

## **TATA TERTIB LABORATORIUM BAKTERIOLOGI**

Untuk menghindari kecelakaan kerja, penularan penyakit dan untuk mendapatkan hasil yang maksimal, maka perlu adanya tata tertib selama melakukan praktikum di Laboratorium Bakteriologi, Sebagai berikut:

### **A. Praktikan**

1. Wajib mengenakan jas laboratorium selama praktik di dalam laboratorium Bakteriologi
2. Wajib menggunakan handscoon, terutama saat memegang sampel infeksius
3. Rambut yang panjang **harus** diikat
4. Tidak diperkenankan makan, minum dan merokok di dalam laboratorium
5. Membawa masuk alat tulis secukupnya sesuai yang dibuthkan
6. Tas diletakkan di rak luar laboratorium
7. Sebelum dan sesudah bekerja harus cuci tangan dengan air mengalir dan sabun cair
8. Sebelum dan sesudah bekerja, meja kerja harus dibersihkan dan didesinfektan menggunakan Lysol atau alcohol 70%.

### **B. Instrumen**

1. Peralatan yang digunakan untuk memindah atau menanam biakan atau sampel (misalnya ose), sesudah dan sebelum digunakan harus di sterilkan pada nyala api yang tidak berjelaga (pemijaran) sampai merah membara. Sedangkan peralatan yang lain (misalnya swab, jarum suntik dan sebagainya) dapat direndam didalam desinfektan
2. Peralatan lainnya, seperti mikroskop, meja praktek, BSC harus Selalu bersih dan siap digunakan
3. Peralatan, reagensia, dan media yang sudah selesai digunakan dikembalikan ditempat penyimpanan semula
4. Alas kaki dan jas laboratorium hanya dipakai di dalam laboratorium saja. Saat sudah selesai dan keluar laboratorium, alas kaki dan jas harus dilepas.

### **C. Lain-lain**

1. Sediaan, biakan, kertas, tissue, kapas bekas dan sebagainya yang tidak terpakai lagi dibuang kedalam tempat yang sudah disediakan
2. Setiap kecelakaan kerja di laboratorium, diantaranya biakan tumpah, kebakaran, tertusuk, harus segera diatasi dengan cara yang sudah diketahui, serta harus segera lapor kepada dosen pembimbing atau asisten dosen, terutama jika tidak dapat mengatasi.
3. Pengisian spirtus kedalam lampu spirtus **jangan** didekat api. Jika akan menyakanan api lampu spirtus, sumbu dalam nya jangan dibuka atau ditarik
4. Tempat kerja sebelum dan sesudah praktikum harus dibersihkan dan dirapikan

5. Masing-masing mahasiswa yang melakukan praktikum, **WAJIB** punya *log book* sendiri-sendiri untuk mencatat tiap tahapan praktikum yang dikerjakan

# ISOLASI DAN IDENTIFIKASI

## UJI PENGARUH ANTIMIKROBA METODE DIFUSI SUMURAN

### PENDAHULUAN:

Pemeriksaan pengaruh antimikroba adalah pengukuran kemampuan obat antibiotik atau obat kimia dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri secara *in vitro*.

### MEDIA DAN REAGENSIA:

1. Muller Hinton Agar plate:
  - a. Pembuatan media ini disesuaikan dengan petunjuk pada label yang ada pada botol media powder
  - b. Penyimpanan di lemari es maksimal 1 minggu
2. Antibiotik, misalnya amoxicillin sirup kering atau injeksi serbuk dengan variasi konsentrasi 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 mg/ml
3. Standard kekeruhan Mc Farland 0.5:

Dibuat dari 0,5 mL 1,175% BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Barium chloride dyhidrate) + 99,5 mL 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> → standard kekeruhan ini dimasukkan kedalam tabung screw cap atau tabung reaksi seperti yang dipakai untuk membuat suspensi bakteri, ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Dapat disimpan di ruang gelap suhu kamar selama 6 (enam) bulan, jika akan digunakan dikocok terlebih dahulu.
4. Kultur murni bakteri dalam media NB umur 24 jam
5. Swab steril
6. Pencadangan baja
7. PZ steril
8. Alcohol 70%

### PROSEDUR :

#### 1. Preparasi Senyawa Uji:

Preparasi senyawa uji dilakukan sesuai petunjuk dalam kemasan, kemudian buatlah berbagai variasi konsentrasi senyawa uji. Pada praktikum ini dibuat 4 (empat) variasi konsentrasi senyawa uji (konsentrasi 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 mg/ml)

#### 2. Preparasi Mikroba Uji:

- a. Siapkan kultur murni bakteri uji
- b. Siapkan larutan standard mc Farland
- c. Buatlah sebanyak 2 tabung @ 10 ml suspensi bakteri uji menggunakan PZ steril dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0.5 (konsentrasi mikroba  $6 \times 10^8$  cfu/ml)

#### 3. Pengujian Potensi Antibiotik secara Difusi Sumuran:

- a. Siapkan beberapa cawan petri berisi 20 ml media NA, 15 ml NA dan 5 ml NA steril
- b. Pembuatan kontrol kontaminasi media
  - Isi cawan petri dengan 20 ml media NA → inkubasi pada 37°C 24 jam → jika setelah inkubasi media tetap steril (tidak ditumbuhi koloni bakteri) maka media siap digunakan
- c. Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji secara *double layer*

- Tuang 5 ml NA steril kedalam cawan petri steril → biarkan memadat Sebagai *base layer agar* → setelah memadat letakkan pencadang baja di atasnya
  - Ambil 1 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan kedalam 15 ml media NA secara *pour plate*, kemudian tuangkan secara merata Sebagai *seed layer agar* di atas *base layer agar* → biarkan memadat
  - Setelah *seed layer* memadat → angkat pencadang baja, sehingga terbentuk sumuran yang siap diisi dengan antibiotik berbagai konsentrasi
  - Beri label pada dasar cawan petri :  
kel.prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji
- d. Pembuatan control negatif dan pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran
- Buatlah media *base layer agar* dan *seed layer agar* seperti di atas beserta lubang sumurannya yang dicetak dengan pencadang baja seperti langkah di atas
  - Dengan menggunakan mikropipet, pada masing-masing sumuran tersebut diinokulasikan 50 µl senyawa uji (antibiotik) dengan control negatif (PZ steril) dan 4 variasi konsentrasi senyawa uji
  - Beri label pada dasar cawan petri

#### 4. Inkubasi:

Diinkubasi pada 35°C 16-18 jam. **Perhatian: inkubasi tidak dilakukan secara terbalik !!**

#### 5. Pembacaan/pengukuran diameter zona hambatan:

Diameter zona hambatan yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambatan yang diukur yaitu daerah jernih sekitar sumuran (tidak ada pertumbuhan bakteri), diukur dari ujung yang satu ke ujung yang lain melalui tengah-tengah sumuran dengan beberapa catatan Sebagai berikut:

- Dengan sulfonamide dan cotrimoxazole, pertumbuhan tipis di atas zona hambatan tidak perlu diperhatikan
- Dengan pertumbuhan *Proteus sp.* yang menjalar (*swarming*) di daerah zona hambatan juga tidak perlu diperhatikan
- Apabila dikerjakan *Staphylococcus* yang memproduksi β-laktamase terhadap penisilin, akan timbul zona hambatan dobek/bertingkat, berapapun ukuran diameter zona hambatannya, harus Selalu dilaporkan **resisten**
- Seperti halnya *Serratia marcescens* terhadap colistin/polimixin B

#### 6. Interpretasi Hasil:

Hasil pengukuran diameter zona hambatan dibandingkan dengan standard untuk memperoleh kepastian laporannya, yaitu Resistensi, Intermediat, Sensitif.

#### CATATAN:

Untuk bakteri-bakteri tertentu dibutuhkan media dan terkadang dengan cara tersendiri, diantaranya Sebagai berikut:

- a. Untuk *Streptococcus* sp. : media MHA ditambah darah
- b. Untuk *Corynebacterium* dan *Listeria* sp. : media MHA ditambah serum
- c. Untuk *Haemophilus* sp. : media MHA ditambah faktor V dan X
- d. Untuk gonococci dan meningococci : media yang digunakan yaitu Chocolate agar ditambah suplemen penyubur
- e. Untuk *Mycobacterium tuberculosis* : digunakan Lewenstein Jensen dengan dengan dilution method

#### **FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI UKURAN DIAMETER ZONA HAMBATAN**

1. Kekeruhan suspensi bakteri:  
Kurang keruh diameter zona hambatan lebih lebar, terlalu keruh diameter zona hambatan makin sempit berarti R dilaporkan S atau S dilaporkan R.
2. Waktu pengeringan/peresapan suspensi bakteri kedalam MHA:  
Tidak boleh lebih dari batas waktu yang diperbolehkan, karena dapat mempersempit diameter zona hambatan, dimana S dilaporkan R
3. Temperatur inkubasi:  
Untuk memperoleh pertumbuhan yang optimal, inkubasi dilakukan pada 35°C. Kurang dari 35°C menyebabkan diameter zona hambatan lebih besar, sehingga R dilaporkan S. Ini bisa terjadi pada media plate yang ditumpuk-tumpuk lebih dari 2 plate pada inkubasinya. Plate yang berada di tengah, suhunya Kurang dari 35°C. Inkubasi pada suhu lebih dari 35°C terkadang ada bakteri yang Kurang subur pertumbuhannya, adapula obat yang difusinya Kurang baik
4. Waktu inkubasi:  
Hampir semua cara/metode menggunakan waktu inkubasi 16-18 jam. Kurang dari 16 jam pertumbuhan bakteri belum sempurna, sehingga sukar dibaca atau diameter zona hambatan lebih lebar. Lebih dari 18 jam pertumbuhan lebih sempurna sehingga diameter zona hambatan makin sempit

## Lembar Kegiatan Praktikum

Tanggal praktikum :  
Topik Praktikum : Uji Resistensi Antibiotik Metode Difusi  
Sumuran  
Tujuan : untuk mengetahui potensi dari obat antibiotik  
Hasil :

