



MODUL
PENYAKIT BAKTERIAL DAN MIKAL
PROGRAM STUDI S-1 KEDOKTERAN HEWAN

Disusun oleh :
Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes
Yulianna Puspitasari, drh., M.VSc., Ph.D.
Ratih Novita Praja, drh., M.Si

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2019

ATURAN KETERTIBAN DALAM PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI DAN MIKOLOGI

A. Sebelum Praktikum:

1. Mahasiswa wajib mempersiapkan diri dengan mempelajari terlebih dahulu buku praktikum dan buku teori lainnya yang berkaitan dengan topik praktikum yang akan dikerjakan. Ada kemungkinan sebelum praktikum dilakukan pre test.
2. Mahasiswa hendaknya datang tepat waktu. Toleransi keterlambatan adalah 10 menit.
3. Bagi mahasiswa yang tidak dapat mengikuti praktikum karena sakit atau keperluan lain yang tidak dapat ditunda, maka harus menunjukkan surat keterangan dokter bagi yang sakit atau surat ijin bagi yang mempunyai keperluan lain. Bila dirasa perlu PJMK mempunyai hak untuk menolak surat ijin tersebut. Bagi mahasiswa yang diterima surat keterangan sakitnya atau surat ijinnya diterima mahasiswa wajib melaksanakan praktikum pada hari lain dengan kompensasi penggantian bahan habis dan kerja tambahan karyawan. Sedangkan mahasiswa karena alasan tertentu tidak diterima surat keterangannya, tidak diberi kesempatan melaksanakan praktikum susulan dan yang bersangkutan kehilangan haknya untuk ikut ujian praktikum.

B. Selama Praktikum

1. Wajib memakai jas praktikum standar jas lab
2. Setiap mahasiswa wajib melaksanakan praktikum dengan tekun, tertib dan kehati-hatian.
3. Dilarang bersenda gurau, membuat gaduh, bercengkrama dan lain-lain hal yang mengganggu jalannya praktikum serta keaseptisan praktikum.
4. Di dalam laboratorium tidak boleh merokok, makan dan minum.
5. Alat yang rusak, pecah karena kesalahan atau kecerobohan harus diganti dengan alat yang sama. Bahan yang tumpah harus lapor pada dosen atau pegawai lab sebelum dibersihkan
6. Bekerja dengan bakteri harus dijaga keaseptisannya. Jangan mengisap suspensi bakteri dengan mulut

C. Sesudah Praktikum

1. Ada kemungkinan diadakan post test.
2. Mahasiswa dianjurkan membersihkan/mencuci tangannya dengan sabun dan meusapnya dengan alkohol 70 %
3. Mahasiswa wajib menandatangani daftar hadir
4. Keluar dari ruang praktikum dengan tertib
5. Wajib mengumpulkan laporan hasil praktikum selama-lamanya 2 hari setelah praktikum, dikumpulkan pada dosen pembimbing praktikum masing-masing.

MATERI PRAKTIKUM I

PENANGANAN SAMPEL

A. Pandangan Umum.

Diagnosa bakteriologis harus dimulai dengan teliti sebelum specimen diambil dan dikumpulkan. Pekerjaan ini meliputi persiapan alat-alat, dan bahan-bahan yang akan dipergunakan. Prinsipnya harus steril. Alat-alat tersebut harus dibuat seaseptis mungkin dan diusahakan terlindung dari pencemaran luar, sehingga tidak mempersulit dalam pekerjaan pemeriksaan laboratorium.

B. Syarat-sarat Specimen.

Syarat penting dalam pemeriksaan bakteriologis adalah penanganan specimen yang akan diperiksa. Ada beberapa Syarat yang perlu ditaati yang berhubungan dengan pengambilan dan transportasi specimen. Dibawah ini ada 5 syarat yang harus dipenuhi :

1. Sampel diambil dalam kondisi steril atau tidak ada pencemaran dari luar. Kontainer dan alat-alat untuk pengumpulan bahan harus steril.
2. Sampel harus “cukup”

Biasanya untuk specimen bentuk cairan (fluid) jumlah yang diambil sebanyak 20 - 50 ml, sedang untuk jaringan, sebanyak 30 - 100 gram. Sampel ini harus tertutup hingga sampai laboratorium. Dalam perjalanan specimen ditempatkan dalam suhu dingin ini dipertahankan. Untuk itu specimen biasanya disimpan dalam Freezer atau Refrigerator.

3. Specimen harus ditempatkan pada tempat yang sesuai dengan ukurannya, tidak mudah pecah Atau terlindung dari kemungkinan pecah.
4. Specimen harus terlindungi dari kerusakan setelah pengambilan. Hal-hal yang dapat Menyebabkan kerusakan adalah kekeringan, oksidasi, panas dan aktivitas enzimatis yang disebabkan oleh bakteri itu sendiri. Usahakan waktu yang diperlukan dalam transportasi sampel secepat mungkin.
5. Setiap sampel harus dilengkapi dengan label yang memberikan informasi tentang :
 - a. Jenis hewan/ kelompok hewan
 - b. Sejarah penyakit hewan.
 - c. Macam organ .
 - d. Tempat, hari dan tanggal pengambilan.
 - e. Nama petugas yang mengambil.

C. Jenis-Jenis Specimen.

Untuk proses laboratoris, diperkenalkan 5 macam sampel yang memerlukan prosedur penanganan yang berbeda, yaitu :

1. Jaringan , eksudat , cairan (kecuali urine dan darah)
2. Urine,
3. Faeces,
4. Kerokan kulit.
5. Darah (ante mortem).

D. Pengambilan dan Penanganan Sampel

Cara pengambilan sampel tergantung jenis sampelnya.

1. Sampel susu

Selain alat dan tempat penampungan yang steril, pekerja atau orang yang mengambil juga khususnya tangannya harus steril, demikian juga dengan organ atau bagian organ yang diambil. Untuk susu pertama ambing dan puting hewan harus dibersihkan dengan sabun, dibilas dan dikeringkan dengan handuk steril. Bagian lubang puting diusap dengan alkohol 70 %. Tangan yang mengambil juga harus dicuci dengan sabun dan dicuci hamakan dengan alkohol 70 %. Selanjutnya perahan pertama dan kedua (dengan tekanan setengah perahan) dibuang. Perahan ketiga dan seterusnya diambil. Susu kemudian dimasukkan dalam termos es sebelum di bawa ke lab. Lama pengangkutan tidak boleh lebih dari 3 jam. Jika lebih diberi media transport. Sampai di laboratorium, susu disentrifuge tiga kali untuk menghilangkan lemaknya. Lemak akan naik ke permukaan bila disentrifuge. Emolisi lemak sering menghambat pertumbuhan kuman, karena apabila dalam keadaan basa lemak tersebut akan mengalami saponifikasi menjadi sabun, bila dalam keadaan asam bersifat deterjen. Sabun dan deterjen ini akan membunuh kuman. Emulsi lemak juga sering menutupi permukaan media, sehingga kuman-kuman yang obligat aerob mengalami kesulitan untuk tumbuh.

2. Sampel dalam bentuk organ

Sampel dalam bentuk organ yang diambil adalah bagian dalamnya. Untuk itu sisi atas, bawah, samping depan dan belakang diiris dengan pisau yang sudah disterilkan dulu, atau jika terpaksa pisau tersebut dibakar terlebih dahulu sampai panas lalu diiriskan pada organ tersebut. Untuk menanam kuman dari organ tersebut sebaiknya organ tersebut digeros dengan mortil yang steril dengan penambahan aquades atau PZ. Dalam keadaan darurat mensterilkan mortil dapat dilakukan dengan menyiramkan spritus pada cawan mortil itu, kemudian spritusnya disebar keseluruhan permukaan cawan dengan menggoyang dan menganduk menggunakan batang

penumbuknya (alu) lalu dibakar. Biarkan spirus habis terbakar dan api padam. Dinginkan mortil lalu gunakan untuk menggeros sampel.

3. Sampel bentuk feses

Feses diambil langsung dari rektum/anus atau cloaca. Dengan menggunakan plastik steril ambil feses dari rektum atau anus sapi, kambing dan hewan besar lainnya lalu dibalik plastiknya sehingga feses berada di dalam kantong plastik. Untuk ayam gunakan kapas bertangkai steril dan oleskan pada cloaca. Feses dapat juga diambil dari yang baru jatuh atau feses yang berada di bagian tengah. Namun yang paling baik tetap feses langsung dari rektum atau cloaca. Di laboratorium sebelum ditanam feses yang padat dimasukan dalam mortil steril dan ditambah aquades atau PZ secukupnya.

MATERI PRAKTIKUM II

P E M B U A T A N DAN PENGENALAN BERMACAM MACAM MEDIA

Seperti telah dijelaskan pada praktikum semester III ilmu Mikrobiologi Veteriner I bahwa media atau medium untuk pertumbuhan kuman merupakan bahan atau substrat buatan yang digunakan untuk menumbuhkan kuman. Media buatan yang digunakan untuk menumbuhkan kuman ini disebut dengan Media Perbenihan Buatan atau “Artificial Medium”.

Juga telah disebutkan untuk dapat ditumbuhi kuman *Artificial Medium* memerlukan berbagai persyaratan, yaitu adanya zat makanan (nutrisi), kondisi pH medium dan didukung oleh kondisi suhu lingkungan dan udara. Nutrisi meliputi sumber energi, sumber karbon, sumber Nitrogen dan berbagai faktor pertumbuhan. Kondisi pH medium tergantung kumannya, begitu juga dengan kondisi suhunya.

Mengulang pada penjelasan praktikum Mikrovet I sebelumnya bahwa media dibagi atas berbagai macam tergantung konsistensinya, bentuk wadah dan berdasar fungsinya yaitu :

1 . Berdasarkan sifat (konsistensinya), media perbenihan bakteri dibagi atas :

- a . Media padat = solid
- b . Media setengah padat = semisolid
- c . Media cair

2 . Berdasarkan bentuknya, terbagi menjadi

- a . Bentuk plate = datar
- b . Bentuk tabung

Dari perpaduan 2 kategori di atas di kenal

- a . Media padat plate
- b . Media padat tabung miring
- c . Media tabung semisolid
- d . Media tabung cair

Untuk isolasi primer kuman biasanya menggunakan media padat plate .

3 . Berdasarkan Kegunaannya, maka dikenal media

- a . Media Umum atau Media sederhana
- b . Media Selektive
- a. Media difrensial
- d . Media Penyubur atau diperkaya
- e . Media Identifikasi

Untuk dapat menjadi media selektif pada media ditambahkan zat penghambat untuk kuman-kuman tertentu yang tidak diinginkan, sedang untuk membuat media difrensial ditambahkan

juga bahan indikator yang dapat memberikan ciri masing-masing pertumbuhan kuman sehingga dapat dibedakan satu kuman dengan kuman lain atau satu golongan kuman dengan golongan kuman lainnya.

CATATAN

Media Mac Conkey biasanya di gunakan untuk media selective, tetapi dapat di gunakan juga sebagai media identifikasi untuk *Pasteurella haemolytica*. Semua *pasteurella*, termasuk *P . multcida* tidak dapat tumbuh pada Mac Conkey , kecuali *Pasteurella haemolytica*. Media agar darah dapat di gunakan untuk mengidentifikasi kuman yang dapat menghaemolysa darah dengan segala type haemolysanya serta kuman-kuman yang tidak menghaemolysa.

Umumnya media selektif yang digunakan sekarang mempunyai dua fungsi sekali gus yaitu sebagai media selektif dan media diffrensial, hal ini disebabkan pada media tersebut selain diberi zat penghambat juga disedian zat indikator. Seperti Mac Concey selain berfungsi sebagai media selektif karena mengandung zat penghambat bile salt dan crystal violet juga mengandung zat indikator laktosa dan neutral red. Manitol salt agar dengan zat penghambatnya kadar garam tinggi di atas 2 %, dan juga mengandung zat indikator manitol dan phenol red.

PEMBUATAN MEDIA

1 . Media Umum/Sederhana

Adalah media yang dapat di gunakan untuk menumbuhkan berbagai kuman gram positif maupun kuman gram negatip .

a . Nutrient Agar (NA)

Furmula	gram per liter
Meat extract	3 . 0
Pepton from meat	5 . 0
Agar-agar	12 . 0

Pembuatan : Suspensikan bahan yang beratnya 20 gram dalam 1 liter air distilasi air dimineralisasi. Biarkan 15 menit, kemudian didihkan di bawah tekanan (pressure cooker) sehingga semua terlarut secara sempurna. Sterilkan dalam autoclave (15 menit / 121°c) pH modium siap di gunakan pada 30’ C adalah 7.0 ± 0.2

b . Blood Agar (Agar darah)

Furmula	gram per liter
Beef heart , infusion	375 . 0

Trypcose	10 . 0
Sodium chloride	5 . 0
Agar	15 . 0

Pembuatan : Suspensikan bahan dalam 1 liter air distilasi air dimineralisasi . biarkan 15 menit dan didihkan. Sterilkan dalam autoclave 121°c / 15menit. Bila suhu turun 50°c tambahkan 53 ml darah defibrinasi .

2 . Media selektive dan Media diffrensial

Adalah media yang dapat menghambat pertumbuhan kuman tertentu sedangkan kuman lainnya tumbuh dengan baik.

a . Eosin Methyline Blue Agar (EMBA)

Digunakan untuk isolasi dan identifikasi E . coli dan Enterobakteri (Aerobakteri) aerogenes , dan untuk identifikasi koagulase positif Staphylococcus.

Furmula	gram per liter
Pepton fram meat	10 . 0
Laktose	10 . 0
Di-potasi um hydrogen phospat	2 . 0
Eosine Yellowish	0 . 4
Methyline Blue	0 . 067
Agar-agar	13 . 5

Pembuatan : Suspensikan bahan dalam 1 liter air distilasi atau air demineralisasi. Biarkan 15 menit dan didihkan sehingga semua bahan terlarut . Sterilkan dalam autoclave 121°c / 15 menit.

Penilaian :

<u>Koloni</u>	<u>Mikroorganisme</u>
Diameter 2-3 mm, koloni hijau metalik bila direflesikan pada cahaya gelap/hitam pada pusatnya bila cahaya digerak-gerakkan	Escheria coli
Diameter 4-6 mm, abu-abu sampai coklat	
Pusatnya, bila cahaya digerak-gerakkan tidak ada warna hitam metalik	Enterobakter aero genes

Translucent, warna kuning gading	Salmonella-shigella
Colourless, koloni bulat seperti ujung	Koagulase positif
Peniti	Staphylococcus .

b . Mac Conkey Agar

Agar selective untuk isolasi dan identifikasi kuman gram negatif terutama kuman yang berasal dari faces dan urine. Juga digunakan untuk memisahkan Proteus dengan kuman golongan Enterik lainnya. Dapat juga digunakan untuk membedakan beberapa organisme non enterik gram negatif (Pasteurella, actinobacillus).

Furmula	gram per liter
Pepton	17.0
Protease pepton	3.0
Laktose	10.0
Bile salts	1.5
Agar	13.5
Neutral Red	0. 03
Crystal violet	0.001

Pembuatan : Suspensikan dalam 1 liter air distilasi atau air dimineralisai. didihkan dan sterilkan dalam autoclave 121°c / 15 menit .

Penilaian :

Koloni	Mikroorganisme
Tak berwarna , jernih	Salmonella-Shigella
Merah, besar dikelilingi Zone keruh	Escheria coli
Pink (merah bata), besar, mucoid	Enterobacter, Klebsiella
Kecil, tumbuh ditepi isolat, buram	Enterococci, Staphy .

c . Brilliant Green Agar

Medium yang sangat selektive untuk isolasi salmonella sp terutama yang dari fases.

Furmula	gram per liter
Yeast Extract	3.0
Protoose pepton	10.0
Sodium Chloride	5.0
Laktose	10.0
Sukrosa	10.0
Phenol red	0.08
Brilliant green	0.0128
Agar-agar	20.0

Pembuatan : Suspensikan dalam air distilasi atau air yang dimineralisasi. Didihkan dan disterilkan dalam autoclave 121°c selama 15 menit .

Penilaian .

<u>Koloni</u>	<u>Mikroorganisme</u>
Pink (merah bata)	Salmonella
Kuning	E. coli, Klebsiella,
	<u>Enterobakter, Proteus</u>

d . Staphylococcus Selektive Agar

Media selektive untuk isolasi dan identifikasi phathogenik Staphylococcus yang menyebabkan penyakit pyogenik, intoksikasi makanan atau kondisi seperti pneumonia, di dasarkan toleransinya terhadap garam, pembentukan pigmen dan kemampuan mendegradasi manitol dan gelatin

Furmula	gram per liter
Yeast Extract	2.5
Pepton from casein	10.0
Gelatin	30.0
Laktose	2.0
D (-) Mannitol	10.0
Sodium Chloride	75.0
di-Potassium hydrogen phospat	5.0
Agar-agar	12.0

Pembuatan : Suspensikan dalam 1 liter air distalasi atau dimineralisasi. Didihkan dan kemudian sterilkan dalam autoclave 121°C selama 15 menit .

Penilaian : Koloni yang membentuk pigmen nampak kuning emas, sedang yang tidak membentuk pigmen tampak putih .

Asam hasil fermentasi mannitol dapat diketahui dari perubahan warna menjadi kuning bila 0.04% lar. Bromothynol blue ditetaskan pada pinggir koloni yang terpisah yang telah dicungkil dengan usa. Gelatinolisis ditandai dengan adanya zone terang isekitar koloni kira-kira 10 menit setelah penetesan lar. Jenuh ammonium sulfat atau 20% lar. Sulfosal icylic acid pada pinggir koloni.

e . Streptococcus Selektive Agar

Media selektive untuk isolasi Streptococcus dari material yang terkontaminasi berat.

Furmula	gram per liter
Pepton from casein	14.4
Pepton from soybean meal	5.0
Sodium chloride	4.0
Sodium citrat	1.0
L. Cystine	0.2
Sodium sulfat	0.2
D (+) glukosa	5.0
Sodium azide	0.2
Crytal violet	0.0002
Agar-agar	13.0

Pembuatan : Suspensikan dalam air distalasi atau air dimineralisasi. Didihkansampai larut semua, dan sterilkan dalam autoclave 121’ c / 15 menit .

Penilaian : Streptococcus membentuk koloni kecil, jernih, mengkilat terang .

f . Tellurit Medium Base

Media selektive untuk kuman gram positif terutama di gunakan untuk isolasi kuman-kuman Corynebakterium, Streptococcus, Listerin dan Staphylococcus .

Furmula	gram per liter
Lab-Lemco Powder (Oxoid L29)	10.0
Pepton	10.0
Sodium Chloride	5.0
Agar-Agar	15.0

Pembuatan : Suspensikan bahan dalam 1 liter air distalasi atau dimineralisasi . Didihkan sampai larut sempurna dan sterilkan dalam autoclave 121°C selama 15 . Dinginkan pada 55°C dan tambahkan 50 ml “ Laldd Blood “ (Oxoid SR 48) dan 10 ml Potassium Tellurite solution 3.5% (SR 30), campur dan tuangkan ke plate.

Penilaian : Koloni Corynebakterium dan Listeria 1-3 ml diameter dengan pusatnya berwarna hitam. Streptococcus koloni kecil berwarna hitam atau coklat kehitaman .

g. Manitol Salt Agar (MSA)

Merupakan media selektif dan sekali gus media difrensial untuk kuman Staphylococcus khususnya Staphylococcus yang phatogen yang menghasilkan enzim koagulase. Kadar garam yang tinggi sekitar 7,5 % menghambat pertumbuhan banyak kuman lain kecuali Staphylococcus dan kuman-kuman marine.

Formula	gram per liter
‘Lab-Lemco’ Powder	1,0
Manitol	10,0
Pepton	10,0
Sodium Chloride	75,0
Phenol red	0,025
Agar	15,0

Pembuatan : Suspensikan 111 gram bahan di atas dalam 1 liter air distilasi lalu panaskan sampai mendidih dan bahan larut semua. Sterilkan dalam autoclave suhu 121oC selama 15 menit. Tuangkan ke Petri disk per 20 ml.

Penilaian : Staphylococcus aureus koloni yang terbentuk dikelilingi oleh warna sekitarnya kuning terang, Staphylococcus saprotyicus juga membentuk koloni dengan sekitarnya kuning, sedangkan Staphylococcus yang lain misalnya Staphylococcus epidermidis membentuk koloni dengan warna merah atau purple di sekitarnya.

h. Baird Parker Medium

Merupakan medium yang sangat selektif untuk Staphylococcus koagulase positif dari makanan. Sebagai perbandingan media Manitol Salt Agar tingkat selektivitasnya terhadap Staphylococcus koagulase positif hanya 49,9 %, sedangkan Phenolphthalein phosphat Agar 54,9 %, maka Baird Parker Medium ini tingkat selektifnya mencapai 85,2 %.

Formula	Gram per liter
Trypton	10,0
‘Lab-Lemco’ Powder	5,0
Yeast Extract	1,0
Sodium pyruvate	10,0
Glycine	12,0
Lithium chloride	5,0
Agar	20,0

Pembuatan : Larutkan 63 gram bahan di atas dalam 1liter air distilasi lalu didihkan sampai bahan larut semua. Tuangkan ke dalam gelas atau labu dan sterilkan dalam autoclave pada suhu 121oC selama 15 menit. Dinginkan sampai suhu 50oC dan tambahkan dan campur dengan 50 ml EggYolk-Tellurite Emulsion SR54 (Oxoid). Masukkan dalam Petri disk @ 20 ml.

Penilaian : Staphylococcus aureus tumbuh dalam waktu 24 jam membentuk koloni convex berdiameter 1,0 – 1,5 mm, berwarna hitam cemerlang dengan tepi berwarna putih dan dikelilingi zone jernih selebar 2 – 5 mm. Kuman lain dapat tumbuh seperti ini tetapi dalam waktu 36 – 48 jam atau lebih.

i. Salmonella-Shigella Agar (SSA)

Media selektif untuk mengisolasi kuman *Salmonella* dan *Shigella*. Walaupun media ini dikhususkan untuk *Salmonella* dan *Shigella*, kuman lain dari golongan Enterobactriaceae tetap dapat tumbuh pada media ini.

Formula	Gram per liter
Lab – Lemco Powder	5,0
Peptone	5,0
Lactose	10,0
Bile Salts	8, 5
Sodium citrate	10,0
Sodium thiosulfat	8,5
Ferric citrate	1,0
Brilliant green	0, 00033
Neutral red	0, 025
Agar	12,0

Pembuatan : Larutkan 57 gram media ke dalam 1 liter air suling. Panaskan sambil diaduk hingga mendidih dan larut sempurna. Cara ini sudah cukup untuk mensterilkan bahan. DILARANG DISTERILKAN DENGAN AUTOCLAVE. Jika dirasa perlu media dapat distreilkan dengan filtrasi atau pemanasan pada suhu 100 °C selama 10 menit berulang dengan jeda waktu 12 jam.

Penilaian : Salmonella dan Shigella tidak memfermentasi laktosa koloni berwarna colorless atau transparant, Salmonella dan Proteus yang dalam metabolismenya menghasilkan H2S koloni yang tebentuk berwaran hitam di tengah (Black spot). E. coli mampu memfermentasi laktosa

secara cepat koloni berwarna merah terang, sedangkan Coliform dayafermentasinya terhadap laktosa lambat koloni merah muda.

3. Media Pemula dan Penyubur

a. Nutrient Broth

Media cair ini sama dengan Nutrient agar tergolong dalam media umum tetapi bentuknya cair. Disamping untuk menumbuhkan kuman juga dapat dilihat sifat pertumbuhan kuman pada media cair.

Formula	gram per liter
Lab – Lemco Powder	1,0
Yeast extract	2,0
Peptone	5,0
Sodium chloride	5,0

Pembuatan : Suspensikan 13 gram media ke dalam 1 liter air suling. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung secara steril.

Penilaian : Pertumbuhan kuman ditandai adanya jonjot-jonjot berwarna putih atau media menjadi keruh

b. Air pepton

Air pepton merupakan mengandung bahan nutrisi dasar yaitu sumber Karbon, Nitrogen, sumber energi dan faktor pertumbuhan dasar untuk pertumbuhan kuman. Bahan ini dapat dibuat dari rebusan daging yang telah dibuang lemaknya. Air pepton ini banyak digunakan dalam pembuatan media, salah satunya untuk membuat media gula-gula.

Formula	Gram per liter
Peptone	10,0
Sodium chloride	5,0

Pembuatan : suspensikan 15 gram media ke dalam 1 liter air suling. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tuang dalam tabung dengan volumenya sesuai dengan keperluan secara steril

c. Tetrathionat Broth Base

Media ini adalah media diperkaya untuk mempercepat pertumbuhan kuman Salmonella. Organisme seperti Salmonella yang mereduksi tetrathionat

pertumbuhannya lebih subur, sedangkan kuman yang khusunya dari feses yang tidak mereduksi tetrathional dihambat. Jadi tetrathionat sendiri sebagai zat penghambat, kecuali bakteri mampu mereduksinya.

Formula	gram per liter
Lab – Lemco Powder	0, 9
Peptone	4, 5
Yeast extract	1, 8
Sodium clhoride	4, 5
Calcium carbonate	25,0
Sodium thiosulphate	40, 7

Pembuatan : Suspensikan 77 gram media ke dalam 1 liter air suling, lalu panaskan hingga mendidihkan. Dinginkan sampai dibawah 45°C lalu tambahkan larutan jodium sebanyak 20 ml, dan campur hingga rata sebelum dituang ke setiap tabung sebanyak masing-masing 10 ml. Jika belum digunakan simpan pada suhu4°C.

d. Manitol Selenite Broth Base

Merupakan suatu medium penyubur atau diperkaya untuk isolasi kuman Salmonella yang berasal dari feses, urine.

Formula	gram per liter
Bacteriological pepton	5,0
Manitol	4,0
Sodium Phospat	10,0

Pembuatan : Tambahkan 19 gram bahan di atas ke dalam1 liter air yang sudah mengandung Sodium Biselenite L121 (Oxoid). Panaskan sampai bahan larut semua. Tempatkan dalam tabung erlemenyer lalu sterilkan dalam Water bath yang mendidih selama10 menit. TIDAK DIPERKENANKAN DITERILKAN DENGAN AUTOCLAVE. Untuk meminimkan resiko tetratogenisitas pekerja Lab, Sodium Biselenite harus ditambahkan pada medium ini secara terpisah.

4. Media Identifikasi

a. Triple sugar Iron Agar (TSI-A)

Media identifikasi ini digunakan untuk mengetahui kemampuan kuman dalam memfermentasi 3 gula glukosa, laktosa dan sukrosa yang ada dalam media sehingga terbentuk asam, gas dan H₂S. Glukosa berada dibagian tegak sedangkan laktosa dan

sukrosa pada seluruh bagian media, sehingga bila glukosa saja yang difermentasi maka perubahan warna menjadi kuning hanya pada bagian tegak. Jika salah satu dari laktosa dan atau sukrosa yang difermentasi maka warna kuning terdapat pada kedua bagian media bagian miring dan tegak. Adanya H₂S dapat terlihat ada warna hitam pada media, sedangkan adanya gas terlihat dari media yang terangkat atau media mengalami pecah-pecah. Acid butt (warna kuning pada bagian bagian)

Formula	gram per liter
Lab – Lemco Powder	3,0
Yeast extract	3,0
Peptone	20,0
Sodium chloride	5,0
Lactose	10,0
Sucrose	10,0
Dextrose	1,0
Ferric citrate	0, 3
Sodium thiosulphate	0, 3
Phenol red	0.024

Pembuatann : suspensikan 65 gram media ke dalam 1 liter air suling. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tuang dalam tabung reaksi dan letakkan ± 30 – 45 ° sehingga diperoleh bagian tegak dan bagian miring yang sama tinggi. Biarkan medium menjadi dingin dan padat.

Penilaian : Ada 7 penilaian yang dapat terjadi pada TSI-A yang telah diinokulasi dengan kuman yaitu :

Tabel 1
Reaksi – reaksi TSIA

	Pertumbuhan	Miring	Tegak	Gas	H ₂ S
1.	+	Asam	Asam	+	-
2.	+	Alkalis	(Asam)	+	+
3.	+	Alkalis	Asam	Variabel	-
4.	+	Asam	(Asam)	+	+
5.	+	Alkalis	Alkalis	-	-
6.	+	Asam	Asam	-	-
7.	-	-	-	-	-

() tak begitu jelas karena adanya H₂S pada bagian tegak

Orange – merah : warna sebelum inoculasi
 Kuning (asam) : glukosa dan / atau sukrosa dan / atau lactose
 difermentasi
 Merah (alkalis) : glukosa, sukrosa dan laktosa tidak difermentasi .

Warna hitam pada bagian tegak : Produksi H₂S

Gelembung gas pada bagian tegak : Organisme aerogenes

<u>TSI-A</u>	<u>REAKSI</u>
1. Asam pada bagian tegak Asam pada bagian miring Gas pada bagian tegak Tidak ada warna hitam	glukosa,laktosa dan atau sukrosa difermentasi menghasilkan asam dan gas
2. Asam pada bagian tegak Alkalis pada bagian miring Gas pada bagian tegak Bervariasi, ada warna hitam	glukosa difermentasi dengan menghasilkan asam, laktosa dan sukrosa tidak difermentasi, H ₂ S dihasilkan.
3. Asam pada bgn. Tegak, Alkalis pada bgn. Miring Gas pada bgn. Tegak Bervariasi, tidak ada warna Hitam.	glukosa difermentasi dengan menghasilkan asam, laktosa dan sukrosa tidak difermentasikan, H ₂ S tidak dihasilkan.
4. Asam pada bgn. Tegak, Asam pada bgn. Miring Gas pada bagian tegak Bervariasi, ada warna Hitam.	glukosa, laktosa, dan/ atau sukrosa difermentasi dengan menghasilkan asam, H ₂ S dihasilkan .
5. Alkalis pada bgn. Tegak bagian miring Tidak ada.gas warna hitam Tidak ada.	glukosa, laktosa, dan sukrosa pada tidak difermentasikan, H ₂ S tidak dihasilkan.
6. Asam pada bgn. Tegak, Asam pada bgn. Miring Tidak ada gas warna hitam Bervariasi.	glukosa, laktosa, dan /atau sokrosa difermentasikan dengan hanya menghasilkan asam. H ₂ S dihasilkan atau tidak di Hasilkan .

TSI-A harus diamati pada 24 jam kemudian, dengan inkubasi yang lebih panjang, reaksi asam dapat berubah menjadi alkalis. Juga sedikit senyawa asam yang dihasilkan dari fermentasi glukosa dioxydasi secara cepat pada bagian miring yang akan tetap atau merubah bagian miring tersebut menjadi alkalis. Oleh pengaruh tekanan oxygen yang rendah di bagian tegak reaksi asam karena fermentasi glukosa dipertahankan.

b. Urea agar

Media ini digunakan untuk mengetahui adanya aktivitas urease oleh mikroorganisme

Formula	gram per liter
Pepton	1.0
Glukosa	1.0
Sodium Chloride	5.0
Monopotassium phosphate	2.0
Urea	20.0
Phenol red	0.012
Agar-agar	12,0

Pembuatan : Suspensasikan dalam 950 ml air distilasi atau air dimineralisasi dan di biarkan 15 menit . didihkan hingga terlarut semua. Sterilkan dalam autoclave 121°c/ 15.

Penilaian : bila urea dihydrolisa, amoniak akan dibebaskan dan menyebabkan medium berubah menjadi alkalis .

Positif : warna merah

Negatif : warna kuning (tidak ada perubahan)

c. Simon Citrat Agar

Untuk menentukan kemampuan suatu organisme untuk menggunakan citrat sebagai sumber carbon utama. Digunakan untuk identifikasi bakteri golongan Enterobacteriaceae dan beberapa bakteri gram negatif lainnya.

Formula	gram per liter
Magnesium Sulfat	0.2
Monoammonium Phosphat	1.0
Dipotassium phosphat	1.0
Sodium citrat	2.0
Sodium chloride	5.0
Agar-agar	5.0
From thymol blue	0.08

Pembuatan : Suspensikan dalam 1 liter air distilasi . didihkan hingga larut sempurna
Sterilkan dalam autoclave 121°C / 15' . Masukkan dalam tabung dan miringkan .

Penilaian : Adanya pertumbuhan warna biru, Tidak ada pertumbuhan warna hijau (tidak berubah)

d. SIM (Sulfide- Indol- Motility)

Medium ini di rancang untuk 3 tujuan yaitu untuk mengetahui motilitas organisme adanya pembebasan H₂S (Sulfido) dan adanya pembentukan Indol.

Furmula	gram per liter
Trypticase peptone	20.0
Thiotone peptone	6.1
Ferrous Ammonium sulfate	0.2
Sodium thiosulfate	0.2
Agar-agar	3.5

Pembuatan : Suspensikan dalam 1 liter air distilasi atau air dimineralisasi. Didihkan hingga larut sempurna. Sterilkan dalam autoclave 121°C / 15 menit .

Penilaian : - Adanya H₂S dimanifestasikan oleh warna hitam pada bagian dasar sebagai hasil reaksi H₂S dengan Fe menjadi FeS warna hitam .
- Indol di uji dengan penambahan 1 ml Chloroform dan 1 ml Reagent kovacs . Adanya indol terlihat berupa cincin merah yang terbentuk hanya beberapa detik pada lapisan reagent .
- Motilitas terlihat dengan adanya warna keruh dan adanya penyebaran pertumbuhan yang menjalar ke atas .

e. Gula-gula

Media gula-gula ini digunakan untuk mengetahui kemampuan kuman dalam memfermentasi gula-gula.

Furmula	gram per liter
air peptone	100 ml
Gula-gula	2.0 gram
Phenol red	1.0 ml

Pembuatan : Gula-gula dilarutkan dalam air peptone lalu di tetesi phenol red .
Tuangkan pada tabung , sterilkan dalam autoclave 121°C / 15 .

Penilaian : Positif medium berwarna kuning, artinya gula difermentasi dengan menghasilkan asam. Negatif medium berwarna merah (tidak ada perubahan)

f. Methyl Red- Voges Proskauer (MR-VP)

Media dan uji ini dikerjakan untuk membedakan antara dua jalur fermentasi glukosa yaitu : Percampuran asam, dan fermentasi butanediol atau butylene glycol. Digunakan untuk membantu dalam pembagian bakteri coliform dan penting dalam pemeriksaan secara bacterial dari sampel makanan dan air minum yang terkontaminasi faces .

PRISIP :

MR : beberapa bakteri memfermentasi glukosa menjadi asam tanpa adanya reaksi yang lebih lanjut menyertainya. pH hasil fermentasi ini di bawah 4.4 .

VP : Beberapa bakteri dalam penggunaannya terhadap glukosa, menghasilkan acetone (acethyl methyl carbinol), 2,3 butanediol, atau diacehyl. Hasil metabolisme ini mengalami oksidasi dengan hasil akhirnya adalah KOH, O2 dan beberapa bahan lain (Creatinine) .

Furmula	gram per liter
Dipotassium phosphat	5.0
Polypeptone atau peptone buffer	7.0
Glukosa	5.0

Pembuatan : Suspensikan dalam air distilasi atau air dimineralisasi dan sterilkan dalam Autoclave 121°C / 16 .

Penilaian : MR Test : Inkubasikan kuman dalam medium di atas pada 37°C selama 48-72 jam . Setelah itu 1 mil dari medium dipindahkan untuk di tambah 5 tetes reagen

MR :

Methyl Red	0.1 gram
Ethanol 95	300 ml
Air distilasi	500 ml

Larutan Methyl red dalam ethanol, tambahkan air distilasi sampai volume yang ditetapkan . simpan pada temperature kamar .

Reaksi : Merah : Positip (PH lebih kecil dari 4,4)
 Merah-Orange : Positip lemah (PH antara 4,4 dan 5,3)
 Kuning : Negatip (PH lebih besar dari 5,3)

VP Test : Tambahkan 12 tetes alpha naphtol dan 5 tetes KOH pada 1 ml medium yang berumur 40 jam . Goyang dengan sempurna , tunggu sampai 30 menit.

Reagent :	1. Alpha naphthol	5 gram
	Ethanol absolut	100 ml
	2. KOH	4 gram
	Air distilasi	100 ml

Positif : Warna pink sampai merah (di sebabkan oleh reaksi kondensasi diantara diacethyl , suatu hasil akhir dari oksidasi glukosa dihasilkan dengan adanya KOH dan O₂ dan beberapa bahan dalam medium (creatinine) .

Negatif : Tidak ada perubahan .

Penilaian : MR test jika positif menandakan fermentasi type campuran Asam telah terjadi , yang merupakan type untuk kebanyakan Enterobacteriaceae .
VP positif menandakan adanya hasil akhir dari type fermentasi Butanediol , yang merupakan kuman diantara golongan Enterobacteriaceae , secara essential dibatasi pada klebsiella Enterobakter group.

g. Litmus Milk

Suatu medium digunakan untuk membantu dalam mengidentifikasi bakteri gram positif, teristimewa Streptococcus dan Corynebacterium.

Formula :

Skin milk	100.0 ml
Litmus	0.75 gram
pH 6.8	

Pembuatan : Suspensikan bahan di atas dalam 1 liter air distilasi, penambahan air tersebut dilakukan secara bertahap. Sterilkan dalam autoclave suhu 121oC selama 15 menit. Selanjutnya tuangkan dalam tabung reaksi

Penilaian : Litmus milk yang tidak diinokulasi dengan kuman adalah buram dan berwarna ungu. Laktose difermentasi merubah medium menjadi merah. Pada pH 4,5 susu (milk) membeku. Casein yang dicerna (digestion) membuat medium menjadi opalescent. Sifat alkalis yang ekstrim dapat mengintensifkan warna ungu .

h. Nitrat Eduction (Nitrat Broth)

Untuk menetapkan kemampuan suatu organisme untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit dan seterusnya. Media ini berguna untuk identifikasi beberapa type bakteri (Corynebakteria , actinomycetes dan lain-lain) .

Furmula	gram per liter
Beef extract	3.0
Peptone	5.0
Potassium Nitrat	1.0

Pembuatan : Suspensikan dalam 1 liter air distilasi dan sterilkan dalam autoclave 121°C selama 15 menit. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada 37°C. tambahkan masing-masing 5 tetes dari reagent dibawah ini dan amati perubahan warna merah yang segera timbul .

Reagent :	1. Sulfanilic acid	8.0 g
	Acetic acid 5 N	1000 ml
	2. N,N-Dimethyl-l-Naphthylamine	8.0 g
	Acetic acid 5 N	1000 ml

Penilaian : Warna merah disebabkan p-sulfo benzeneazonaphthylamine, adalah

suatu warna merah azo yang terbentuk sebagai hasil dari :

- 1). Diazonisasi dari asam sulfanilit oleh nitrat
- 2). Pengikatan naphthylamine pada terminal atom N dari sulfanilit yang diazonisasi .

Bila reduksi terus berlangsung , Nitrit dirubah menjadi N2 dan NH3, test akan memberikan hasil negatip. Hal in dapat diatasi dengan menambahkan beberapa partikael dari zinc powder pada kultur yang memberikan test negative. Jika tidak ada perubahan pada nitrit, Zinz akan mereduksi nitrit tersebut dan berubah menjadi test positif. Dengan demikian setelah ditambahkan partikel zinc tersebut tes menjadi positif berarti nitrat tidak direduksi sehingga hasil sesungguhnya adalah negatif

i. Orthonitro phenyl-D-D-galactopyranoside (OPNG) borth.

Uji dengan larutan ini digunakan untuk menetapkan adanya B-Galactosidase, suatu enzym pemecah lactose, yang mengkatalisasi langkah pertama dan menentukan dalam fermentasi lactose.

Penggunaan yang penting dari uji ini adalah dapat mengidentifikasi secara cepat delayed ladctosa fermented diantara kuman Enterobacteriaceae. Jika tidak menggunakan uji ini proses fermentasi dapat memakan waktu sampai 30 hari .

Formula	
OPNG solution	250 ml
OPNG	6 g
0.01 N Na2HPO4	1000 ml
Air pepton	750 ml

Pepton 10 g
NaCl 5 g
Air 100 ml
pH 7.2

Pembuatan : Tuangkan campuran bahan di atas dalam tabung steril sebanyakmasing-masing 2,5 ml. Sterilkan dalam autoclave 121°c / 15. Media dapat disimpan dalam refrigerator lebih 1 bulan .

Penialaian :

Dasar uji : Bakteri memiliki enzym yang dapat memecah secara cepat OPNG yang tidak berwarna menjadi d-galactosa dan o-nitrophenol yang berwarna kuning kuat .

Catatan : Sejumlah organisme yang tidak mampu memfermentasikan laktose adalah organisme yang bila diuji dengan OPNG hasilnya positif.

j. Oxidative-Fermentative (OF media)

Inokulasikan setiap tabung dengan tusukkan tunggal sampai dasar. Tutupi 1 kultur/tabung dengan $\frac{1}{2}$ inchi minyak mineral steril.

Media ini digunakan untuk menentukan apakah asam yang terbentuk dari karbohidrat hasil dari oxidative atau fermentative. Berguna untuk mengidentifikasi gram positif cocci.

Furmula	gram per liter
Peptone (trypcase)	2.0
Sodium Chloride	5.0
Dipotassium phosphate	0.3
Brom thymol blue	0.03
Agar-agar	3,0

Pembuatan : Suspenisikan dalam air distilasi (1 liter). Sterilkan dalam autoclave 121°c / 15 . Dinginkan, dan tambah lar. Karbohydrad steril sampai konsentrasi akhir 1% . Karbohidrat yang biasa digunakan adalah glucosa .

Penilaian : Oxidative : akan merombak karbohidrat pada media yang tidak ditutup minyak mineral dan merubah warna media menjadi kuning dimulai pada bagian atas karena terbentuk asam .

 Fermentative : Akan merombak karbohidrat pada kedua tabung yang tertutup maupun tidak tertutup oleh minyak mineral dengan menghasilkan asam sehingga merubah medium menjadi kuning pada seluruh bagian medium .

5. Media Sabourand Dextrose Agar untuk jamur

Media ini sangat cocok dan selektif untuk isolasi jamur. PH yang rendah dan kandungan gula yang tinggi merupakan hambatan untuk pertumbuhan bakteri.

Formula	gram per liter
My cological Peptone	10
Dextrose	40
Agar No. 1	15

Pembuatan : Suspensikan bahan media di atas ke dalam 1 liter air distilasi Panaskan sampai mendidih dan bahan larut sempurna. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Tuangkan ke dalam cawan petri kurang lebih 20 ml tiap cawan

Oxidase test .

Prosedur : Gosokkan usa dari kultur agar yang tumbuh pada kertas filter yang mengandung reagent oxidase .

Uji Positif : Warna ungu gelap dalam waktu 10 detik

Negatif : Reaksi yang kekuning-kuningan atau reaksi ungu yang terlambat (lebih dari 10 detik)

Reagent : Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride .

MATERI PRAKTIKUM III

MENGENAL PERTUMBUHAN BERBAGAI KUMAN PADA BERBAGAI MEDIA

Praktikum ini merupakan kelanjutan dari praktikum sebelumnya yaitu Pembuatan dan Pengenalan Media (Materi Praktikum II). Bahan yang digunakan untuk praktikum ini menjadi satu dengan materi praktikum II tersebut. Oleh karena itu mahasiswa diharuskan membuka kembali materi praktikum II tersebut.

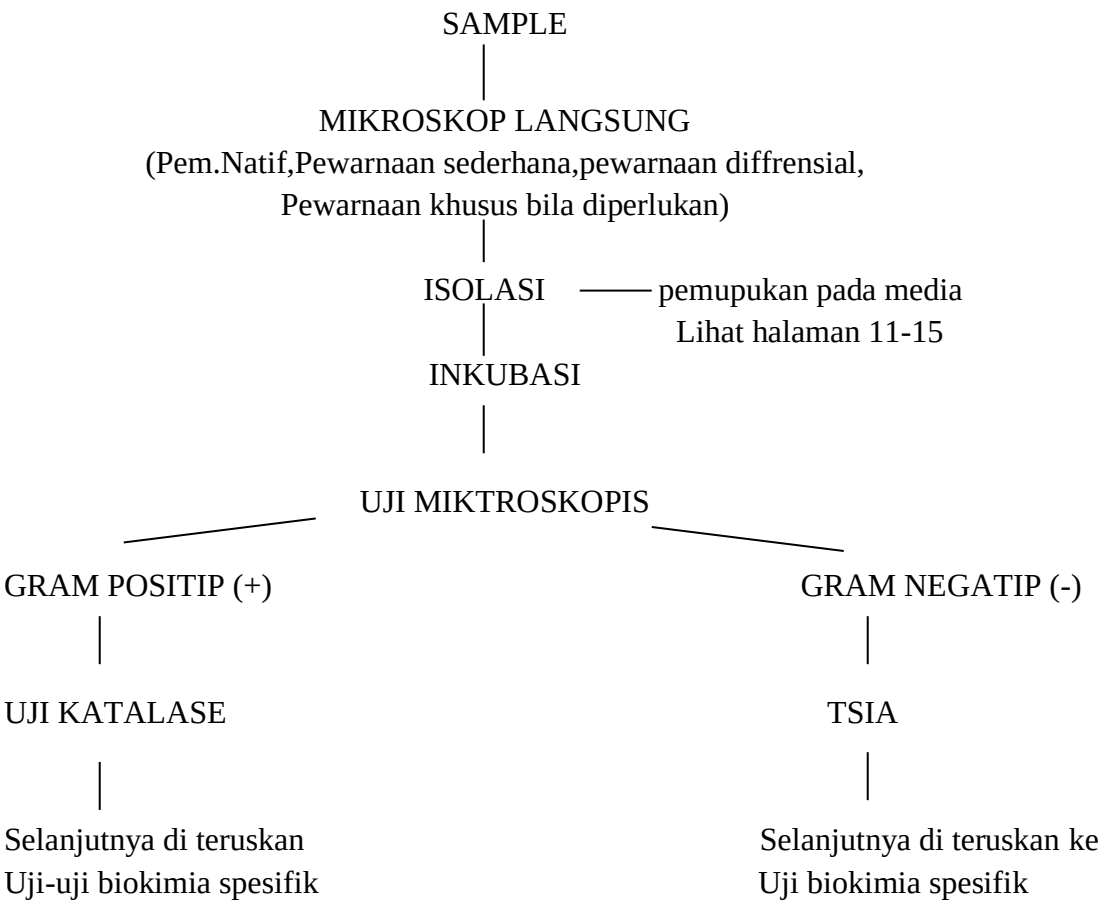
Pada praktikum ini kita melihat pengaruh zat penghambat dalam pertumbuhan kuman sehingga media dengan zat penghambat tersebut dapat menjadi media selektif untuk pertumbuhan kuman-kuman tertentu. Ada beberapa zat dapat menghambat kuman Gram positif tetapi tidak menghambat kuman Gram negatif, seperti kristal violet. Ada beberapa zat yang selain menghambat kuman Gram positif, juga menghambat beberapa kuman Gram negatif seperti Bile Salt, Natrium Nitrat, Na- deoxycholat, Natrium thyosulfat dan Brilliant green. Disamping itu juga dapat dilihat pengaruh penambahan berbagai indikator yang menjadikan media tersebut menjadi media differensial. Dari media differensial ini dapat dibedakan jenis kuman berdasarkan warna koloni atau warna media disekitar koloni. Indikator yang umum ditambahkan pada media adalah bahan gula monosakarida atau disakarida seperti laktosa, sukrosa atau bahan – bahan lain yang bila didegradasi menghasilkan suasana asam atau basa seperti carbon citrat, urea atau protein, serta bahan indikator warna asam atau basa seperti phenol red, neutral red, eosin, Brome thymol blue dan Methylene blue. Kuman-kuman yang dapat memfermentasi suatu gula sederhana akan menghasilkan asam. Suasana asam akan merubah indikator warna asam yang tadinya merah (phenol red) menjadi kuning, atau yang tadinya netral (neutral red) menjadi pink. Demikian juga kuman yang dapat megradasi protein biasanya akan terbentuk suasana basa, suasana basa ini dapat merubah indikator warna basa brome thymolblue menjadi biru atau indikator warna asam phenol red menjadi pink.

Pada praktikum ini akan ditampilkan berbagai macam media sederhana/umum seperti Nutrient Agar, Blood Agar; media selektif dan differensial seperti Mac Conkey Agar, Salmonella Shigella Agar, Manitol Salt Agar, Eosin Methylene Blue Agar dan lain-lain; Media Penyubur seperti Tetratationat broth, Selenit broth; media indentifikasi seperti TSI-A, Urease, Gula-gula, simon Citrat, dan sebagainya kemudian mahasiswa diminta mengamati karakteristik pertumbuhan kuman dilihat dari warna dan bentuk koloni, reaksi-reaksi biokimia seperti adanya gas, gelembung gas, dan pengumpalan. Bentuk koloni dilihat dari bentuk keseluruhan, dilihat dari warna tiap-tiap koloni kuman dalam masing-masing media selektif dan differensialnya, dilihat juga margin, elevasi, permukaan dan opasitasnya khususnya bila ditumbuhkan pada media umum atau sederhana atau media yang tidak ada indikator warnanya.

MATERI PRAKTIKUM IV
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI

Isolasi adalah menanam/meinokulasi bakteri pada media padat bentuk datar (media isolasi) umumnya dengan cara streak untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Koloni yang terpisah berasal dari pertumbuhan satu sel kuman yang terpisah. Satu sel kuman yang terpisah berkembang biak dengan cara binari fasion membentuk banyak sel baru yang membentuk koloni yang terpisah. 1 koloni yang terpisah dapat mengandung puluhan ribu sampai jutaan sel kuman. Koloni yang terpisah yang menunjukkan tanda-tanda koloni kuman pathogen akan diidentifikasi untuk mendapatkan jenis kuman tertentu. Untuk mengidentifikasi kuman tersebut dilakukan dengan uji biokimia atau uji identifikasi. Kuman pathogen umumnya dapat dicirikan dengan koloni yang halus. Pada media selektif dan diffrensial kuman pathogen dapat di jaring sesuai dengan keinginan si pemeriksa. Bila kita ingin mengisolasi kuman pathogen Staphylococcus aureus maka kita mengisoalsinya pada media selektif seperti Manitol Salt agar, Baird Parker Medium; kalau kita ingin mengisolasi Salmenella kita inokulasi kuman tersebut pada media Salmonella Shigella Agar atau Bismuth Sulfid Agar, Hektoen Enteric Agar, Xylose Lysin desoxycholate Agar. Pada media-media tersebut Staphylococcus atau Salmonella membentuk koloni yang dapat dicirikan dari warnanya (lihat Materi praktikum III)

Di dalam pemeriksaan isolasi dan identifikasi ada beberapa tahap yang dilalui. Tiap-tiap tahap dilaksanakan secara sistematis. Tahapan-tahapan itu adalah :



Dari skema di atas, setelah diketahui kuman yang diperiksa bersifat Gram negatif maka dilakukan penanaman pada TSI-A

CARA KERJA

- Bahan : Sampel air susu mastitis, feses sapi, bahan pakan. Untuk mengetahui susu mastitis khususnya yang subklinis dilakukan dengan salah satunya adalah uji California mastitis Tes
- Media Nutrient Agar, Blood agar, Manitol salt agar, Mc. Conkey, Salmonella Shigella agar, Sabouraud Dextrose Agar, TSI-A, Simon’s Citrat, Urease, SIM, gula-gula, H2O2, Plasma kelinci.
- Alat : Ose, nedle, mikroskop, lampu pembakar bunsen, inkubator
- Cara kerja : Bakar ose pada nyala api lampu bakar bunsen sampai berpijar. Celupkan/tempelkan ose pada sampel lalu goreskan ose secara zigzag pada media isolasi. Sampel susu media isolasinya Nutrient Agar, Manitol Salt agar dan Mc Conkey agar, sampel feses sapi ditanam pada Mc conkey agar dan Salmonella shigella agar, sampel bahan pakan ditanam pada Sabouraud Dextrose Agar.
- Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam
- Amati dan temukan koloni yang terpisah, lalu perbanyak koloni yang terpisah pada media isolasi yang sama. Jika tidak terdapat koloni yang terpisah murnikan dengan menanam koloni yang tumbuh pada media yang sama dengan cara yang sama.
- Periksa koloni dari hasil perbanyakkan dengan pemeriksaan mikroskop, pewarnaan Gram. Jika kuman diketahui bersifat Gram negatif lalkukan penanaman pada TSI-A. Hasil yang dapat diamati pada TSI-A seperti tabel1di bawah ini.

Tabel 1. Reaksi – reaksi TSIA

	Pertumbuhan	Miring	Tegak	Gas	H2S	Lihat tabel halaman
1.	+	Asam	Asam	+	-	17
2.	+	Alkalis	(Asam)	+	+	18
3.	+	Alk.	Asam	Variabel	-	19
4.	+	Asam	(Asam)	+	+	20
5.	+	Alk.	Alk.	-	-	21-23
6.	+	Asam	Asam	-	-	24
7.	-	-	-	-	-	25

(v) tak begitu jelas karena adanya H2S pada bagian tegak

Dari hasil reaksi pada TSI-A dapat mengarahkan kita untuk melakukan uji-uji lebih lanjut seperti yang ditunjukkan pada reaksi TSI-A tersebut di atas.

Uji-uji lanjutan tersebut meliputi uji biokimia dengan menanam kuman yang diperiksa pada media-media identifikasi seperti uji koagulase dengan menanam kuman pada plasma kelinci (untuk kuman *Staphylococcus*), media gula-gula, MRVP, Simon,s Citrat, Oksidase, Oksidasi dan Fermentasi, Litmus Milk, dan lain sebagainya. CARA MENANAM KUMAN UNTUK UJI IDENTIFIKASI LIHAT MATERI PRAKTIKUM II MENGENAI PEMBUATAN DAN PENGENALAN BERBAGAI MACAM MEDIA.

Dari hasil uji biokimia tersebut dapat diambil kesimpulan mengenai genus atau spesies kuman yang diperiksa.

Jika berdasarkan pemeriksaan pewarnaan Gram ternyata kuman bersifat Gram positif, maka pemeriksaan lanjutan yang harus dilakukan sesuai tabel 11 sampai 13.

Tabel 2
GRAM NEGATIF COCCOBACILLI + BATANG
REAKSI TSIA : ASAM / ASAM , GAS

	Aeromonas Spp	E. Coli	Klebsiella Pneumonia	Citrobacter intermodius	Proteus rettgeri	Serratia Leque ficient	Maecescē cens	Enterobacteriac aerogenen	Cloaca	Erwina Herbicola
UREASE	-	-	+	d	+	d	d	-	d	d
INDOL	d	+	d	+	+	-	-	-	-	d
MOTILITY	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+ (25 ⁰ C)
OXIDASI	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRAT	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		Methyl Red	-	+	+	d	d	-	-	d
		Voges Proskeuer	+	-	-	d	+	+	+	d
			PD	-	+	-	-	-	-	-
				Arabinosa		+	-	+	+	+
				Adonitol		d	d	+	d	-
				Rhamnosa		-	-	+	+	d
				Gelatin Lig. 37 ⁰ C		+	+	d	d	+ (25 ⁰ C)
				LD		d	+	+	-	-
						Esculin		+	-	+
d. difrent type		LD. Lysine decarboxylase		PD. Phenylalanie deamine						

Tabel 3
GRAM NEGATIP COCCOBACILLI + BATANG
REAKSI TSIA : ALKALIS / ASAM ? GAS H2S

	Proteus mirabilis	Salmonella spp	Salmonella Arizona	Edwardsiella tarta	citrobacter freundii
UREASE	+	-	-	-	d
INDOL	-	-	-	+	-
Motility	-	-	+	-	+
CITRAT		+	+	-	-
LD		+	+	+	+

d . different type
LD . Lysine decarboxylase
OPNG. Orthonitrophenyl-b-d pyranogalactoside

TABEL 4
GRAM NEGATIP BATANG, COCCOBACILLI
REAKSI TSI : ALKALIS/ASAM, GAS VARIABLE

[illegible]

TABEL 5
GRAM NEGATIP BATANG,COCCOBACILLI
REAKSI TSI : ASAM/ASAM, GAS VARIABLE, H2S

	E. Coli	mirabilis	vulgaris	citrobachter freundii	salmonella arizona
UREASE	-	+	+	d	-
Indol	+	-	+	-	-
Motility	+	+	+	+	+
	CITRAT	d	d	+	+
		+	+	-	-
				OPNG	+
				LD	+

d- different type
LD- Lysine Decarboxylase
PD- Phenylalanine Deaminase

TABEL 6
GRAM NEGATIP BATANG, COCCOBACILLI
BUKAN GOLONGAN ENTERIK
REAKSI TSI : ALKALIS/ALKALIS, TIDAK ADA GAS, H2S

	Alkaligenesis faecalis	Bordetella broncheseptic	Pseudomonas			Flavobacterium sp	Chromobacterium sp
			aero- ginosa	fluor- escens	malto- philia		
Motility	+	+	+	+	+	d	+
Indol	-	-	-	-	-	d	-
UREASE	-	+	++	d	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	-	+	+
CITRAT	d	+	+	+	-	d	d
OF (glucosa)	-/-	-/-	0/-	0/-	0/1	0/- atau -/-	0/F
Haemolysis	-	d	d	-	-	-	+
Pigment			d	+	+	+	d
			Gelatin digested			+	d

d- different type
0- Oxydase
F- Fermentative
-/- : Karbohidrat tidak diurai (medium mungkin berubah menjadi biru artinya Lebih Alkalis pada kasus ini.

TABEL 7a
GRAM NEGATIP COCCI, DIPLOCOCCI DAN COCCOBACILLI
TO ENTERIK GROUP
REAKSI TSI : ALKALIS/ALKALIS
Semua anggota dari group ini adalah NON MOTIL DAN INDOL NEGATIP

	Neisseria	Branhamella	Moraxella			Acinetobacter	Brucella
Gram negatif Morfologi	Cocci, tunggal / berpasangan	Cocci sering berpasangan	batang gemuk, berpasangan atau batang pendek, filament			Cocci sampai batang pendek dan gemuk, berpasangan atau rantai, filament	Coccobacillary
			Bovis	lacunata	spp		
Hemolisis	-	+	+	-	-	d	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	-	d
CO2 required	d	-	-	-	-	-	d
Urease	-	-	-	-	d	d	d
OF (glucosa)	O/-	-	-	-	-	O/-	O/-
Pigment	d	d	-	-	-	-	-
Growth on Mac Conkey	-	-	-	-	d	+	d
Citrat	-	-	-	-	-	d	-
H2S Production	d	-	-	-	-	-	d
Nitrat reduction	-	-	+	+	-	-	-
loefflers							
O- Oxydase	d- different type						

Tabel 7 b

	B. Abortus	B. Melitensis	B. suis	B. neotamiae	B. Ovis	B. Canis
CO2 required	+	-	-	-	+	-
H2S	+	-	+	+	-	-
Oxidase	+	+	+	-	-	+
Nitrat Reduction	+	+	+	+	-	+
Urease	+	+	+	+	-	+
Basic Fuchsin 1 : 50,000 tolerated	+	+	-	-	+	-
Thionin 1 : 50,000 tolerated	-	+	+	+	+	+

TABEL 8
GRAM NEGATIP BATANG PLEOMORFIK, COCCOBACILLI, BATANG LURUS ATAU BENGKOK
NON ENTERIK GROUP
REAKSI TSI : ASAM/ASAM

	P a s t e u r e l l a				E. sp	Yersinia entercco- litica	Vibrio oholereae	Serratia spp	Actinobacillossis			
	Multo- Oida	pneu- tropica	ureae	hemoly- tica					sp	equuli	suis	lignier
Oxydase	+	+	+	+	+	-	+	-	d	d	-	d
Urease	-	+	+	-	-	+	-	d	+	+	+	+
Indol	+	+	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Hemolysis	-	-	d	+	-	-	d	-	d	-	+	-
OPNG	-	d	-	d	d	+	+	+	+	+	+	+
Growth on Mac conkey	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin Liquef							+	+	-	-	-	-
									Raffinosa	+	+	-
									Trehalosa	+	+	-
									Esculin	-	+	-
									Methyline Flue Reduction	-	-	+

d- different type

TABEL 9
GRAM NEGATIP BATANG PLEOMORFIK, COCCOBACILLI, FILAMENT
NON ENTERIK GROUP
TIDAK TUMBUH PADA TSI

	<u>HAEMOPHYLUS SPECIES</u>									
	H. agni H. Somnus	infleun- zae	suis	haemoly- ticus	parain- fluenza	parasuis	pleuro- pneumonia	haemoglobin philus	galli- narum	paragalli- narum
Satellitic on	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TA with Staph										
X required	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
V required	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Indol	d	d	-	d	-	-	-	+	-	-
CO2 Requirement	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Hemolytic	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Serum required	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Urease	?	d	-	+	d	-	+	-	-	-
OPNG	?	-	+	-	d	+	+	d	?	-

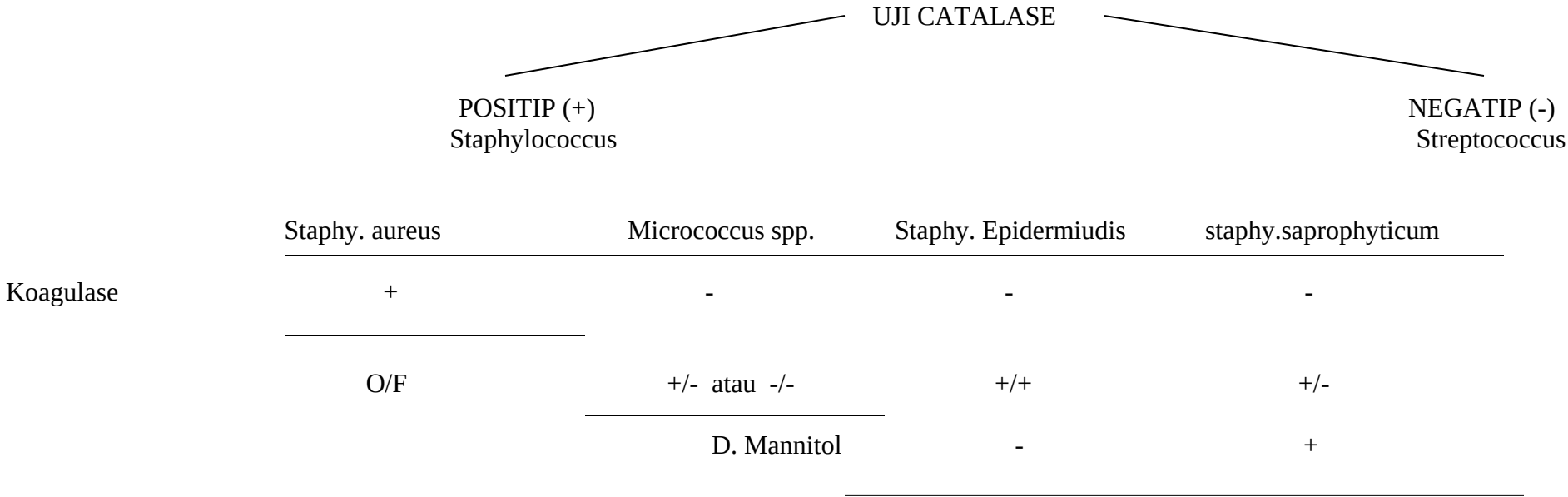
d- different type

TABEL 10
NON ENTERIK GROUP
TUMBUH PADA TSI TIDAK TERATUR/SULIT

Tumbuh pada agar darah datar pada 37°c dengan CO2 3-15% setelah 48 Jam

	Campylobachter						
	fetus			sputorum			
SUBSPECIES	jejuni (coli)	fetus intertinalis		bubulus	sputorum	fecalis	Streptobacillus moniliformis
Morfologi	Gram negatip, bentuk komma, bengkok atau bentuk S, spiral panjang						Batang sylindris, rantai panjang, Filament irregular fragmen dirculer sampai kumparan gendut
Oxidase	+	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	-	-	+	-
H2S (ditunjukkan dengan Kertas acetat)	+	-	+	+	+	+	-
TSI	-	-	-	+	+	+	-
Tumbuh dalam 1% thyol	bawah per mukaan	bawah per mukaan	bawah per- mukaan	menyelu- ruh	menyelu- ruh	bawah per- mukaan	tidak bisa diamati
Nitrat reduction	-	-	-	+	+	+	-
CO2 required	+	+	+	+	d	+	+
Tumbuh pada 25°C	-	+	+	d	+	-	+

TABEL 11a
GRAM POSITIP COCCI
TUNGGAL-BERPASANGAN-BERGEROMBOL



TABEL 11b
GRAM POSITIP COCCI TUNGGAL, BERPASANGAN,
BERGEROMBOL

CATALASE NEGATIP (-) -----) Inokulasikan ke kaldu darah 18-24 jam

Inokulasi dengan pipet steril 3 tetes kultur kaldu darah pada biokimia DI BAWAH INI

	Larutan Hemolysin	6,56 NaCl	Laktose*	Sorbitol*	Trehalose*	Litmus Milk			sukrose*	Arabinose*
						R	A	C		
Strp. Pyogenes	+	-	+	-	+	-	+	d	+	-
Strp. Zooeepidimicus	+	-	+	+	-	-	+	d	+	-
Strp. Canis	+	-	+	-	d	-	+	-	+	-
Strp. Equei	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Strp. Equisimilis	+	-	d	-	+	-	d	-	+	-
Strp. Viridans	-	-	d	d	d	+	+	+	+	-
Strp. Faecalis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Subsp. Zymogenes	d	+	+	+	+	d i g e s t i o n			d	-
Strp. Faecium	-	+	+	d	+	+	+	+	d	d
Enterococcus sp	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Strp. Pneumonia	-	-	+	+	+	-	+	+	+	d
d- different type			R-Reduksi	A- Asam	C-menggumpal	*mengandung serum kuda				

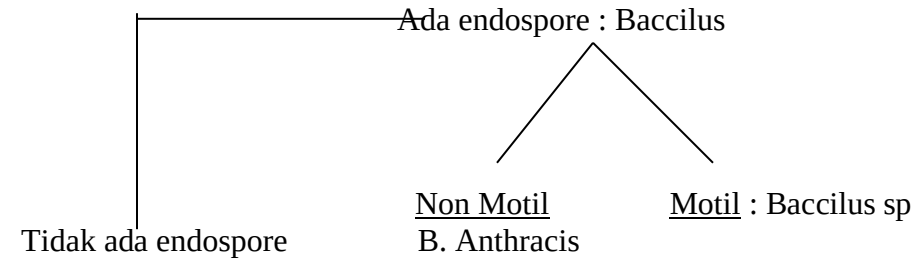
Tabel 11c

	Larutan Hemolysin	6,56 NaCl	Laktose*	Sorbitol*	Trehalose*	Litmus Milk	Hipporate hydrolysis	esculin	CAMP reaction
Strp. Agalactia	d	-	+	-	+	RAC	+	-	+
Strp. Dysgalactia	-	-	+	-	+	RAC (1)	-	-	-
Strp. Uberis	-	-	+	+	+	RAC	+	+	d

(1) gumpalan dan deduksi dapat bervariasi
CAMP test : Streak B. Staphylococcus toxin melintang di tengah agar darah
Uji Microorganisme dengan menyilangkan pada streak toxin
Amati adanya zone hemolysin yang luas (toxin dan mikroorganisme berintegrasi)

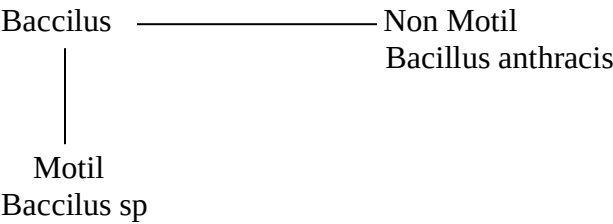
Tabel 12a
GRAM POSITIP BATANG, PLEOMORPHIK, DI PHTREROID

CATALASE POSITIP



	Sp.	Equi	Pseudo Diphterium	bovis	renale	kutscheri	pseudo tbc	ulcerans	diphtheriae	Listeria monocytogenes	Actinomycae viscosus
UREASE	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Haemolysis (kaldu darah)	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	-
Glukosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat reduction			-	+	+	-	-	d	+	-	-
Sukrose					-	+	d	+	-	d	+
Gelatin digestited								+	-	-	-
Motility									-	+	-
Esculin H2S (TSI)											+
											+

Tabel 12 b
GRAM POSITIP BATANG, CATALASE POSITIP
ADA ENDOSPORE



	Facultative Anaerobe	VP	Arabinose	Xylose	Mannitol	Growth dalam 7%NaCl
B. cereus	+	+	-	-	-	+
B. Subtilis	-	+	+	+	+	+

Tabel 13
GRAM POSITIP BATANG
(PLEOMORPHIC, DIPHTHEROID, IRREGULER, FILAMENT)
CATALASE POSITIP

	Corynebacterium Pyogenes	haemoliticum	Erydipelothrix rhusiopathiae	Lactobacillus	
Hemolitic Pencarian thd Loeffler serum miring	+ (beta)	+ (beta)	d (alpha/-)	d (alpha/-)	Hemolitic Pencarian thd Loeffler serum miring
	+	-	-	tak tumbuh	
Kaldu darah (Lar. Haemolisin)	+	+	-	-	Kaldu darah (Lar. Haemolisin)
		LBS plate	-	+	LBS plate
		H2S	+	-	H2S
d- different type					
LBS- Lactobacillus Selective agar					

MATERI PRAKTIKUM V

UJI BIOLOGIS

Tujuan utama uji biologis pada bakteri adalah untuk mengetahui tingkat kepatogenan atau keganasan bakteri. Keganasan atau kepatogenan bakteri ditentukan oleh virulensi dan jumlah kuman. Makin kecil jumlah kuman yang dapat menimbulkan penyakit dengan meninggalkan jejas-jejas (lesi) yang spesifik berarti makin virulen kuman tersebut. Jadi virulensi menunjukkan tingkat keganasan sedangkan pathogen menunjukkan kemampuan kuman menimbulkan atau menimbulkan kerusakan yang progresif. Makin Virulen suatu kuman makin fatal kerusakan yang ditimbulkan.

Virulensi ditentukan oleh toksin dan enzim yang dihasilkan. Beberapa toksin ada yang menimbulkan gangguan dan kerusakan yang fatal namun ada juga kerusakan atau gangguan yang ditimbulkannya ringan. Selain tergantung jenis toksinnya, potensi suatu toksin ditentukan oleh target organ yang dituju. Toksin dari beberapa golongan kuman *Clostridium* organ targetnya adalah syaraf. Toksin seperti ini sering fatal bagi kehidupan.

Enzim juga berperan dalam menentukan tingkat virulensi suatu kuman. Banyak enzim yang merusak jaringan di sekitarnya, ada yang mengkoagulasi darah, melisiskan sel-sel darah merah dan putih.

Menentukan kepatogenan suatu kuman dengan uji biologis berdasarkan kaedah Postulat Kock, yang prinsipnya berbunyi :

1. Jika suatu kuman ganas, maka kuman tersebut akan menimbulkan penyakit bila menginfeksi hospes spesifik dan akan menimbulkan lesi-lesi pada organ spesifik pula.
2. Dari organ yang mengalami lesi-lesi tersebut akan dapat diisolasi kuman dengan ciri-ciri tertentu yang tersifat
3. Jika kuman hasil isolasi tersebut disuntikan kembali pada hewan, maka kuman tersebut akan menimbulkan lesi yang sama seperti lesi pada poin 1
4. Dari lesi hewan reinfeksi harus dapat diisolasi kuman dengan ciri-ciri seperti ciri kuman poin 2

Lakukan studi Pustaka cari toksin-toksin dan enzim-enzim yang dihasilkan kuman yang menentukan virulensinya. Apa beda eksotoksin dan endotoksin.

Karena kita tidak mengetahui tingkat virulensi kuman uj, maka penentuan keganasan kuman berdasarkan ID50 atau LD50. Artinya berapa jumlah kuman yang dapat menimbulkan penyakit (infeksi) atau kematian sebanyak 50 % hewan coba. Pada praktikum ini ID50 masing-masing kuman yang diuji telah diketahui.

Aplikasi pemberian kuman pada hewan tidak sama, tergantung port of entry dari kuman tersebut dalam menginfeksi hewan dan organ predeliksinya. Organ predeleksi menentukan port of entry. Kuman-kuman yang menginfeksi saluran pencernaan umumnya port of entrynya adalah mulut. Namun organ-organ bagian dalam seperti hepar, jantung, paru, ginjal, limfa dapat diinfeksi melalui berbagai port of entry.

Hewan coba yang dipilih juga tergantung kuman spesifiknya. Untuk kuman *Salmonella pullorum* hewan cobanya anak ayam umur kurang dari 2 minggu. Karena organ predileksinya saluran pencernaan, maka aplikasinya oral. Untuk kuman *Brucella* atau anthrax hewan cobanya dapat marmut, kelinci dan tikus putih. Aplikasi pemberiannya dapat oral, intraperitonium, intramuskuler atau intra uterin (*Brucella*)

CARA KERJA

Bahan : berbagai hewan coba yang terdiri ayam, marmut, kelinci, dan tikus putih
 Berbagai suspensi kuman yaitu kuman *Salmonella pullorum*,
Brucella,
 Kapas, alkohol

Alat : alat suntik (spuit)

Cara kerja :

1. Anak ayam untuk kuman *Salmonella pullorum*

Aplikasi pemberian oral. Siapkan suspensi kuman yang ID₅₀ nya sudah diketahui sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan spuit yang ujung tajam jarumnya sudah dihilangkan. Buka paruh ayam dengan tangan kiri dan masukan kuman dengan tangan kanan. Kembalikan ayam ke dalam kandangnya. Amati kemungkinan ayam menderita sakit atau mati dalam beberapa hari. Selanjutnya lakukan seksus pada ayam yang sakit atau mati dan amati adanya perubahan patologis pada organ hewan atau adanya feses yang berupa pasta atau berak kapur.

2. Kelinci, Marmut, Tikus Putih

a. Penyuntikan Intra peritonial

Siapkan suspensi kuman. Telentangkan hewan. Tentukan tempat penyuntikan yang aman yaitu di bawah labung dan hepar di atas Visica urinaria dan usus besar. Lokasi tersebut pada kelinci kira-kira 2-3 jari dibawah rusuk terakhir, 2 jari di atas tulang velvis dan sebelah kanan linea alba. Untuk hewan marmut dan tikus putih perkirakan tempatnya dengan prinsip menghindari organ-organ di atas. Cara penyuntikan spuit dengan posisi tegak lurus. Dihindari penyuntikan mengenai bagian tubuh di bawahnya

b. Penyuntikan intra muskuler

Tempat penyuntikan di paha pada tempat yang banyak dagingnya. Bisa bagian dorso lateral paha atau bagian belakang bahu di atas lutut. Untuk ayam biasanya dilakukan pada otot dada. Arah penyuntikan tegak lurus dengan permukaan yang disuntik. Hati-hati jangan sampai terlalu dalam mengenai tulang. Jika terjadi pendarahan berarti mengenai pembuluh darah. Dalam keadaan ini spuit harus dicabut kembali dan dicari tempat yang kurang pembuluh darahnya

c. Penyuntikan Sub cutan

Pada ayam penyuntikan subcutan dilakukan pada subkutan bagian leher, sedangkan pada kelinci, marmut dan tikus putih dilakukan pada daerah punggung. Penyuntikan dilakukan dengan arah miring. Setelah jarum suntik masuk spuit digerakkan ke kiri dan

ke kanan, jika terasa ringan berarti jarum telah masuk sub kutan, tetapi bila terasa berat kemungkinan jarum suntik masuk intra kutan atau intra muskuler.

d. Intravena

Pada ayam dilakukan pada vena sayap atau vena pada daerah lateral dada. Pada kelinci pada vena telinga sedangkan tikus putih pada vena ekor. Sebelum disuntik darah dibendung dulu lalu masukan jarum hampir mendatar dengan permukaan yang akan disuntik. Posisi jarum ujung yang tajam di bawah, jika jarum sudah masuk pembuluh darah jarum diputar dengan posisi ujung yang tajam ke atas. Hal ini untuk menghindari jarum menembus pembuluh darah.

MATERI RAKTIKUM VI

UJI SEROLOGIS

Uji serologis didasarkan pada reaksi antigen dan antibodi. Antibodi terbentuk karena adanya stimulus dari antigen. Reaksi antigen dan antibodi bersifat spesifik, artinya antibodi hanya bereaksi dengan antigen yang merangsang pembentukannya. Oleh karena itu reaksi antigen dan antibodi yang dikenal dengan uji serologis ini dapat digunakan untuk membantu mendiagnosa penyakit yang disebabkan suatu agen mikroorganisme. Dalam uji serologis ini salah satu antigen atau antibodi diketahui. Uji serologis ini dapat juga digunakan untuk titer dari antibodi atau antigen.

Reaksi antara antigen dan antibodi dapat dilihat dalam bentuk agglutinat dan presipitat. Prosesnya agglutinat disebut agglutinasi, sedangkan proses presipitat disebut presipitasi.

AGGLUTINASI

Pengumpulan partikel sel seperti bakteri atau sel darah merah karena adanya antibodi. Antibodi mengikat multiple partikel/sel dan bergabung membentuk kompleks yang besar dan mengendap.

PRESIPITASI

Terbentuknya senyawa yang solid/padat dalam larutan. Senyawa solid tersebut disebut presipitat sedangkan prosesnya disebut presipitasi. Presipitat yang terbentuk memisahkan diri sehingga membentuk lapisan tersendiri. Jika larutan antigen ditambah secara perlahan-lahan pada larutan antibodi maka reaksi antigen dan antibodi membentuk presipitat yang padat yang memisahkan diri dari larutannya dan membentuk lapisan yang biasanya berada diantara larutan antigen dan antibodi.

Pada praktikum ini mahasiswa melakukan uji agglutinasi cepat plate seperti uji serologis rose Bengal untuk Brucellosis, Rapid Whole Blood untuk Pullorum dan uji agglutinasi cepat plate untuk Mycoplasma.

CARA KERJA :

- | | |
|------------|---|
| Bahan | : Antigen pullorum, serta antiserum serta antigen Brucella (Rose Bengal) Ayam Dewasa |
| Alat | : S spuit, objek gelas, pipet |
| Cara kerja | : Uji Rapid Whole Blood Test (RWBT) untuk penyakit pullorum siapkan terlebih dahulu objek gelas, dibersihkan dengan alkohol lalu keringkan
Tetesi objek gelas dengan antigen pullorum
Ambil darah ayam melalui vena sayap, teteskan pada objek gelas yang telah ditetesi antigen pullorum |

Goyang dengan cara melingkar(sirkuler) sampai tercampur lalu tunggu 2 menit.

Positif bila terjadi aglutinat berupa butir-butir seperti pasir dalam waktu kurang 2 menit. Aglutinat yang terjadi lebih dari 2 menit dinyatakan dubius, atau aglutinat yang tidak jelas terjadi kurang dari 2 menit juga dinyatakan dubius. aglutinat sempurna terjadi bila butir-butir pasir terbentuk dengan carian agak jernih di sekelilingnya.

Untuk uji Rose Bengal dilakukan hampir sama dengan uji RWBT, hanya yang digunakan antiserum bukan darah. Hasilnya juga mirip dengan hasil tes RWBT.

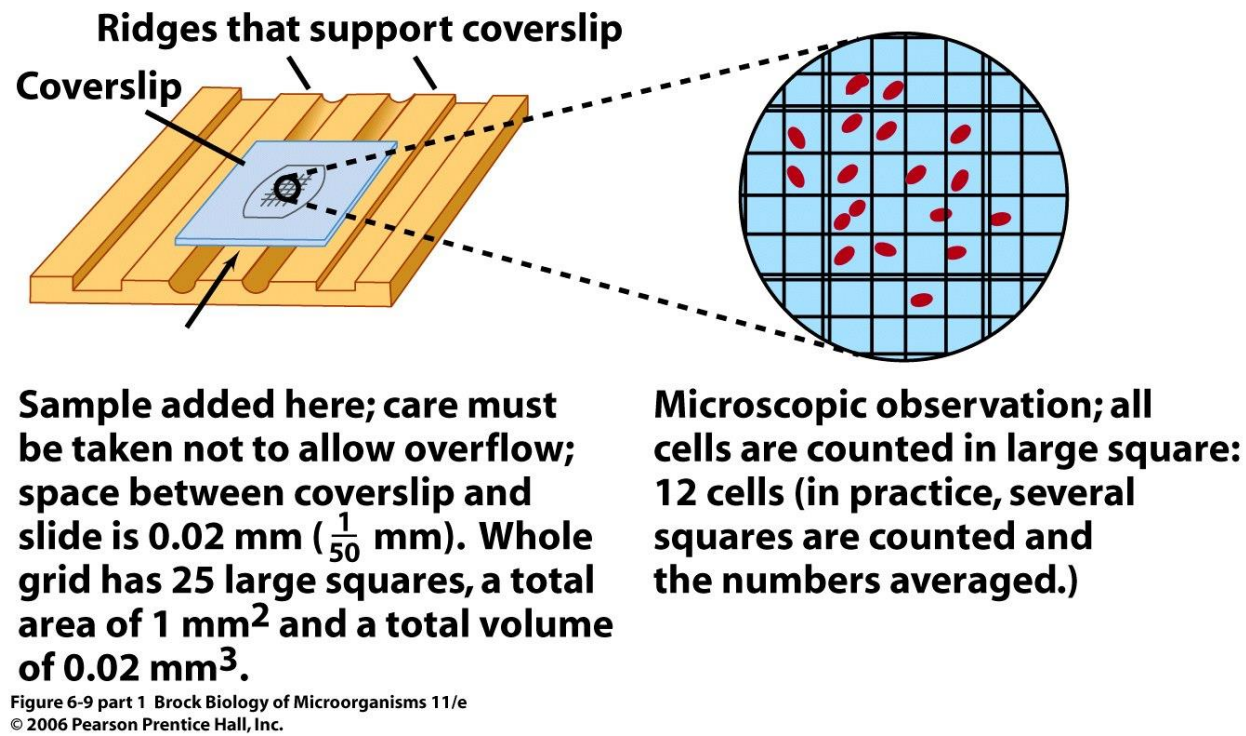
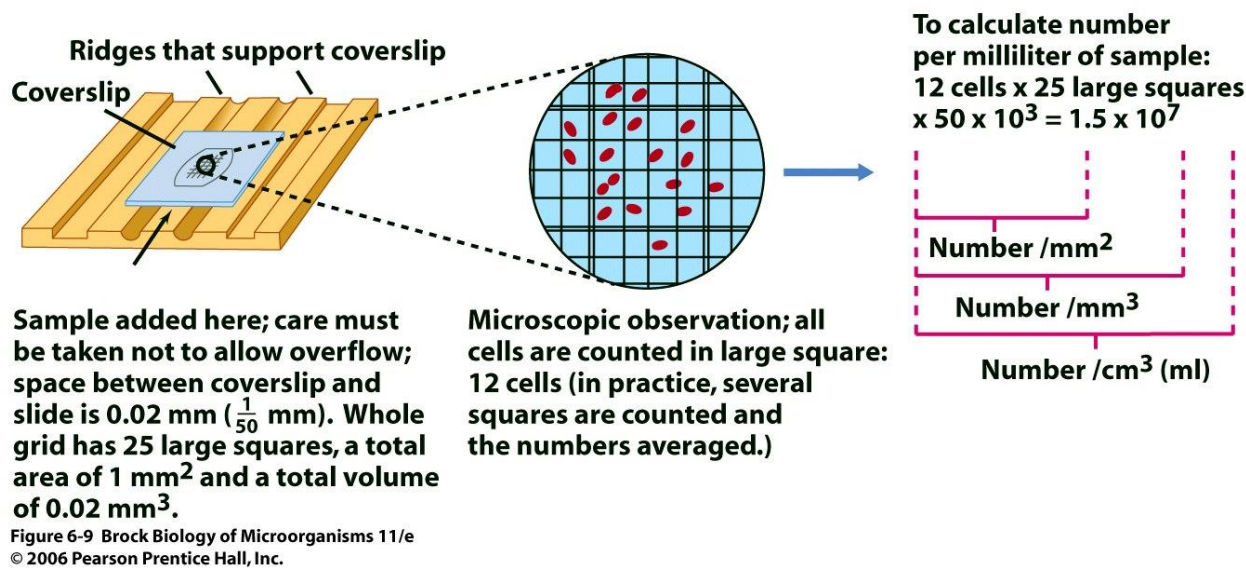
Titer Antibodi atau antigen suatu bakteri dapat diukur dengan metode dilusi menggunakan tabung atau microtiter. Agar tidak terjadi tumpang tindih dalam pengukuran titer ini pengukuran titer antigen dan antibodi dilakukan di Ex lab. Virologi dan Mikologi.

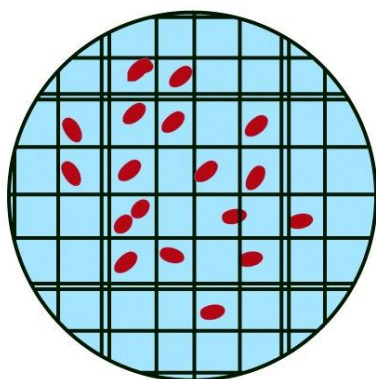
MATERI PRAKTIKUM VII

MENGHITUNG JUMLAH KUMAN SECARA KWANTITATIF

Menghitung jumlah kuman dalam suatu bahan (biasanya bahan makanan atau bahan baku untuk dikonsumsi atau untuk dibuat makanan) bertujuan untuk mengetahui tingkat pencemaran kuman terhadap bahan yang diperiksa tersebut. Hal ini dikaitkan dengan tingkat keamanan dari bahan tersebut untuk dikonsumsi hewan dan manusia. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan dalam menghitung jumlah total kuman, yaitu menghitung jumlah kuman hidup dengan Plate Count dan menghitung total semua kuman baik yang hidup maupun yang mati dengan metode mikroskopik menurut Breed.

I. Menghitung Jumlah Total Kuman Hidup dan Mati

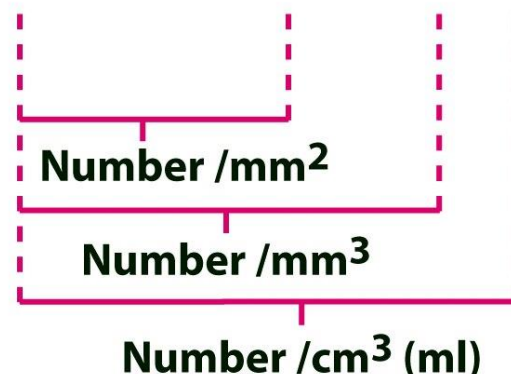




Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)

Figure 6-9 part 2 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

**To calculate number per milliliter of sample:
12 cells x 25 large squares
x $50 \times 10^3 = 1.5 \times 10^7$**



Namun kuman-kuman tidak dapat dihitung secara tepat dengan pemeriksaan mikroskopik, kecuali bila ada sekurang-kurangnya 100 juta (10^8) sel untuk tiap ml nya. Air di alam yang belum tercemar jarang mengandung lebih dari 10^5 sel untuk tiap ml nya, karena itu metode yang digunakan ialah perhitungan pada lempeng perbenihan yaitu yaitu metode Plate Count. Pada metode ini sejumlah tertentu air yang akan diperiksa diencerkan terlebih dahulu secara berturut-turut – umumnya dengan kelipatan 10, kemudian 1 ml dari tiap larutan tersebut ditanam pada plat agar nutrisi dan koloni-koloni yang tumbuh dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengenceran.

II. Menghitung Jumlah Total Kuman Hidup

Ada beberapa cara menghitung kuman dengan metode Plate Count yaitu cara :

1. Tuang
2. Spread
3. Drop

Yang umum dipakai dari ke 3 cara ini adalah cara tuang dan spread. Cara drop tingkat kesalahannya lebih besar karena selain dikalikan faktor pengenceran, jumlah sampel yang diperiksa terlalu kecil (0,02 atau 0,05 ml) kurang mewakili sampel secara keseluruhan, juga dengan cara drop harus dikalikan dengan angka 20 (untuk sampel 0,05 ml) atau 50 (untuk sampel 0,02 ml).

Media yang digunakan untuk menghitung kuman dengan metode Plate count adalah Plate Count Agar (PCA) yang merupakan media pertumbuhan mikrobial non selektif. Komposisi media ini ialah :

0,5 % Pepton
 0,25 % Yeast Extract
 0,1 % Glukosa
 15 % Agar
 pH netral pada suhu 25°C

CARA KERJA

a. Metode Tuang

Alat-alat : - Tabung Erlemenyer

- Pipet 1 ml dan 10 ml
- Tabung reaksi besar
- Petri disk
- Alat penangas air
- Vortex

Bahan : - Cairan PZ atau cairan buffer

- Media Padat yang masih cair dalam Erlemenyer dimasukan dalam alat penangas suhu kurang lebih 50oC
- Sampel air sumur

- Cara kerja :
1. Siapkan 10 tabung reaksi besar, susun berderet dan tandai tabung dengan no 1 samapi 10
 2. Isi semua tabung reaksi dengan 9 ml PZ
 3. Ambil 1 ml sampel air dan masukan ke dalam tabung 1 lalu kocok dengan Vortex.
 4. Ambil 1 ml suspesi dari tabung 1 dan masukan ke dalam tabung 2 lalu kocok dengan Vortex
 5. Lakukan dengan cara yang sama dari tabung no 2 ke no 3 dan seterusnya sampai tabung no 10
 6. Ambil masing-masing suspensi pada tabung 1 sampai 10 sebanyak 1 ml dan teteskan pada Petri disk yang masih kosong
 7. Tuangkan media PCA yang masih cair pada Petri disk yang telah berisi suspensi sampel
 8. Goyang media pada meja datar sampai suspensi sampel dan media bercampur rata
 9. Biarkan media selama kurang lebih 45 menit sampai media menjadi beku
 10. Inkubasi media pada 37oC selama 24 jam
 11. Amati pertumbuhan kuman dalam bentuk koloni dan hitung jumlahnya pada media yang mengandung koloni sejumlah 30 -300 koloni, lalu kalikan faktor pengenceran.

b. Metode Spread

Alat-alat : - Petri disk yang sudah mengandung media padat

- Tabung reaksi besar
- Pipet 1 ml dan 10 ml
- Spatel (batang gelas bengkok)
- Vortex

Bahan : - Cairan PZ atau cairan buffer
 - Media Padat dalam Petri disk
 - Sampel air sumur

Cara kerja :

1. Siapkan 10 tabung reaksi besar, susun berderet dan tandai tabung dengan no 1 samapi 10
2. Isi semua tabung reaksi dengan 9 ml PZ
2. Ambil 1 ml sampel air dan masukan ke dalam tabung 1 lalu kocok dengan Vortex
3. Ambil 1 ml suspensi dari tabung 1 dan masukan ke dalam tabung 2 lalu kocok dengan Vortex
4. Lakukan dengan cara yang sama dari tabung no 2 ke no 3 dan seterusnya sampai tabung no 10
5. Ambil masing-masing suspensi pada tabung 1 sampai 10 sebanyak 0,2 ml dan teteskan pada permukaan media dalam Petri disk
6. Ratakan suspensi sampel dengan menggunakan spatel ke seluruh permukaan media
7. Biarkan media selama kurang lebih 15 menit sampai sampai diperkirakan cairan suspensi terserap media, sedangkan kuman berada pada permukaan media
8. Inkubasi media pada 37oC selama 24 jam
9. Amati pertumbuhan kuman dalam bentuk koloni dan hitung jumlahnya pada media yang mengandung koloni sejumlah 20 – 200 koloni, lalu kalikan dengan faktor pengenceran.

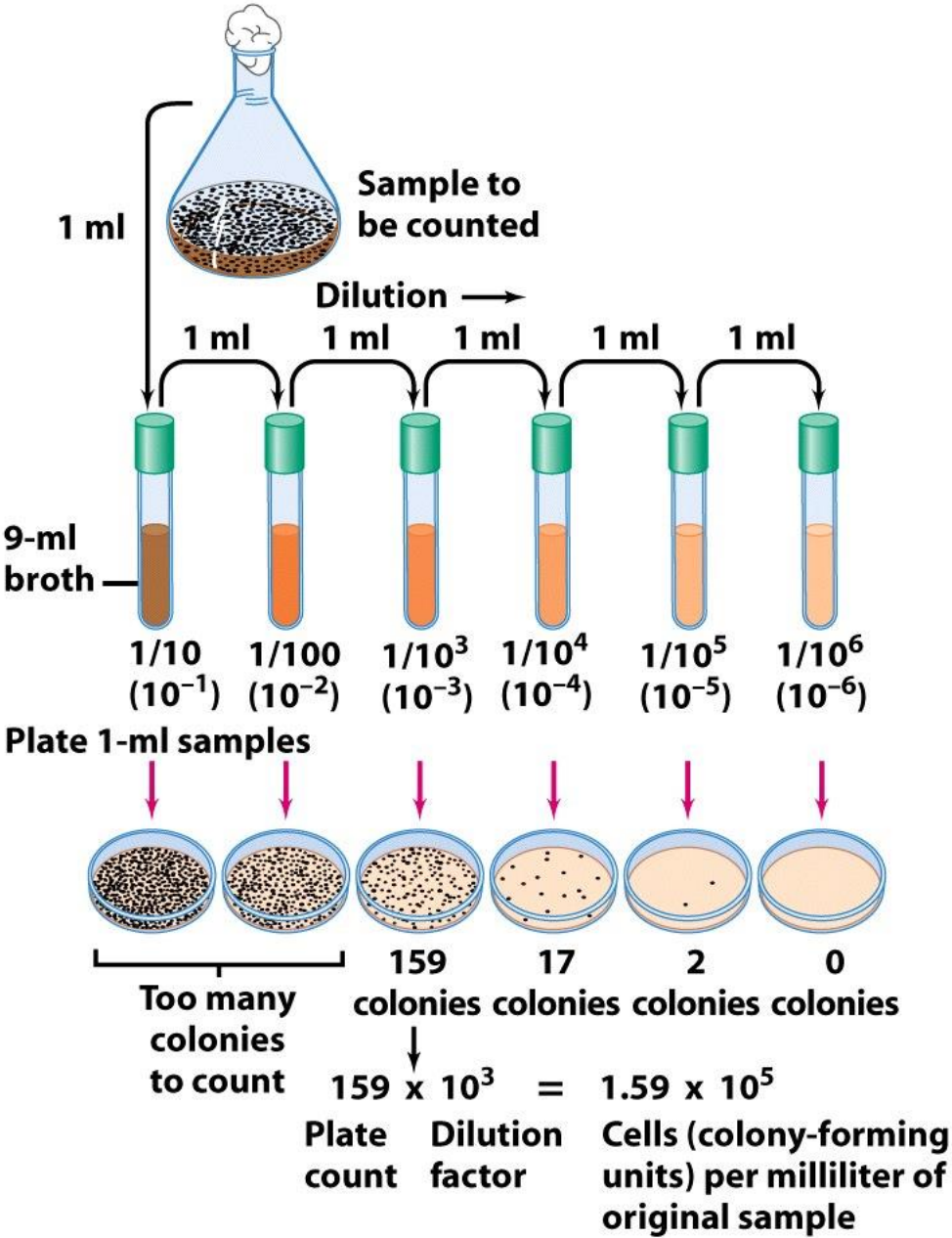
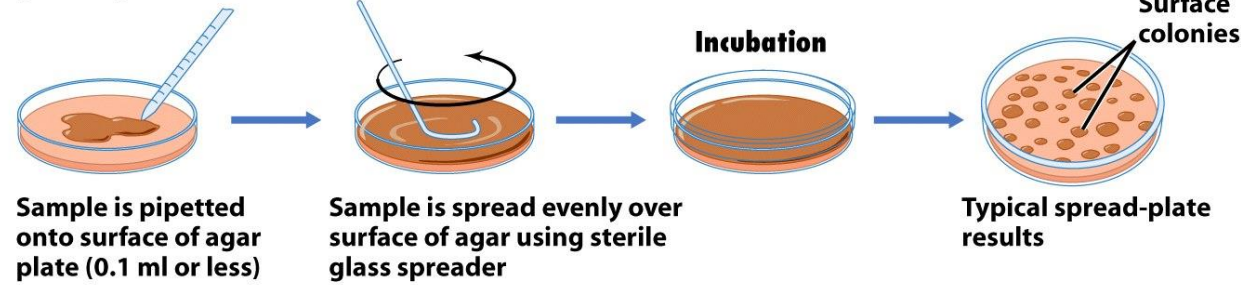


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Spread-plate method



Pour-plate method

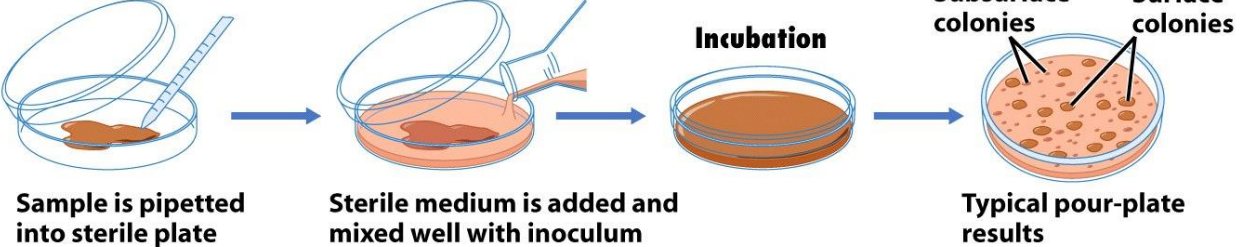


Figure 6-10 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

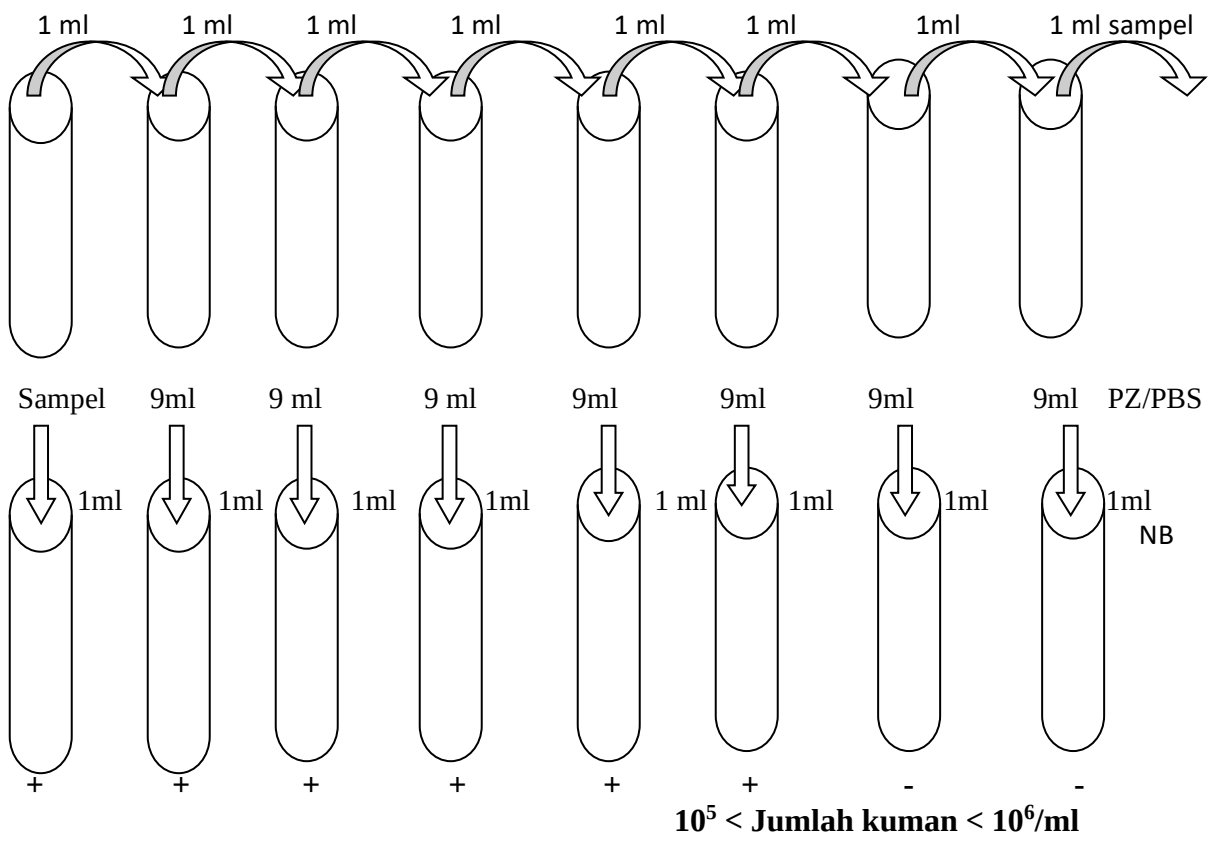
MATERI PRAKTIKUM VIII
MENGHITUNG JUMLAH KUMAN SECARA KWALITATIF

Teknik Most Probable Number adalah suatu teknik untuk memperkirakan jumlah mikrobial yang ada pada tanah, air dan produk-produk pertanian. Teknik MPN ini digunakan untuk memperkirakan besarnya populasi mikrobial pada bahan-bahan di atas. Aspek penting dari metode MPN adalah kemampuan memperkirakan besarnya suatu populasi mikrobial didasarkan pada adanya pertumbuhan atau adanya indikasi-indikasi tertentu yang dihasilkan oleh mikrobial tersebut seperti kekeruhan, perubahan warna media atau adanya gas.

Metode MPN umumnya dapat digunakan untuk menentukan perkiraan jumlah total kuman, jumlah Coliform dan E. coli.

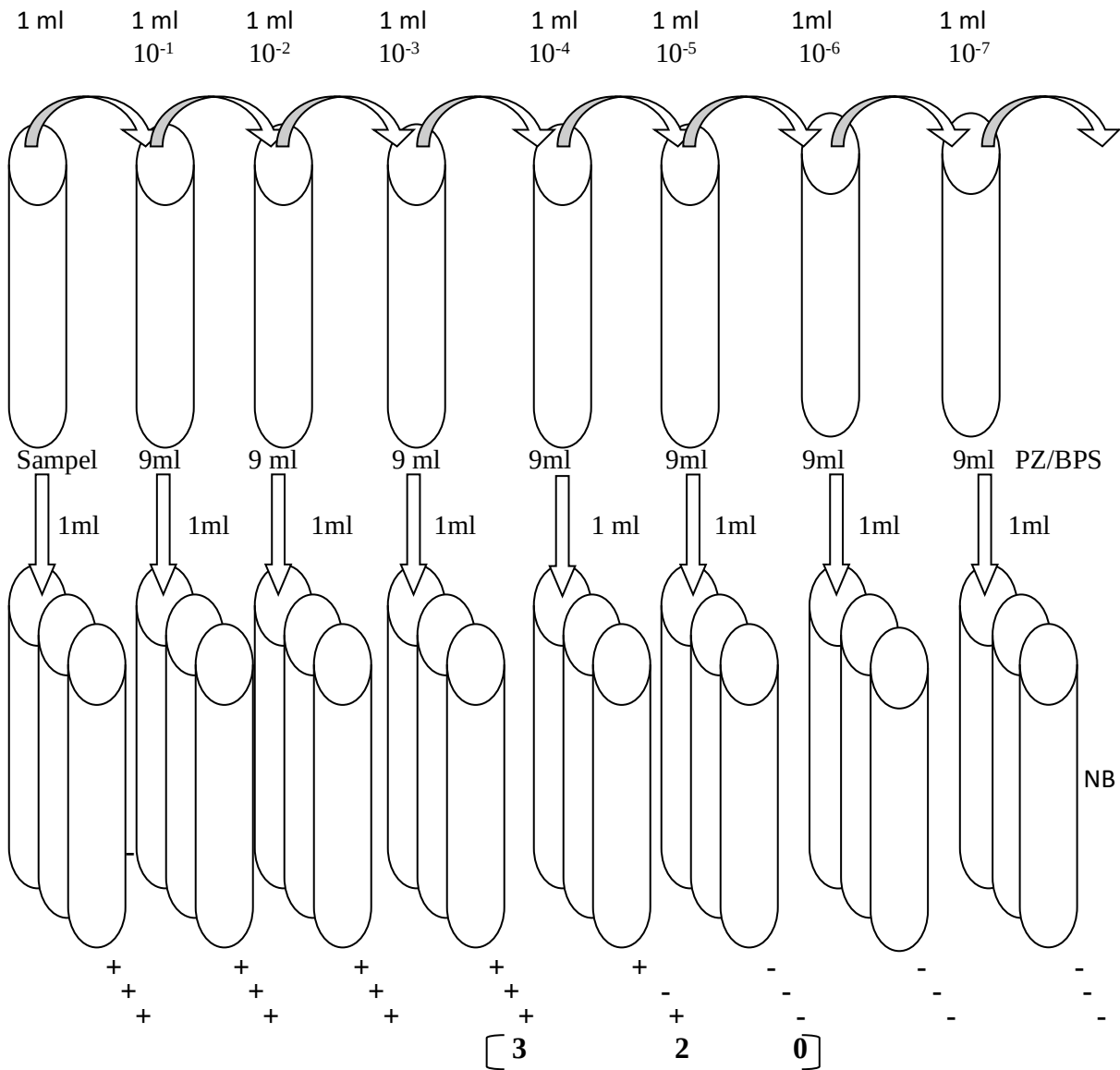
Metode pada teknik MPN adalah melakukan pengenceran sampel cair dengan kelipat 10, kemudian sebanyak 1 ml dari tiap pengenceran tersebut diinokulasikan pada tabung yang telah mengandung media cair. Media selanjutnya diinkubasi. Setelah diinkubasi media diamati ada tidak adanya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan (untuk jumlah total kuman), perubahan warna dan dihasilkannya gas (untuk Coliform dan E. coli).

Secara teori setidaknya 1 organisme yang ada pada sampel, pertumbuhan yang nyata harusnya terlihat pada tabung tertentu. Jika pada media cair pengenceran 10^{-5} terlihat tumbuh, tetapi tabung pada seri 10^{-6} tidak, ini dapat diperkirakan jumlah total kuman adalah lebih besar dari 10^5 , tetapi lebih kecil dari 10^6 kuman per ml (lihat gambar di bawah)



Namun bakteri jarang tersebar secara merata keseluruh bagian sampel. Bila ada 10 ml sampel mengandung 300 organisme, maka tidak berarti tiap ml mengandung 30 organisme.

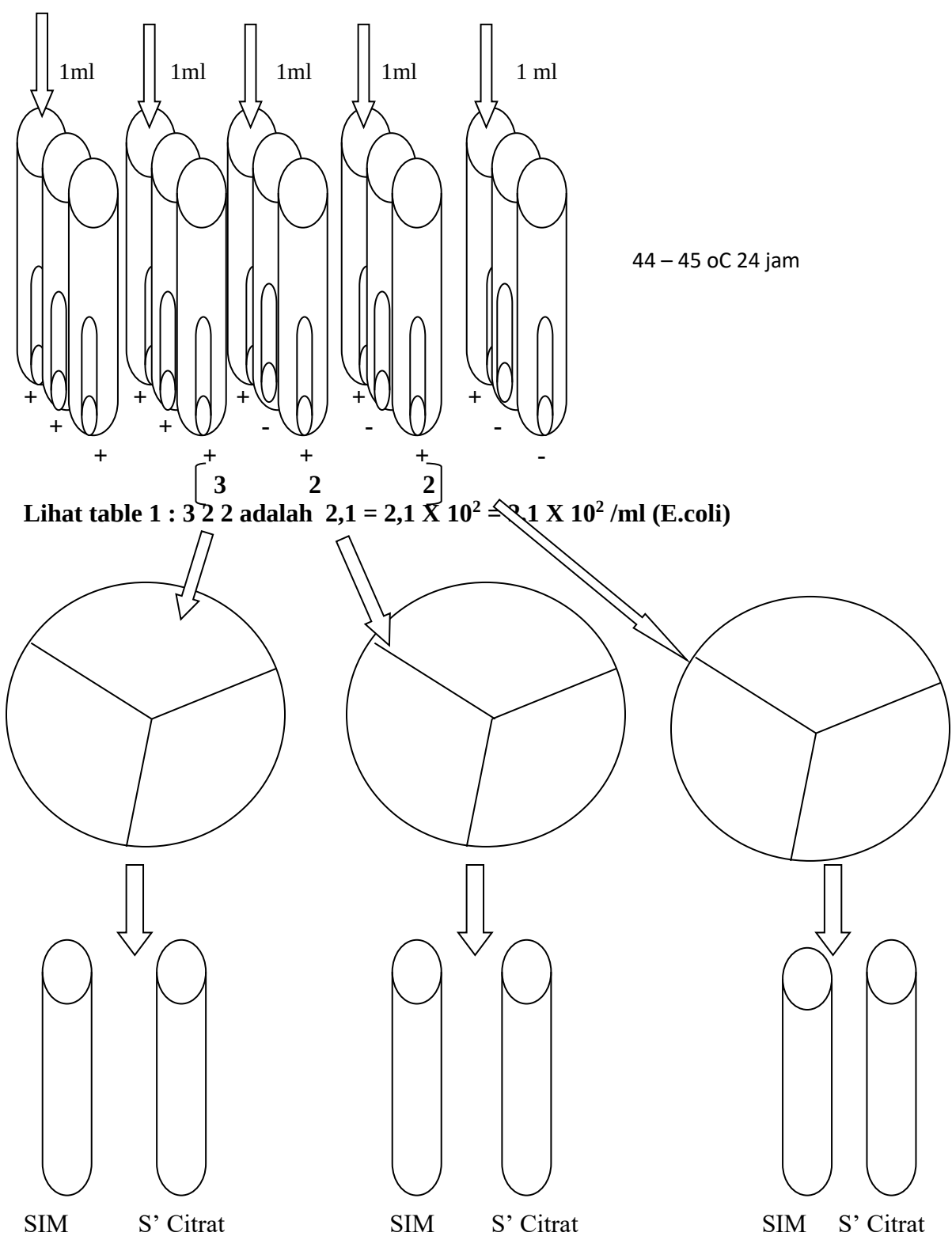
Oleh karena itu untuk meningkatkan *accuracy* statistik dari pengujian, perlu menggunakan lebih dari 1 tabung media cair untuk diinokulasi dengan masing-masing 1ml dari satu pengenceran sampel. Standar prosedur MPN menggunakan minimum 3 pengenceran dan 3, 5, 10 tabung media cair per pengenceran. Variabilitas statistik untuk penyebaran bakteri pada sampel terbaik perkiraannya dengan menggunakan sebanyak-banyaknya tabung media cair per pengenceran. Untuk menghitung total kuman pada sampel media yang digunakan adalah Nutrient Broth.



Lihat table 1 : 3 2 0 adalah $0,93 = 0,93 \times 10^4 / \text{ml} \rightarrow$ Jadi jumlah kuman = $9,3 \times 10^3 / \text{ml}$

Setelah diinkubasi jumlah tabung pada masing-masing pengenceran yang ditumbuhi kuman dicatat, kemudian ditentukan pengenceran tertinggi dari tabung yang semua tabungnya (ketiga-tiga tabungnya) menunjukkan adanya pertumbuhan kuman. Lalu ambil 2 seri pengenceran setelahnya dan catat berapa tabung dari tiap seri pengenceran yang menunjukkan adanya pertumbuhan kuman. Lihat gambar di atas!! Seri terakhir yang menunjukkan ke tiga tabungnya ditumbuhi kuman adalah seri pengenceran 10^{-3} dua seri berikutnya adalah 10^{-4} dan 10^{-5} , masing-masing didapatkan 2 tabung pada seri 10^{-4} ditumbuhi kuman dan tidak ada 1 tabungpun seri pengenceran 10^{-5} yang ditumbuhi kuman.

semua tabungnya mengandung gas adalah tabung pengenceran 10^{-3} , maka 2 seri pengenceran berikutnya adalah tabung dengan pengenceran 10^{-4} dan tabung pengenceran 10^{-5} . Dengan demikian hasilnya adalah 320. Jika dilihat tabel 3 tube MPN angka 320 adalah 0,93. Penentuan faktor pengenceran adalah bilangan tengah dari 320 yaitu 2. Bilangan 2 terdapat pada seri pengenceran 10^{-4} , maka nilai MPN organisme per ml adalah $0,93 \times 10^4$ atau $9,3 \times 10^3$ msel bakteri/ml. Nilai MPN tersebut untuk kuman Coliform. Untuk menentukan nilai MPN E. coli dilakukan pemeriksaan lebih lanjut berupa uji Eijkman yaitu dengan menginokulasikan 1 ml dari tabung yang memberikan nilai positif ke media EE broth. Selanjutnya media diinkubasikan pada suhu 44-45°C selama 24 jam. Jika 24 jam pertama tidak menunjukkan adanya perubahan, inkubasi dapat dilanjutkan 24 jam lagi. Setelah itu EE broth yang menunjukkan nilai positif berupa terbentuknya gas pada tabung Durham dilakukan uji lebih lanjut yaitu uji determinasi dengan menanamnya pada media EMBA. Setiap tabung EE broth yang menunjukkan gas positif diinokulasikan dengan cara streak pada permukaan EMBA. Media EMBA dibagi tiga. Tiap-tiap bagian EMBA diperuntukkan untuk tiap tabung EE broth. Jadi tiap pengenceran tabung EE broth disediakan 1 media EMBA yang dibagi menjadi 3 bagian. Lebih jelaskan lihat gambar di bawah. Amati adanya pertumbuhan bakteri dalam bentuk koloni hijau metalik. Koloni hijau metalik pada EMBA menunjukkan koloni E. coli. Untuk memperteguh diagnosa dilakukan uji selanjutnya yaitu uji konfirmasi terhadap koloni hijau metalik tersebut dengan menumbuhkannya pada media SIM dan Simon's Citrat. E.coli pada SIM menghasilkan Indol tetapi tidak menggunakan Citrat sebagai sumber karbon, sehingga warna citrat tidak berubah, tetap hijau.

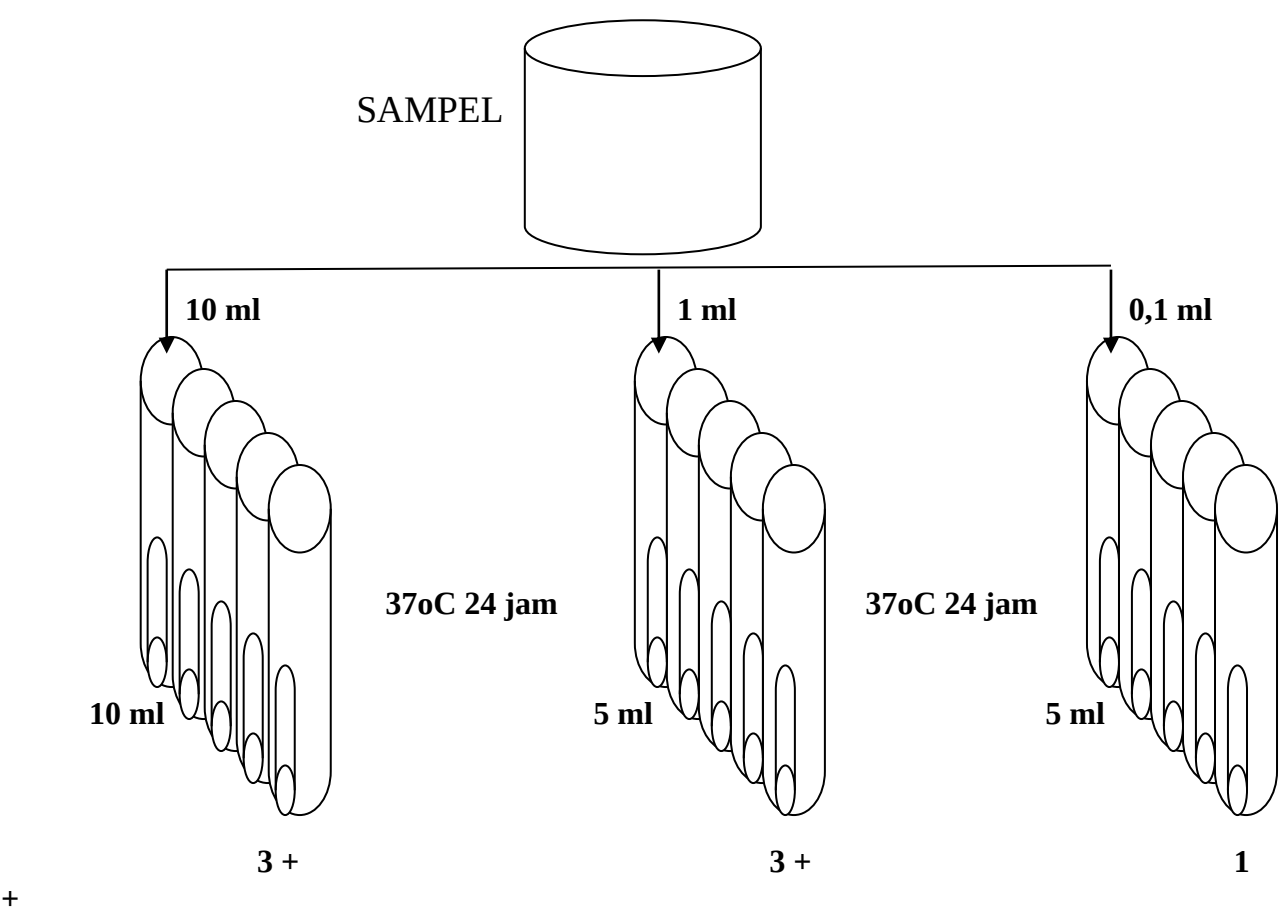


Tabel MPN 3 Tabung (Sumber : John Lindquist. Dilution Theory Page 3: The Most Probable Number Methode. 2011. Departement of Bacteriology University Wisconsin. Madison. USA.

No, of Tube			MPN in the inoculum of the middle set of Tubes
First set	Middle set	Last set	
0	0	0	0.03
0	0	1	0.03
0	0	2	0.06
0	0	3	0.09
0	1	0	0.03
0	1	1	0.061
0	1	2	0.092
0	1	3	0.12
0	2	0	0.062
0	2	1	0.093
0	2	2	0.12
0	2	3	0.16
0	3	0	0.094
0	3	1	0.13
0	3	2	0.16
0	3	3	0.19
1	0	0	0.036
1	0	1	0.072
1	0	2	0.11
1	0	3	0.15
1	1	0	0.073
1	1	1	0.11
1	1	2	0.15
1	1	3	0.19
1	2	0	0.11
1	2	1	0.15
1	2	2	0.20
1	2	3	0.24
1	3	0	0.16
1	3	1	0.20
1	3	2	0.24
1	3	3	0.29

No, of Tube			MPN in the inoculum of the middle set of Tubes
First set	Middle set	Last set	
2	0	0	0.091
2	0	1	0.14
2	0	2	0.20
2	0	3	0.26
2	1	0	0.15
2	1	1	0.20
2	1	2	0.27
2	1	3	0.34
2	2	0	0.21
2	2	1	0.28
2	2	2	0.35
2	2	3	0.42
2	3	0	0.29
2	3	1	0.36
2	3	2	0.44
2	3	3	0.53
3	0	0	0.23
3	0	1	0.39
3	0	2	0.64
3	0	3	0.95
3	1	0	0.43
3	1	1	0.75
3	1	2	1.2
3	1	3	1.6
3	2	0	0.93
3	2	1	1.5
3	2	2	2.1
3	2	3	2.9
3	3	0	2.4
3	3	1	4.6
3	3	2	11
3	3	3	24

MPN Coliform dan E. coli 5 tabung



Lihat 2 Tabel Mc Crady,s 3 3 1 adalah 21 jadi Nilai MPN untuk Coliform 21 per 10 ml Untuk E. coli tabung yang bernilai positif diinokulasi kembali pada media yang sama atau Media EE broth kemudian di inkubasi pada suhu 44-45oC selama 24 jam. Selanjutnya diuji determinasi dan konfirmasi seperti MPN 3 tabung

Most Probable Number (MPN) of Bacteria Per 100 g (ml) of Test Material Using 5 Tubes With 10, 1 and 0.1 ml or g of Test Material

Pos* 10;1;0,1	MPN	Pos* 10;1;0,1	MPN	Pos* 10;1;0,1	MPN	Pos* 10;1;0,1	MPN	Pos* 10;1;0,1	MPN	Pos* 10;1;0,1	MPN
000	<1.8	100	2	200	4.5	300	7.8	400	13	500	23
001	1.8	101	4	201	6.8	301	11	401	17	501	31
002	3.6	102	6	202	9.1	302	13	402	21	502	43
003	5.4	103	8	203	12	303	16	403	25	503	58
004	7.2	104	10	204	14	304	20	404	30	504	76
005	9	105	12	205	16	305	23	405	36	505	95
010	1.8	110	4	210	6.8	310	11	410	17	510	33
011	3.6	111	6.1	211	9.2	311	14	411	21	511	46
012	5.5	112	8.1	212	12	312	17	412	26	512	64
013	7.3	113	10	213	14	313	20	413	31	513	84
014	9.1	114	12	214	17	314	23	414	36	514	110
015	11	115	14	215	19	315	27	415	42	515	130
020	3.7	120	6.1	220	9.3	320	14	420	22	520	49
021	5.5	121	8.2	221	12	321	17	421	26	521	70
022	7.4	122	10	222	14	322	20	422	32	522	95
023	9.2	123	12	223	17	323	24	423	38	523	120
024	11	124	15	224	19	324	27	424	44	524	150
025	13	125	17	225	22	325	31	425	50	525	180
030	5.6	130	8.3	230	12	330	17	430	27	530	79
031	7.4	131	10	231	14	331	21	431	33	531	110
032	9.3	132	13	232	17	332	24	432	39	532	140
033	11	133	15	233	20	333	28	433	45	533	180
034	13	134	17	234	22	334	31	434	52	534	210
035	15	135	19	235	25	335	35	435	59	535	250
040	7.5	140	11	240	15	340	21	440	34	540	130
041	9.4	141	13	241	17	341	24	441	40	541	170
042	11	142	15	242	20	342	28	442	47	542	220
043	13	143	17	243	23	343	32	443	54	543	280
044	15	144	19	244	25	344	36	444	62	544	350
045	17	145	22	245	28	345	40	445	69	545	440
050	9.4	150	13	250	17	350	25	450	41	550	240
051	11	151	15	251	20	351	29	451	48	551	350
052	13	152	17	252	17	352	32	452	56	552	540
053	15	153	19	253	26	353	37	453	64	553	920
054	17	154	22	254	29	354	41	454	72	554	1600
055	19	155	24	255	32	355	45	455	81	555	>1600

MATERI PRAKTIKUM IX

UJI SENSITIVITAS KUMAN TERHADAP BAHAN ANTIBAKTERIAL

Pada praktikum Mikrobiologi Veteriner I di semester tiga tentang materi praktikum XIII mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri diketahui bahwa berbagai bahan logam seperti Ag, Hg, Cu, Pb mempunyai daya biosid atau bakteristatik. Selain logam suhu, keasaman berbagai zat kimia juga dapat mempengaruhi pertumbuhan kuman. Bahan-bahan tersebut bersifat antibakterial. Namun demikian tidak semua bahan antibakterial tersebut dapat digunakan sebagai obat baik dalam pengobatan invitro maupun untuk pengobatan invivo. Bahan-bahan logam yang berpengaruh dalam pertumbuhan kuman selama ini tidak digunakan dalam pengobatan karena kurang efektif dan efisein disamping sifat toksisitas selektifnya yang sangat rendah. Bahan kimia yang bersifat antibakterial yang umum digunakan untuk pengobatan invitro misalnya bahan yang bersifat deterjen, bahan yang bersifat antiseptik, desinfektan dan antibiotika. Bahan kimia yang bersifat antibakterial yang umum digunakan untuk pengobatan invivo adalah antibiotika.

Syarat suatu antibiotika dan obat-obat lain yang bersifat antibakterial untuk pengobatan invivo adalah bahwa obat tersebut harus mempunyai toksisitas selektif yang tinggi, artinya bahan tersebut mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan kuman tetapi tidak membunuh dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel hospes. Kerja berbagai antibakterial baik yang digunakan secara invitro maupun invivo prinsipnya sama yaitu :

1. Menghambat sintesa dinding sel
2. menghambat sintesa membran sel
3. Menghambat sintesa protein dan
4. Menghambat sintesa asam nuklead.

Ada juga berbagai bahan kimia seperti deterjen yang bersifat menurunkan tegangan permukaan sehingga mempunyai kemampuan merobek membran sel, sehingga menyebabkan kematian sel kuman.

Sebelum suatu bahan antibakterial digunakan sebagai obat infeksi terlebih dahulu bahan itu diuji potensinya secara invitro maupun invivo. Uji invitro ini pertama dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah suatu bahan bersifat antibakterial atau tidak. Selanjutnya dilakukan uji menentukan seberapa besar potensinya dalam menghambat atau membunuh bakteri. Lebih lanjut diuji apakah bahan tersebut bersifat menghambat pertumbuhan kuman atau membunuh kuman. Bahan antibakterial yang menghambat pertumbuhan kuman disebut bakteristatik sedangkan bahan yang membunuh kuman disebut bakteriosid. Suatu bahan antibakterial tidak dapat bersifat bakteristatik sekaligus bakteriosid, sekalipun dosis ditingkatkan. Banyak kekeliruan di dalam menyimpulkan suatu bahan antibakterial bersifat bakteristatik atau bakteriosid. Suatu bahan bakteriosid bila dosisnya kecil hanya mampu membunuh sebagian kuman, sedangkan sebagian kuman yang lain tidak terbunuh. Ketika bahan antibakterial itu dibebaskan dari kuman uji dan kuman tersebut ditumbuhkan maka diketahui terjadi pertumbuhan. Kesimpulannya menjadi bahan tersebut bersifat bakteristatik. Pada hal sebenarnya tidak. Kuman yang tumbuh tersebut adalah sebagian kuman yang tidak terbunuh pada waktu pemberian antibakterial bakteriosid, bukan berasal dari pertumbuhan kuman yang

dihambat oleh bahan antibakterial bakteriosid karena dosis pemberiannya kecil. Bila suatu bahan antibakterial diberikan pada kuman yang sedang tumbuh, dan ternyata pertumbuhan kuman terhambat (tidak ada pertumbuhan yang dapat diamati atau pertumbuhannya lambat atau tidak ada pertumbuhan yang signifikan), tetapi setelah bahan antibakterial tersebut dihentikan pemberiannya atau dalam pertumbuhan kuman tersebut bahan antibakterial disingkirkan ternyata pertumbuhan kuman kembali terjadi, maka bahan tersebut disebut bersifat bakteristatik. Sebaliknya setelah bahan antibakterial dihentikan pemberiannya atau disingkirkan pada kuman yang sedang tumbuh, ternyata kuman tetap tidak bisa tumbuh, maka bahan tersebut disebut bersifat bakteriosid. Hal ini jangan dikelirukan dengan pemberian bahan antibakterial yang bersifat bakteriosid, tetapi diberikan dalam dosis kecil menyebabkan sebagian kuman tidak terbunuh. Kuman yang tidak terbunuh ini jika ditumbuhkan akan tetap tumbuh tidak tergantung ada dan tidak adanya antibakterial (dosis kecil)

Untuk mengetahui sensitivitas kuman terhadap antibakterial secara invitro dilakukan dengan cara:

I. Metoda difusi

I Metoda dilusi

III. Koeffisien Fenol

I. Metoda difusi

Berdasarkan namanya metoda ini sangat tergantung pada kelarutan suatu bahan antibiotika terhadap air. Semakin tinggi kelarutannya terhadap air maka semakin besar kemampuan terdifusi di dalam media pertumbuhan kuman. Prinsip kerjanya adalah antibakterial dilarutkan ke dalam pelarutnya. Lalu ke dalam larutan antibakterial tersebut dimasukan kertas disk yang mampu mengisap larutan tersebut. Jumlah larutan yang dapat disisap kertas disk menentukan jumlah bahan antibakterial yang masuk dalam kertas disk tersebut. Kertas disk selanjutnya dikeringkan dalam oven temperatur antara 50 – 70°C. Kita dapat menghitung berapa ml larutan yang diserap tiap kertas disk dan berapa mg bahan yang tertinggal dalam kertas disk. Pertama disiapkan pelarut antibakterial tersebut, misalnya 100 ml. Ke dalamnya kita larutkan antibakterial sebanyak 1 gram atau 1000 mg. Dengan demikian di dalam 100 ml larutan tersebut telah mengandung 1000 mg bahan antibakterial atau setiap 1 ml nya mengandung 10 mg bahan antibakterial. Kemudian dalam larutan tersebut dimasukan 100 keping kertas disk. Dibiarkan agar kertas disk tersebut menyerap larutan antibakterial sepenuhnya. Ambil kertas disk dari larutan dan tempatkan ke dalam cawan petri. Sisa larutan antibakterial diukur kembali volumenya. Misalkan volume larutan antibakterial tersebut tersisa 75ml. Jadi volume yang terserap kertas disk adalah 25 ml. Dengan demikian volume yang terserap tiap-tiap (satu) kertas disk adalah 0,25 ml. Volume tersebut setara dengan 2,5 mg bahan antibakterial yang telah masuk ke dalam kertas disk. Ketika kertas disk dikeringkan dalam oven, maka yang tertinggal dalam kertas disk tersebut tinggal bahan antibakterialnya tanpa mengandung pelarutnya. Potensi antibakterial yang ada dalam kertas disk ini diuji potensinya terhadap bakteri :

Uji Sensitivitas Metoda Difusi

Alat-alat : Cawan disk yang telah mengandung Muller-Histon agar

Batang gelas bengkok.

Pipit

Bahan : koloni kuman dalam media cawan petri atau tabung agar miring

Kertas disk yang telah mengandung bahan antibakterial

Standard tabung Mc Farland tabung 1.

Cara kerja : Siapkan Cawan yang sudah mengandung media Muller-Histon agar ukuran standar 150 mm.

Siapkan suspensi kuman dengan cara membuat suspensi kuman yang mengandung $10^5 - 10^8$ sel kuman /ml. Caranya ambil lima koloni kuman larutkan dalam pelarut NaCl fisiologis (PZ). Standarkan dengan tabung Mac Farland nomor 1. Jika belum sesuai dengan larutan standar Mc Farland nomor 1 misalnya terlalu encer tambahkan koloni kuman secukupnya. Jika terlalu pekat tambahkan PZ secukupnya sampai tercapai larutan sesuai dengan tabung mcd Farland nomor 1. Teteskan 0,2ml (jumlah kuman $10^5 - 10^8$ sel kuman /ml) di atas permukaan media Muller Histon agar dalam cawan Petri, lalu ratakan dengan gelas batang bengkok. Biarkan 15 menit.

Tempelkan kertas disk yang sudah mengandung antibakterial di atas permukaan media Muller-Histon agar. Biarkan 15 menit.

Inkubasi media selama 24 jam pada suhu 37°C.

Amati zone jernih disekitar kertas disk sebagai tanda tidak adanya pertumbuhan kuman. Ukur diameternya.

CATATAN : Besarnya diameter zone jernih sebagai tanda tidak tumbuhnya kuman tidak menentukan tingkat sensitivitas suatu bahan antibakterial, tetapi lebih ditujukan pada besarnya difusi bahan tersebut dalam media. Zone tersebut hanya menentukan bahwa bahan tersebut berpotensi membunuh atau menghambat pertumbuhan kuman. Luas zone yang tidak ditumbuhi kuman tersebut disuaikan lagi dengan diameter standar masing-masing bahan tersebut yang sudah ada.

DAFTAR BESARNYA ZONE INTERPESTASI DARI KIRBY-BAUER

Bahan Antibakterial	Pontensi dalam kertas edisk	Diameter Zone hambatan		
		Resinten (dalam mm)	Intermediate (dalam mm)	Sensitive (dalam mm)
Bacitrasin	10 µg	Kurang dari 8	9 – 12	Lebih dari 13
Cephaloridine	30 µg	Kurang dari 11	12 – 15	Lebih dari 16
Cephalotin	30 µg	Kurang dari 14	15 – 17	Lebih dari 18
Chloramfenicol	30 µg	Kurang dari 12	13 – 17	Lebih dari 18
Culistin	30 µg	Kurang dari 8	9 – 10	Lebih dari 11
Erythromycin	15 µg	Kurang dari 13	14 – 17	Lebih dari 18
Gentamycin	10 µg	--		Lebih dari 13
Annamycin	30 µg	Kurang dari 13	14 – 17	Lebih dari 18
Lincomycin	2 µg	Kurang dari 9	10 – 14	Lebih dari 15
Methecillin	5 µg	Kurang dari 9	10 – 13	Lebih dari 14
Nafcillin dan Oxacillin	1 µg	Kurang dari 10	11 – 12	Lebih dari 13
Nalidix acid	30 µg	Kurang dari 13	14 – 18	Lebih dari 19
Neomycin	30 µg	Kurang dari 12	13 – 16	Lebih dari 17
Novobiosin	30 µg	Kurang dari 17	18 – 21	Lebih dari 22
Nitrofurantoin	300 µg	Kurang dari 14	15 – 16	Lebih dari 17
Oleandomycin	15 µg	Kurang dari 11	12 – 16	Lebih dari 17
Polymycin-B	300 µg	Kurang dari 8	9 – 11	Lebih dari 12
Streptomycin	10 µg	Kurang dari 11	12 – 14	Lebih dari 15
Sulfonamid	300 µg	Kurang dari 12	13 – 16	Lebih dari 17
Tetracyclin	30 µg	Kurang dari 14	15 – 18	Lebih dari 19
Vancomycin	30 µg	Kurang dari 9	10 – 11	Lebih dari 12
Amphicillin				
-Gr – dan Enterococci	10 µg	Kurang dari 11	11 – 13	Lebih dari 14
-Staphylococcus	10 µg	Kurang dari 20	21 – 28	Lebih dari 29
-Haemophylus				Lebih dari 20
Penicillin				
-Staphylococcus	10 U	Kurang dari 20	21 – 28	Lebih dari 29
-Organisme lain	10 U	Kurang dari 11	11 – 21	Lebih dari 22
Amikacin	30 µg	Kurang dari 14	15 – 16	Lebih dari 17
Clindamycin	2 µg	Kurang dari 14	15 – 16	Lebih dari 17
Trimetroprim	1,25 µg	Kurang dari 10	11 – 15	Lebih dari 16

II. Metoda Dilusi

Kalau pada metoda difusi mempunyai kelemahan pada daya difusi suatu bahan antibakterial terhadap media Muller-Histon agar, maka dengan metode dilusi ini kelemahan tersebut dihindari. Dengan metoda dilusi besarnya potensi bahan antibakterial tersebut dapat diketahui dengan pasti. Metode ini juga dapat menentukan apakah suatu antibakterial tersebut bersifat bakteristatik atau bakteriosid.

Prinsip dari metoda ini adalah bahan antibakterial yang akan diuji diencerkan secara bertingkat bisa tingkatan persepuluh atau berdasarkan persentase. Dengan demikian dengan metoda dilusi ini dapat menentukan konsentrasi terkecil dari bahan yang dapat menghambat pertumbuhan kuman (Minimal Inhibition Concentration = MIC). Untuk mengetahui lebih lanjut apakah bahan tersebut bersifat bakteriosid atau bakteristatik dilanjutkan dengan uji MBC yaitu Minimal Bactericide Concentration.

A. Minimal Inhibition Concentration (MIC)

Alat alat : Tabung reaksi ukuran besar sebanyak 10

Pipet ukuran 5 atau 10 ml

Pipet ukuran 1ml

Bahan : bahan antibakterial yang akan diuji

Suspensi kuman $10^5 - 10^8$ sel/ml dalam larutan BHI broth

Larutan PZ

Cara kerja : Sambil mengerjakan yang lain inkubasikan dulu suspensi kuman dalam larutan BHI broth.

Siapkan 11 tabung reaksi disusun dalam rak

Isi tabung reaksi no 1 sampai no 11 dengan PZ masing-masing 9 ml

Masukan 1 ml suspensi atau 1gram bahan antibakterial ke dalam tabung pertama, lalu dikocok sampai homogen.

Ambil 1 ml larutan dari tabung pertama lalu masukan ke dalam tabung kedua, kocok hingga homogen.

Ambil 1 ml larutan dari tabung kedua lalu masukan ke dalam tabung ketiga.

Lakukan seterusnya dari tabung ketiga ke keempat dan seterusnya sampai tabung ke 10.

Dari tabung 10 ambil 1ml dimasukan ke dalam tabung 12.

Tabung sebelas tidak ditambah antibakterial sebagai kontrol larutan. Tabung ke 12 tidak diisi PZ sebagai kontrol bahan antibakterial.

Tambahkan masing-masing ml suspensi kuman ke dalam tabung 1 sampai 10 dan tabung 12.

Inkubasi tabung pada suhu 37°C selama 24 jam.

Amati tabung terakhir yang jernih yang tidak ditumbuhi kuman. Catat faktor pengencerannya. Kebalikan dari faktor pengenceran adalah nilai MIC.

B. Minimal Bacteriosid Concentration (MBC)

Untuk menentukan apakah bahan antibakterial tersebut bersifat bakteriostatik atau bakteriosid, dari hasil uji MIC di atas dengan menggunakan ose diinokulasikan bakteri yang ada dalam tabung yang menunjukkan suspensi paling jernih terakhir dan satu atau 2 tabung setelahnya pada media Muller-Hinton agar lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Amati terhadap pertumbuhan kuman. Jika dari tabung yang paling jernih setelah diinokulasi pada media Muller-Hilton agar ternyata terdapat pertumbuhan kuman, maka bahan antibakterial yang diuji bersifat bakteriostatik, sebaliknya bila tidak terjadi pertumbuhan kuman, maka bahan antibakterial yang diuji bersifat bakteriosid. Pertumbuhan kuman dari 1 atau 2 tabung berikutnya tadi hanya kontrol ada atau tidak adanya kuman dalam larutan.

III. Koefisien Fenol (Rideal-Walker Test)

PENENTUAN DAYA HAMBAT DARI SUATU SEDIAAN YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTISEPTIK ATAU DESINFEKTAN TERHADAP BAKTERI UJI.

Uji koefisien fenol adalah untuk mengevaluasi daya anti mikroba suatu desinfektan dengan memperkirakan potensi dan efektifitas desinfektan berdasarkan konsentrasi dan lamanya kontak terhadap kuman dan membandingkannya terhadap fenol standard yang disebut koefisien fenol.

TUJUAN

Menentukan daya hambat suatu sediaan yang berpotensi sebagai antiseptika atau desinfektan, dengan membandingkan terhadap standar fenol (koefisien fenol). Untuk mengevaluasi daya anti mikroba suatu desinfektan, perlu diperkirakan potensi kekuatannya dan efektifitas desinfektan antara lain : konsentrasi, lamanya kontak sebagai pembunuh atau penghambat pertumbuhan. Salah satu cara untuk mengukur efektifitas suatu desinfektan terhadap mikroorganisme adalah dengan membandingkannya terhadap fenol standar yang disebut sebagai uji koefisien fenol.

TEORI

Dalam berbagai keperluan tentunya kita telah mengenal, bahkan mungkin menggunakan beberapa produk keperluan rumah tangga, laboratorium, atau rumah sakit yang bernama desinfektan. Tidak jarang istilah desinfektan dirancukan dengan istilah lain yakni antiseptik. Padahal keduanya memiliki definisi dan fungsi yang berbeda. Desinfektan didefinisikan sebagai bahan kimia atau pengaruh fisika yang digunakan untuk mencegah terjadinya infeksi atau pencemaran jasad renik seperti bakteri dan virus, juga untuk membunuh atau menurunkan jumlah mikroorganisme atau kuman penyakit lainnya. Sedangkan antiseptik didefinisikan sebagai bahan kimia yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan jasad renik seperti bakteri, jamur dan lain-lain pada jaringan hidup. Bahan desinfektan dapat digunakan untuk proses desinfeksi tangan, lantai, ruangan, peralatan dan pakaian (Risma, 2008).

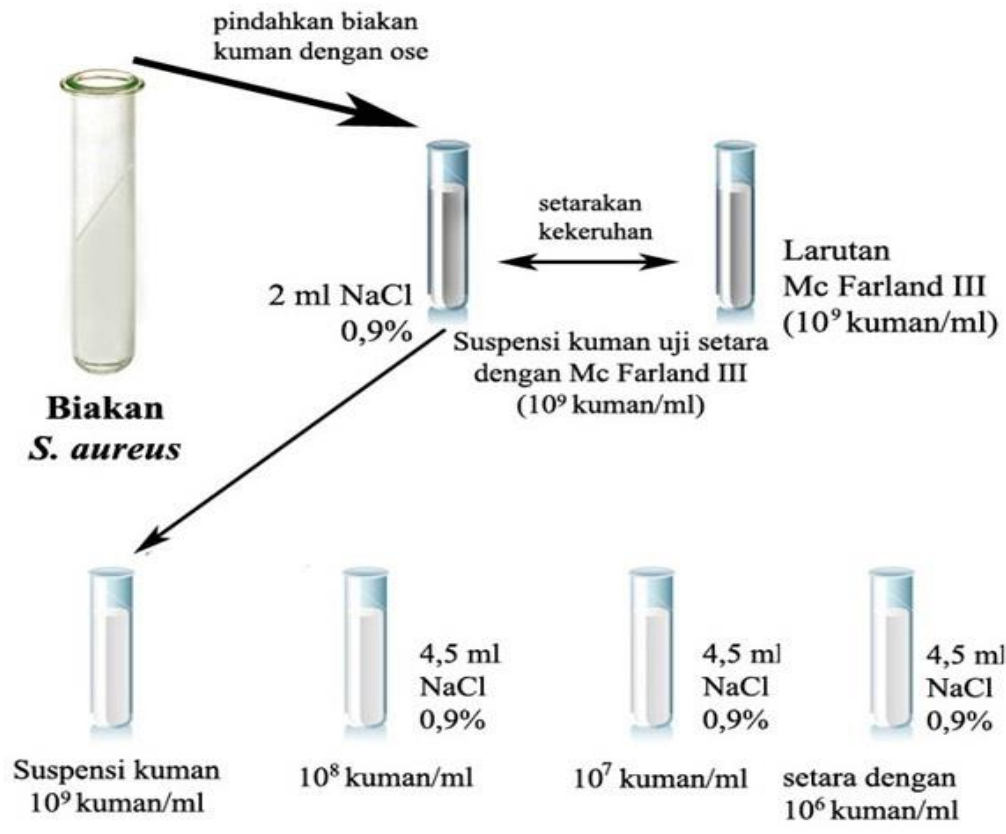
Pada dasarnya ada persamaan jenis bahan kimia yang digunakan sebagai antiseptik dan desinfektan. Tapi tidak semua bahan desinfektan adalah bahan antiseptik karena adanya batasan dalam penggunaan antiseptik. Antiseptik tersebut harus memiliki sifat tidak merusak jaringan tubuh atau tidak bersifat keras. Terkadang penambahan bahan desinfektan juga dijadikan sebagai salah satu cara dalam proses sterilisasi, yaitu proses pembebasan kuman. Tetapi pada kenyataannya tidak semua bahan desinfektan dapat berfungsi sebagai bahan dalam proses sterilisasi. Walaupun kita sering menggunakan produk desinfektan, sebagian besar konsumen tentunya belum mengenal jenis bahan kimia apa yang ada dalam produk tersebut. Padahal bahan kimia tertentu merupakan zat aktif dalam proses desinfeksi dan sangat menentukan efektivitas dan fungsi serta target mikroorganisme yang akan dimatikan (Rismana, 2008).

CARA KERJA

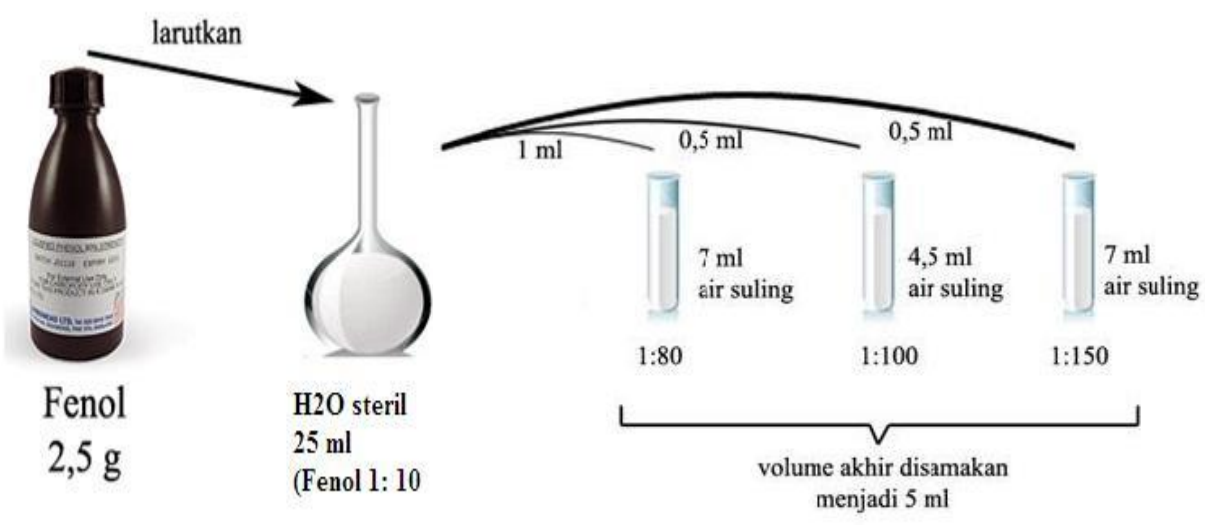
- Bahan :
- Nutrient Broth (NB)
 - Akuades
 - *Staphylococcus aureus* dalam agar
- Alat :
- Tabung reaksi
 - Ose
 - Timer

Cara pengujian

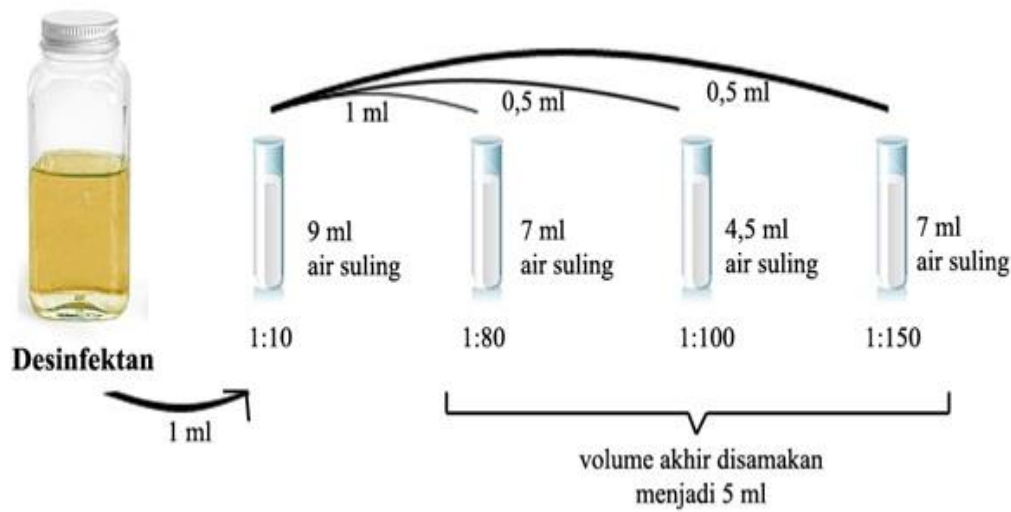
1. Media Nutrient Broth (NB) disediakan dalam tabung reaksi ukuran 20 x 150 mm, dengan volume masing-masing 10 ml. Komposisi perliter terdiri dari 10 g pepton, 5 g ekstrak daging dan 5 g NaCl. Ph akhir ; 6,8
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanam pada Nutrient agar (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Biakan dari agar miring diinokulasikan pada media NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Buat pengenceran sesuai dengan larutan Mc. Farland III, kemudian lakukan pengenceran dengan larutan NaCl fisiologis hingga diperoleh pengenceran 10 x, 100x dan 1000x



3. Dibuat larutan persediaan baku fenol 10% dengan cara menimbang 2,5 g kristal fenol dalam 25 ml air suling steril (disesuaikan dengan kebutuhan), kemudian diencerkan kembali dengan mengambil larutan fenol tersebut sebanyak 1 ml ml dan mencampurkannya dengan 7 ml air suling sehingga dicapai pengenceran 1 : 80. Kemudian diambil kembali larutan fenol 10% sebanyak 0,5 ml dan dicampur dengan air suling 4,5 ml sehingga didapat pengenceran fenol 1:100.Untuk membuat pengenceran 1:150 dilakukan dengan cara mengambil 0,5 ml larutan fenol 10% dan dicampur dengan 7,5 ml air suling.



4. Dibuat larutan desinfektan di dalam air suling steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10, 1 : 80, 1: 100, dan 1: 150. pengenceran dibuat dalam tabung-tabung reaksi ukuran 25×150 mm; samakan volumenya masing-masing menjadi 5 ml



5. Media bakteri uji, larutan fenol, dan desinfektan telah disiapkan. Dengan demikian kita dapat melakukan inokulasi kuman uji dalam desinfektan dan fenol dengan memperhitungkan waktu kontak 5, 10, dan 15 menit secara akurat. Label 12 tabung berisi Nutrient both dengan menandai F 1:80 5', F 1:80 10', F 1:80 15', F 1:100 5', F 1:100 10', F 1:100 15' F 1:150 5', F 1:150 10', F 1:150 15'; DES 1:80 5', DES 1:80 10', DES 1:80 15', DES 1:100 5', DES 1:100 10', DES 1:100 15', DES 1:150 5', DES 1:150 10', DES 1:150 15'. (F= fenol; DES = desenfektan)

Uji Fenol

Pipet inokulum berkonsentrasi 10^6 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam larutan fenol 1:80. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran tersebut dan masukkan ke dalam tabung media Nutrient Broth F 1:80 5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut dan masukan ke dalam tabung media Nutrient Broth F 1:80 10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut masukkan ke dalam tabung media F 1:80 15'. Lakukan hal yang sama untuk larutan fenol 1:100 dan 1:150.

Uji Desenfektan

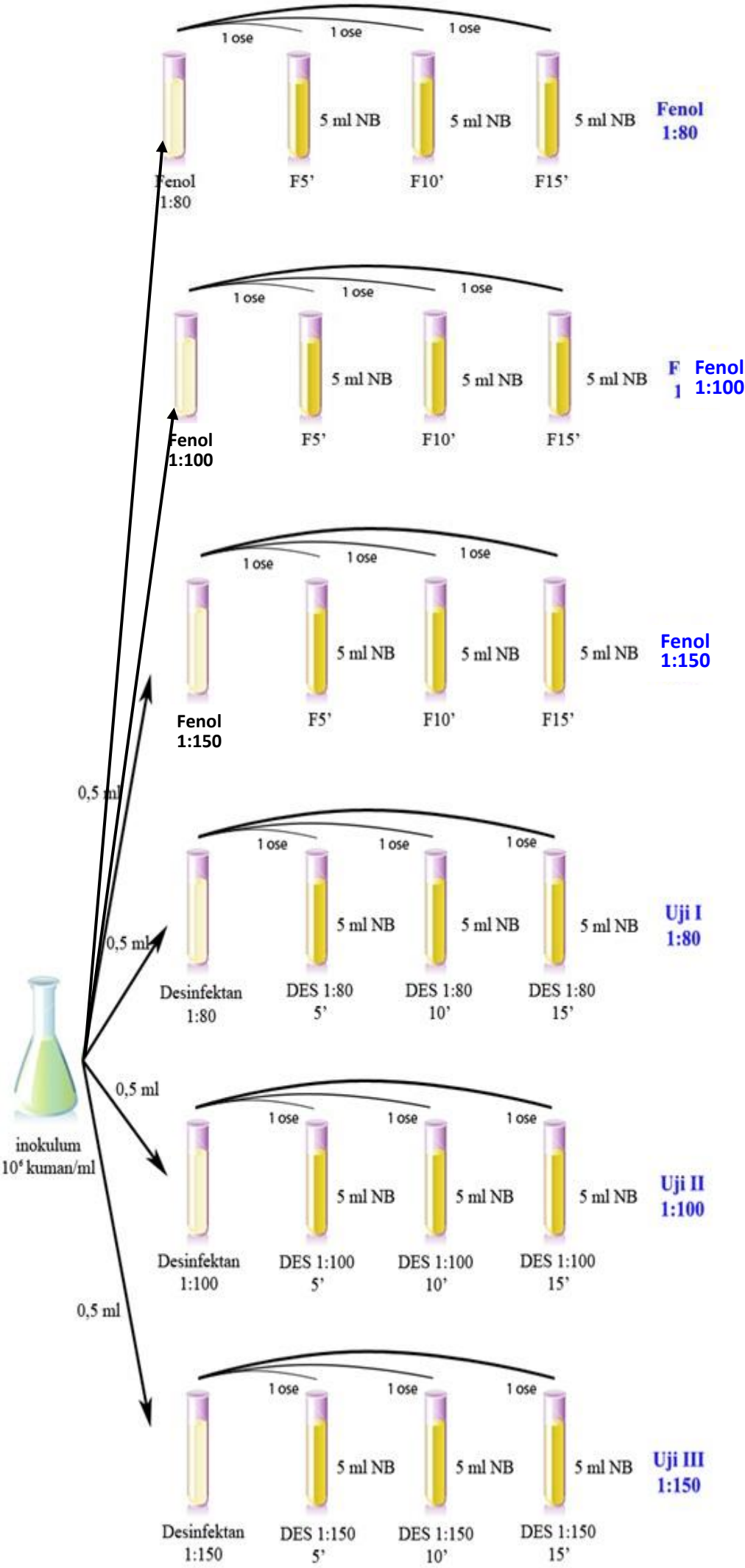
Pipet inokulum berkonsentrasi 10^6 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam desinfektan 1:80. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran tersebut dan masukkan ke dalam tabung media NB berlabel DES 1:80 5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut dan masukkan ke dalam tabung media NB DES 1:80 10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut dan masukkan ke dalam tabung media NB DES 1:80 15'. Lakukan hal yang sama untuk larutan desenfektan 1:100 dan 1:150.

Tabung-tabung reaksi uji kemudian dieramkan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

Diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada setiap tabung.

Pengamatan cara inokulasi kuman ke dalam disinfectan :

(+) keruh : ada pertumbuhan; (-) jernih : tidak ada pertumbuhan



Hasil pengamatan

Setelah tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam, maka didapatkan hasil sebagai berikut:

Pengenceran		Lama Kontak dengan Bahan Antibakterial (menit)		
		5	10	15
Larutan Desinfektan	1 : 80	-	-	-
	1 : 100	+	-	-
	1 : 150	+	+	-
Larutan Fenol	1 : 80	-	-	-
	1 : 100	+	+	-
	1 : 150	+	+	-

Perhitungan

Koefisien fenol adalah hasil bagi dari faktor pengenceran tertinggi desinfektan dengan faktor pengenceran tertinggi baku fenol yang masing-masing dapat membunuh bakteri uji dalam jangka waktu 10 menit, tetapi tidak membunuh dalam jangka waktu 5 menit. Pada contoh di atas daya bunuh larutan desinfektan adalah 1/100, sedangkan daya bunuh fenol 1/80. Jadi koefisien fenol untuk desinfektan yang di uji adalah $100/80 = 1,25$