan. Menurut *British Pharmacopoeia*:

- *Tioglycolat liquid medium*

Media tioglikolat cair yang mengandung glukosa dan Na Tioglikolat cocok untuk pembiakan aerob, dengan suhu inkubasi 30-35°C.

- *Soya bean casein digest medium*

Media ini membantu pertumbuhan bakteri anaerob dan fungsi. Suhu inkubasi 30-35°C, sedang fungi 20-25°C.

2. Membran filtrasi

Teknik yang banyak direkomendasikan farmakope, meliputi filtrasi cairan melalui membran steril. Filter lalu ditanam dalam media. Masa inkubasi 7-14 hari karena mungkin organisme perlu adaptasi dulu.

3. Introduction of concentrate culture medium

Medium yang pekat langsung dimasukkan dalam wadah sampel yang akan ditumbuhkan. Tidak banyak digunakan, hanya dipakai bila ada kecurigaan akan adanya bakteri.

### 10.3 Prosedur Percobaan

#### 1. Persiapan media

- Media yang dapat digunakan adalah media cair Tioglikolat (untuk bakteri anaerob) dan media *Soybean-Casein Digest Medium* (untuk pertumbuhan

kapang dan bakteri aerob).

## 2. Uji sterilitas media

- Inkubasi sebagian media di inkubator selama 14 hari. Tidak boleh ada pertumbuhan mikroba.

## 3. Pembuatan larutan pengencer dan pembilas metode penyaringan membran

- Cairan A: larutkan 1 gr *peptic digest of animal tissue* dalam air hingga 1 liter, jika perlu saring atau sentrifus hingga jernih, atur pH hingga  $7,1 \pm 0,2$ . Bagikan ke dalam wadah-wadah, dan sterilisasi.
- Cairan D: Untuk setiap liter *Cairan A* tambahkan 1 ml *polisorbat 80 P*, atur pH hingga  $7,1 \pm 0,2$ , bagikan ke dalam wadah-wadah, dan sterilisasi menggunakan proses yang telah divalidasi. Gunakan cairan ini untuk bahan uji yang mengandung lesitin atau minyak, atau untuk alat kesehatan yang beretiket lumen steril.
- Cairan K: Larutkan 5,0 g *peptic digest of animal tissue*; 3 g *beef extract* dan 10 g *polisorbat 80 P*, dalam air hingga 1 L. Atur pH hingga setelah sterilisasi  $6,9 \pm 0,2$ . Bagikan ke dalam wadah-wadah, dan sterilisasi.

## 4. Jumlah bahan yang akan diuji

- Dapat dilihat di FI V halaman 1344. 5% dari 2 wadah tetes mata steril volume kecil dari 40 ml. Maka digunakan 4 ml untuk pengujian

## 5. Metode

- Sampel uji dapat diuji dengan 2 metode yaitu inokulasi langsung ke dalam media atau menggunakan metode penyaringan membran. Sesuai FI edisi V, larutan yang mengandung antibiotika atau memiliki sifat antimikroba diuji dengan metode inokulasi langsung

## 6. Pengerjaan

- 4 ml sampel tetes mata steril di inokulasikan langsung ke media *Soybean Casein Digest Medium*.
- Inkubasi selama maksimal 5 hari dan amati pertumbuhan mikroba.
- Pada akhir periode inkubasi amati secara visual adanya pertumbuhan mikroba dalam media. Jika bahan uji menimbulkan kekeruhan pada media sehingga tidak dapat ditetapkan secara visual ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba, pindahkan sejumlah media (tiap tabung tidak kurang dari 1 ml) ke dalam

media segar yang sama, kemudian inkubasi bersama-sama tabung awal selama tidak kurang dari 4 hari.

- Jika tidak terjadi pertumbuhan mikroba, maka bahan uji memenuhi syarat sterilitas. Jika terbukti terjadi pertumbuhan mikroba, maka bahan uji tidak memenuhi syarat sterilitas.

## LAMPIRAN

### PENGUNAAN ALAT

#### 1. Penggunaan Autoklaf

Banyak macam autoklaf yang tersedia di pasaran. Gunakanlah instruksi pemakaian dari pabrik pembuatnya. Autoklaf dipakai untuk sterilisasi dan medium. Waktu sterilisasi pada saat suhu dan tekanan yang diperlukan sudah tercapai. Matikan aliran listrik ke autoklaf jika waktu sterilisasi telah selesai dan biarkan tekanan turun sampai jarum penunjuk tekanan menunjukkan angka 0 (nol). Keluarkan semua larutan dan medium yang sudah steril.

Jangan mempercepat pengeluaran uap untuk menurunkan tekanan, karena dapat mengakibatkan terlepasnya sumbat kapas pada lab atau tabung atau muncratnya larutan hingga membasahi kapas.

#### 2. Penggunaan oven

Oven dipakai untuk sterilisasi alat-alat gelas yang sebelumnya sudah dibungkus dengan kertas koran/aluminium foil. Suhu oven dapat mencapai 200°C, untuk sterilisasi cukup digunakan suhu 160°C selama 2 jam, sebab pada suhu 170°C kertas pembungkus dan kapas sudah mulai gosong. Peralatan gelas yang belum kering betul sesudah dicuci jangan dibungkus dan disterilkan karena dapat menyebabkan keretakan gelas. Pintu oven jangan dibuka sebelum suhunya turun sampai suhu kamar, ini untuk menghindari retaknya gelas atau masuknya udara yang mengandung partikel debu.

#### 3. Penggunaan Mikroskop

Mikroskop merupakan alat bantu utama dalam praktikum mikrobiologi. Tanpa mikroskop tidak dapat mengamati mikroba terutama bakteri, jamur dan beberapa mikro *algae* yang ukurannya sangat kecil secara baik dan benar. Jenis mikroskop yang dapat digunakan bermacam-macam tergantung pada tujuan dan jenis pengamatan. Mikroba yang terlihat dengan mikroskop mengalami perbesaran antara 100 sampai 1000 kali (dengan mikroskop biasa), kecuali dengan mikroskop elektron, perbesaran dapat mencapai 20.000 kali.

Ada 2 dasar yang berbeda untuk mikroskop, yaitu (1) mikroskop optik dan (2) mikroskop electron. Mikroskop optik lebih sering digunakan dan sudah banyak dimiliki.

Mikroskop optik perlu dibedakan antara mikroskop biologi dan mikroskop stereo. Mikroskop biologi digunakan untuk mengamati benda-benda tipis dan transparan. Jika yang diamati tebal (misal jaringan), harus dibuat sayatan terlebih dahulu yang tipis. Benda yang diamati biasanya diletakan diatas kaca objek, dalam medium air dan ditutup Balsam Kanada. Penyinaran diberikan dari bawah oleh sinar alam atau lampu. Objektif yang paling kuat untuk mikroskop optik adalah 100 x yang disebut objektif minyak emerasi, karena penggunaannya harus dengan minyak emerasi.

Perbesaran yang sering terdapat pada mikroskop biologi adalah sebagai berikut:

- a. Objektif 4x, okuler 10x, perbesaran total 40x.
- b. Objektif 10x, okuler 10x, perbesaran total 100x.
- c. Objektif 40x, okuler 10x, perbesaran total 400x.

(1) Mikroskop Stereo, digunakan untuk pengamatan benda-benda yang tidak terlalu halus, dapat tebal, maupun tipis, transparan maupun tidak, mempunyai sifat sebagai berikut:

- a. Mempunyai 2 objektif dan 2 okuler, agar didapat bayangan 3 dimensi dari 2 mata.
- b. Perbesaran tidak terlalu kuat tetapi lebih diutamakan adalah medan pandang yang luas dan jarak kerja yang panjang. Dengan demikian benda yang diamati cukup jauh, sehingga mikroskop ini dapat dipakai untuk pembedahan.
- c. Benda yang diamati dapat kering atau dalam medium cair, dapat tebal atau tipis. Pada mikroskop stereo yang dipesan khusus penyinaran dapat diatur dari atas maupun dari bawah.
- d. Mikroskop stereo mempunyai perbesaran:
  - Objektif 1 x atau 2 x
  - Okuler 10 x atau 15 x perbesaran total sampai 30 x

Bagian-bagian utama pada mikroskop adalah:

(1) Lensa terdiri dari lensa okuler, yaitu lensa yang paling dekat dengan mata kita. Perbesarannya ada yang 6 x, ada yang 10 x. lensa objektif, yang terletak pada revolver pada ujung seberang lensa okuler. Jumlahnya biasanya lebih dari satu, sesuai dengan banyaknya perbesaran 4x, 10x, 40x, dan 100x.

- (2) Meja mikroskop, yang dilengkapi dengan penjepit kaca objek. Meja digunakan untuk menyimpan objek yang diamati.
- (3) Kondensor, letaknya dibawah meja mikroskop. Terdiri dari alat pengatur cahaya intensitas cahaya yang masuk sesuai dengan yang diinginkan kedua alat ini dapat diatur sesuai kebutuhan.
- (4) Cermin, yang terletak dibawah kondensor dan lampu listrik. Cermin sebagai alat penangkap sinar, bila mikroskop tidak menggunakan cahaya listrik untuk sumber cahaya. Lampu listrik merupakan sumber cahaya langsung.

#### Prosedur Pemakaian Mikroskop

- (1) Periksa keadaan mikroskop, kelengkapan lensa, ada atau tidaknya kerusakan (tercatat dalam label mikroskop).
- (2) Nyalakan lampu mikroskop
- (3) Lakukan pengamatan tanpa objek yang dipasang pada meja mikroskop. Aturlah diafragma agar cahaya yang masuk sedikit atau banyak.
- (4) Setelah cahaya masuk lancer, letakkan sebuah objek pada meja mikroskop, jepit dengan baik.
- (5) Pasanglah lensa objektif 4x, amati objek yang ada kemudian atur focus dengan kasar, lalu pertajam gambar bayangan dengan pengatur focus halus. Kemudian lensa objektif diganti dengan perbesaran 10x, atur focus dengan pengatur focus halus. Lensa objektif ganti lagi dengan perbesaran 40x, atur lagi focus untuk mendapatkan gambar yang baik. Bila penggunaan lensa objektif 100x hendaknya saudara berhati-hati dan gunakan pengatur halus saja. Juga harus selalu digunakan minyak imersi, yang berfungsi sebagai pengatur indek bias. Karena jarak lensa yang sangat dekat dengan objek, maka sinar yang masuk tidak akan dibiaskan kearah lain sehingga tidak melewati objek, akibatnya tidak akan didapat gambar yang baik. Minyak emersi diletakkan pada objek yang akan diamati cukup 1 tetes. Setelah memperoleh gambar yang baik dengan perbesaran 40x, gunakan sekali lagi focus halus untuk mempertajam gambar.
- (6) Bila telah selesai mengamati dengan minyak emersi, bersihkan minyak tadi dengan menggunakan larutan xylol yang diteteskan pada kapas. Usap semua lensa objektif dengan kapas yang berxylol tadi. Hati-hati dengan xylol karena banyak bahan yang akan mudah larut dalam xylol.

## LARUTAN PENGECER MIKROBIOLOGI

1. Air pepton 0,1 %

Lihat pepton dilution Fluid (PDF)

2. Air Suling Agar 0,05 %

Pembuatan: 0,5 g agar dilarutkan dalam 1000 ml air suling, didihkan sambil diaduk hingga larut sempurna. Disterilkan dalam autoklaf pada 121°C selama 20 menit.

3. Dapar fosfat, larutan (LDF) pH 6,0.

4. Komposisi:       Dikalium Hidrogen Fosfat 2,0 g

                          Kalium Dihidrogen Fosfat 9,0 g

                          Air sampai 1000 ml

                          pH = 6,0 ± 0,05

Pembuatan       : Bahan-bahan dilarutkan sempurna dalam 750 ml air dan diatur dengan larutan 10 N Kalium Hidroksida/ larutan 18 N asam Fosfat hingga pH= 6,0 ± 0.05. dicukupkan dengan air hingga 1000 ml dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu-suhu 121°C selama 15 menit.

Penggunaan     : Larutan dapar Fosfat yang telah disterilkan, didinginkan hingga Suhu kamar dan digunakan sesuai kebutuhan.

Penyimpanan    : Larutan dapar Fosfat yang telah disterilkan, disimpan pada suhu kamar.

5. Dapar fosfat, Larutan (LDH) pH 8,0

Komposisi:       Dikalium Hidrogen Fosfat    16,730 g

                          Kalium Dihidrogen Fosfat    0,523 g

                          Air sampai 1000 ml

                          pH = 8,0 ± 0,1

Pembuatan       : Bahan-bahan dilarutkan sempurna dalam air dan diatur dengan larutan 10 N Kalium Hidrosida/larutan 18 N asam fosfat hingga pH 8,0 ± 0,1. Dicukupkan dengan air hingga 1000 ml dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Penggunaan     : Larutan dapar fosfat yang telah disterilkan, didinginkan hingga

suhu kamar dan digunakan sesuai kebutuhan.

Penyimpanan : Larutan dapar fosfat yang telah disterilkan, disimpan pada suhu kamar.

6. Dapar Fosfat, Larutan (LDH) pH 8,0

Komposisi: Dikalium Hidrogen Fosfat 16,730 g  
Kalium Dihidrogen Fosfat 0,523 g  
Air sampai 1000 ml  
pH= 8,0 ± 0,1

Pembuatan : Bahan-bahan dilarutkan sempurna dalam air dan diatur dengan larutan 10 N Kalium Hidrosida/larutan 18 N asam fosfat hingga pH 8,0 ± 0,1. Dicukupkan dengan air hingga 1000 ml dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Penggunaan : Larutan dapar Fosfat yang telah disterilkan, didinginkan hingga suhu kamar dan digunakan sesuai kebutuhan.

Penyimpanan : Larutan dapar Fosfat yang telah disterilkan, disimpan pada suhu kamar.

7. Dapar Fosfat Fisiologik.

Larutan A

Komposisi : Natrium Klorida 8 g  
Kalium Klorida 0,2 g  
Ca Cl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 0,132 g  
Mg Cl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 0,1 g  
Air bebas mineral 800 ml

Pembuatan : Masing-masing zat dilarutkan dalam air bebas mineral secara berurutan.

Larutan B

Komposisi : Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 1,15 g  
K HPO<sub>4</sub> 0,2 g  
Air bebas mineral 200 ml

Pembuatan : Masing-masing zat dilarutkan kedalam air bebas mineral secara

berurutan.

Larutan A dan Larutan B secara terpisah dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah dingin kedua larutan dicampur secara aseptis dan pH harus 7,0. Sterilitas larutan harus diuji dengan menginokulasikan pada medium agar darah kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Tidak boleh ada pertumbuhan pada medium tersebut.

#### 8. Pepton Dilution Fluid (PDF)

- Pembuatan : 1 gr Pepton dilarutkan dalam 100 ml air suling dan diukur pH  $7,0 \pm 0,1$ . Diisikan kedalam tabung dengan volume tertentu, kemudian disterilkan pada suhu 121° C selama 15 menit, dengan autoklaf.
- Penggunaan : Larutan Pepton Dilution Fluid yang telah disterilkan, didinginkan sampai suhu kamar kemudian digunakan sesuai dengan kebutuhan.
- Penyimpanan : Larutan Pepton Dilution Fluid yang telah disterilkan jika tidak digunakan disimpan pada suhu kamar.

## PEREAKSI MIKROBIOLOGI

1. Asam Sulfanilat, larutan.

Pembuatan : Sejumlah 8 g asam sulfanilat dilarutkan dalam 1000 ml asam asetat 5 N

Penggunaan : Untuk uji nitrat pada clostridium perfringens.

Penyimpanan : Dalam botol kaca tertutup rapat.

2. Kalium Hidroksida (KOH) 40 % larutan

Pembuatan : Sejumlah 40 g kalium hidroksida dilarutkan dalam 100 ml air.

Penggunaan : Untuk uji voges Proskauer.

Penyimpanan : Dalam botol kaca tertutup rapat.

3. A-naftol 0,5 % larutan.

Pembuatan : Sejumlah 5 g  $\alpha$ -Naftol dilarutkan dalam 1000 ml etanol mutlak.

Penggunaan : Untuk uji nitrat pada clostridium perfringens

Penyimpanan : Dalam botol berwarna coklat dan tertutup rapat.

4.  $\alpha$ -Naftol 5 % larutan

Pembuatan : Sejumlah 5 g  $\alpha$ -Naftol dilarutkan dalam 100 ml etanol mutlak

Penggunaan : Untuk uji voges Proskauer.

Penyimpanan : Dalam botol berwarna coklat dan tertutup rapat.

5. Pewarnaan Gram, larutan.

a. Larutan kristal violet

Komposisi:	Kristal Violet (85-90 % pewarna)	2 g
	Etil Alkohol (95 %)	20 g
	Ammonium Oksalat	0,8 g
	Air Suling	80 ml

Pembuatan : Kristal violet dilarutkan dalam etil alkohol dan ditambahkan ammonium oksalat, kemudian ditambahkan air, larutan tersebut disimpan selama 24 jam sebelum digunakan.

Penyimpanan : Disimpan pada suhu kamar.

b. Larutan Lugol

Komposisi:	Iodine ( Iod-12 )	1 g
	Potassium Iodide (KI)	2 g
	Air suling	300 ml

Pembuatan : Potassium Iodide ditambah 2 ml air suling digerus dalam mortar kemudian ditambahkan iodine dan digerus lagi. Sedikit demi sedikit ditambah air hingga larut semua.

Penyimpanan : Disimpan pada suhu kamar

c. Larutan Safranin

Komposisi:	Safranin O	0,25 g
	Etil Alkohol	10 ml
	Air suling	100 ml

Pembuatan : Safranin dilarutkan dalam etil alkohol, kemudian dilarutkan dalam air.

Penyimpanan : Disimpan pada suhu kamar.

