

# **PANDUAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI**



**Disusun Oleh:  
Bagian Mikrobiologi**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG**

**2021**

## **PENGANTAR**

Modul praktikum Mikrobiologi ini berisi tentang ketrampilan yang harus diketahui oleh mahasiswa pada Blok Kedokteran Industri dan Lingkungan yaitu

1. Ketrampilan pewarnaan dan morfologi
2. Ketrampilan pemeriksaan normal flora
3. Ketrampilan pemeriksaan Air
4. Ketrampilan pemeriksaan Air Susu Sapi

Modul ini diharapkan memudahkan mahasiswa dalam melakukan kegiatan praktikum Mikrobiologi, selain prosedur praktikum modul ini juga dilengkapi dengan gambar-gambar sehingga mahasiswa lebih mengerti materi yang dipaparkan dalam modul ini.

Kami ucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah membantu dalam pembuatan dan penyusunan modul praktikum Mikrobiologi ini.

Malang, September 2021

Penyusun

## **BAB I PETUNJUK UMUM**

Mikrobiologi adalah ilmu yang mempelajari kuman atau mikroba dalam ukuran yang sangat kecil. Mikroba yang dipelajari merupakan mikroba yang dapat menimbulkan penyakit.

Praktikum mikrobiologi ini perlu ketelitian dan bekerja dengan sebaik-baiknya sehingga sebelum melakukan praktikum persiapkan sebaik mungkin dengan membaca buku kuliah/buku pegangan (textbook) dan buku petunjuk praktikum.

### **Sebelum Praktikum**

1. Siapkan : buku petunjuk praktikum, buku laporan praktikum, pensil warna
2. Pakailah baju praktikum dengan identitas nama pada dada sebelah kiri
3. Persiapkan peralatan yang akan dipergunakan sesuai dengan topik praktikum dan periksa kelengkapan alat dan bahannya.
4. Jika peralatan dan bahan praktikum dalam keadaan tidak lengkap atau rusak laporkan pada Instruktur
5. Jika mahasiswa merusakkan peralatan praktikum, maka diwajibkan untuk mengganti alat tersebut

### **Selama Praktikum**

1. Tidak diperbolehkan merokok, makan, atau memasukkan jari/benda-benda lain ke dalam mulut
2. Jika terjadi kecelakaan (luka kecil atau biakan kuman hidup tumpah) laporkan pada Instruktur.
3. Biakan kuman harus selalu di tutup apabila tidak di pakai
4. Sampah harus di buang di tempat sampah
5. Jika tidak dipakai matikan api spiritus/bunsen

### **Setelah Praktikum**

1. Bersihkan mikroskop dengan kertas lensa atau kapas yang dibasahi dengan sedikit xylol
2. Peralatan (seperti; pipet, gelas obyek, swab) yang telah terpakai masukkan kedalam larutan Lysol
3. Masukkan mikroskop pada tempatnya sesuai dengan nomor mikroskop
4. Atur alat/bahan yang telah dipakai pada tempat yang telah di sediakan

5. Bersihkan meja praktikum
6. Cuci tangan setelah selesai memasukkan peralatan dan bahan pada tempatnya dengan sabun antiseptik
7. Dilarang membawa pulang biakan kuman

**Laporan Hasil Praktikum**

1. Catat hasil praktikum sementara pada buku petunjuk praktikum
2. Buat laporan praktikum dan jawablah pertanyaan sesuai dengan buku petunjuk praktikum pada buku laporan praktikum
3. Kumpulkan laporan praktikum sesuai dengan petunjuk Instruktur

## BAB II MIKROSKOP

Mikroskop merupakan alat yang digunakan untuk memeriksa mikroba yang berukuran sangat kecil. Dengan mikroskop dapat melihat morfologi kuman, hasil pewarnaan dan gerakan kuman.

### 1. Persiapan

- Atur letak meja dan kursi, sehingga lensa okuler mikroskop terletak tepat setinggi mata saudara.
- Periksa dan bersihkan kaca, lensa obyektif dan lensa okuler dengan kertas lensa

### 2. Prosedur Menggunakan Mikroskop

- Cara melihatnya sedapat mungkin menggunakan kedua mata, agar mata tidak cepat lelah
- Atur posisi kaca, sehingga sesuai dengan sumber cahaya yang dibutuhkan
- Letakkan kondensor setinggi mungkin, agar sinar yang masuk ke lensa obyektif kuat dan sebanyak mungkin. Letak kondensor tinggi menyebabkan volume udara yang terdapat diantara kondensor dan gelas obyek sedikit, sehingga jalannya sinar yang masuk seolah-olah tidak mengalami perubahan dan sinar yang masuk ke dalam gelas obyek akan mempunyai kualitas dan kuantitas yang cukup. Keadaan sebaliknya akan terjadi apabila kondensor letaknya di bawah.
- Atur sinar yang masuk sehingga lapangan pandang maksimal dan terfokus.
- Letakkan preparat yang akan di periksa pada stage.
- Atur ukuran lensa obyektif dari mulai pembesaran kecil kemudian menggunakan lensa obyektif dengan pembesaran 100x (sebelum diubah pembesaran 100x beri 1 tetes minyak immersi), sebab jarak fokusnya pendek (2mm). Minyak immersi digunakan untuk menghilangkan daya refraksi udara yang terdapat diantara sediaan/gelas obyek dengan lensa obyektif, sehingga sinar lebih banyak masuk ke lensa obyektif karena indek bias minyak immersi hampir sama dengan indeks bias gelas.
- Mulailah pada bagian sediaan yang tidak terlalu tebal (tidak bergerombol /tumpang tindih) dengan menggunakan lensa obyektif pembesaran kecil. Fokuskan sediaan dengan lensa obyektif pembesaran ini, dengan cara memutar makrometer terlebih dahulu, dan kemudian dengan memutar mikrometer.

Kemudian gantilah lensa obyektif dengan pembesaran 100x dan fokuskan dengan memutar mikrometer.

### **3. Prosedur Selesai Menggunakan Mikroskop**

- Bersihkan lensa obyektif dengan menggunakan kertas lensa atau kapas yang dibasahi dengan sedikit xylol
- Jika xylol menempel pada lensa bersihkan dengan menggunakan kertas lensa kering, sebab xylol yang berlebihan akan melarutkan bahan perekat lensa.

### BAB III PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI

Pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi bertujuan untuk mengidentifikasi kuman penyebab suatu penyakit infeksi. Agar hasil pemeriksaan akurat maka harus memperhatikan persyaratan dan prosedur pemeriksaan.

#### **A. SPESIMEN (BAHAN PEMERIKSAAN)**

Spesimen merupakan bahan yang akan diperiksa dan diambil sesuai gejala klinis yang diderita seorang pasien. Spesimen yang baik adalah spesimen yang dapat mewakili kuman penyebab penyakit infeksi.

Spesimen dapat berupa pus/sekret, darah, urin, sputum/dahak, feces, cairan cerebrospinal, cairan rongga dada, cairan sendi, hapusan hidung, tenggorok, rectum, vagina, ulkus/luka, dan lainnya tergantung gejala klinisnya.

Pada pengiriman bahan pemeriksaan, bahan harus dikirim sesegera mungkin, jika perlu bahan pemeriksaan dapat dimasukkan ke dalam medium transport untuk menjaga agar bahan tidak kering.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam penerimaan bahan pemeriksaan adalah:

- Periksa label spesimen sudah sesuai dengan formulir permintaan dokter, misalnya nama penderita, nomor register, alamat, diagnosa klinis, macam spesimen yang dikirim, dan sebagainya.
- Spesimen yang di kirim representatif, misalnya : spesimen yang diperlukan sputum maka tidak representatif apabila yang di kirim adalah saliva (air liur).
- Cara pengambilan, pengiriman spesimen secara aseptis dan dengan cara yang benar
- Faktor lain yang dapat mempengaruhi kehidupan mikroorganisme/kuman, misalnya tempat penampungan spesimen mengandung bahan disinfektan.

#### **B. CARA PENGAMBILAN DAN PENGIRIMAN SPESIMEN**

Dalam menentukan diagnosa klinis dari penyebab suatu penyakit infeksi, diperlukan pengetahuan dan ketrampilan dalam cara-cara pengambilan, pengiriman dan pemeriksaan spesimen.

##### **1) Bahan pemeriksaan swab tenggorok**

Tujuan : untuk menegakkan diagnosa infeksi pada tenggorokan, misalnya Difteri, Pertusis, Infeksi oleh *Streptococcus sp.*

Bahan yang di sediakan:

- Spatel lidah
- Lidi kapas steril
- Medium Blood Agar Plate atau Chocolate Agar Plate
- Medium PAI atau Medium Loeffler.

Cara Pengambilan:

- a. Lidah dijulurkan dan ditekan menggunakan spatel lidah.
- b. Usapkan lidi kapas pada daerah tenggorokan, sebaiknya pada tempat yang mengalami radang atau pada tempat yang terdapat bercak/membran/pseudomembran.
- c. Bahan pemeriksaan tersebut dipakai untuk pemeriksaan langsung dengan cara pewarnaan (Gram dan Neisser), serta ditanam pada medium perbenihan.

## **2) Bahan Pemeriksaan Darah**

Tujuan : untuk menegakkan diagnosa beberapa penyakit, misalnya typhoid fever, Sub acut bacterial endocarditis, syndroma of septicaemia, atau febris yang tidak diketahui penyebabnya.

Bahan yang disediakan:

- Swab
- Larutan Iodium 2%
- Larutan Alkohol 70%
- Sduit dan jarum steril
- Medium biphasik pada botol /tabung
- Torniquet

Cara Pengambilan darah :

- a. Pasang torniquet
- b. Vena dipalpasi dari kulit diatasnya pada lengan bawah.
- c. Permukaan kulit diolesi dengan iodium (gunakan kapas) dengan sedikit tekanan secara sirkuler dari tengah kearah luar.
- d. Dengan cara yang sama tempat tersebut diolesi dengan alkohol dan hindari dari kekeringan.
- e. Siapkan sduit dan jarum steril, suntikkan jarum pada vena.

- f. Setelah darah teraspirasi ke dalam spuit lepaskan torniquet. Darah di ambil 10-20ml untuk dewasa, 5ml untuk anak dan bayi. Kemudian jarum dilepaskan dan pada tempat bekas suntikan diolesi dengan alkohol, dengan sedikit tekanan.
- g. Darah di dalam spuit dipindahkan secara aseptis ke dalam botol/tabung yang mengandung medium perbenihan. Untuk menghindari kontaminasi perbenihan dengan udara, ujung botol dibakar di atas api bunsen dengan posisi miring, kemudian semprotkan darah dari spuit secara hati-hati.
- h. Botol ditutup. Apabila tutupnya terbuat dari karet bersihkan dahulu dengan alkohol untuk menghindari kontaminasi.
- i. Eramkan pada suhu 37 °C selama 21 hari.
- j. Bahan pemeriksaan diperiksa setiap hari. Apabila terdapat pertumbuhan kuman dilakukan identifikasi.
- k. Hasil biakan dikatakan negatif, apabila sampai 21 hari tidak didapatkan pertumbuhan kuman.

### **3) Bahan Pemeriksaan Urin**

Tujuan : Untuk mengetahui adanya infeksi pada saluran kemih.

Bahan yang disediakan:

- Alat penampung urin (botol/tabung steril)
- Larutan PZ/saline
- Bahan pembersih/antiseptika, misalnya: sabun, deterjen, zephiran, air hangat steril.

Cara pengambilan:

- a. Untuk Laki-laki: Ujung penis/uretra dibersihkan dengan PZ dan sabun bergantian, yang terakhir dengan air hangat steril. Aliran kencing pertama dibuang yang ditampung adalah aliran kencing bagian tengah (midstream urine)
- b. Untuk perempuan: Vulva dan labial fold dibersihkan seperti pada laki-laki. Kencing dilakukan dengan berdiri dan yang ditampung adalah aliran kencing bagian tengah.
- c. Untuk pengiriman bahan pemeriksaan urin, urin harus ditempatkan pada wadah steril dan dikirimkan ke laboratorium secepat mungkin.

#### 4) **Bahan Pemeriksaan Sekret Luka**

Tujuan :Untuk mengetahui penyebab infeksi pada luka.

Bahan yang disediakan:

- Lidi kapas steril
- Kapas
- Larutan alkohol 70%

Cara pengambilan:

- a. Bagian tepi luka dibersihkan dahulu dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%
- b. Dengan hati-hati (jangan menyentuh bagian tepi luka) ambillah (swab) sekret luka dengan lidi kapas steril.
- c. Ambillah dua kali dengan cara yang sama. Satu untuk pemeriksaan sedian langsung dan satu lagi untuk kulyur kuman.
- d. Sebaiknya segera dilakukan pemeriksaan sebelum bahan pemeriksaan kering. Pengiriman bahan pemeriksaan sebaiknya dimasukkan ke dalam medium transport.

### **C. TATA LAKSANA PEMERIKSAAN**

Sesudah spesimen diterima dan dicatat dalam buku penerimaan, selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan beberapa prosedur sebagai berikut:

#### 1) **Sediaan Langsung (direct smear) dan pewarnaan**

Dibuat hapusan pada gelas obyek, kemudian dilakukan pewarnaan dan dilihat dibawah mikroskop.

- Pewarnaan rutin yang dilakukan adalah pewarnaan gram
- Pewarnaan tertentu dapat dilakukan tergantung diagnosa klinisnya seperti:
  - Pewarnaan metakromasi/neisser untuk penyakit Difteri
  - Pewarnaan tahan asam untuk penyakit TBC, Lepra
  - Pewarnaan Spora untuk penyakit Anthrax, Tetanus
- Dengan pewarnaan dapat diketahui morfologi kuman serta sifat kuman terhadap pewarnaan.

Pada spesimen tertentu dapat dibuat preparat basah tanpa pewarnaan, misalnya apabila kita ingin melihat kuman masih dalam keadaan hidup:

- Melihat pergerakan kuman metode Hanging drop method
- Melihat Leptospira menggunakan Darkfield microscope.

## 2) **Kultur (perbenihan kuman)**

Pada perbenihan dan isolasi primer kuman, dipakai medium perbenihan yang sesuai untuk pertumbuhannya, misalnya :

<i>C. diphtheriae</i>	: medium PAI, Loeffler
<i>M. tuberculosis</i>	: medium Lowenstein Jensen
<i>N. gonorrhoe</i>	: medium Thayer Martin V C N
<i>Streptococcus sp</i>	: medium Blood Agar Plate
<i>D. pneumoniae</i>	: medium Chocolate Agar Plate
<i>Enterobacteriaceae</i>	: Medium Mc Conkey, Eosin Methylene Blue

Setelah inokulasi/streaking pada medium perbenihan, kemudian medium dieramkan pada almari pengeram (inkubator) pada suhu optimum 35-37 C, selama 18-24 jam. Kuman-kuman tertentu pada pertumbuhannya memerlukan suasana anaerob, untuk itu untuk pertumbuhannya medium dimasukkan ke dalam anaerobic jar. Ada pula kuman yang memerlukan suasana CO<sub>2</sub> 5-10% untuk pertumbuhannya, untuk itu medium dimasukkan kedalam candle jar. Apabila setelah pengeraman didapatkan pertumbuhan kuman (koloni), maka dapat dilanjutkan identifikasi kuman. Identifikasi kuman diarahkan sesuai dengan morfologi yang ditemukan pada pemeriksaan sediaan langsung dan bentuk koloni warna koloni/pigmen pada medium pertumbuhan.

## 3) **Reaksi biokimia**

Untuk membantu identifikasi kuman, dilakukan beberapa reaksi biokimiawi, misalnya tes fermentasi gula – gula, produksi indol, produksi urease.

## 4) **Tes Kepekaan kuman terhadap antibiotika/antimikroba**

Tes ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu kuman penyebab penyakit peka terhadap antimikroba yang diujikan secara laboratories (in vitro). Tes ini sangat membantu klinisi dalam memberikan terapi.

## 5) **Reaksi serologis**

Reaksi serologis diperlukan untuk menegakkan diagnosa suatu penyakit, misalnya: reaksi gumpal widal untuk menegakkan diagnosa penyakit Typhoid fever.

## 6) **Tes Virulensi/ keganasan kuman**

Tes ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah kuman penyebab yang ditemukan itu bersifat patogen/toksigenik ataukah tidak.

Tes ini dapat dilakukan secara:

- In vitro misalnya tes koagulase kuman *Staphylococcus aureus*
- In vivo menggunakan binatang percobaan (misal; kelinci, mencit, marmut) yang diinfeksi kuman. Pemilihan binatang percobaan didasarkan kepekaan binatang tersebut terhadap kuman yang diuji.

Hal lain yang perlu diingat dalam mengerjakan pemeriksaan mikrobiologis adalah setiap pemindahan atau pengambilan kuman dari medium ke medium lainnya harus dalam suasana yang aseptis, dimaksudkan untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

## BAB IV PEWARNAAN

Pewarnaan pada kuman merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi kuman penyebab penyakit. Bakteri dapat diwarnai oleh karena bakteri pada pH 7 (*negative charge*) dapat menangkap bahan warna (*positif charge/basic dyes*) seperti crystal violet, methylene blue, dan safranin. Cara pewarnaan lainnya bakteri tidak diwarnai yang diwarnai adalah latar belakangnya dan dikenal sebagai *negative staining*.

### PEMBUATAN SEDIAAN (SMEAR)

Sediakan :

- Gelas obyek
- Ose
- Aquadest steril
- Bunsen

Cara :

- a. Bersihkan gelas obyek dengan kapas, kemudian lewatkan di atas api atau alkohol untuk menghilangkan lemak, kemudian biarkan dingin.
- b. Siapkan ose, setiap menggunakan ose dipanaskan terlebih dahulu di api bunsen dan dinginkan
- c. Buat sediaan **tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis** dengan cara:
  - Biakan padat : panaskan ose ambil aquadest steril dan teteskan satu ose pada gelas obyek, kemudian ambil dengan ose yang telah dipanaskan kuman padat sedikit dan suspensikan dengan aquadest di gelas obyek dan ratakan.
  - Biakan cair : panaskan ose ambil satu ose kuman dan teteskan pada gelas obyek dan ratakan.
- d. Biarkan sediaan kering di udara, setelah kering lakukan fiksasi dengan cara lewatkan sediaan di atas api sebanyak 3x dan sediaan siap diwarnai.

### PEWARNAAN SEDERHANA

Disebut juga pewarnaan langsung oleh karena hanya menggunakan satu macam pewarna.

Bahan warna yang digunakan : Safranin, Methylene blue, Gentian violet. Tujuan pewarnaan sederhana untuk melihat morfologi bakteri

Sediakan:

- Biakan kuman berbentuk batang dan kokus
- Methyylene blue dan safranin
- Gelas obyek & Ose
- Aquades steril
- Air
- Kertas penghisap

Cara

- a. Buatlah sediaan kuman pada gelas obyek
- b. Tuangi sediaan dengan pewarna Methylene blue atau Safranin selama  $\frac{1}{2}$  -1 menit
- c. Buang sisa bahan warna dan bilas dengan air, kemudian keringkan menggunakan kertas penghisap.
- d. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi).

### **PEWARNAAN GRAM**

Tujuan pewarnaan Gram untuk melihat morfologi bakteri dan sifat pewarnaan kuman, bahan warna yang digunakan Kristal violet, Lugol, Alkohol 96 %, Safranin

Sediakan:

- Biakan kuman berbentuk batang dan kokus
- Bahan pewarna untuk pewarnaan Gram
- Gelas Obyek & Ose
- Aquades Steril
- Air
- Kertas penghisap

Cara:

- a. Buatlah sediaan (smear) kuman pada gelas obyek
- b. Tuangi sediaan dengan Kristal violet selama 1 menit, buang sisa Kristal violet dan bilas dengan air.

- c. Tuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit, buang sisa Lugol dan bilas dengan air
- d. Tuangi sediaan dengan Alkohol 96 % selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur dan buang sisa Alkohol dan bilas dengan air.
- e. Tuangi sediaan dengan Safranin selama  $\frac{1}{2}$  menit, buang sisa safranin dan bilas dengan air
- f. Keringkan sediaan menggunakan kertas penghisap
- g. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi)

### **PEWARNAAN TAHAN ASAM**

Tujuan pewarnaan Tahan Asam untuk melihat morfologi bakteri dan sifat pewarnaan kuman, ada 2 golongan kuman Tahan Asam dan kuman non Tahan Asam. Bahan warna yang digunakan Carbol fuchin, Alkohol Asam, Methylene blue

Sediakan:

- Sputum penderita batuk menahun
- Gelas obyektif & ose
- Bahan pewarna untuk pewarnaan Tahan Asam Zielhl Neelsen
- Bunsen
- Air
- Kertas hisap

Cara:

- a. Buatlah sediaan dari bahan pemeriksaan sputum pada gelas obyektif. Sputum sudah basah maka untuk pembuatan sediaan tidak perlu aquades steril. Biarkan kering di udara, kemudian difiksasi.
- b. Tuangi sediaan dengan Carbol fuchsin dan panaskan selama 5 menit, dijaga jangan sampai mendidih dan kering. Buang sisa carbol fuchsin dan bilas dengan air.
- c. Tuangi sediaan dengan alkohol asam sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol asam dan bilas dengan air.
- d. Tuangi sediaan dengan methylen blue selama  $\frac{1}{2}$  menit. Buang sisa dan bilas dengan air.

- e. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap dan lihat di bawah mikroskop. Lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi).

### **PEWARNAAN SPORA**

Merupakan pewarnaan khusus, tujuan pewarnaan Spora untuk melihat morfologi kuman terutama spora. Bahan warna yang digunakan : Malachite green, Safranin

Sediakan:

- Kuman pembentuk spora
- Bahan pewarna untuk pewarnaan spora metode Schaeffer Fulton
- Gelas obyek & ose
- Aquadest steril
- Air
- Kertas hisap

Cara Metode Schaeffer Fulton :

- a. Buatlah sediaan kuman pada gelas obyek.
- b. Tuangi sediaan dengan Malachite green dan panaskan selama 5 menit, dijaga jangan sampai mendidih dan kering. Buang sisa pewarna dan bilas dengan air.
- c. Tuangi sediaan dengan Safranin dan bilas dengan air.
- d. Keringkan sediaan dan lihat di bawah mikroskop. Lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi)

Cara “modifikasi tahan asam”

- a. Caranya sesuai dengan cara pewarnaan tahan asam namun tanpa menggunakan alkohol asam

### **PEWARNAAN METACHROMASI**

Tujuan pewarnaan metachromasi untuk melihat morfologi kuman yang disebut “granula (yang bersifat) metachromatis”

Sediakan :

- Kuman pembentuk metachromasi
- Bahan warna Neisser AB & Neisser C
- Gelas Obyek & ose
- Aquadest steril

- Kertas hisap

Cara :

- a. Buatlah sediaan (smear) kuman
- b. Tuangi sediaan dengan Neisser AB selama  $\frac{1}{2}$  menit, buang sisa Neisser AB **tanpa** dibilas air
- c. Tuangi sediaan dengan Neisser C selama 1 menit, buang sisa Neisser C **tanpa** dibilas air
- d. Keringkan sediaan dengan kertas hisap dan lihat dibawah mikroskop. Lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi)

## BAB V FLORA NORMAL

Flora normal adalah mikroorganisme yang terdapat pada orang sehat/normal. Sifat flora ada 2 yaitu Flora tetap (*resident flora*) : jenis mikroorganisme tertentu, pada bagian tubuh tertentu, pada usia tertentu, bila berubah segera kembali semula dan Flora sementara (*transient flora*) : mikroorganisme non patogen/potensial patogen, pada waktu tertentu, asal dari lingkungan.

Tujuan praktikum flora normal untuk membuktikan bahwa di alam sekeliling kita tidak bebas dari kuman, terdapat flora yang bersifat flora tetap maupun flora sementara.

Sediakan:

- NAP
- BAP
- Bahan pemeriksa:
  - Potongan rambut
  - Kerokan bawah kuku
  - Telunjuk
  - Tanah
  - Udara

Cara :

**Hari I :**

### **Flora normal badan & tanah**

- a. Dikerjakan per kelompok / group
- b. Masing masing kelompok mendapat 1 NAP
- c. NAP dibagi menjadi 4 bagian menggunakan spidol pada dasar plate.
- d. Berilah tanda pada masing-masing bagian, kemudian tanamlah potongan rambut, kerokan bawah kuku, telunjuk dan sedikit tanah pada masing masing bagian tersebut.

### **Flora normal di udara**

- a. Dikerjakan per kelompok / group
- b. Masing-masing kelompok mendapatkan 1 NAP dan 1 BAP, berilah tanda menggunakan spidol (nomor kelompok)

- c. Biarkanlah media terkontaminasi dengan udara, dengan cara membuka tutup plate NAP selama 15 menit dan BAP selama 30 menit.
- d. Eramkan semua media pada inkubator dengan suhu 37°C, selama 18-24 jam.

### **Hari II**

- a. Ambil semua media yang telah dimasukkan dalam inkubator.
- b. Pelajari semua koloni yang tumbuh pada masing-masing bagian.

### **Demonstrasi**

- Masing-masing kelompok/group mendapatkan 1 BAP flora normal

### **Tugas :**

1. Deskripsikan koloni BAP flora normal (demonstrasi) dan NAP flora normal potongan rambut, kerokan bawah kuku, telunjuk dan sedikit tanah serta NAP-BAP normal flora udara yang saudara lakukan:
  - Besar ukurannya / diameter
  - Jumlah koloni
  - Permukaan : kasar / licin / mukoid / cembung / datar
  - Warna : putih / hijau / pigmen / hemolisa BAP
  - Tepi koloni : rata / tidak rata, fimbriated / bersilia
2. Lakukan pewarnaan Spora dan Gram untuk setiap koloni yang berbeda yang tumbuh pada BAP flora normal (demonstrasi)
3. Deskripsikan hasil pewarnaan Spora dan Gram saudara
4. Sebutkan jasad renik apa saja yang merupakan: Flora normal di badan, Flora normal di tanah dan Flora normal di udara
5. Apabila tubuh kita tidak bebas dari kuman, mengapa tidak selalu timbul penyakit?

## BAB VI

### PEMERIKSAAN AIR SECARA BAKTERIOLOGIS

Air yang dipakai untuk kebutuhan minum harus memenuhi syarat baik secara fisik, kimia maupun bakteriologis. Secara bakteriologis pemeriksaan air sangat penting sebab air dapat menularkan penyakit (waterborne disease), misalnya : demam tifoid, cholera, disentri basiler/disentri amuba, poliomyelitis, dan beberapa penyakit jamur dll.

Ada beberapa cara pemeriksaan air : Kualitatif (presumptive test, confirmed test dan completed test, ketiga tes ini dilakukan secara bertahap. Kuantitatif (most probable number/MPN method, plate count method dan membrane filter method)

#### **PEMERIKSAAN SECARA KUALITATIF – SEMI KUANTITATIF METODE MPN (MOST PROBABLE NUMBER)**

Sediakan:

- Air sampel
- Pipet steril
- 15 tabung Durham yang berisi media *lactose broth*:
  - 5 tabung berisi 10 ml *lactose broth*
  - 5 tabung berisi 5 ml *lactose broth*
  - 5 tabung berisi 5 ml *lactose broth*
- EMB agar
- Tabel Mc.Crady
- NAP
- Bahan untuk pewarnaan gram

#### **METODE PRESUMPTIVE TEST**

Hari ke-1:

1. Dengan pipet steril, kedalam 5 tabung masing-masing berisi 10 ml *lactose broth* ditambahkan air sampel sebanyak 10 ml.
2. Dengan cara yang sama :
  - 5 tabung berisi masing-masing 5 ml *lactose broth* ditambahkan 1 ml air sampel.
  - 5 tabung berisi masing-masing 5 ml *lactose broth* ditambahkan 0,1 ml air sampel.
3. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Hari ke-2:

1. Ambil pekerjaan saudara hari ke-1
2. Perhatikan pada masing-masing tabung, amati terbentuknya gas pada tabung Durham.

Dari pertumbuhan kuman pada *lactose broth* tersebut dapat diperkirakan jumlah kuman pada sampel dengan metode MPN (menggunakan tabel Mc.Crady).

3. Ambil 1-2 ose inokulum dari tabung yang terdapat gelembung gasnya dan tanamlah pada EMB untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Eramkan EMB pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Hari ke-3:

1. Ambil satu koloni kuman yang khas dari EMB (preparat hari ke-II), kemudian tanamlah pada *lactose broth* dan NA *slant*.
2. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Hari ke-4:

1. Amati terbentuknya gas hasil pembedahan pada tabung *lactose broth*
2. Lakukan pengecatan Gram dari koloni kuman pada NA *slant* dan carilah kuman yang berbentuk batang gram negatif.

**METODE MPN (MOST PROBABLE NUMBER)**

- Prinsip sama dengan *presumptive test*
- Mempergunakan seri 3 tabung atau 5 tabung. dilihat jumlah gas (+) yang terbentuk dalam tabung fermentasi (durham) pada tiap seri dijumlah dan dicocokkan dengan tabel Mc Crady
- Tabel Mc Crady dapat menunjukkan perkiraan jumlah bakteri per 100 ml-air

**METODE PLATE COUNT**

Sediakan :

- Dua seri tabung, masing-masing seri terdiri dari 7-10 tabung.

Cara :

1. Isi masing-masing tabung dengan 9 ml PZ steril.
2. Masukkan 1 ml air sampel pada **tabung I** (untuk setiap seri tabung). Campur homogen, kemudian ambil 1 ml dan masukkan kedalam **tabung II**. Dari tabung II ambil 1 ml dan masukkan pada **tabung III** dan seterusnya.

Dari tabung terakhir buang campuran tersebut 1 ml, sehingga didapatkan pengenceran air sampel sebagai berikut:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dst (pengenceran yang dibuat tergantung pada perkiraan tingkat kontaminasi).

3. Dari setiap tabung diambil 1 ml dan dituangkan kedalam cawan petri steril. Tambahkan pada masing-masing cawan petri tersebut nutrient agar yang masih cair sebanyak 20 ml, goyang-goyangkan supaya air sampel dan nutrient agar tercampur rata. Biarkan medium memadat.
4. Inkubasikan satu seri pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam dan satu seri lagi pada suhu kamar.

Jumlah koloni kuman yang memenuhi syarat untuk dihitung adalah apabila jumlah koloni yang tumbuh antara **30-300/cawan petri**.

**Jumlah kuman pada air sample =  
Rerata total jumlah koloni yang tumbuh x pengenceran (kuman/ml air)**

**Demonstrasi:**

- Pemeriksaan air secara kuantitatif dengan metode *Plate Count*.
- *Colony counting*.

**Tugas**

1. Hitunglah kuman (MPN) air sample
2. Buatlah pewarnaan Gram
3. Gambar dan deskripsikan hasil pewarnaan saudara
4. Sebutkan kuman yang dipakai sebagai indikator air bebas bakteriologis

Table 1. MPN Index and 95% Confidence Limits for Various Combinations of Positive Tubes in a 3 Tube Dilution Series Using Inoculum Quantities of 10, 1 and 0.1 g (ml).

Combination of Positives	MPN Index per g (ml)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<0.03	---	0.095
0-0-1	0.030	0.0015	0.096
0-1-0	0.030	0.0015	0.11
0-1-1	0.061	0.012	0.18
0-2-0	0.062	0.012	0.18
0-3-0	0.094	0.036	0.38
1-0-0	0.036	0.0017	0.18
1-0-1	0.072	0.013	0.18
1-0-2	0.11	0.036	0.38
1-1-0	0.074	0.013	0.20
1-1-1	0.11	0.036	0.38
1-2-0	0.11	0.036	0.42
1-2-1	0.15	0.045	0.42
1-3-0	0.16	0.045	0.42
2-0-0	0.092	0.014	0.38
2-0-1	0.14	0.036	0.42
2-0-2	0.02	0.045	0.42
2-1-0	0.15	0.037	0.42
2-1-1	0.20	0.045	0.42
2-1-2	0.27	0.087	0.94
2-2-0	0.21	0.045	0.42
2-2-1	0.28	0.087	0.94
2-2-2	0.35	0.087	0.94
2-3-0	0.29	0.087	0.94
2-3-1	0.36	0.087	0.94
3-0-0	0.23	0.046	0.94
3-0-1	0.38	0.087	1.1
3-0-2	0.64	0.17	1.8
3-1-0	0.43	0.09	1.8
3-1-1	0.75	0.17	2.0
3-1-2	1.2	0.37	4.2
3-1-3	1.6	0.40	4.2
3-2-0	0.93	0.18	4.2
3-2-1	1.5	0.37	4.2
3-2-2	2.1	0.40	4.3
3-2-3	2.9	0.90	10.
3-3-0	2.4	0.42	10.
3-3-1	4.6	0.90	20.
3-3-2	11.	1.8	41.
3-3-3	>11.	4.2	---

Approved by Laboratory Quality Assurance Division (LQAD)

## **BAB VII PEMERIKSAAN AIR SUSU SAPI**

ASS (air Susu Sapi) merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri oleh karena kandungan protein, lemak dan karbohidrat yang dimilikinya. Melalui ASS dapat ditularkan berbagai penyakit (milk borne disease). Praktikum pemeriksaan ASS ini bertujuan untuk mengetahui ASS yang telah disterilkan dengan baik atau belum steril

Sediakan :

- Air sus sapi
- Methylene blue 1 %
- Ammonium sulphate
- Kertas filter
- Penangas air

### **REDUKSI METHYLENE BLUE (REDUCTASE TEST)**

1. Masukkan 10 ml air susu sapi segar pada tabung reaksi steril
  2. Tambahkan pada air susu sapi tersebut 1 ml methylene blue 1% dan campur sampai homogen
  3. Inkubasikan tabung tersebut pada 37 C, amati setiap ½ jam
  4. Lihatlah perubahan warna yang terjadi, catat waktu saat terjadinya perubahan warna tersebut. Semakin cepat warna biru hilang, semakin jelek kualitas ASS
- Luntur dalam waktu 2 jam : Kualitas ASS baik  
Luntur dalam waktu > 8 jam : Kualitas ASS lebih baik

### **TURBIDITY TEST**

1. Masukkan 10 ml air susu sapi yang disterilisasi pada suhu 65°C pada tabung reaksi steril dan masukkan air susu sapi yang disterilisasi pada suhu di atas 100°C pada tabung reaksi lain yang steril
2. Tambahkan pada masing-masing tabung ammonium sulphate sehingga diperoleh konsentrasi akhir ammonium sulphate 30%, campur sampai homogen
3. Saringlah campuran tersebut diatas menggunakan kertas saring kedalam tabung reaksi lain yang steril

4. Masukkan kedua tabung tersebut pada penangas air yang mendidih selama 5 menit  
ASS yang disterilisasi (dipanasi > 100 C); turbiditas negatif (jernih)  
ASS yang dipasteurisasi (dipanasi 65 C); turbiditas positif (keruh)

**Tugas :**

1. Gambar dan deskripsikan hasil praktikum saudara
2. Kesimpulan yang dapat diambil dari praktikum yang saudara lakukan apa?

## DAFTAR PUSTAKA

- Cruickshank R., Duguid J.P. Marmion B.P., Swain R.H.A., 1975. *Medical Microbiology Vol. II, The Practice of Medical Mikrobiologi*, 12<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone, Endinburg-London-Newyork.
- Finegold S.M., Martin W.J Scott E.G., 1978. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 5 ed., C.V. Mosby Co., St. Louis.
- Finegold S.M., Barron EJ., 1986. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 7<sup>th</sup> Edition., C.V. Mosby Company.,USA.
- Frankel S., Reitman S., Sonnenwirth AC., 1970. *Gradwohl's Clinical laboratory Method & Diagnosis*, 7<sup>th</sup> ed., Volume II, The CV Mosby Company, Toronto.
- Joklik W.K., Willet H.P.,Amos D.B.,Wilfert C.M.,1988. *Zinsser Microbiology*, 19<sup>th</sup> Edition, Prentice-Hall International Inc., USA.
- Tim Mikrobiologi FK Unibraw. 2003 *Bakteriologi Medik* Bayu Publishing. Jawa Timur Indonesia
- Keith S.J, Westran R.P. 2003. *Clinical Bacteriology*. ASM Press. Washiington, DC.
- Murray. PR, Rosenthal KS, et all. 1998. *Medical Mycrobiology*. Third edition. Mosby, Inc. Missouri
- Jawets, Melnick. Adelberg's. 1998. *Medical Microbiology*. Twenty-first edition. Appleton & lange. Amerika

@@@@@@@@

(.....)

## FLORA NORMAL

JAWAB PERTANYAAN DIBAWAH INI

1. Sebutkan semua koloni yang tumbuh pada masing-masing bagian (identifikasi koloni) : bentuk, warna, tepi koloni, permukaan dan bau
2. Gambarlah hasil pewarnaan gram dan spora pada tiap koloni yang berbeda
3. Flora normal dibagi menjadi 2 golongan sebutkan.
4. Sebutkan Jasad renik apa saja yang merupakan :
  - a. Flora normal di badan
  - b. Flora normal di tanah
  - c. Flora normal di udaraKapan kuman menjadi ganas / menimbulkan penyakit ?

Pemeriksa,

(.....)

## PEMERIKSAAN AIR SECARA BAKTERIOLOGIS

JAWAB PERTANYAAN DIBAWAH INI

1. Gambarlah hasil pemeriksaan air
2. Kuman apa yang digunakan sebagai indikator pemeriksaan air secara bakteriologis?
3. Penyakit apa saja yang dapat ditularkan melalui air minum ?
4. Untuk pemeriksaan secara kuantitatif, metode apakah yang saudara pilih?

Pemeriksa,

(.....)

### PEMERIKSAAN AIR SUSU SAPI

JAWAB PERTANYAAN DIBAWAH INI

1. Gambarlah hasil pemeriksaan air susu sapi
2. Apa tujuan dilakukan uji reduksi methylene blue?
3. Apa tujuan dilakukan *turbidity tes*?
4. Sterilisasi jenis apakah yang sesuai untuk ASS? Jelaskan alasan saudara

Pemeriksa,

(.....)