

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 DILUSI

DEFINISI:

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) adalah kadar terendah dari antibiotik dan obat-obatan kimia yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

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. Antibiotika / obat kimia / bahan herbal (bahan alam)
3. Standard kekeruhan Mc Farland 0.5:

Dibuat dari 0,5 mL 1,175% BaCl₂.2H₂O (Barium chloride dyhidrate) + 99,5 mL 1% H₂SO₄ → 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. PZ steril
6. Aquadest steril
7. Alkohol 70%

METODE PEMERIKSAAN

Ada 2 cara pemeriksaan, yaitu:

1. Broth dilution : antibiotik diencerkan dengan media cair (broth medium) yang dapat ditumbuhi bakteri uji
2. Agar dilution : antibiotik diencerkan dengan media agar yang dapat ditumbuhi bakteri uji

PROSEDUR :

1. Broth Dilution:

Umumnya untuk bakteri yang mudah/cepat tumbuh, beberapa jenis antibiotik dapat digunakan untuk 1 spesimen bakteri uji.

- a. Antibiotik yang digunakan dilarutkan di dalam pelarut dengan kadar tertentu
- b. Kemudian diencerkan dengan media cair steril, sehingga diperoleh sederet kadar antibiotik, misalnya 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mcg/mol atau IU/mL
- c. Tiap kadar diambil 1 mL ditambah masing-masing 1 mL suspensi bakteri uji dalam media cair yang berumur 4-8 jam → di mix → dimasukkan kedalam incubator 37°C 18-48 jam
- d. Pada waktunya dibaca MIC nya dengan mencari tabung yang mengandung kadar antibiotik terendah, namun masih mampu menghambat/mematikan bakteri (sampuran media, suspensi bakteri uji dan antibiotik dalam tabung kelihatan jernih)

2. Agar Dilution:

Umumnya untuk bakteri yang sulit/lambat tumbuh. Satu kadar obat untuk beberapa bakteri uji sejenis

- a. Antibiotik yang digunakan dilarutkan dengan pelarut sampai diperoleh kadar antibiotik tertentu, misalnya 100 µg/mL
- b. Kemudian dibuat pengenceran antibiotik dengan media agar, sehingga diperoleh media agar plate dengan kadar obat yang berbeda-beda
- c. Deretan media agar plate yang berbeda kadar antibiotiknya, ditetesi suspensi bakteri uji yang berumur 24-48 jam → inkubasi 37°C 24 jam
- d. Pada waktunya dibaca/tidaknya pertumbuhan bakteri pada bekas tetesan dan dicari agar plate yang menunjukkan kadar obat terendah yang bakterinya tidak tumbuh.

3. Cara Membuat Pengenceran:

A. Broth Dilution

- a. Dirimbang 50 mg antibiotik di dalam Erlenmeyer steril, tambahkan pelarutnya sampai 50 mL. Ini menjadi larutan obat yang kadarnya 1000 µg/mL
- b. Di dalam tabung steril dimasukkan 2 mL larutan antibiotik tersebut ditambah 8 mL media cair steril, sehingga diperoleh larutan dengan kadar 200 µg/mL. Selanjutnya dibuat larutan sbb:

Tabung steril	Larutan 200 mg/mL	Media Cair	Kadar (µg/mL)
1	1 mL	1 mL	100
2	1 mL	3 mL	50
3	0.5 mL	4.5 mL	20
4	0.5 mL	9.5 mL	10
5	0.1 mL	8.9 mL	5
6	0.1 mL	9.9 mL	2

- c. Kadar akhir setelah ditambah suspensi bakteri sama banyaknya menjadi setengahnya

B. Agar Dilution

- a. Satu jenis antibiotik yang digunakan dibuat larutan dengan pelarutnya sehingga diperoleh kadar tertentu, misalnya 100 µg/mL
- b. Disediakan beberapa labu Erlenmeyer yang berisi media agar yang sesuai untuk bakteri uji, steril dan suhu ± 50°C dengan volume tertentu. Kemudian masing-masing ditambah larutan antibiotik dengan volume yang berbeda-beda. Campuran ini selanjutnya dituang di dalam cawan petri steril.

Contoh perbandingan media agar dan obat:

Antibiotik 100 mg/mL	Media Agar	Kadar Akhir Obat ($\mu\text{g/mL}$)
1 mL	199 mL	0.5
1 mL	99 mL	1
2 mL	98 mL	2
5 mL	95 mL	5
10 mL	90 mL	10

CATATAN:

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

- Untuk *Streptococcus* sp. : media MHA ditambah darah
- Untuk *Corynebacterium* dan *Listeria* sp. : media MHA ditambah serum
- Untuk *Haemophilus* sp. : media MHA ditambah faktor V dan X
- Untuk gonococci dan meningococci : media yang digunakan yaitu Cocholate agar ditambah suplemen penyubur
- 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 Dilusi
Tujuan : untuk mengetahui MIC dari obat antibiotik

Hasil :

