MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI FARMASI

Disusun Oleh:
Tim Dosen Farmasi
Universitas Indonesia Maju

PROGRAM STUDI S1 FARMASI
UNIVERSITAS INDONESIA MAJU
JAKARTA 2022

KATA PENGANTAR

Modul Praktikum Mikrobiologi disusun untuk memenuhi kebutuhan dan sebagai pegangan mahasiswa selama mengikuti praktikum Mikrobiologi di Laboratorium. Topik-topik percobaan dalam penuntun ini telah disesuaikan untuk menunjang pemahaman mahasiswa terkait materi yang diajarkan di perkuliahan dan materi suplemen untuk menunjang materi dalam perkuliahan.

Modul Praktikum Mikrobiologi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritikan dan saran dari pemakai buku ini sangat kami harapkan untuk penyempurnaan pada penerbitan selanjutnya.

Jakarta, 2019

Tim Penyusun

DAFTAR

Halaman Sampul i

Kata Pengantar ii

Daftar Isi iii

BAB I Pendahuluan 1

BAB II Pengenalan Alat dan Sterilisasi 2

BAB III Pembuatan Media 8

BAB IV Pengenalan Mikroorganisme 13

a. Pendahuluan 13

b. Pewarnaan Bakteri Gram 13

c. Pembiakan Bakteri 17

BAB V Pengujian Mikroorganisme 24

a. Pendahuluan 24

b. Pengaruh Lingkungan terhadap Pertumbuhan Mikroorganisme 24

c. Uji Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotika 28

d. Angka Lempeng Total Bakteri 30

e. Probable Number (MPN) Coliform 34

DAFTAR PUSTAKA

BAB I
PERSIAPAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Praktikum mikrobiologi menjadi bahasan yang penting untuk diketahui oleh mahasiswa farmasi karena menjadi penunjang pada teori mikrobiologi. Pada praktikum ini mahasiswa akan diberikan materi tentang tahaptahap persiapan praktikum, pengenalan mikroba dan cara pembiakannya sampai pada cara-cara pengujian kualitatif dan kuantitatif sediaan farmasi seperti obat tradisional/jamu, makanan dan minuman secara mikrobiologis.

Dalam bidang farmasi terutama pada industri farmasi, analisis kimia digunakan secara rutin untuk menentukan suatu sediaan farmasi memenuhi syarat atau tidak. Hasilnya dapat digunakan pada departemen pengawasan mutu atau quality control. Setelah selesai mempelajari materi matakuliah ini, di akhir semester Anda diharapkan mampu mempersiapkan alat, bahan dan serta cara sterilisasi berbagai media pembiakan dan pengujian bakteri serta pengujian pengaruh lingkungan terhadap pertumbuhan mikroorganisme sampai kepada pengujian. Untuk mencapai kompetensi umum tersebut, maka kompetensi-kompetensi khusus berikut harus Anda capai, yaitu:

a. Menggunakan alat dan mensterilisasi alat dan bahan
b. Membuat berbagai media untuk pengujian
c. Melakukan identifikasi berbagai jenis bakteri
d. Melakukan pembiakan bakteri
e. Melakukan pengujian kepekaan bakteri terhadap antibiotic
f. Melakukan pengujian pengaruh lingkungan terhadap pertumbuhan bakteri
g. Melakukan pengujian dan perhitungan Angka Lempeng Total Bakteri (ALTB)
h. Melakukan pengujian MPN (Most Probable Number) Colifor

Selanjutnya, pada Bab 1 ini dari mata kuliah praktikum Mikrobiologi ini kompetensi khusus yang Anda capai adalah:

a. Menggunakan alat dan mensterilisasi alat dan bahan
b. Membuat berbagai media untuk pengujian

Pada pertemuan pertama praktikum mikrobiologi ini mahasiswa akan dikenalkan tentang gambaran secara umum praktikum mikrobiologi dan persiapan apa saja yang akan dilakukan sebelum praktikum mikrobiologi. Setelah mempelajari bab 1 diharapkan setelah melakukan kegiatan praktikum pada bab ini mahasiswa dapat menerapkan prinsip sterilisasi dan pembuatan media untuk menunjang kegiatan praktikum berikutnya.

BAB II

PENGENALAN ALAT DAN STERILISASI

A. TUJUAN

1. mengenal alat-alat yang akan digunakan dalam praktikum mikrobiologi dan dapat menggunakannya secara benar
2. menerapkan macam-macam teknik sterilisasi

B. DASAR TEORI

Laboratorim mikrobiologi adalah salah satu laboratorium yang wajib ada pada program studi farmasi karena laboratorium ini sangat menunjang pembuatan peroduk-produk atau sediaan farmasi. Berbagai sediaan obat dan makanan serta minuman yang akan dipasarkan untuk publik memiliki syarat tertentu terhadap cemaran mikroba, bahkan obat-obat steril bebas dari cemaran mikroba dan bahan-bahan lain yang mengancam keselamatan penggunanya.

Selama melakukan kegiatan dalam laboratorium ini harus tetap menjaga keamanan dan keselamatan diri, oleh karena itu tahap pengenalan alat dan proses sterilisasi menjadi amat penting diketahui dan dipahami oleh para mahasiswa yang akan bekerja di dalamnya.Selain penggunaan alat pelindung diri (APD) di laboratorium, mahasiswa juga perlu mengenal dan paham cara menggunakan alat-alat yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi. Beberapa alat laboratorium tersebut meliputi alat-alat yang besar seperti mikroskop, autoklaf, inkubator, oven, lemari pendingin,dan colony counter. Alat-alat lain adalah alat-alat kecil seperti mikropipet, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, tabung durham, kawat ose/sengkelit, pinset, timbangan dan lain-lain.

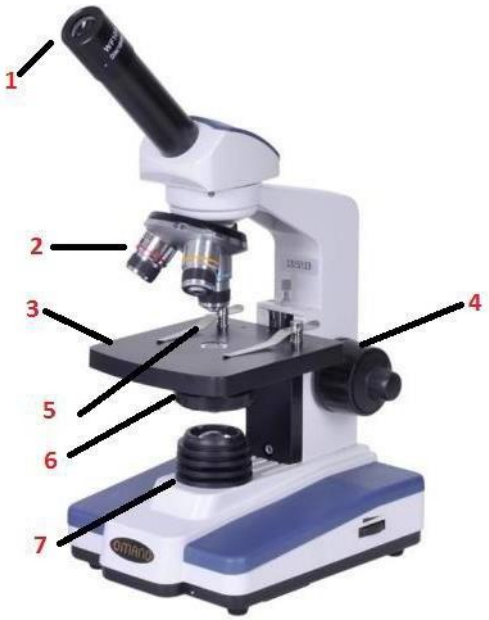
Untuk melakukan proses sterilisasi juga diperlukan pengetahuan yang cukup tentang alat dan proses-proses sterilisasi yang akan digunakan atau dipilih. Proses sterilisasi biasanya menggunakan alat-alat dan persyaratan tertentu yang harus dipelajari secara spesifik, apalagi untuk bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan sediaan farmasi. Oleh karena itu bab persiapan praktikum ini juga memiliki peran yang penting untuk melakukan tahaptahap praktikum mikrobiologi berikutnya.

1. Alat Laboratorium

Alat-alat laboratorium yang umum digunakan dalam praktikum mikrobiologi antara lain mikroskop, autoklaf, oven, inkubator, colony counter, lemari pendingin, hot platestirrer, mikropipet, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, tabung durham, kawat ose, pinset.

Fungsi dari alat-alat tersebut adalah :

a. Mikroskop: digunakan untuk mengamati mikroorganisme yang sangat kecil ukurannya. Bagian-bagian dari mikroskop cahaya adalah:
   1) Lensa okuler untuk memperbesar bayangan yang terbentuk oleh lensa objektif,
   2) Lensa objektif untuk memperbesar specimen,
   3) Pengatur focus kasar yaitu skrup untuk menaikkan dan menurunkan meja benda,
   4) Pengatur focus halus yaitu skrup untuk menaikkan dan menurunkan meja benda secara halus,
   5) Meja benda tempat meletakan specimen,
   6) Sumber cahaya,
   7) Kondesor cahaya dan penjepit specimen.



Bagian-bagian dari mikroskop cahaya:

1) Lensa okuler; memperbesar penampakan objek
2) Lensa obyektif; memperbesar objek
3) Meja objek; tempat meletakkan objek
4) Mikrometer; memfokuskan bayangan
5) Penjepit preparat
6) Pengatur intensitas cahaya
7) Cahaya; sumber cahaya.

b. Autoklaf adalah alat yang digunakan untuk sterilisasi alat, bahan, atau media tertentu dengan menggunakan uap panas pertekanan. Alat ini menggunakan uap air panas bertekanan kira 2 atm(=15 Psi) dengan lama strerilisasi umumnya 15 menit.

Cara penggunaan autoklaf:

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
6) tunggu sampai selesai proses sterilisasi
7) buka katup pengaman agar uap keluar, setelah tekanan turun, buka autoklaf dan keluarkan alat/bahan yang telah steril.

c. Oven, bagian dari alat yang digunakan untuk sterilisasi dengan metode panas kering. Suhu sterilisasi dengan oven kira-kira 1600 C selama 60 menit. Sterilasasi dengan oven digunakan untuk alat, bahan atau media yang tahan terhadap pemanasan tinggi.

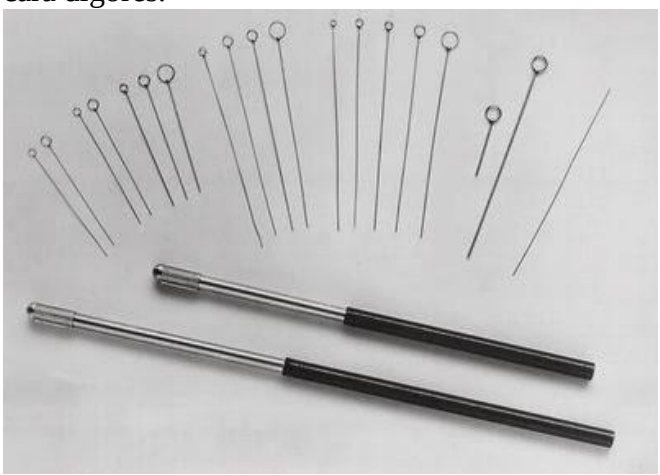
Oven adalah alat yang digunakan untuk sterilisasi alat dan bahan dengan menggunakan udara kering. Oven digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas seperti Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi dan gelas lainnya. Lamanya sterilisasi tergantung pada jumlah alat disterilkan dan ketahanan alat terhadap panas.

d. 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.

e. Counter adalah alat yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri.

f. Lemari pendingin adalah alat yang digunakan untuk menyimpan media atau bahan/spesimen agar isi dan mutu tidak berubah.

g. Kawat ose/loop/sengkelit adalah alat yang digunakan untuk menanam bakteri dengan cara digores.



h. Alat-alat lain yang digunakan dalam praktikum seperti alat gelas (erlenmeyer, beaker glass, cawan petri), mikropipet, kaca obyek, lampu bunsen, disc antibiotik, tabung durham,dan lain-lain.

2. Teknik Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu cara untuk membebaskan alat ataupun bahan dari segala bentuk kehidupan terutama mikrooganisme. Dalam praktikum mikrobiologi sterilisasi dapat dilakukan secara fisik dan kimia, pemilihan cara sterilisasi tergantung pada jenis bahan yang akan disterilkan ataupun bentuk bahan/sediaan yang akan disterilkan.

Jenis Sterilisasi yang biasa digunakan adalah:

a. Sterilisasi Pemijaran
   Cara ini terutama digunakan untuk sterilisasi kawat ose yang terbuat dari platina ataupun nikrome, dilakukan dengan membakar ose sampai pijar dua sampai tiga kali
b. Sterilisasi Udara Kering (Oven)
   Oven umumnya digunakan untuk sterilisasi alat-alat gelas seperti erlemeyer, baker glass, petri dish, dan alat gelas lainnya. Temperatur yang digunakan 150 – 170^{o}C selama minimal 1 jam tergantung jumlah alat yang disterilkan.
c. Sterilisasi Uap Bertekanan (Otoklaf)
   Otoklaf merupakan tehnik sterilisasi yang paling efisien, karena adanya uap panas akan memperbesar penetrasi uap air ke dalam sel mikroba dan distribusi panas lebih merata sehingga terjadi koagulasi protein yang mempercepat kematian mikroba. Umumnya digunakan untuk sterilisasi media mikrobiologi, kapas, kertas maupun alat gelas tertentu.
d. Sterilisasi dengan Penyaringan

Mekanisme penyaringan berdasarkan perbedaan ukuran partikel , penyaring dibuat memiliki pori yang sangat kecil sehingga cukup untuk menahan bakteri, saringan akan tercemar bakteri sedangkan cairan yang melewatinya bebas bakteri—steril

Bahan-bahan yang tidak tahan pemanasan seperti serum, darah, toksin, maupun sediaan farmasi yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan menggunakan penyaring bakteri seperti:

1) Berkefeld filter ⇨ penyaring bakteri dari tanah diatomae
2) Chamberlain Filter ⇨ penyaring bakteri dari porselein
3) Seitz filter ⇨ penyaring bakteri dari asbes
4) Fritted glass filter ⇨ penyaring bakteri dari gelas

C. PROSEDUR KERJA

1. Pengawas praktikum mendemonstrasikan cara menggunaan alat yang benar sambil menjelaskan fungsinya.
2. Praktikanmempraktekkan cara menggunaan alat dengan benar.
3. Praktikan mempraktekkan penggunaan autoklaf dan oven sebagai alat sterilisasi.

BAB III
PEMBUATAN MEDIA

A. TUJUAN

1. Menerapkan cara pembuatan media padat untuk pengujian mikrobiologi
2. Menerapkan cara pembuatan media cair untuk pengujian mikrobiologi

B. DASAR TEORI

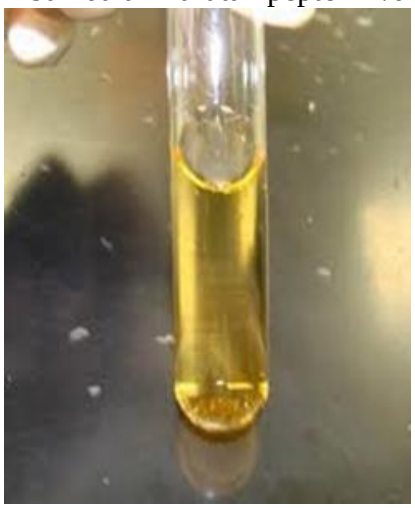
Media adalah campuran nutrien atau zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan. Media selain untuk menumbuhkan mikroba juga dibutuhkan untuk isolasi & inokulasi mikroba serta untuk uji fisiologi dan biokimia mikroba. Media yang baik untuk pertumbuhan mikroba adalah yang sesuai dengan 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.

Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu: sumber energi misalnya gula, sumber nitrogen, juga ion inorganik essensial 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. Berdasarkan bentuknyanya media dibedakan menjadi:

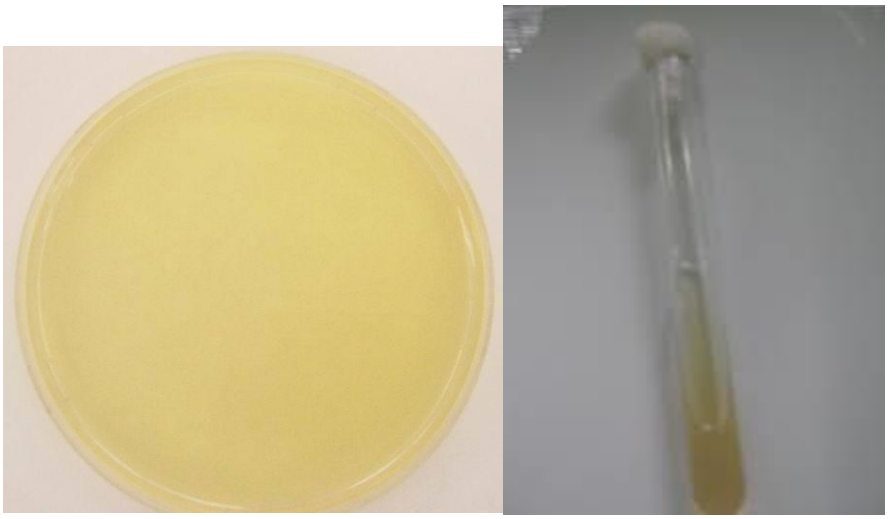
1. Media Cair

Media cair digunakan untuk pembenihan diperkaya sebelum disebarke 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%



2. **Media semi padat**
   Adalah media yang mengandung agar sebesar 0.5 %
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.



Berdasarkan tujuan penggunaannya media dibedakan menjadi

a. Media isolasi
   Media yang mengandung unsur esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba.
b. 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.

4. **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.

Jenis media dan fungsinya dijabarkan sebagai berikut ini :

Jenis	Nama	Fungsi
Cair	Kaldu Nutrisi (Nutrient Broth)	Media Pengayakan dan pembiakan
	Kaldu Darah	Media pembiakan dan melihat sifat hemolysis
	Air Pepton (Pepton Dilution Fluid/PDF)	Media pengayaan
	Kaldu empedu	Media pembiakan bakteri enterik

	Gula pepton (kaldu gula) dengan gula yang digunakan glukosa atau laktosa	Media untuk melihat fermentasi gula
Semi padat	0,5% Agar	Untuk melihat gerak bakteri
Padat	Agar nutrisi (Nutrient Agar)	Untuk mempelajari koloni bakteri
	Agar Darah	Untuk melihat koloni bakteri dan sifat hemolysis
	Agar Endo	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan peragi laktosa
	EMBA-eosin Methylene Blue Agar	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan peragi laktosa
	SS Agar – Salmonella Shigella Agar	Media pembiakan Salmonella dan Shigella
	TCBS – Thiosulphate Citrate Bile	Media Pembiakan Vibrio
	Agar darah telurit	Media pembiakan Corynebacterium diphteriae
Agar Miring	Lowenstein-Jensen	Media pembiakan Mycobacterium tuberculosis
	TSIA – Triple Sugar Iron Agar	Media untuk melihat kemampuan bakteri dalam meragi gula dan membentuk H2S
	Nutrient Agar	Untuk peremajaan koloni murni

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

a. Cawan petri
b. Erlenmeyer
c. Gelas ukur
d. Tabung reaksi
e. Pipet
f. Tip pipet
g. Batang pengaduk
h. Penangas air/pemanas

2. Bahan

a. Nutrien agar (NA)
b. Pepton Dilution Fluid (PDF)
c. Muller Hinton Agar (MHA

d. Mc Conkey Broth (MCB)
e. Plate Count Agar (PCA)
f. Aquadest

D. CARA KERJA

1. Timbang media sesuai prosedur di kemasan. (Catatan : Buatlah media sesuai kebutuhan masing-masing/sesuai instruksi dari Dosen/Penanggung jawab praktikum).
2. Serbuk media dimasukkan secara hati-hati ke dalam Erlenmeyer
3. Tambahkan aquades dan aduk sampai merata dengan batang pengaduk
4. Untuk media yang perlu dipanaskan, gunakan pemanas sampai media tercampur homogen (kuning dan jernih), hati-hati jangan sampai media mendidih dan meluap, panaskan dengan hati-hati menggunakan penangas/elemen
5. Untuk pembuatan media agar miring NA, sebelum di autoklaf, tuangkan media NA untuk agar miring sejumlah kurang lebih 5 ml ke dalam tabung reaksi. Agar miring ini akan digunakan untuk kultur atau pembiakan bakteri. Sisa media NA biarkan dalam erlenmeyer.
6. Untuk media cair (PDF dan MCB) masukkan sejumlah 9 ml ke dalam tabung reaksi, PDF sebanyak 10 tabung, dan MCB sebanyak 30 tabung.
7. Tutup erlenmeyer dan tabung reaksi yang berisi media dengan kapas penutup tabung.
8. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 1210 C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
9. Untuk media NA miring, keluarkan kedia dari autoklaf dan bekukan dalam posisi miring
10. Untuk media NA dan MHA, tuangkan dalam cawan petri steril dan tunggu sampai beku.

LEMBAR KERJA :

1. **Nutrien Agar**
   Volume : ……..
   NA Yang Ditimbang : ……..
   Jumlah Tabung / Agar Miring: ……
   Jumlah Tabung / Agar Tegak : …….
   Volume NA Tiap Tabung : …….
   Sterilisasi : …….
2. **Pepton Dilution Fluid**
   Volume : ……..
   PDF Yang Ditimbang : ……..
   Jumlah Tabung Reaksi PDF : ……
   Volume PDF Tiap Tabung : ……..
   Sterilisasi : ……..
3. **Mc Conkey Broth**
   Volume : ……..
   MCB Yang Ditimbang : ……..
   Jumlah Tabung Reaksi MCB : ……
   Volume MCB Tiap Tabung : ……..
   Sterilisasi : ……..
4. **Plate Count Agar**
   Volume : ……..
   Pca Yang Ditimbang : ……..
   Sterilisasi : ……..
5. **Muller Hitton Agar**
   Volume : ……..
   MHA Yang Ditimbang : ……..
   Sterilisasi : ……..

TANGGAL DAN PARAF DOSEN

BAB IV
PENGENALAN MIKROORGANISME

A. PENDAHULUAN

Sudah sampai dimanakah persiapan praktikum mikrobiologi saudara? Kami berharap anda sudah siap dan dapat melanjutkan bab 4 ini tentang Pengenalan Mikroorganisme. Mahasiswa sekalian, mikroorganisme merupakan suatu kelompok organisme yang tidak dapat dilihat secara langsung dengan menggunakan mata telanjang. Untuk mengamati mikroorganisme, baik yang hanya terdiri atas sebuah sel saja maupun yang lebih dari satu sel, diperlukan alat bantu seperti mikroskop, lup dan lain-lain. Bentuk bakteri yang beraneka ragam berupa seperti bola, batang, bengkok atau koma, dan spiral. Ukuran bakteri jugaberaneka ragam dari kira-kira 0.1 µ. sampai dengan 100 µ.

Pada praktikum ini akan dikenalkan tentang berbagai bentuk dan jenis bakteri sehingga diharapkan setelah melaksanakan praktikum ini mahasiswa dapat :

1. menjelaskan perbedaan bakteri gram positif dan negative
2. menjelaskan perbedaan berbagai bentuk bakteri dan contohnya
3. melakukan pembiakan bakteri secara aseptik dengan metode gores baik pada media agar rata dan agar miring

Diharapkan setelah melakukan praktikum bab 2 ini dengan baik dan benar dapat menjadi bekal mahasiswa untuk melakukan pengujian mikrobiologi termasuk melaksanakan penelitian bidang mikrobiologi.

B. PEWARNAAN BAKTERI GRAM

1. TUJUAN

a. Menjelaskan perbedaan berbagai bentuk bakteri dan contohnya
b. Menjelaskan perbedaan bakteri gram positif dan negatif

2. DASAR TEORI

Bentuk bakteri beraneka macam yaitu basil (tongkat/batang), coccus, spirilum. Bakteri bentuk basil pembagiannya yaitu basil tunggal, diplobasil, dan tripobasil.Bakteri bentuk kokus dibagi menjadi monokokus, diplokokus, dan stafilokokus.Untuk bakteri bentuk spirilum hanya dibagi dua yaitu setengah melengkung dan melengkung (Dwidjoseputro,1998). Melihat dan mengamati bakteri dalam kedaan hidup sangat sulit, karena selain bakteri itu tidak berwarna juga transparan dan sangat kecil. Untuk mengatasi hal tersebut maka dikembangkan suatu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama dalam penelitian-penelitian mikrobiologi (Dwidjoseputro, 1998).

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri dengan mudah.Pewarnaan gram untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yakni gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884. 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 lipoposakarida (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, poripori 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 dasarkristal 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 keduasafranin/fuchsin yang berwarna merah. Kuman yang mempertahankan warna dasarungu 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 menganggu pengamatan dan diperoleh hasil yang baik. Kemudian pulasan bakteri difiksasi.Fiksasi dilakukan dengan cara melewatkan preparat diatas api atau merendamnya dengan metanol. Fiksasi bertujuan melekatkan bakteri pada glass objek dan mematikan bakteri. Setelah fiksasi dilakukan maka teknik pewarnaan dapat segera dilanjutkan.

3. ALAT DAN BAHAN

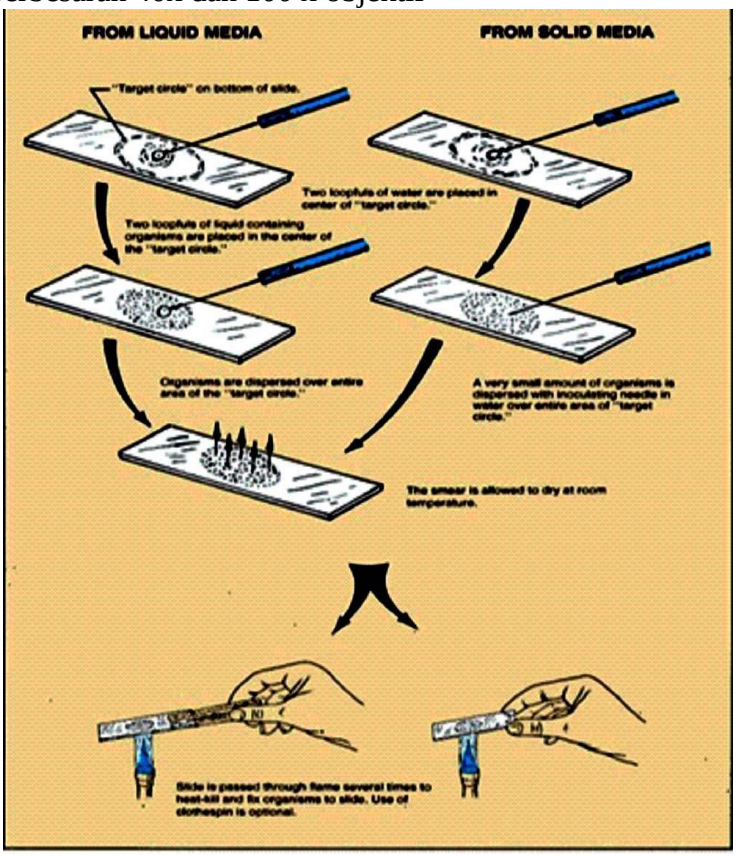
a. **Alat**
   1) Mikroskop
   2) Kaca objek
   3) Cover glass
   4) Jarum ose
   5) Bunsen
   6) Beaker glass
   7) Kertas saring
   8) Pinset

b. **Bahan**
   1) *Staphyllococus aureus*
   2) *Bacillus subtilis*
   3) *Escherichia coli*
   4) Aquadest
   5) Karbol Kristal Ungu
   6) Fuchsin
   7) Lugol
   8) Alcohol 95 %
   9) Immersion oil

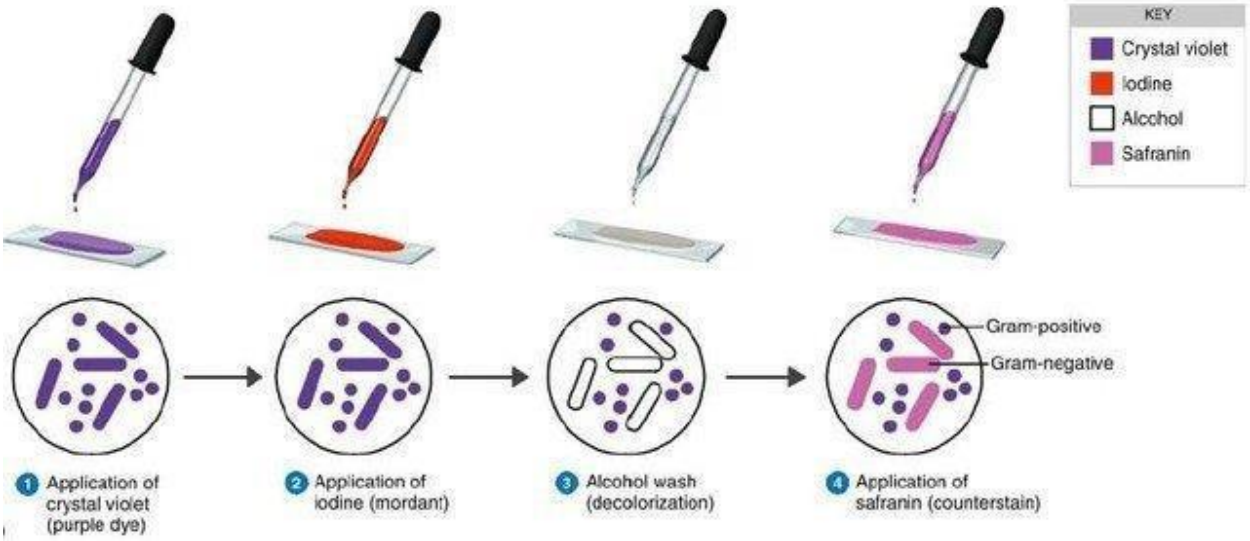
4. PROSEDUR KERJA

a. Ambil satu sengkelit biakan kuman, letakkan pada kaca objek, suspensi dengan air kemudian difiksasi

b. Tambahkan pewarna I kristal ungu biarkan selama lima menit, cuci dengan air
c. Tambahkan cairan lugol biarkan 45 – 60 detik cuci dengan air
d. Bilas dengan alcohol 95 % sampai warna ungu tidak mengalir, cuci dengan air
e. Tambahkan pewarna II fuchsin, diamkan 1-2 menit. Cuci dengan air, keringkan
f. Tambahkan minyak imersi, tutup dengan cover glass, periksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x dan 100 x objektif



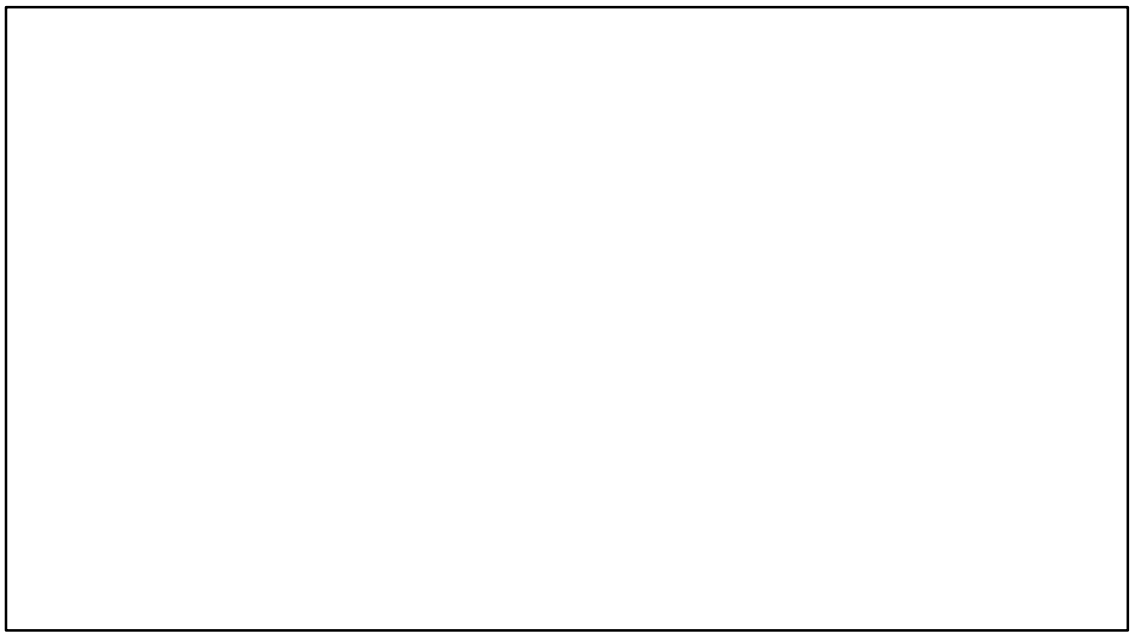
Procedure for making a bacterial smear



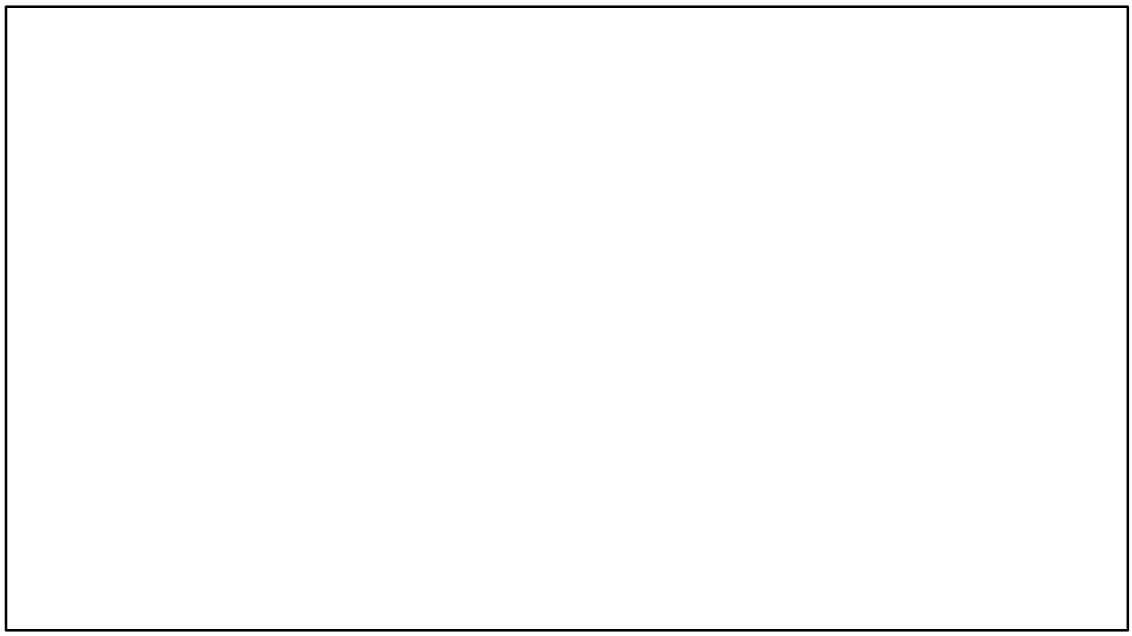
LEMBAR KERJA

HASIL/PENGAMATAN

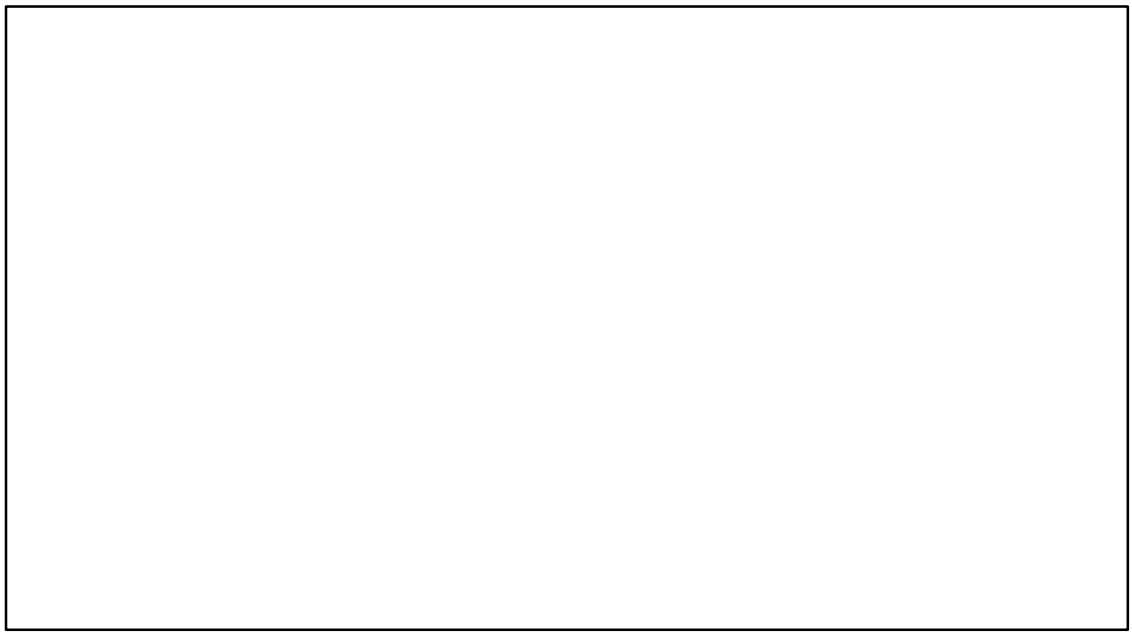
1. *Staphyllococus aureus*



2. *Bacillus subtilis*



3. *Escherichia coli*



TANGGAL DAN PARAF DOSEN

C. PEMBIAKAN BAKTERI

1. TUJUAN

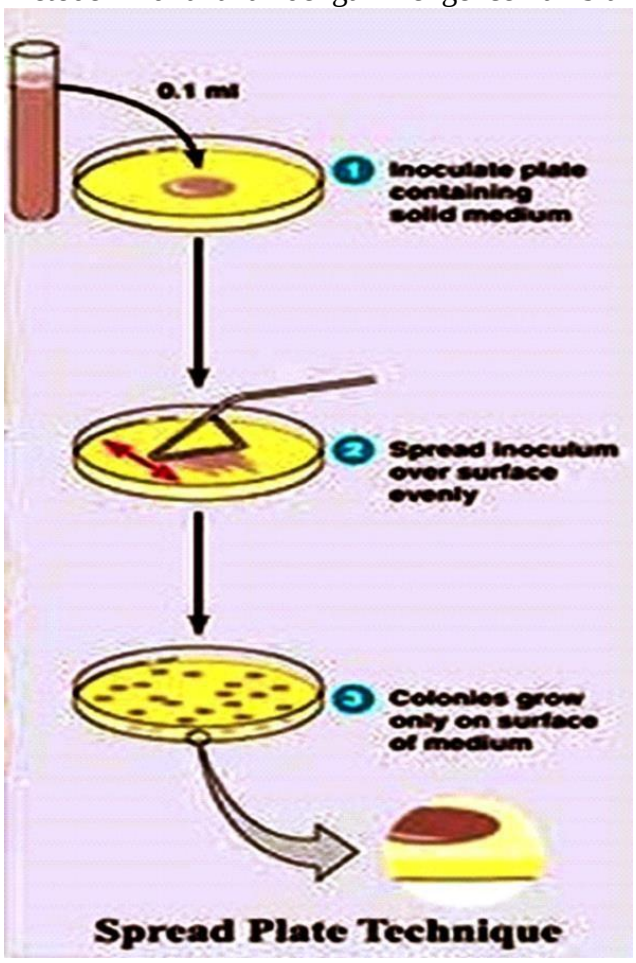
a. Melakukan pemindahan biakan bakteri secara aseptic
b. Melakukancara pembiakan bakteri dengan metode gores pada media rata dan miring

2. DASAR TEORI

Pada penanaman mikroba perlu diperhatikan kebutuhan nutrisi untuk mikroba tersebut sehingga dapat tumbuh dengan baik.Isolasi bakteri adalah memisahkan bakteri dari alam dan menanamnya dalam media baru sebagai biakan murni.Teknik untuk menanam bakteri adalah sebagai berikut:

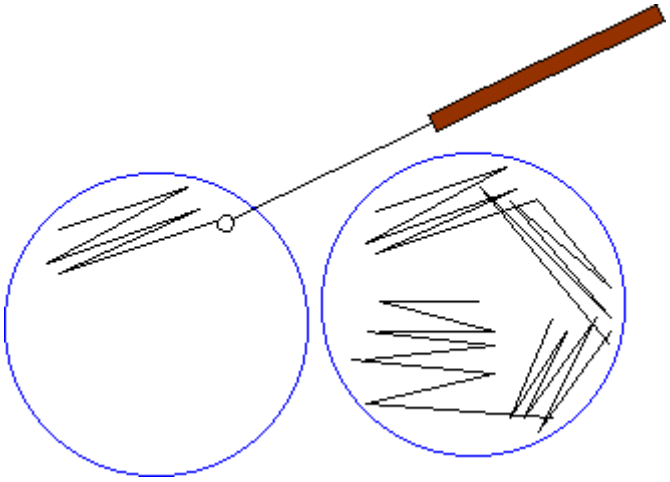
a. ***Spread plate method*** **(cara tebar/sebar)**

Teknik spread platemerupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba dengan cara dipulas atau disebar padapermukaan media agar padat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba.



b. **Streakplate method (cara gores)**

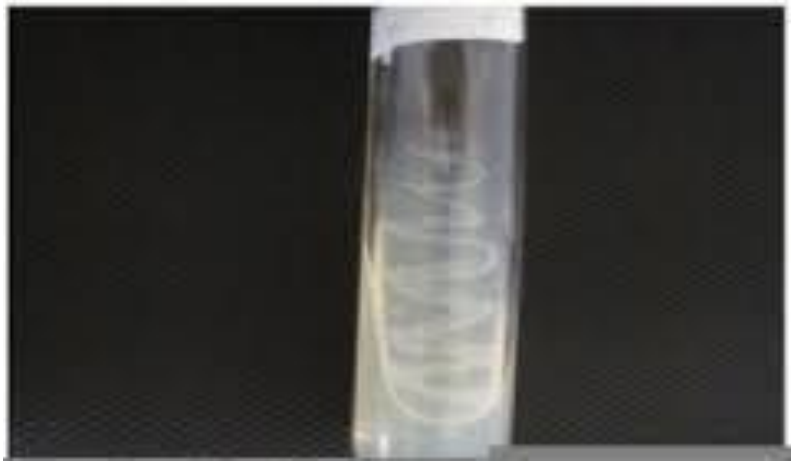
Teknik isolasi koloni bakteri dengan cara ini dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan media agar padat.



c. **Pour plate method (cara tabur)**
Teknik ini dilakukan menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50^{o}C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril.

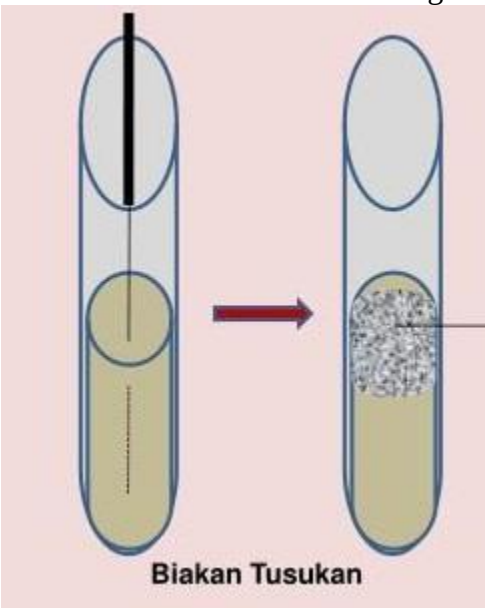
d. **Pembiakan lapangan**
Teknik ini dilakukan dengan cara membasahi seluruh permukaan agar dengan suspense kuman. Hal ini akan menyebabkan pertumbuhan kuman merata. Biasanya digunakan untuk uji kepekaan antibiotika dan uji jenis kuman dengan bakteriofaga

e. **Pembiakan agar miring**
Teknik inokulasi bakteri dengan caramenggoreskan pada permukaan agar miring



f. **Pembiakan dengan tusukan**

Teknik inokulasi bakteri dengan caramenusukkan ose pada permukaan agar tegak.



g. **Biakan cair**

Teknik ini dilakukan dengan cara kedalam wadah yang berisi media cair dicelupkan kawat.

3. ALAT DAN BAHAN

a. **Alat**

1) Kawat ose
2) Lampu Bunsen
3) Beaker glass

b. **Bahan**

1) Agar miring nutrien agar
2) Agar NA lempeng
3) Biakan bakteri *Escherichia coli*
4) Biakan bakteri *Bacillus subtilis*
5) Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*
6) Biakan bakteri *Serratia marcecens*
7) Biakan bakteri *Bacillus violence*

4. PROSEDUR KERJA

a. **Teknik gores (Streak plate method)**

1) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
2) Bakar kawat ose, biarkan dingin.
3) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri
4) Goreskan kawat ose pada permukaan lempeng nutrien agar secara kontinyu sampai setenga permukaan agar, putar cawan petri dan oles kembali pada permukaan agar yang kosong
5) Bakar kembali kawat ose
6) Inkubasikan

b. **Biakan pada agar miring**

1) Siapkan media agar miring

2) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
3) Bakar kawat ose, biarkan dingin.
4) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri
5) Goreskan kawat ose pada permukaan agar miring secara zigzag.
6) Bakar kembali kawat ose
7) Inkubasikan

LEMBAR KERJA

1. Biakan bakteri *Escherichia coli*

Hasil Pengamatan	:
Warna Koloni	:
Jenis Koloni	:
Gambar	:

2. Biakan bakteri *Bacillus subtilis*

Hasil Pengamatan	:
Warna Koloni	:
Jenis Koloni	:
Gambar	:

3. Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil Pengamatan	:
Warna Koloni	:
Jenis Koloni	:
Gambar	:

4. Biakan bakteri *Serratia marcecens*

Hasil Pengamatan	:
Warna Koloni	:
Jenis Koloni	:
Gambar	:

5. Biakan bakteri *Bacillus violence*

Hasil Pengamatan	:
Warna Koloni	:
Jenis Koloni	:
Gambar	:

TANGGAL DAN PARAF DOSEN

BAB V
PENGUJIAN MIKROORGANISME

A. PENDAHULUAN

Apakah anda sudah mengenal mikroorganisme dengan baik? Kami yakin jawaban anda sudah, oleh karena itu mari kita lanjutkan bab berikutnya tentang pengujian mikroorganisme. Mahasiswa sekalian, mikroorganisme merupakan bagian tidak terpisahkan dari kehidupan manusia.Mikroorganisme terdapat di sekitar kita baik yang berupa mikroba patogen maupun bukan.Pengujian mikroorganisme perlu dikembangkan untuk melihat potensi pemanfaatan bagi manusia, seperti untuk pengembangan antibiotic atau pengujian keamanan makanan dan minuman.

Pada praktikum kali ini, para mahasiswa akan dikenalkan dengan beberapa teknik pengujian mikroorganisme, sehingga diharapkan setelah melakukan praktikum ini mahasiswa mempunyai kemampuan untuk :

1. Menjelaskan pengaruh lingkungan(pemanasan serta sterilisasi dan desinfeksi) terhadap pertumbuhan kuman/bakteri
2. Melakukan pengujian dan perhitungan Angka Lempeng Total Bakteri (ALTB)
3. Melakukan pengujian MPN (Most Probable Number) Coliform
4. Melakukan pembuktikan pengaruh pemanasan terhadap pertumbuhan kuman

Pengujian mikroorganisme amat penting dalam bidang farmasi sebagai penyedia obat-obatan maupun makanan dan minuman. Pengujian ini dilakukan untuk menjamin sediaan tersebut layak dikonsumsi oleh masyarakat dan dibuat atau dipersiapkan sesuai dengan cara-cara yang diteapkan, baik CPOB (Cara Pembuatan Obat yang Baik) maupun CPOTB (Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik).

Kompetensi khusus yang ingin dicapai pada bab ini adalah:

1. Menjelaskan pengaruh pemanasan terhadap pertumbuhan kuman/bakteri
2. Menjelaskan pengaruh sterilisasi dan desinfeksiterhadap pertumbuhan bakteri
3. Melakukan pengujian dan perhitungan Angka Lempeng Total Bakteri (ALTB)
4. Melakukan pengujian MPN (Most Probable Number) Coliform

Pada saat akhir praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu menerapkan prinsip pengujian mikobiologi untuk melakukan pengujian terhadap sediaan farmasi serta menjamin sediaan farmasi yang bebas cemaran mikroba. Penerapan prinsip pengujian ini dapat dilakukan mahasiswa pada penelitian bidang mikrobiologi menggunakan metode yang sesuai, baik dalam bentuk sampel obat tradisional, makanan dan minuman.

B. PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

1. TUJUAN PRAKTIKUM

a. Melakukan pembuktikan pengaruh pemanasan terhadap pertumbuhan kuman
b. Melakukan pembuktian pengaruh proses sterilisasi dan desinfeksi terhadap pertumbuhan kuman

2. DASAR TEORI

Pertumbuhan mikroba sangat dipengaruhi oleh lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan pengaruh lain. Selain dipengaruhi oleh faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme juga dipengaruhi faktor dari dalam bakteri itu sendiri.Untuk pertumbuhannya mikroorganisme membutuhkan kondisi yang ideal sehingga mikroba dapat tubuh secara optimal. Perubahan lingkungan akan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, bahkan

dapat mengubah morfologi dan fisiologi dari mikroba tersebut. Mikroorganisme dapat beradaptasi dengan baik di lingkungan yang berbeda.mikroorganisme dapat berkembang dengan sangat pesat, bahkan pertumbuhan mikroorganisme yang sangat besar dapat menjadi suatu wabah penyakit atau meyebabkan kerusakan pada bahan makanan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme diantaranya adalah:

a. Suhu
   Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh optimal pada suhu tubuh manusia, tetapi ada sebagian bakteri yang dapat tumbuh pada kondisi cukup ekstrim, misalnya pada suhu panas atau dingin.
b. pH
   pH optimal untuk pertumbuhan bakteri adalah sekita pH netral yaitu 6,5 – 7,4. Pada umumnya bakteri tidak akan tumbuh pada pH terlalu asam atau basa. Sehingga ketahanan terhadap pH ini yang dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan bahan makanan, misalnya dengan teknik fermentasi, dimana makanan dibuat fermentasi.
c. Oksigen
   Oksigen merupakan unsur yang sangat penting untuk pertumbuhan mikroba aerob.
d. Tekanan osmotic
   Tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan air keluar dari dalam sel bakteri, akibatnya bakteri dapat mati atau terhambat pertumbuhannya. Teknik ini dapat digunakan untuk mengawetkan makanan dengan cara penambahan garam sehingga tekanan osmotic cairan akan naik.
e. Unsur kimia
   Untuk pertumbuhannya bakteri membutuhkan unsur-unsur kimia seperti C, H, N, S, dan P. selain itu juga membutuhkan unsur mikro seperti, Zn, Fe, dan Cu.

3. ALAT DAN BAHAN

a. Biakan kuman
b. Lempeng na
c. Kapas usap steril
d. Kaldu nb
e. Desinfektan
f. Uang logam

4. PROSEDUR KERJA

a. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman
   1) Ambil satu sengkelit biakan kuman masukkan dalam nutrient broth
   2) Celupkan kapas usap ke dalam suspensi kuman dan oleskan pada permukaan agar secara merata
   3) Sisa suspensi kuman dididihkan. Setelah mendidih ulangi langkah 2 pada lempeng agar yang lain
   4) Inkubasi pada suhu 37o C selama 24 jam
   5) Bandingkan yang terjadi pada dua cawan petri tersebut.

Hasil Pengamatan

	Suspensi kuman	Suspensi kuman yang dididihkan
Pengamatan		

b. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman

1) ambil satu buah uang logam tempelkan pada permukaan lempeng agar
2) ambil satu buah uang logam yang lain, bakar hingga memijar dan tempelkan pada permukaan lempeng agar lain
3) inkubasi selama 24 jam pada suhu 37o C
4) amati yang terjadi

Hasil Pengamatan

	Uang logam yang tidak dipijar	Uang logam yang dipijar
Pengamatan		

c. Melihat pengaruh desinfektan terhadap pertumbuhan kuman

1) kapas usap steril dibasahi oleh NB dan diusapkan pada telapak tangan, kemudian diusapkan pada lempeng agar
2) cuci tangan dengan sabun, ulangi langkah 1 pada lempeng agar lain
3) cuci tangan dengan desinfektan, ulangi langkah 1 pada lempeng agar lain
4) inkubasi selama 24 jam pada suhu 37o C
5) amati yang terjadi

Hasil Pengamatan

	Tangan yang tidak dicuci sabun/desinfektan	Tangan yang dicuci sabun/desinfektan
Pengamatan		

TANGGAL DAN PARAF DOSEN

C. UJI KEPEKAAN BAKTERI TERHADAP ANTIBIOTIKA

1. TUJUAN PRAKTIKUM

a. Mampu melakukan uji kepekaan kuman terhadap berbagai antibiotikadengan metode difusi dan dilusi.
b. Mampu menginterpretasi hasil tes uji kepekaan antibiotika

2. DASAR TEORI

Penyakit infeksi bakteri dapat diobati dengan antibiotika baik yang bersifat bakterisida maupun bakteriostatika. Untuk mengatasi penyakit dengan tepat diperlukan data kepekaan kuman penyebab infeksi tersebut terhadap antibiotika yang tersedia. Pengujian kepekaan antibiotik dapat dilakukan dengan metode difusi atau dilusi.

Pada metode difusi prinsipnya adalah terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam media padatyang telah diinokulasi dengan bakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan cara cakram atau sumuran. Pada metode difusi cakram, kertas cakram yang mengandung antibiotik diletakkan di atas media yang telah mengandung mikroba, kemudian diinkubasi dan dibaca hasilnya berdasarkan kemampuan penghambatan mikroba di sekitar kertas cakram. Metode difusi sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang sudah ditanami bakteri.Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran tersebut dan diinkubasikan.Zona jernih yang terbentuk di sekitar cakram atau sumuran merupakan indikator penghambatan antibiotik terhadap pertumbuhan mikroba.

Metode pengujian berikutnya adalah dengan metode dilusi.Pada metode ini dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, dapat menentukan minimum inhibitoryconcentration(MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) dan minimum bacterial concentration (MBC)atau kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada agen medium cair yang ditambahkan dengan agen mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM.

Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut dilanjutkan dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM. Metode Dilusi Padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

3. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

a. Alat gelas : cawan petri, beaker glass, pipet, erlenmeyer, tabung reaksi
b. Mikropipet
c. Pinset
d. Kawat ose
e. Pipet ukur
f. Jangka sorong

2. Bahan

a. Suspensi kuman
b. Standar Mc. Farland
c. Cakram antibiotic
d. Media Muller Hinton Agar (MHA)

e. Aquadest steril
f. Alkohol 70 %
g. Kapas usap steril

3. PROSEDUR KERJA

a. Cara Cakram

1) kapas usap steril dimasukkan kedalam suspensi kuman
2) pada lempeng agar Muller Hitton usapkan suspensi kuman dengan kapas secara merata
3) dengan menggunakan pinset ambil cakram antibiotika dan letakkan diatas lempeng yang telah ditanami kuman
4) inkubasi pada 35o C selama 16-18 jam

b. Cara Tabung

1) buat suspensi antibiotika dengan kadar tertentu
2) masukkan 1 ml suspensi kuman kedalam tubung reaksi yang telah berisi larutan antibiotika
3) inkubasi pada suhu 35o C selama 16 – 18 jam

4. Hasil Pengamatan

Diameter hambatan : …… cm
Kuman : ……..
Antibiotika : ……..

TANGGAL DAN PARAF DOSEN

D. ANGKA LEMPENG TOTAL BAKTERI

1. TUJUAN

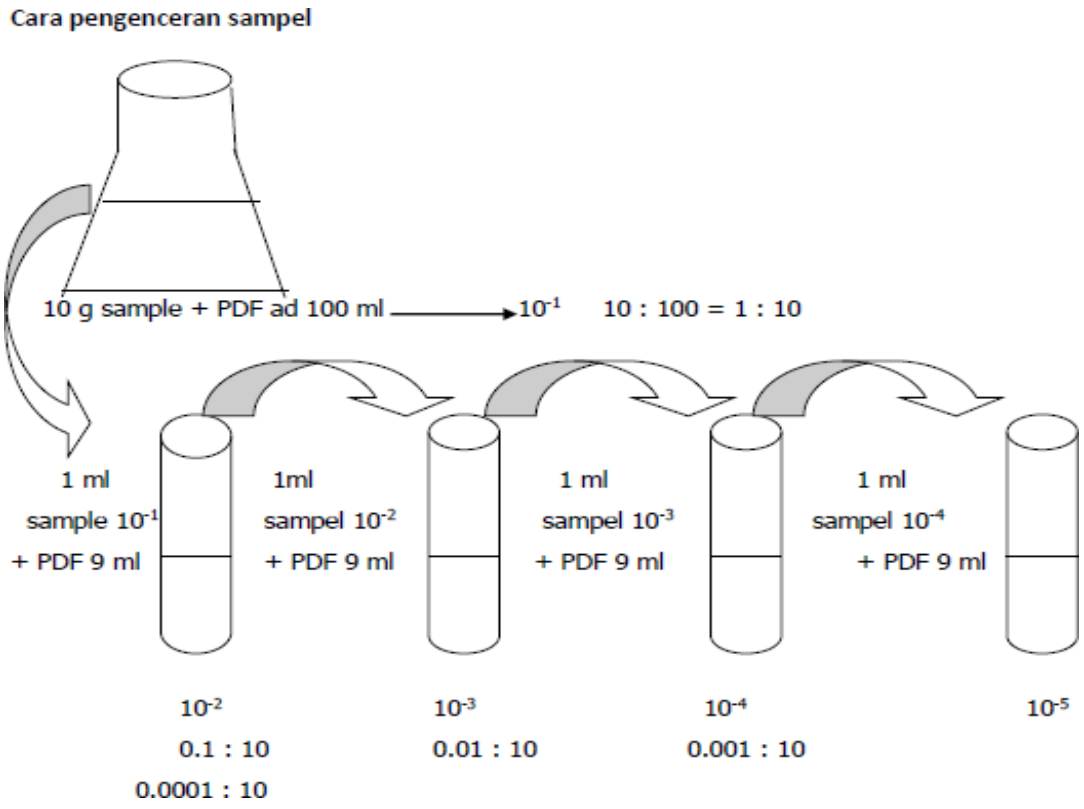
a. mampu melakukan pengujian angka lempeng total bakteri (ALTB)
b. mampu menginterpretasi hasil pengujian ALT.

2. DASAR TEORI

Angka Lempeng Total bakteri adalah jumlah koloni bakteri aerob mesofil yang terdapat dalam tiap gram ataupun ml sample uji. Bakteri mesofil merupakan bakteri yang tumbuh pada temperatur minimal 10-20°C, optimal pada suhu 20-40°C dan maksimal pada suhu 40-45°C. Uji ALTB mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo.Untuk mendapatkan ALTB representative dilakukan terhadap beberapa pengenceran sample seperti 10-1; 10-2 ; 10-3 dst. Sample bentuk padat diperlakukan sebagai berikut; sample padat dihancurkan dalam kemasan sebelum dibuka, timbang sebanyak 25 g, larutkan dengan PDF hingga 250 mlSample bentuk serbuk seperti jamu, timbang sebanyak 10 g, larutkan dengan PDF hingga 100 ml. Sample cair seperti minuman ringan tidak perlu diencerkan lebih dahulu.

Sampel yang akan diuji terlebih dahulu dihomogenkan dalam larutan pepton pengencer (pepton dilution fluid, PDF) sehingga didapat pengenceran 10-1. Dari hasil pengenceran tersebut, dipipet sebanyak 1 ml ke dalam tabung pertama yang berisi 9 ml larutan pengencer PDF sehingga diperoleh pengenceran 10-2. Campuran dikocok homogen. Pengenceran dilakukan demikian seterusnya sehingga diperoleh pengenceran bertingkat 10-3, 10-4, 10-5 dan seterusnya. Dari setiap hasil pengenceran, dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Selanjutnya, ke dalam setiap cawan petri, dituang sebanyak 15-20 ml media Plate Count Agar (PCA). Cawan petri segera digoyangkan perlahan supaya sampel tercampur rata dengan media pembenihan. Setelah media membeku, cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.

Pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 30-300 koloni dicatat. Pada setiap pemeriksaan, selalu disertakan media control uji (blanko). Angka lempeng total untuk 1 gram atau 1 mL sampel dihitung dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran.ALTB dihitung dari petri dengan jumlah koloni representative jika tidak terdapat jumlah koloni representatif, ALTB merupakan prakiraan dari pengenceran tertinggi.



3. ALAT DAN BAHAN

a. Alat

1) petri dish
2) tabung reaksi
3) pipet ukur
4) erlemeyer

b. Bahan

1) Pepton Dilution Fluid (PDF)
2) Plate Count Agar (PCA)
3) sample makanan, minuman, jamu

4. PROSEDUR KERJA

1) buat pengenceran sample dengan PDF
2) masukkan 1 ml sample tiap pengenceran ke dalam petri dish steril (duplo)
3) tambahkan PCA secukupnya aduk hingga rata, biarkan membeku
4) inkubasi 24 – 48 jam pada suhu 37o C
5) hitung angka lempeng total bakteri

LEMBAR KERJA
ALTB pada Sampel Jamu
CONTOH

Sample : JAMU Tolak Angin
Diproduksi : SIDO MUNCUL
No. Batch : KLM 2345
No. Registrasi : TR 768892001
Konsentrasi sample : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10-5
Jumlah koloni tiap konsentrasi
10^{-3} : 150 170
10^{-4} : 25 40
10^{-5} : 10 17

ALTB : (150 + 170) : 2 : 10^{-3} = (150 + 170) : 2 X 10^3 Kol / g
= 160 x 10^3 = 1,6 x 10^5 kol / g

Syarat ALTB Jamu Serbuk < 10^6 Kol/G
Kesimpulan :
Jamu Sidomuncul Dengan No. Bacth Klm 2345 Memenuhi Syarat Altb

1. **ALTB pada Sampel Jamu**
   Sample :
   Diproduksi :
   No. Batch :
   No. Registrasi :
   Konsentrasi sample
   Jumlah koloni tiap konsentrasi
   10^{-3} :
   10^{-4} :
   10^{-5} :

Hasil perhitungan ALTB Jamu: (Syarat Altb Jamu Serbuk <106 Kol/g)

Kesimpulan :

2. **ALTB Makanan Ringan**
   Sample :
   Diproduksi :
   No. Batch :
   No. Registrasi :
   Konsentrasi sample
   Jumlah koloni tiap konsentrasi
   10^{-3} :
   10^{-4} :
   10^{-5} :

Hasil perhitungan ALTB Makanan Ringan: (Syarat Altb < 10^4 Kol/g)

Kesimpulan :

3. ALTB Minuman Ringan

Sample :
Diproduksi :
No. Batch :
No. Registrasi :
Konsentrasi sample
Jumlah koloni tiap konsentrasi
10^{-3} :
10^{-4} :
10^{-5} :

ALTB Minuman Ringan (syarat $<2.10^2$ Kol/ml) :

Kesimpulan :

E. MOST PROBABLE NUMBER (MPN) COLIFORM

1. TUJUAN

Mampu melakukan uji ***Most Probable Number*** **(MPN) Coliform** pada sampel makanan, minuman ataupun jamu

2. DASAR TEORI

MPN Coliform adalah suatu metode penentuan angka mikroorganisme dengan metode Angka Paling Mungkin yang digunakan luas di lingkungan sanitasi untuk menentukan jumlah koloni Coliform di dalam air, susu dan makanan lainnya. Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung menghitung jumlah bakteri yang dapat memfermentasi laktosa membentuk gas, misalnya bakteri Coliform.

Metode MPN menggunakan medium cair di dalam tabung reaksi, dimana prinsipnya adalah menghitung jumlah tabung yang positif yang ditumbuhi oleh mikroba setelahinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.Tabung pada pengujian MPN dinyatakan positif apabila timbul kekeruhan dan atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham. Pengujian menggunakan metode MPN terdiri atas dua cara, yaitu menggunakan deretan 3 tabung dan deretan 5 tabung reaksi. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian dan kepekaan yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak. Namun pada prinsipnya cara penentuan menggunakan deretan 5 tabung sama dengan metode MPN menggunakan deretan 3 tabung.

Pengujian MPN dilakukan dengan menggunakan sampel berbentuk cair, apabila sampel yang akan digunakan berbentuk padatan maka sampel tersebut harus dibuat cair (suspensi) lebih dahulu dengan perbandingan 1 :10. Tahapan uji kualitatif koliform secara lengkap terdiri dari tiga tahap, yaitu:

a. Uji Penduga

Uji ini menggunakan Lactose Broth atauMac Conkey Broth (MCB), apabila sampel yang digunakan mengandung bakteri asam laktat, misalnya susu, dapat digunakan Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB). Bakteri asam laktat dapat memfermentasi laktosa dan membentuk gas, hingga dapat mengakibatkan pembacaan uji positif yang salah.

Inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 24 jam, dan tabung dinyatakan positif jika terbentuk gas sebanyak 10% atau lebih dari volume di dalam tabung durham. Tabung yang tidak menunjukkan gas diperpanjang lagi inkubasinya sampai 48 jam.Jika tetap tidak terbentuk gas, dihitung sebagai tabung negatif.

b. Uji Penguat

Terbentuknya gas di dalam Mac Conkey Broth (MCB) atau di dalam Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB) tidak selalu menunjukkan jumlah bakteri koli karena mikroba lainnya mungkin juga ada yang dapat memfermentasi laktosa dengan membentuk gas, misalnya bakteri asam laktat dan beberapa khamir tertentu.

Uji penguat dilakukan dengan memindahkan sebanyak 1 ose biakan dari tabung yang membentuk gas pada media Mac Conkey Broth (MCB) / Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB) ke dalam tabung yang berisi 10 ml Brilliant Green Lactose Bile 2% (BGLB 2%). Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Gas yang terbentuk pada tabung durham dalam media Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) 2% memperkuat bukti adanya bakteri Kliform.

c. Uji Pelengkap

Uji pelengkap dilakukan untuk mengidentifikasi jenis bakteri Coliform dalam sampel yang menunjukkan tabung positif pada uji penguat. Tabung yang menunjukkan hasil positif diambil 1 ose biakan dan digoreskan di atas media endo agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika hasil uji pelengkap menunjukkan terbentuknya koloni hijau metalik pada media endo agar, hasil tersebut menyatakan bahwa terdapat bakteri Escherichia coli pada sampel. Jika hasil uji pelengkap menujukkan terbentuknya koloni berwarna merah tanpa kilap hijau metalik, hasil tersebut menyatakan bahwa bakteri Coliform yang terkandung dalam sampel bukan Escherichia coli tetapi kemungkinan jenis lain dari bakteri Coliform seperti Enterobacter aerogenesis.

3. ALAT DAN BAHAN

a. Alat

1) Tabung reaksi
2) Tabung durham
3) Kawat ose
4) Pipet ukur
5) Erlenmeyer
6) Lampu Bunsen

b. Bahan

1) *Lactose broth*
2) *Mac Conkey Broth* (MCB)
3) Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)
4) Endo Agar

d. Sampel uji

4. PROSEDUR KERJA

a. Uji Penduga

1. Siapkan 9 tabung reaksi berisi 9 ml MCB/LB steril dengan serial pengenceran 10^{-1} ,10^{-2} ,10^{-3}. Tiap pengenceran terdapat masing-masing 3 buah tabung.
2. Sampel dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam masing-masing 3 tabung sesuai pengenceran.
3. Beri tanda untuk setiap sampel dan penngenceran agar tabung tidak tertukar dan mempermudah pengamatan.
4. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37oC
5. Amati dan catat tabung yang menunnjukkan reaksi positif dengan adanya gelembung udara pada tabung durham dan atau mengalami perubahan warna dari ungu menjadi keruh pada larutan uji.
6. Apabila setelah diamati 24 jam tidak terbentuk gas pada tabung duham, maka inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam.

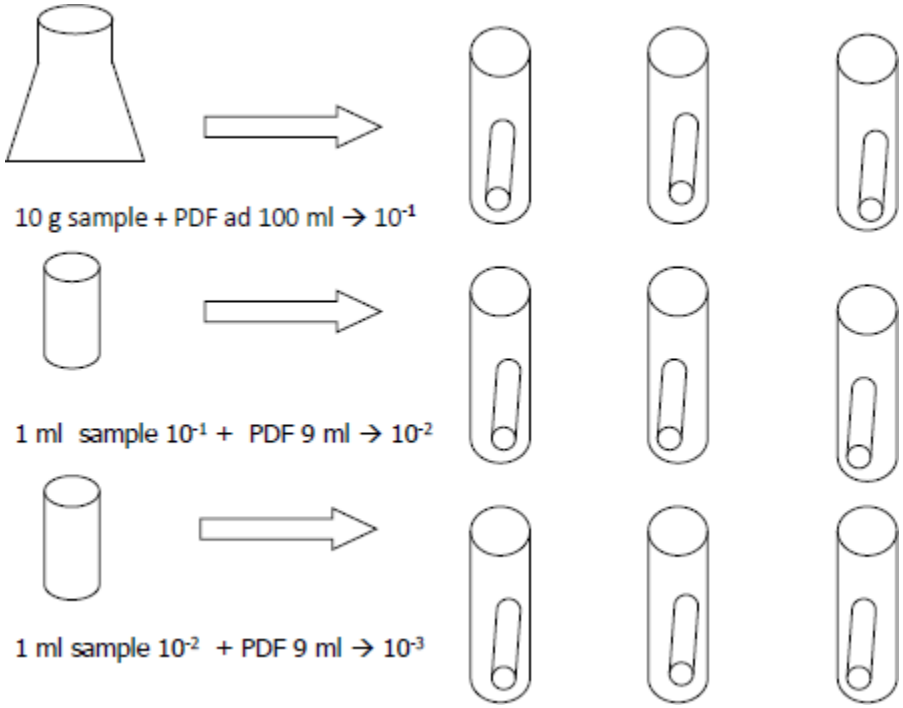
b. Uji Penguat

1) Pindahkan 1 ose dari tabung yang menunjukkan hasil positif dari uji penduga kedalam tabung yang berisi BGLB steril.
2) Beri tanda untuk setiap sampel serta pengencerannya agar tabung tidak tertukar dan mempermudah pengamatan
3) Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37ºC.

4) Setelah 24 jam amati dan catat tabung yang menunnjukkan hasil positif dengan terbentukanya gas dalam tabung durham.
5) Apabila setelah diamati 24 jam belum terjadi perubahan, maka inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam.

c. Uji Pelengkap

1) Hasil biakan positif pada uji penguat MPN Coliform diambil 1 ose biakan
2) Goreskan ke pemukaan media Endo agar secara zig-zag
3) Inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam
4) Amati pertumbuhan koloni pada media Endo agar.
5) Koloni yang menampakkan adanya warna merah dengan hijau metalik merupakan koloni bakteri Escherechia coli.



LEMBAR KERJA
MPN Coliform Jamu

Sample :
Diproduksi :
No. Batch :
No. Registrasi :

TABUNG GAS POSTIF

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN Coliform

SYARAT MPN Coliform Jamu < 3 /g
KESIMPULAN :

GAMBARAN Hasil Pengujian :

LEMBAR KERJA
MPN Coliform Makanan RIngan

Sample :
Diproduksi :
No. Batch :
No. Registrasi :

TABUNG GAS POSTIF

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN Coliform

SYARAT MPN Coliform < 3 /g
KESIMPULAN :

Gambaran Hasil Pengujian :

LEMBAR KERJA
MPN Coliform Minuman Ringan

Sample :
Diproduksi :
No. Batch :
No. Registrasi :

TABUNG GAS POSTIF

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN Coliform

SYARAT MPN Coliform Jamu < 3 /g
KESIMPULAN :

GAMBARAN Hasil Pengujian :

TABEL MPN COLIFORM

JUMLAH TABUNG POSITIF GAS			MPN per GRAM/ ml	Batas keyakinan 95 %	
1 : 10	1 : 100	1 : 1000		Min	Max
0	0	0	3		
0	0	1	3	< 0.5	5
0	1	0	3	< 0.5	9
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	9	1	36
3	0	1	14	3	37
3	0	2	15	3	44
3	1	0	20	7	89
3	1	0	21	4	47
3	1	2	28	10	150
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	74	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	2400		

DAFTAR PUSTAKA

1. Lorian V, Antibiotics in Laboratory Medicine, ed 4, William & Wikins, New York. Dwidjoseputro, D, 1998, Dasar-dasar Mikrobiologi, Djambatan, Malang.
2. Jawet, Melnick, and Adelberg, 2001, Medical Microbiology, ed. 22, California Appleton and Lange.
3. Staf Pengajar Mikrobiologi FKUI, 2005, Penuntun Praktik Mikrobiologi Kedokteran, Medical Multimedia Indonesia, Jakarta
4. Imam Supardi. dan sukamto. *Mikrobiologi dalam Pengolah dan Keamanan Pangan*. Bandung: Yayasan Adikarya IKAPI ; 1999.
5. Maksum Radji. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC ; 2009.
6. Harmita dan Maksum Radji. *Buku Ajar Analisis Hayati*, Edisi Kedua. Depok: *Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia* ; 2005.
7. Srikandi Fardiaz. *Analisis Mikrobiologi Pangan. Jakarta* : PT. Raja Grafindo ; 1993. Departemen Kesehatan RI.
8. Peraturan Kepala BPOM RI No. HK.00.06.1.52.4011 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan. Jakarta : Departemen Kesehatan RI ; 2009.