

**MODUL PRAKTIKUM**  
**MIKROBIOLOGI FARMASI**

**(FARF406)**



**Tim Penyusun:**  
**apt. Catharina Apriyani W H, M.Farm**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**  
**SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO**  
**YOGYAKARTA**  
**2024**

## KATA PENGANTAR

Modul Praktikum Mikrobiologi Farmasi adalah petunjuk tata laksana matakuliah Praktikum Mikrobiologi Farmasi (FARF406) yang harus ditempuh oleh mahasiswa semester 2 Program Studi S1 Farmasi STIKES Notokusumo Yogyakarta tahun ajaran 2023/2024. Panduan ini bukan merupakan referensi yang dapat dijadikan Pustaka baku untuk sebuah makalah ataupun laporan, dengan demikian mahasiswa diharapkan untuk tetap mempelajari buku-buku referensi sekunder lain terkait keilmuan Mikrobiologi Farmasi guna menambah pengetahuan dan memperkuat pemahaman atas ilmu yang dipelajari dan praktikum yang dikerjakan.

Modul panduan praktikum mikrobiologi farmasi ini merupakan pengembangan berbagai referensi yang tercantum dalam daftar pustaka, dalam rangka memberikan bekal keterampilan dan keilmuan yang relevan bagi mahasiswa S1 Farmasi STIKES Notokusumo Yogyakarta. Namun demikian, masih terdapat banyak kekurangan dan masih memerlukan penyempurnaan lebih lanjut. Untuk itu, berbagai hal yang belum terakomodir dalam modul ini, akan diatur kemudian dalam proses pembelajaran Praktikum Mikrobiologi Farmasi. Selain itu, sangat diharapkan kritik dan saran bagi kelengkapan dan perbaikan modul ini.

Sebagai penutup, penyusun mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah ikut membantu dalam mewujudkan modul praktikum ini.

Tim penyusun

apt. Catharina Apriyani W H, M.Farm

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	2
DAFTAR ISI .....	3
TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI.....	4
LAPORAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI.....	6
PRAKTIKUM 1.....	9
Pengenalan Alat .....	9
PRAKTIKUM 2.....	17
Teknik Sterilisasi .....	17
PRAKTIKUM 3.....	22
Pembuatan Media dan Pemindah Biakan Media .....	22
PRAKTIKUM 4.....	26
Teknik Isolasi Bakteri.....	26
PRAKTIKUM 5.....	30
Uji Angka Lempeng Total .....	35
PRAKTIKUM 6.....	37
Uji Angka Kapang Khamir .....	37
PRAKTIKUM 7.....	30
Pengamatan Bakteri, Jamur dan Yeast .....	30
PRAKTIKUM 8.....	32
Teknik Pengecatan .....	32
PRAKTIKUM 9.....	39
Uji Sensitivitas Antibiotik Metode Kirby-Bauer.....	39
PRAKTIKUM 10.....	40
Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Bahan Alam .....	40
Pustaka Acuan.....	42

## TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

1. Peserta praktikum (praktikan) Mikrobiologi Farmasi adalah mereka yang telah terdaftar di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, STIKES Notokusumo Yogyakarta.
2. Praktikan harus bersikap baik dalam menjalankan praktikum:
  - a. Berpakaian rapi, bersepatu, tidak diperkenankan memakai sandal kecuali dengan alasan yang dapat diterima.
  - b. Keluar masuk ruangan harus berdasar izin dari asisten praktikum yang sedang bertugas.
  - c. Menjaga kebersihan ruang praktikum dengan tidak membuang sampah sembarangan.
3. Praktikan diwajibkan memakai jas lab dengan memakai pakaian yang sopan dan rapi selama praktikum berlangsung (dilarang makan, memakai sandal dan atau kaos oblong serta tidak boleh merokok).
4. Sebelum pelaksanaan praktikum, hendaknya praktikan telah memahami dan menguasai acara praktikum yang akan dilaksanakan.
5. Setiap praktikan (peserta praktikum) harus sudah menyiapkan alat-alat yang harus dipersiapkan sebelum praktikum dimulai.
6. Praktikan harus datang 15 menit sebelum jadwal praktikum dimulai dan mengenakan jas praktikum. Praktikan yang **datang terlambat** lebih dari 15 menit tidak diperkenankan mengikuti kegiatan praktikum.
7. Mempelajari materi praktikum baik teori yang mendasari percobaan, tujuan dan prosedur percobaan.
8. Membuat **Laporan Sementara** sebagai syarat mengikuti praktikum dan mengikuti **Pretest** sebelum praktikum dimulai.
9. Memastikan alat gelas yang digunakan dalam praktikum harus sudah dibersihkan sebelum dan sesudah digunakan.
10. Selama praktikum berlangsung, praktikan wajib menjaga ketertiban dan ketenangan laboratorium dan wajib melaporkan alat-alat yang rusak dan pecah ke laboran atau dosen serta mengganti peralatan yang rusak atau pecah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.


11. Selama pelaksanaan praktikum, praktikan tidak diperkenankan meninggalkan ruang praktikum tanpa ijin dosen.
12. Setelah selesai praktikum, praktikan wajib merapikan dan membersihkan kembali peralatan dan tempat praktikum sesuai ketentuan yang berlaku.
13. **Tidak ada inhal.** Bagi praktikan yang berhalangan hadir karena alasan sakit atau tugas prodi/institusi diberi kesempatan untuk mengikuti praktikum golongan lainnya (dengan catatan praktikum golongan lain belum berlangsung) dengan meminta ijin kepada koordinator praktikum.
14. Untuk mengikuti praktikum berikutnya diharuskan sudah menyerahkan **Laporan Akhir** dari acara praktikum minggu sebelumnya. Bila pada saat itu belum menyerahkan laporan, nilai laporan sama dengan **NOL**.
15. Praktikan wajib mengikuti **Responsi** praktikum setelah semua materi praktikum dilaksanakan.
16. Hal-hal yang belum dinyatakan dalam aturan ini dan sekiranya diperlukan demi kemajuan dan ketertiban acara praktikum Mikrobiologi Farmasi akan ditentukan kemudian dengan kesepakatan bersama.

## LAPORAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

1. Laporan Praktikum Mikrobiologi terdiri dari 2 jenis, yaitu: **Laporan Sementara dan Laporan Akhir.**
2. Laporan sementara dikerjakan secara individu (ditulis tangan kecuali cover dan disahkan oleh dosen praktikum). Laporan sementara ini menjadi syarat praktikan mengikuti praktikum pada hari itu. Laporan sementara dikerjakan pada kertas HVS ukuran A4 dengan sistematika sebagai berikut:
  - a. Cover di print (dengan ketentuan seperti contoh)
  - b. Tujuan praktikum
  - c. Dasar Teori
  - d. Alat dan Bahan
  - e. Skema Kerja
3. Laporan Akhir ditulis tangan pada kertas HVS ukuran A4 dan dijadikan satu dengan laporan sementara yang sudah disahkan oleh dosen praktikum. Format dalam laporan akhir ini merupakan lanjutan dari laporan sementara yang sudah dibuat, dengan sistematika sebagai berikut:
  - f. Hasil Pengamatan
  - g. Pembahasan
  - h. Kesimpulan
  - i. Daftar Pustaka
4. Komponen penilaian acara praktikum, meliputi :
  - a. Pre/post test : 20 %
  - b. Laporan Sementara : 10 %
  - c. Laporan Akhir : 20 %
  - d. Responsi : 40 %
  - e. Sikap : 10 %

## CONTOH FORMAT LAPORAN PRAKTIKUM

**COVER :** (Diisi acara praktikum yang dilaksanakan sesuai panduan)

<p style="text-align: center;"><b>LAPORAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Judul Mata Praktikum (Hari, tanggal praktikum)</b></p> <p>Nama : NIM : Dosen Pengampu :</p> <p style="text-align: center;"><b>PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA 2021</b></p>
---

- A. TUJUAN :** (Diisi tujuan dari mata acara praktikum)
- B. DASAR TEORI :** (Diisi teori-teori dari pustaka yang mendasari materi mata acara praktikum tersebut)
- C. ALAT DAN BAHAN :** (diisi alat dan bahan yang digunakan tiap mata praktikum)
- D. SKEMA KERJA :** (Diisi skema kerja secara sistematis langkah-langkah penelitian dengan jelas dan lengkap)

Contoh:

Kentang dikupas lalu dibersihkan, diiris sepanjang 1 cm kemudian dimasak dalam 500 ml aquadest dan dibiarkan mendidih, dijaga agar volumenya tetap



Kemudian ekstraknya disaring, diperas, dan diambil filtratnya.



Kemudian dekstrose ditambahkan beserta agar-agar dan aquadest, dipanaskan dengan api sedang sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. pH diatur antara 5-6



Kemudian dimasukkan pada tabung reaksi/erlenmeyer dan ditutup kapas yang telah dibungkus oleh kain kassa



Disterilkan dengan autoklaf

- E. HASIL PENGAMATAN** : (tuliskan hasil pengamatan, bila perlu disertai gambar, kurva, tabel dsb beserta keterangannya)
- F. PEMBAHASAN** : (pembahasan disesuaikan dengan data hasil pengamatan, hasil diskusi dengan dasar acuan pustaka)
- G. KESIMPULAN** : (berisi kesimpulan dari pembahasan yang ditulis singkat 1 paragraf)
- H. DAFTAR PUSTAKA** : (tuliskan pustaka yang dijadikan acuan dan dibuat di halaman tersendiri sebagai halaman paling belakang)



# **PRAKTIKUM 1**

## **PENGENALAN ALAT**

### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu mengenal nama-nama alat dan memahami fungsi alat-alat tersebut yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi
2. Mahasiswa mampu menggunakan alat-alat dalam praktikum mikrobiologi dengan tepat dan benar

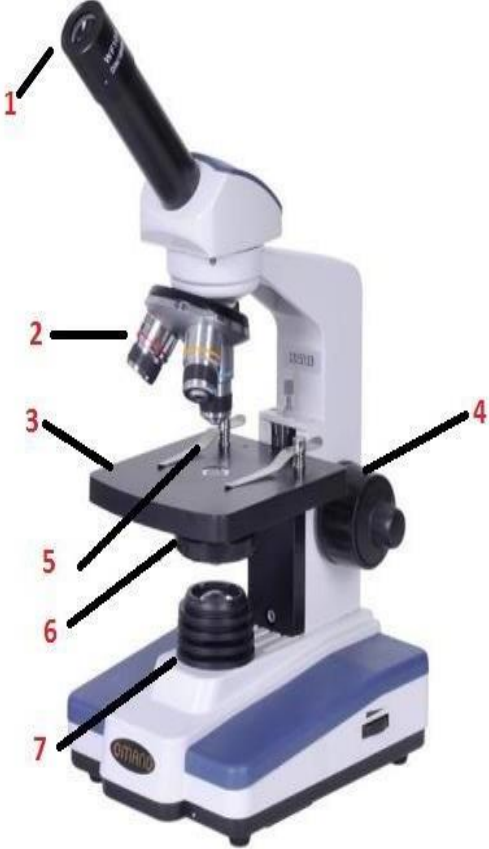
### **DASAR TEORI**

Praktikum mikrobiologi merupakan praktikum yang berhubungan dengan mikroba sehingga memerlukan beberapa alat yang mendukung pelaksanaannya seperti autoklaf, mikroskop, dll. Berikut beberapa alat-alat mikrobiologi yang perlu dikenal: mikroskop, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), jarum oase, jarum enten oase, spreader, tabung reaksi, oven, inkubator, *colony counter*, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, cawan petri, tabung reaksi dan lampu Bunsen.

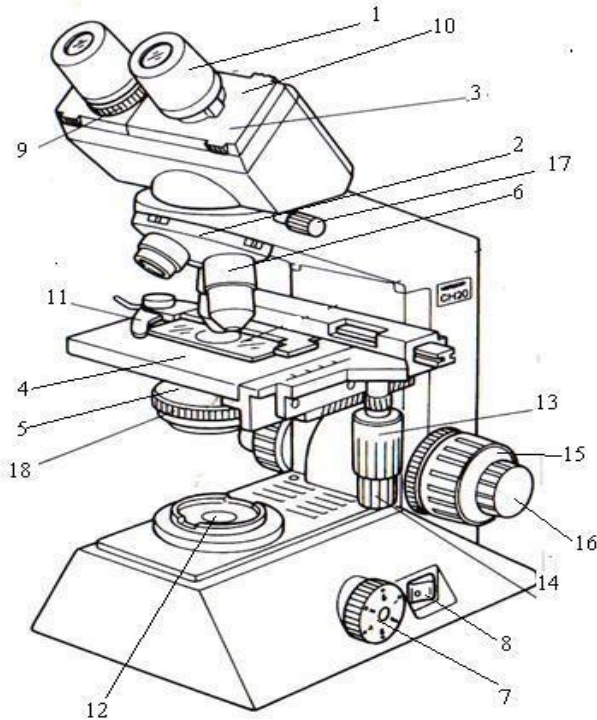
### **PROSEDUR KERJA**

1. Simulasi/demo alat dan penjelasan mengenai cara kerja dan fungsi alat
2. Praktek penggunaan alat dengan benar sesuai dengan fungsinya

## ALAT DAN FUNGSINYA

<b>1. Mikroskop</b>	Mikroskop digunakan untuk mengamati mikroorganisme yang sangat kecil ukurannya.
<p><u>Mikroskop Monokuler</u></p> 	Bagian-bagian mikroskop monokuler: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Lensa okuler untuk memperbesar bayangan yang terbentuk oleh lensa objektif, letaknya dekat dengan mata pengamat.</li><li>2. Lensa objektif yang terletak dekat dengan objek, digunakan untuk memperbesar spesimen</li><li>3. Meja benda/obyek tempat meletakkan specimen</li><li>4. Micrometer pengatur fokus kasar (untuk memfokuskan bayangan sekrap, untuk menaikkan dan menurunkan meja benda)</li><li>5. Penjepit preparat</li><li>6. Pengatur intensitas cahaya</li><li>7. Sumber cahaya</li></ol>

### Mikroskop Binokuler



### Bagian-bagian mikroskop binokuler:

1. Lensa okuler (*eyepiece*)
2. Pemutar lensa objektif (*revolving nosepiece*) untuk memutar lensa objektif sehingga mengubah perbesaran
3. Tabung pengamatan (*observation tube*)
4. *Stage* (meja benda) untuk menempatkan specimen
5. Condensor untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. Lensa objektif
7. *Brightness adjustment knob* (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
8. *Main switch* (tombol *on-off*)
9. *Diopter adjustmet ring* (cincin pengatur diopter), untuk menyamakan fokus antara mata kanan dan kiri
10. *Interpupillar distance adjustment knob* (pengatur jarak interpupillar)
11. *Spesimen holder* (penjepit spesimen), untuk menjepit spesimen agar tidak bergerak/berubah tempat
12. *Illuminator* (sumber cahaya)
13. *Vertical feed knob* (sekrup pengatur vertikal), untuk menaikkan atau menurunkan *object glas*
14. *Horizontal feed knob* (sekrup pengatur horizontal), untuk menggeser ke kanan/kiri objek *glas*
15. *Coarse focus knob* (sekrup fokus kasar), untuk menaikturunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat
16. *Fine focus knob* (sekrup fokus halus), untuk menaikturunkan meja benda secara halus dan lambat
17. *Observation tube securing knob*
18. Sekrup pengencang tabung okuler
19. *Condenser adjustment knob* (sekrup pengatur kondenser), untuk menaikturunkan kondenser

Cara menghitung kekuatan perbesaran lensa :  
 Ukuran spesimen yang diamati dapat diperoleh dengan mengalikan perbesaran lensa okuler dengan lensa objektif.

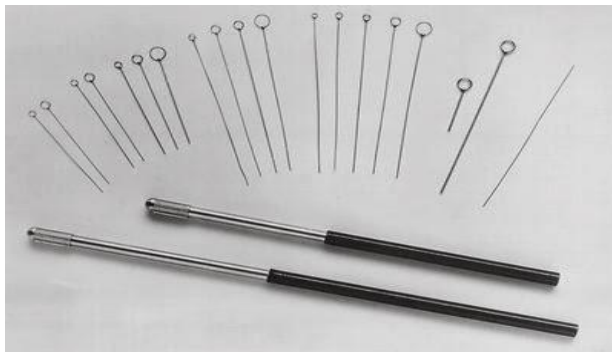
$$P = \text{Okuler} \times \text{Objektif}$$

**2. Laminar Air Flow (LAF) atau Biological Safety Cabinet (BSF)**



Alat ini berfungsi untuk proses sterilisasi (bekerja secara aseptis) karena alat ini memiliki pola pengaturan dan penyaringan aliran udara sehingga dihasilkan proses yang steril.

**3. Jarum Oase/Loop/Inokulum**



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

*Inoculating loop* cocok untuk melakukan *streak* di permukaan agar, sedangkan *inoculating needle* cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*).

**4. Jarum Enten Oase**



Alat ini digunakan untuk mengambil mikroba berupabiakan jamur/fungi.

**5. Spreader atau Batang Bengkok ataubatang Drigalsky**



Alat ini digunakan untuk menanam bakteri/mikroba dengan cara sebar/pulasan

**6. Tabung Durham**



Tabung Durham digunakan untuk memindahkan, mencampurkan dan melihat mikroba maupun media dalam ukuran kecil.

**7. Autoklaf**



- Merupakan alat yang digunakan untuk sterilisasi alat, bahan atau media tertentu dengan menggunakan uap panas bertekanan.
- Alat ini menggunakan uap air panas bertekanan kira 2 atm (15 Psi) dengan lama sterilisasi umumnya 15 menit dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi<sup>2</sup> (15 Psi = 15 pounds per square inch)

**8. Oven**



Oven adalah alat yang digunakan untuk sterilisasi alat dan bahan dengan menggunakan udara kering.

**9. Inkubator**



Inkubator merupakan alat yang digunakan untuk menginkubasi mikroba pada suhu tertentu. Inkubator digunakan untuk menumbuhkan bakteri, jamur dan menyimpan biakan murni pada suhu rendah. Inkubator memiliki sekat kaca antara bagian dalam inkubator dan pintu yang fungsinya untuk melihat biakan mikroba tanpa membuka sekat dalam, sehingga kondisi dalam inkubator tetap terjaga. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu pada inkubator adalah 10-70°C

**10. Colony Counter**



Merupakan alat yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri. Alat ini berguna untuk mempermudah penghitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan karena adanya kaca pembesar. Selain itu, alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni yang sangat banyak. Jumlah koloni pada cawan Petri dapat ditandai dan dihitung secara otomatis yang dapat di-reset.

<p><b>11. Lemari Pendingin</b></p> 	<p>Merupakan alat yang digunakan untuk menyimpan media atau specimen/bahan agar mutu ataupun isi tidak berubah. Lemari pendingin juga dapat digunakan untuk menyimpan cakram antibiotic yang belum dipakai agar tidak berubah.</p>
<p><b>12. Hotplate atau Stirer Bar (Magnetic Stirrer)</b></p> 	<p>Alat ini digunakan untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat yang terdapat pada alat ini dapat dipanaskan hingga mampu berfungsi untuk mempercepat proses pengadukan dan homogenisasi. Alat ini dapat menghomogenkan 10 L larutan, dengan kecepatan lambat sampai 160 rpm dan dipanaskan sampai 425<sup>0</sup>C.</p>
<p><b>13. Cawan Petri dan Tabung Reaksi</b></p> 	<p><b>Cawan Petri (a)</b> berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroba</p> <p><b>Tabung reaksi (b)</b> digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil.</p>

#### 14. Lampu Bunsen



**Lampu Bunsen** memiliki fungsi untuk menciptakan kondisi yang steril.

Sterilisasi jarum Ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas).

Lampu Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas, alkohol, spiritus



## **PRAKTIKUM 2**

### **TEKNIK STERILISASI**

#### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu menyebutkan pengertian, macam dan tujuan sterilisasi
2. Mahasiswa mampu melakukan teknik sterilisasi untuk alat, bahan maupun media

#### **DASAR TEORI**

Kajian ilmu farmasi memiliki berbagai aspek yang dapat dikaji. Salah satunya adalah dalam bidang mikrobiologi, dimana dalam proses melakukan pekerjaannya harus dilakukan secara aseptik. Bekerja secara aseptik adalah prinsip yang paling utama dalam aktivitas pengamatan yang berhubungan dengan mikroba guna mengurangi terjadinya kontaminasi. Steril sendiri merupakan syarat mutlak keberhasilan kerja dalam laboratorium mikrobiologi. Teknik-teknik tertentu diperlukan agar sterilisasi dapat dilakukan secara sempurna, dan tidak ada mikroorganisme lain yang mengkontaminasi media.

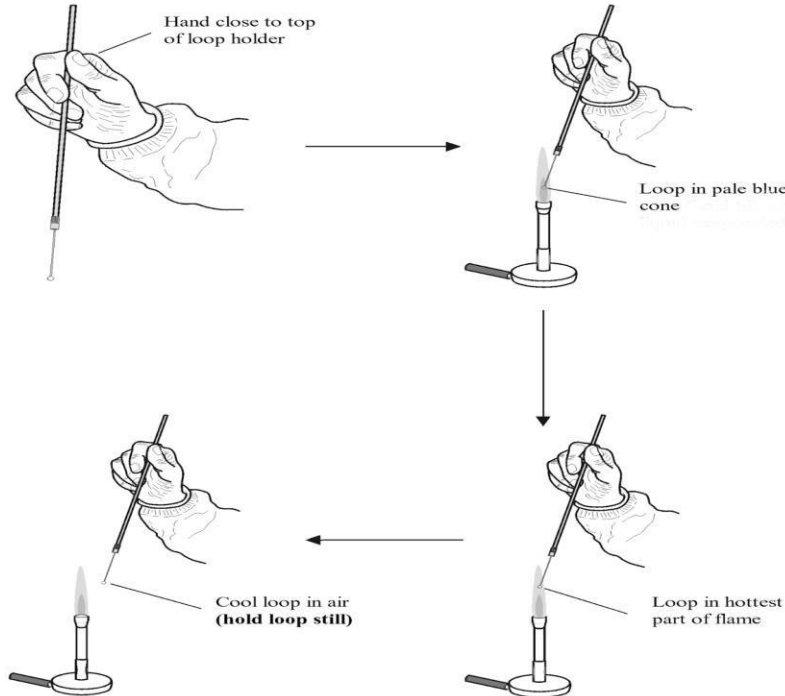
Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda (alat ataupun bahan). Secara umum sterilisasi dapat dilakukan dengan tiga metode: mekanis, fisis dan ataupun secara kimia. Bahan, alat dan meja kerja yang akan digunakan dalam praktek di laboratorium mikrobiologi harus melalui tahap sterilisasi terlebih dahulu, hal ini bertujuan supaya pekerjaan dikerjakan secara aseptis atau terbebas dari mikroba pencemar yang tidak diinginkan.

## TEKNIK STERILISASI

<p><b>Sterilisasi Fisik</b></p>	<p><b>PEMANASAN</b></p> <p>2. Sterilisasi Kering (Panas Kering)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pemijaran api</li> <li>• Flaming (jilatan api)</li> <li>• Udara panas (Oven)</li> </ul> <p>3. Sterilisasi Basah (Panas Basah)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uap Bertekanan (Autoklaf)</li> <li>• Uap Mengalir (Tyndalisasi)</li> <li>• Penggodogan dalam Air</li> </ul> <p><b>PENYINARAN</b></p> <p>Penyinaran sinar UV (ultra violet)</p>
<p><b>Sterilisasi Kimiawi</b></p>	<p>Biasanya digunakan senyawa desinfektan antara lain:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Peralatan besar dengan menggunakan HCl, HgCl<sub>2</sub>, Formalin, Phenol, Chlorin dan alkohol.</li> <li>2. Lingkungan dengan menggunakan pestisida dan antiseptis.</li> <li>3. Biasanya yang paling banyak digunakan adalah alkohol, baik untuk mensterilkan alat, tangan pekerja ataupun meja kerja.</li> </ol>
<p><b>Sterilisasi Mekanik</b></p>	<p>Sterilisasi secara mekanik dengan menggunakan saringan berpori yang sangat kecil, biasanya berkisar (0.22 - 0.45 mikron), sehingga mikroba tertahan pada 12 saringan tersebut. Alat yang dikenal dengan mikrofilter tersebut berkerja dengan gaya sentrifugasi atau pompa vakum. Dimana pada sterilisasi ini: bakteri tertahan disaringan, virus tidak dapat tersaring, dan digunakan untuk bahan yang tidak tahan panas dan mudah menguap, seperti vitamin, larutan enzim dan antibiotik</p>

### Prinsip kerja pemijaran api

Pemijaran merupakan suatu kegiatan membakar langsung alat-alat seperti ujung ose, ujung pinset, ujung spatula yang berbahan logam. Pemijaran dilakukan sampai alat-alat tersebut berwarna merah pijar.



### Prinsip kerja flaming (Jilatan Api)

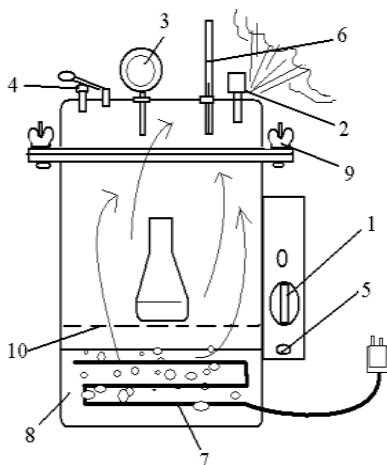
Alat-alat seperti kaca objek, cawan petri yang telah berisi media, mulut erlenmeyer yang berisi media dan jarum cukup dilakukan jilatan api atau melewati alat tersebut pada nyala api bunsen. Artinya alat-alat tersebut hanya mengalami jilatan api dan tidak sampai memijar.



## Prinsip Kerja Autoklaf

Merupakan alat yang digunakan untuk sterilisasi alat, bahan atau media tertentu dengan menggunakan uap panas bertekanan. Alat ini menggunakan uap air panas bertekanan kira-kira 2 atm (15 Psi) dengan lama sterilisasi umumnya 15 menit dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi<sup>2</sup> (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Cara penggunaan autoklaf, yaitu:

1. Isi air sampai batas yang ditentukan
2. Masukkan alat/bahan yang akan disterilisasi ke dalam keranjang khusus
3. Tutup autoklaf dan kencangkan klep pengaman
4. Nyalakan autoklaf
5. Atur suhu dan waktu sterilisasi, autoklaf dinyalakan, diatur *timer* dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C
6. Tunggu sampai selesai proses sterilisasi yaitu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman, kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan ditunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15 menit dimulai sejak tekanan mencapai 2atm.
7. Jika alarm tanda selesai berbunyi maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *preissure gauge* menunjuk ke angka nol) buka katup pengaman agar uap keluar, setelah tekanan turun, buka autoklaf dan keluarkan alat/bahan yang telah steril



### Keterangan:

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

## **Prinsip kerja Tyndalisasi**

Proses sterilisasi menggunakan metode tyndalisasi membutuhkan alat-alat antara lain erlenmeyer, aluminium foil atau kapas, dandang atau *Arnold Steam Sterilizer* dan termometer bila menggunakan dandang. Bahan yang bisa disterilisasi dengan metode ini yaitu bahan makanan seperti susu, ekstrak buah atau sayuran. Cara kerja metode tyndalisasi yaitu:

1. Bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer atau botol dan ditutup rapat dengan sumbat atau aluminium foil.
2. Erlenmeyer/botol kemudian dimasukkan ke dalam alat sterilisasi (alat standar menggunakan *Arnold Steam Sterilizer*/dandang).
3. Sumber panas dinyalakan dan ditunggu hingga termometer menunjukkan suhu 100°C kemudian waktu dihitung mundur hingga 30 menit (uap panas yang terbentuk akan mematikan mikroba).
4. Setelah selesai, alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan.
5. Setelah 24 jam, bahan tersebut disterilkan lagi dengan cara yang sama, waktu ini dimaksudkan untuk memberi kesempatan spora atau sel vegetatif yang belum mati untuk tumbuh sehingga mudah dibunuh.

## **BAHAN DISKUSI / PEMBAHASAN**

1. Sebutkan macam cara/metode proses sterilisasi (sertai dengan gambar)!
2. Buatlah mekanisme/prinsip kerja dari setiap metode sterilisasi tersebut!
3. Sebutkan alat/bahan/media yang dapat disterilisasikan dengan masing masing metode sterilisasi tersebut!

## **PRAKTIKUM 3**

### **PEMBUATAN MEDIA DAN PEMINDAH BIAKAN MEDIA**

#### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu membuat media pertumbuhan bakteri baik cair maupun padat.
2. Mahasiswa mampu melakukan sterilisasi media yang nantinya akan digunakan untuk menumbuhkan bakteri.
3. Mahasiswa mampu memindahkan biakan dari satu media ke media lain secara aseptis

#### **DASAR TEORI**

Pembiakan mikrobial di laboratorium memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai bagi mikroba. Media adalah suatu bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba yang terdiri atas campuran nutrisi atau zat-zat makanan. Selain untuk menumbuhkan mikroba, media dapat juga digunakan untuk isolasi, memperbanyak, pengujian sifat-sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroba. Biakan murni sangat diperlukan dalam kegiatan mikrobiologi, misalnya keperluan diagnostik, karakterisasi mikroorganisme, industri mikrobiologi dan lain-lain. Kultur yang murni didapatkan dengan nutrisi dan lingkungan yang menunjang pertumbuhan mikroorganisme tersebut, selain itu perlu dilakukan pencegahan kontaminasi dalam biakan. Teknik untuk mendapatkan hal tersebut dengan menggunakan teknik aseptis.

Teknik aseptis dilakukan dengan berusaha mencegah terjadinya kontaminasi pada biakan, selain itu juga mencegah seseorang yang melakukan pemindah biakan tersebut terkontaminasi biakan yang bersifat patogen. Hal yang perlu diperhatikan dalam kerja aseptis adalah:

1. Area tempat kerja dibersihkan dengan desinfektan
2. Alat-alat untuk keperluan kerja aseptis disterilisasi terlebih dahulu
3. Pekerjaan dikerjakan secara cepat dan efisien

## ALAT DAN BAHAN

### 1. Untuk pembuatan dan sterilisasi media :

- Alat: timbangan, gelas ukur 500 ml, erlenmeyer 500 ml dan 1 L, tabung reaksi, batang pengaduk, autoklaf, cawan petri, magnetik stirer, pipet volume, penangas
- Bahan: kapas, alkohol 70%, benang/tali, aquadest, media NA (*Nutrien Agar*)/NB (*Nutrient Broth*), media PDA/*Potato Dextrose Agar*, kertas saring

### 2. Untuk pemindah biakan media :

- Lampu spiritus
- Jarum ose
- Nutrien agar miring
- Kaldu nutrient
- Kultur dalam agar miring
- Kultur yang akan ditanam (*E.coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.)

## PROSEDUR KERJA

### A. Pembuatan dan Sterilisasi Media Umum Bakteri

#### 1. Nutrient Agar / NA dan Nutrient Broth / NB

- Komposisi:

\* NA manual

R/ Beef ekstrak 3 gram

Agar-agar 15 gram

Aquadest 1000 ml

\* NB manual

R/ Beef ekstrak 3 gram

Aquadest 1000 ml

\* NA Instan

R/ NA instan/serbuk 20 gram Peptone 5 gram

Aquadest 1000 ml

\* NB instan

R/ NB instan/serbuk 20 gram Peptone 5 gram

Aquadest 1000 ml

- Cara Pembuatan:

1. Masukkan beef ekstrak, peptone, agar-agar dan aquadest ke dalam beaker glass 1000 ml
2. Panaskan di atas kompor pemanas, aduk hingga homogen atau hampir mendidih, pH diatur netral, jika belum netral bisa ditambahkan NaOH/KOH/HCl.

3. Masukkan kedalam tabung reaksi masing-masing 10 ml untuk media tegak dan 5-7 ml untuk media miring, 15 ml pada cawan petri untuk isolasi bakteri.
4. Semua tabung medium ditutup dengan dengan kapas yang telah dibungkus dengan kain kasa, dan cawan petri dibungkus kertas.
5. Sterilkan dengan autoklaf, selama 15 menit, tekanan 1 atm dan suhu 121°C
6. Setelah disterilkan untuk media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung

## 2. Pembuatan PDA/*Potato Dextrose Agar*

- Komposisi:

Manual:

Kentang                    200 gram

Dekstrose                20 gram

Agar-agar                20 gram

Aquadest                1000 ml

Instan:

PDA                        39 gram

Aquadest                1000 ml

- Cara pembuatan:

1. Kentang dikupas lalu dibersihkan, diiris sepanjang 1 cm kemudian dimasak dalam aquadest dan dibiarkan mendidih, dijaga agar volumenya tetap
2. Kemudian ekstraknya disaring, diperas, dan diambil filtratnya.
3. Kemudian dekstrose ditambahkan beserta agar-agar dan aquadest, diaduk hingga homogen (jika akan digunakan untuk pertumbuhan jamur, pH diatur antara 5-6 dengan penambahan asam sitrat)
4. Kemudian dimasukkan pada tabung reaksi/erlenmeyer dan ditutup kapas/aluminium foil.
5. Disterilkan dengan autoklaf
6. Setelah steril, tuangkan PDA pada cawan petri atau tabung reaksi menggunakan teknik aseptis, biarkan dingin dan memadat. Untuk media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung.



## **B. Pemindahan biakan dari media cair ke media padat**

Cara kerja:

1. Buka tabung yang berisi kultur yang akan dipindahkan, panasi mulut tabung dengan lampu spiritus
2. Masukkan pipet steril ke dalam biakan, ambil sedikit cairan
3. Buka tabung berisi nutrient agar, panasi mulut tabung dengan lampu spiritus
4. Pindahkan biakan dari pipet ke dalam tabung nutrient agar miring
5. Panasi kembali mulut tabung, tutup dengan kapas berbalut kasa dan aluminium foil, panasi kembali tutupnya
6. Inkubasi pada suhu 37°C untuk praktikum yang akan datang

## **C. Pemindahan biakan dari media padat ke media padat**

Cara kerja:

1. Buka tabung yang berisi kultur, panasi mulut tabung dengan lampu spiritus
2. Panasi ose sampai merah
3. Ambil sedikit biakan dari agar miring, goreskan ke dalam tabung yang berisi media agar miring
4. Panasi kembali mulut tabung, tutup dengan kapas berbalut kasa dan aluminium foil, panasi kembali tutupnya
5. Inkubasi pada suhu 37°

# PRAKTIKUM 4

## TEKNIK ISOLASI BAKTERI

### TUJUAN

Mahasiswa mampu melakukan teknik isolasi bakteri

### DASAR TEORI

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai jenis. Di dalam laboratorium, populasi mikroba dapat diisolasi dari sumber/ habitat seperti udara, tanah, air, makanan dan lainnya. Hasil isolasi umumnya merupakan biakan mikroba campuran dan perlu dimurnikan untuk memperoleh biakan murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat fisiologi dan biokimiawinya.

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. Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikrobia adalah : 1). *Spread plate method* (cara tebar/sebar), 2). *Streak platemethod* (cara gores), 3). *Pour platemethod* (cara tabur).

### ALAT DAN BAHAN

#### 1. Untuk isolasi bakteri *Spread Plate Method* (Cara Tebar/Sebar)

- Spreader/batang bengkok/batang Drigalsky
- Pipet volume
- Lampu bunsen
- Media NA dalam cawan petri
- Kultur murni bakteri

#### 2. Untuk isolasi bakteri *Pour Plate Method* (Cara Tabur)

- Media NA dalam tabung reaksi
- Cawan petri steril

- Kultur murni bakteri
- Pipet volume, lampu Bunsen

### 3. Untuk isolasi bakteri **Streak Plate Method (Cara Gores)**

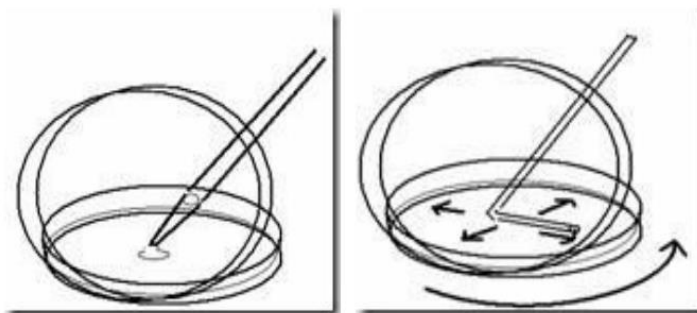
- Media NA dalam cawan petri
- Kultur murni bakteri
- Jarum ose
- Lampu Bunsen

## PROSEDUR KERJA

### A. Isolasi bakteri **Spread Plate Method (Cara Tebar/Sebar)**

Cara kerja:

- Buatlah pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  dari kultur murni bakteri dengan larutan pengencer. Ambil tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri, buka dan bakar leher tabung.
- Pindahkan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media NA dalam cawan petri.
- Bakar spreader yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol, biarkan dingin.
- Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan spreader secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar dibawah).
- Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.



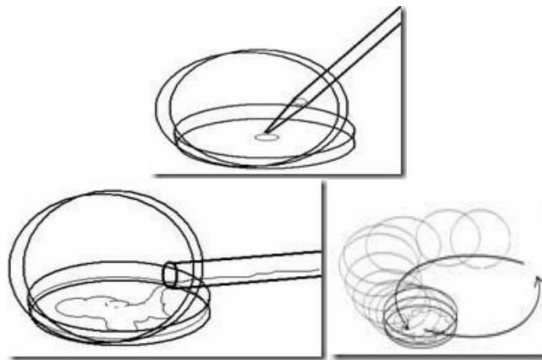
**Gambar Spread Plate Method**

### B. Isolasi bakteri **Pour Plate Method (Cara Tabur)**

Cara kerja :

- Dinginkan media NA dalam tabung reaksi sampai suhu  $\pm 45 - 50^{\circ}\text{C}$  (cirinya :terasa hangat di kulit/tidak 'kemranyas').

- b. Buka tutup tabung yang mengandung kultur murni bakteri, dan bakar leher botol.
- c. Pindahkan 1 ml kultur murni bakteri ke dalam tabung reaksi yang mengandung NA secara aseptis.
- d. Bakar leher tabung di atas bunsen, dan tuangkan media NA yang telah mengandung kultur murni bakteri ke dalam cawan petri.
- e. Goyangkan perlahan-lahan untuk mencampur kultur bakteri dengan NA sampai homogen. Penggoyangan petri jangan terlalu kuat. Pada saat penuangan media, petri bisa diletakkan dalam radius maksimal 20 cm dari sumber api (zona steril) (lihat Gambar dibawah).
- f. Setelah agar memadat diinkubasi terbalik pada suhu kamar selama 24 jam. Inkubasi terbalik dilakukan setelah agar memadat. Amati pertumbuhannya.

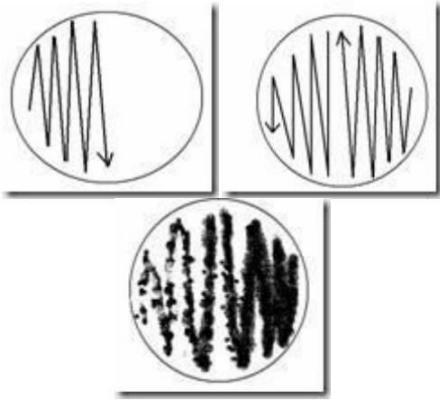


**Gambar Pour Plate Method**

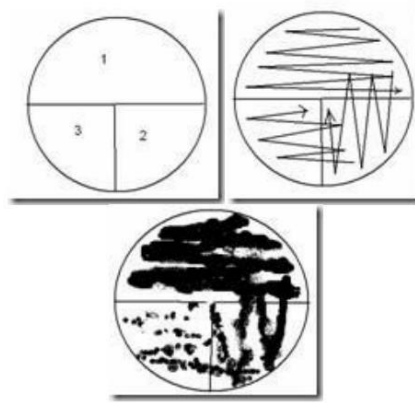
### **C. Isolasi bakteri *Streak Plate Method* (Cara Gores)**

Cara kerja :

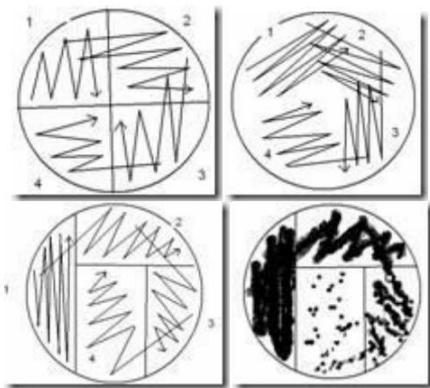
- a. Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri.
- b. Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada permukaan media agar dimulai pada satu ujung. Perhatikan teknik penggoresan! (lihat Gambar dibawah). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar.
- c. Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
- d. Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar selama 24 jam dan amatipertumbuhannya.



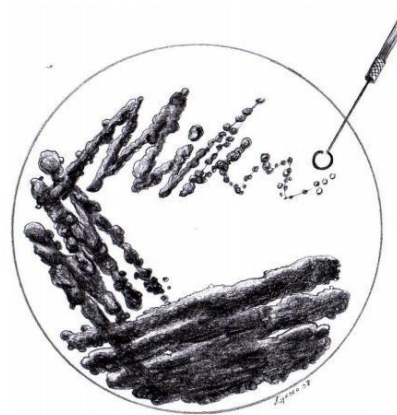
**Gambar Teknik *Streak Plate Method* secara Goresan Sinambung**



**Gambar Teknik *Streak Plate Method* secara Goresan T**



**Gambar Teknik *Streak Plate Method* dengan lebih banyak Sektor**



**Gambar Contoh Hasil Isolasi *Streak Plate Method***

## **PRAKTIKUM 5**

### **PENGAMATAN BAKTERI, JAMUR DAN YEAST**

#### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu melihat morfologi sel dan koloni beberapa bakteri
2. Mahasiswa mampu melihat morfologi sel serta koloni jamur dan yeast

#### **DASAR TEORI**

Bakteri dapat didefinisikan baik secara morfologi, biokimiawi maupun secara genetik. Identifikasi bakteri secara morfologi yaitu dengan mempelajari bentuk, ukuran dan susunan sel. Sebagian besar bakteri berbentuk silinder atau bulat. Perubahan lingkungan mungkin dapat sedikit mempengaruhi bentuk dan ukuran sel, misalnya bakteri berbentuk batang bisa menjadi lebih panjang atau pendek akibat perubahan lingkungan tersebut, namun tidak dapat berubah menjadi bentuk lain misalnya batang menjadi bulat.

Jamur adalah organisme multiseluler yang berfilamen dan pertumbuhannya mudah dilihat karena penampakannya yang berserabut seperti kapas. Jamur terdiri dari suatu thalus yang tersusun dari filament yang bercabang yang disebut hifa. Kumpulan hifa disebut miselium.

Yeast merupakan fungi uniseluler dan berkembang biak dengan tunas, pembelahan sel, spora aseksual maupun seksual. Ukuran yeast lebih besar dari sel bakteri. Bentuk sel yeast bermacam-macam berupa botol atau membentuk miselium semu. Struktur yeast terdiri atas kapsul dinding sel, membrane sitoplasma, nucleus, vakuola, mitokondria, globula lipida dan sitoplasma.

#### **ALAT DAN BAHAN**

1. Preparat awetan dan biakan murni beberapa bakteri
2. Preparat awetan dan biakan murni jamur
3. Preparat awetan dan biakan murni yeast
4. Mikroskop
5. Minyak emersi

## **PROSEDUR KERJA**

### **Pengamatan bakteri, jamur, yeast**

- a. Amati bentuk-bentuk sel bakteri, jamur dan yeast pada preparat awetan yang telah disediakan dengan menggunakan mikroskop, mulailah dengan perbesaran lemah dan dilanjutkan dengan perbesaran sedang hingga kuat (menggunakan minyak emersi)
- b. Amati penampakan koloni pada biakan murni bakteri, jamur dan yeast
- c. Buatlah gambar sel dilengkapi dengan keterangan yang diperlukan (nama, bentuk dan ukuran sel, hifa, spora dan lain-lain serta beri keterangan yang diperlukan (nama preparat, perbesaran yang dipakai dan lain-lain).
- d. Bersihkan minyak emersi pada lensa dengan menggunakan larutan xylol.

# **PRAKTIKUM 6**

## **TEKNIK PENGECATAN**

### **TUJUAN**

Mahasiswa mampu menentukan gram positif dan gram negatif pada bakteridan jamur yang diuji

### **DASAR TEORI**

Sebagian besar sel mikrobial tidak mudah diamati meskipun di bawah mikroskop karena sel tersebut tidak berwarna (transparan). Teknik pengecatan membantu dalam mengamati sel mikrobial lebih jelas karena akan didapatkan perbedaan warna sebagai latar belakang sel-sel mikrobial tersebut. Ada 3 tipe pengecatan sel bakteri yaitu:

1. Pengecatan sederhana adalah pengecatan sel mikrobial dengan satu pewarna dan satu tahap pengecatan saja. Teknik pengecatan ini dapat mewarnai sel atau latar belakangnya sehingga memungkinkan mengamati bentuk dan susunan sel. Contoh larutan cat: karbol fuchsin, gentian violet dan metylen blue
2. Pengecatan diferensial/majemuk merupakan pengecatan sel mikrobial yang menggunakan kombinasi pewarna dengan tujuan untuk identifikasi karena masing-masing mikrobial memiliki reaksi tertentu. Contoh: pengecatan gram, ZN/acid fast atau bahan tahan asam
3. Pengecatan khusus merupakan pengecatan yang hanya mewarnai satu bagian dari sel sehingga dapat digunakan untuk membedakan bagian yang satu dengan bagian yang lain dari bakteri. Contoh pengecatan gram untuk melihat flagella atau pengecatan Burri untuk melihat kapsula.

Pengamatan mikroskopik jamur dapat dilakukan dengan preparat natif (tanpa pengecatan) yaitu dengan menggunakan larutan garam fisiologis atau KOH 10-20% ataupun dengan pengecatan. Ada 3 tipe pengecatan pada jamur, yaitu pengecatan sederhana dengan lactophenol (LP) yang berwarna coklat muda maupun lactophenol cotton blue yang berwarna biru, pengecatan diferensial contohnya pengecatan gram dan pengecatan spesial dengan contoh tinta cina untuk pengamatan kapsula atau HE dan GIEMSA untuk pemeriksaan jaringan.



## ALAT DAN BAHAN

### 1. Larutan cat Gram:

Cat Gram A : Kristal violet 2 gram  
(warna ungu) : Alkohol 96% 20 ml  
Ammonium oxalate 1% in aqua 80 ml

2. Cat Gram B : Iodium 1 gram  
(warna cokelat) : Kalium iodida 2 gram  
Aquadest 100 ml

(larutan KJ dalam air, kemudian ditambahkan Iodium dan simpan dalam botol warna cokelat)

3. Cat Gram C : Aceton 30 ml (tidak berwarna)  
Alkohol 96% 70 ml

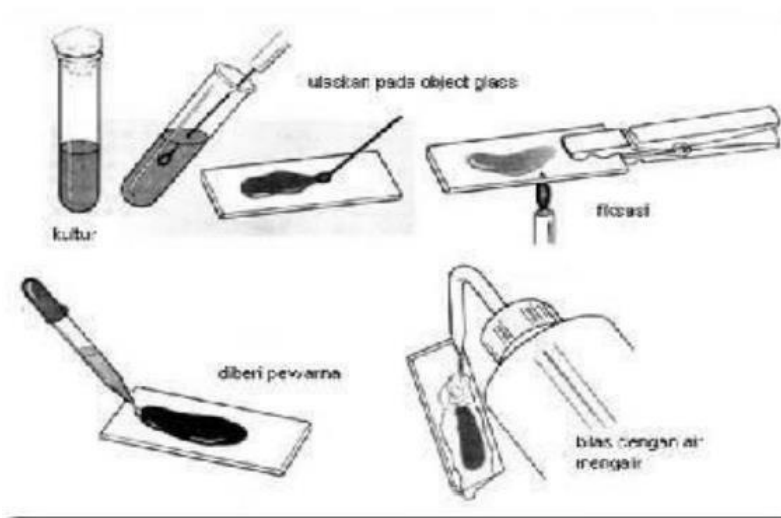
4. Cat Gram D : Safranin 1 gram  
(warna merah) Alkohol 96% 10 ml  
Aquadest 90 ml

## PROSEDUR KERJA

### Pengecatan bakteri

- Bersihkan objek glass dengan alkohol. Beri label pada ujung objek glass dengan nama mikrobial yang akan dicat. Di bawah objek glass digambar bulatan berdiameter 1 cm dengan spidol, gunakan daerah ini untuk pengecatan mikrobial. Balikan objek glass sehingga gambar bulatan ada dibaliknya
- Letakkan 1 tetes aquadest pada permukaan objek glass dalam daerah yang sudah digambar. Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose bermata secara aseptis dan campur dengan aquadest pada objek glass. Ratakan suspensi ini pada seluruh area bulatan.
- Kering anginkan sehingga membentuk noda
- Lakukan fiksasi panas dengan melewatkan objek glass pada nyala api beberapa kali (jangan sampai objek glass terkena api secara langsung sehingga menjadi terlalu panas)
- Genangi preparat dengan cat Gram A selama 1-3 menit. Buang cat tanpa dicuci dengan air.
- Genangi preparat dengan cat Gram B selama 1 menit. Cuci sisa cat Gram B dengan air mengalir dan kering anginkan.

- g. Miringkan objek glass dan cuci dengan cat Gram C dengan cara meneteskannya pada permukaan noda sampai warna cat tepat dilunturkan (tidak berwarna) kurang lebih selama 30 detik
- h. Cuci dengan air mengalir secara singkat dan kering anginkan
- i. Genangi preparat dengan cat Gram D dan diamkan selama 2 menit. Cuci secara cepat dengan air mengalir dan kering anginkan
- j. Tutup permukaan objek glass dengan penutup objek glass dan amati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat menggunakan minyak emersi. Sel berwarna merah muda merupakan Gram negative dan sel berwarna biru merupakan Gram positif
- k. Catat hasil pengamatan, gambar beberapa sel yang mewakili dan tulis perbesaran yang dipakai.



**Gambar Teknik Pengecatan Bakteri**

## **PRAKTIKUM 7**

### **UJI ANGKA LEMPENG TOTAL**

#### **TUJUAN**

Mahasiswa mampu menetapkan adanya cemaran dengan uji angka lempeng total dalam sediaan makanan, minuman, kosmetika dan obat tradisional.

#### **DASAR TEORI**

Angka Lempeng Total (ALT) adalah jumlah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C. 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. 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.

#### **ALAT DAN BAHAN**

1. Media *Plate Count Agar* (PCA)
2. *Buffered Pepton Water* (BPW)
3. Sampel uji (serbuk jamu)
4. Pipet volume
5. *Colony Counter* (alat hitung koloni)

#### **PROSEDUR KERJA**

##### **Uji Angka Lempeng Total (ALT)**

- **Penyiapan Sampel Uji**  
Kemasan jamu yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.
- **Persiapan dan Homogenasi Sampel**  
Secara aseptis diambil sebanyak 10 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan 90 ml BPW dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$
- **Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*)** (hitung dan lihat carapembuatan media pada kemasan)

- Pengenceran sampel untuk uji ALT

Sebanyak 5 buah labu ukur 10 ml disiapkan, masing-masing telah diisi dengan 9 ml pengencer BPW. Sebanyak 1 ml pengenceran  $10^{-1}$  dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung pertama yang telah diisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$  (homogenisasi dengan vortex). Selanjutnya dibuat pengenceran hingga  $10^{-5}$ .

- Uji Angka Lempeng Total (ALT)

Dari tiap pengenceran dipipet 1 ml suspensi ke dalam cawan petri steril secara duplo. Dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 15 ml media PCA. Cawan petri digoyang dengan hati-hati agar sampel tersebar merata.

- Dilakukan pula uji kontrol untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam cawan petri dan biarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dan 1 ml pengencer BPW lalu dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

- Lakukan perhitungan ALT (Angka Lempeng Total).

## **PRAKTIKUM 8**

### **UJI ANGKA KAPANG KHAMIR**

#### **TUJUAN**

Mahasiswa mampu menetapkan adanya cemaran dengan uji angka lempeng total dan angka kapang/khamir dalam sediaan makanan, minuman, kosmetika dan obat tradisional

#### **DASAR TEORI**

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25<sup>0</sup> C dan dinyatakan dalam satuan koloni 46/mL. 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<sup>0</sup>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.

#### **ALAT DAN BAHAN**

1. Media *Potato Dextrrose Agar* (PDA)
2. Larutan pengencer *Pepton Dilution Fluid* (PDF)
3. Sampel uji (serbuk jamu)
4. Kloramfenikol 100 mg/liter media
5. Pembuatan larutan kloramfenikol : 1 gram kloramfenikol dalam 100 ml air suling steril.
6. Pipet volume

#### **PROSEDUR KERJA**

##### **Uji Angka Kapang/Khamir**

- Penyiapan Sampel Uji (sama dengan uji ALT)
  - Pembuatan media PDA (hitung dan lihat cara pembuatan media padakemasan)
  - Homogenisasi dan pengenceran Sampel
- Perhitungan Angka Kapang Khamir (AKK) bertujuan untuk menghitung jumlah koloni kapang dan khamir yang terdapat dalam bahan. Pada prinsipnya pengujian ini menggunakan metode yang sama dengan penentuan Angka Lempeng Total (ALT).
- Media pertumbuhan yang digunakan adalah PDA (*Potato Dextrrose Agar*) dan larutan pengencer yang digunakan adalah *Pepton Dilution Fluid* (PDF)

- Uji Angka Kapang/Khamir

Dari masing-masing pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri steril secara duplo. Media PDA yang telah dicairkan sebanyak 20 ml dituangkan ke dalam cawan petri yang sebelumnya telah ditambah dengan 1 ml larutan kloramfenikol dan digoyangkan sehingga campuran tersebut merata. Setelah agar membeku, cawan petri dibalik dan diinkubasikan pada suhu 25<sup>0</sup>C atau pada suhu kamar selama 5 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-5. Koloni kapang dan khamir dihitung setelah 5 hari. Uji sterilitas media dilakukan dengan menuangkan media PDA dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan caramenuangkan media PDA dan 1 ml pengencer (PDF) lalu dibiarkan memadat.

- Lakukan perhitungan AKK (Angka Kapang Khamir)

## **PRAKTIKUM 9**

### **UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK METODE KIRBY-BAUER**

#### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu melakukan uji sensitivitas antibiotik dengan metode Kirby-Bauer.
2. Mahasiswa mampu menentukan mikroba sensitif atau resisten terhadap antibiotik.

#### **DASAR TEORI**

Banyak sekali jenis antibiotik yang saat ini tersedia untuk mengobati penyakit infeksi akibat bakteri patogen. Mekanisme kerja antibiotik tersebut dapat menghambat atau membunuh mikroba penyebab infeksi. Penentuan antibiotik untuk mengobati infeksi tertentu sangat penting dalam pelayanan klinik. Metode Kirby-Bauer adalah metode yang digunakan untuk mengetahui sensitivitas suatu mikroba terhadap antibiotik tertentu. Diameter hambatan pertumbuhan mikroba oleh antibiotik diukur dan diinterpretasikan dengan antibiogram.

#### **ALAT DAN BAHAN**

1. Cawan petri
2. Jangka sorong
3. Erlenmeyer
4. Media nutrient agar
5. Kultur mikroba uji dalam kaldu nutrient
6. Beberapa obat antibiotik
7. Paper disk

#### **PROSEDUR KERJA**

##### **Uji Sensitivitas Antibiotik Metode Kirby-Bauer**

- a. Siapkan dan sterilisasi 10 ml media kaldu nutrien dalam erlenmeyer
- b. Setelah agak dingin, campur dengan mikroba uji, homogenkan
- c. Tuang dalam petri steril, tunggu hingga beku
- d. Pasang paper disk di atas permukaan agar
- e. Tetesi dengan 10 $\mu$ l larutan antibiotik
- f. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- g. Ukur diameter hambat untuk masing-masing antibiotik dengan masing-masing mikroba uji
- h. Interpretasikan hasil dengan antibiogram

## **PRAKTIKUM 10**

### **UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA BAHAN ALAM**

#### **TUJUAN**

1. Mahasiswa mampu melakukan uji sensitivitas antimikroba pada senyawa bahan alam.
2. Mahasiswa mampu menentukan mikrobial sensitif atau resisten terhadap antibiotik.

#### **DASAR TEORI**

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram.

Penghambatan mikroorganisme oleh suatu senyawa antibakteri dinyatakan dengan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme sebanyak 90 % dari inokulum asal selama inkubasi 24 jam. Nilai MIC dan MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) senyawa antibakteri dari ekstrak rempah-rempah maupun tanaman berbeda-beda bergantung pada jenis mikroorganisme dan senyawa antifungi.

#### **ALAT DAN BAHAN**

1. Cawan petri
2. Jangka sorong
3. Erlenmeyer
4. Media nutrient agar
5. Kultur mikrobial uji dalam kaldu nutrient
6. Beberapa ekstrak senyawa bahan alam
7. Paper disk

#### **PROSEDUR KERJA**

##### **Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Bahan Alam**

- a. Siapkan dan sterilisasi 10 ml media kaldu nutrient dalam erlenmeyer
- b. Setelah agak dingin, campur dengan mikrobial uji, homogenkan
- c. Tuang dalam petri steril, tunggu hingga beku



- d. Pasang paper disk di atas permukaan agar
- e. Tetesi dengan 10µl larutan ekstrak bahan alam
- f. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- g. Ukur diameter hambat untuk masing-masing antibiotik dengan masing-masing mikroba uji

## PUSTAKA ACUAN

- Asutosh Kar., (2008)., *Pharmaceutical Microbiology.*, New Delhi, India : New Age International
- Sylvia, T.W., (2008)., *Mikrobiologi Farmasi.*, Yogyakarta : Penerbit Erlangga.
- Alexander N.G and Hiroshi Nikaid., (2007)., *Microbial Biotechnology (Second edition).*, California : Cambridge University Press
- Hugo and Russell's., (2011)., *Pharmaceutical Microbiology (8th ed).*, UK : A John Wiley & Sons, Ltd., Publication
- Elida, M. 2009. *Buku Kerja Praktek Mahasiswa (BKPM) Mikrobiologi Pangan.* Politeknik Pertanian Payakumbuh.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan.* PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek.* PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Hogg, Stuart. *Essential Microbiology.* 2005. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Leboffe, MJ and Pierce BE. 2011. *A Photographic Atlas for The Microbiology Laboratory 4th Edition.* Morton Publishing. Colorado.
- Pollack, Roberta et al. 2009. *Laboratory Exercises in Microbiology.* John Wiley & Sons Inc. New Jersey.
- Prescott, LM, Harley, JP and Klein, DA. *Laboratory Exercises in Microbiology 5<sup>th</sup> Edition.* 2002. The McGraw Hill Company. USA.
- Tim Laboratorium Mikrobiologi Fakultas biologi Universitas Jendral Sudirman. 2008. *Petunjuk Pratikum Mikrobiologi Dasar.* Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto
- Winanti dan Nurwitri. 2012. *Mikrobiologi Pangan.* IPB Press. Bogor