

PERCOBAAN 1 STERILISASI ALAT, BAHAN DAN MEDIA

1.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat menyiapkan dan melakukan berbagai macam prosedur sterilisasi alat-alat dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan secara mikrobiologi, mampu menyiapkan dan membuat media padat dan cair serta mengerti dan mampu mengerjakan hal-hal yang berhubungan dengan pekerjaan mikrobiologi.

1.2 PRINSIP

Persiapan, pembuatan serta sterilisasi alat, bahan dan media merupakan tahap awal pada pengerjaan mikrobiologi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara sterilisasi basah (autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit) atau sterilisasi kering (oven pada suhu 170°C selama 1 jam).

1.3 TEORI UMUM

Sterilisasi merupakan suatu proses menghilangkan mikroorganisme hidup. Proses sterilisasi umumnya merupakan tahap akhir pengolahan sediaan atau produk yang harus terbebas dari mikroba. Sterilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan uap air, panas kering, gas, radiasi ion, dan dengan cara penyaringan.

Sterilisasi dengan cara panas merupakan fungsi dari kombinasi waktu dan suhu yang digunakan. Bila suhu dinaikkan, waktu yang diperlukan menjadi lebih pendek. Konstituen penting dari jasad hidup seperti protein dan asam nukleat akan didenaturasi sesuai dengan kecepatan naiknya suhu di atas 50°C.

Sterilisasi panas dan lembab menggunakan uap air jenuh dengan tekanan merupakan metode sterilisasi pilihan untuk sediaan dengan pembawa air serta kain kasa untuk bedah. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Untuk sterilisasi panas kering digunakan oven dengan suhu 170°C selama 1 jam. Cara ini digunakan terutama untuk mensterilkan :

- a. Alat gelas - perlu dilakukan pencucian dengan air yang tidak mengandung pirogen.
- b. Peralatan porselin dan logam.
- c. Minyak dan Lemak - termasuk injeksi dengan pembawa minyak.
- d. Sediaan Serbuk - termasuk produk alami seperti talkum, yang mungkin mengandung spora yang resisten. Pemanasan yang tinggi akan menghancurkan pirogen.

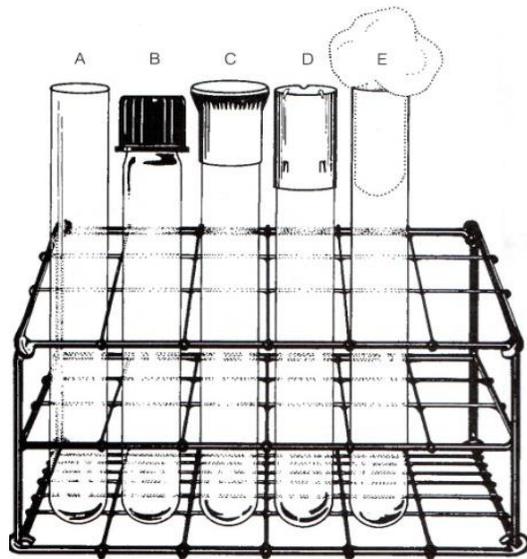
Untuk sterilisasi basah digunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Cara ini digunakan untuk alat dan sediaan berikut :

- a. Larutan atau suspensi dengan pembawa air.
- b. Kain pembalut untuk bedah. Dianjurkan dilakukan pada suhu 134°C selama 3 menit.
- c. *Penutup dari karet ataupun Plastik*. Bila disterilkan terpisah dari wadahnya.
- d. *Instrumen dari logam*. Pemanasan segera diperlukan untuk melindungi terjadinya engkaratan.
- e. *Aparatus dari Gelas dan Wadahnya*. Bila tidak dapat dengan cara pemanasan kering, seperti bagian yang terbuat dari karet.
- f. *Alat gelas lainnya seperti gelas Erlemeyer, gelas piala, pipet (ukur, volume) gelas ukur, labu tentukur, cawan Petri*. Sebelumnya harus dibungkus dengan kertas perkamen atau alufoil, sedangkan labu Erlemeyer dan labu

ukur atau labu tentukur harus ditutup dengan kapas berlemak dan dilapisi alufoil. Untuk jenis pipet dapat disimpan dalam tabung logam tembaga atau logam tahan karat yang bertutup.

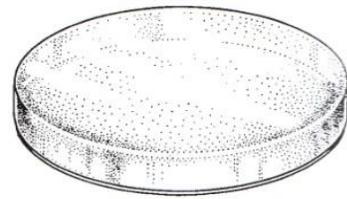
g. *Media untuk Pekerjaan Mikrobiologi.*

Setelah dilarutkan dalam air dan diatur pHnya, dimasukkan dalam labu Erlenmeyer yang sesuai, ditutup dengan kapas berlemak dan alufoil baru dilakukan sterilisasi.



- A. Bacteriological tube
- B. Screw cap
- C. Plastic closure
- D. Metal closure
- E. Nonabsorbent cotton

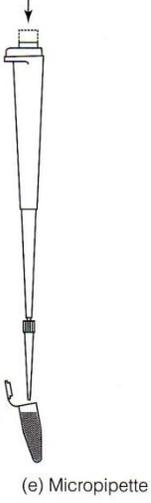
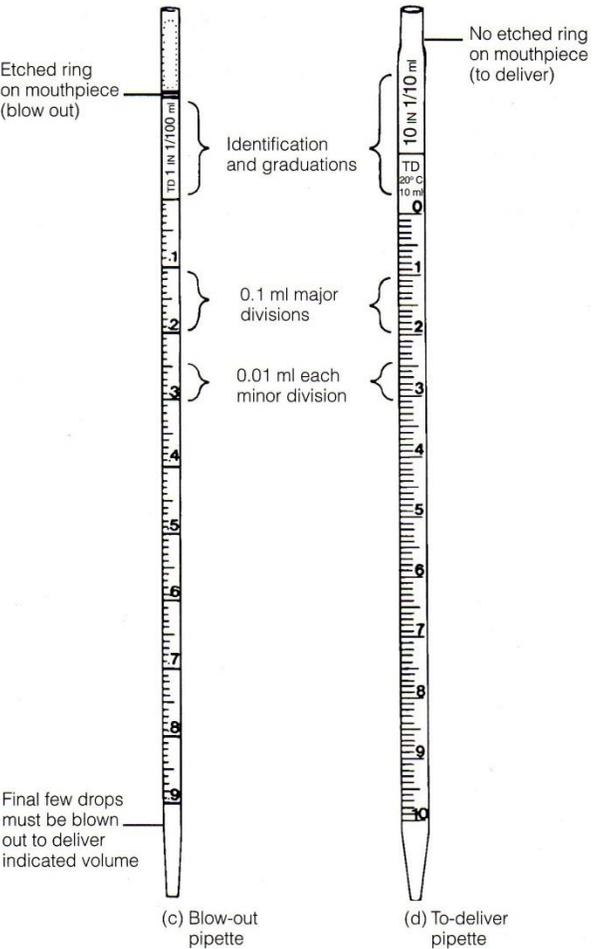
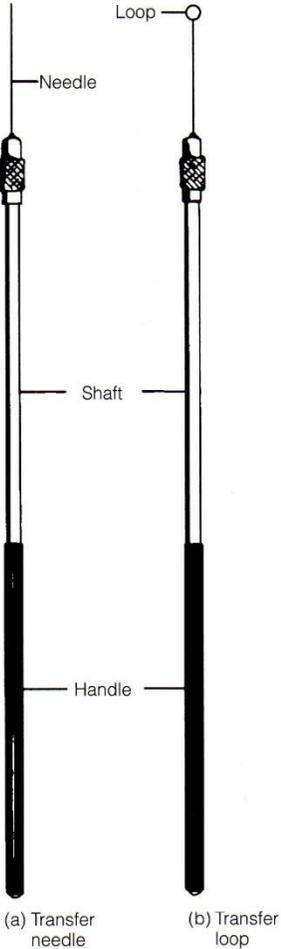
(a) Test tube rack with tubes showing various closures



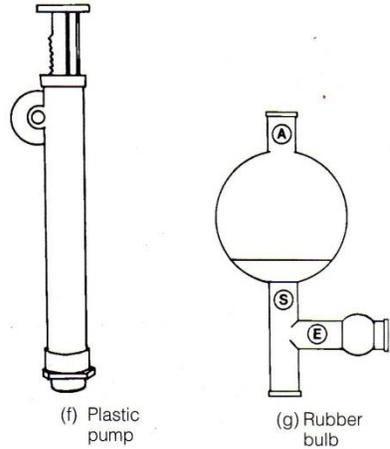
(b) Petri dish



(c) DeLong shaker flask with closure



Mechanical Pipette Aspirators



1.4 PROSEDUR PERCOBAAN

A. PERSIAPAN DAN STERILISASI ALAT

ALAT DAN BAHAN

- Pipet ukur/volume, Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, botol media, gelas ukur dan labu takar
- Autoklaf, Oven
- Alumunium foil, kapas berlemak, tali kasur, kertas label dan gunting

PROSEDUR PERCOBAAN

1. Alat-alat yang akan disterilisasi dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan.
2. Tutup alat-alat yang mempunyai mulut seperti : tabung reaksi, Erlenmeyer, botol media, gelas ukur, labu takar, dan pipet dengan kapas berlemak. Caranya adalah sebagai berikut : ambil sepotong kapas, lipat kedua ujungnya sehingga berbentuk segiempat (besarnya segiempat tergantung pada besarnya mulut alat). Gulung kapas sehingga berbentuk silinder yang cukup padat dan dapat masuk ke dalam mulut alat (2/3 bagian kapas berada di dalam mulut alat). Khusus untuk pipet, tutup kapas ini dimasukkan ke dalam mulut pipet dengan sebatang kawat dan kapas yang terurai keluar dari bagian mulut pipet dihilangkan dengan cara melewatkan mulut pipet melalui nyala api bunsen.
3. Sebelum disterilisasi, kapas penutup tabung, labu takar, Erlenmeyer, dan botol media ditutup lagi dengan alumunium foil atau bahan lain yang sesuai. Demikian pula alat-alat yang permukaannya harus steril seperti pipet, dibungkus satu persatu atau dapat ditempatkan dalam tabung penyimpan pipet. Sedangkan untuk cawan petri, dibungkus seluruhnya dengan alumunium foil.
4. Alat-alat gelas dan alat lain yang tidak presisi disterilisasi dengan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam, sedangkan alat-alat yang presisi disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Apabila alat-alat tersebut telah disterilisasi menggunakan autoklaf, keringkan pada oven pengering dengan suhu 70°C selama 30 menit, untuk menghilangkan uap air yang mungkin masih tersisa pada alat.
5. Simpan alat-alat tersebut untuk digunakan pada praktikum selanjutnya dan jangan lupa diberi etiket supaya tidak tertukar.

B. PEMBUATAN DAN STERILISASI MEDIA SERTA LARUTAN PENGECER

ALAT DAN BAHAN

- Erlenmeyer 100 atau 250 mL, gelas ukur 100 mL, botol media, batang pengaduk, spatel
- Kertas timbang, kaki tiga, kassa asbes, gunting, kertas label, benang kasur, lap tangan, bunsen
- Timbangan listrik
- Media Nutrien Agar, Media Nutrien Broth, dan NaCl

PROSEDUR PERCOBAAN

1. Tiap kelompok, menimbang Nutrien Agar, Nutrien Broth, dan NaCl untuk pembuatan 50 mL. Catatan : Nutrien Agar = 28 gram untuk 1000 mL, Nutrien Broth = 8 gram untuk 1000 mL, dan NaCl fisiologis adalah 0,9% b/v.

2. Masukkan masing-masing media yang telah ditimbang ke dalam Erlenmeyer yang sudah diberi tanda sesuai dengan nama media tersebut.
3. Tambahkan akuades 50 mL, lalu panaskan di atas nyala api bunsen sambil diaduk sampai larutan tidak keruh lagi/jernih (awal larutan akan mendidih).
4. Tuangkan dalam botol media, lalu tutup dengan kapas dan aluminium foil serta ikat dengan benang kasur. Setiap wadah media harus diberi etiket.

Contoh :

1 Januari 2015 (Tanggal pembuatan)
Media Nutrien Agar (Nama Media)
Messa (Nama pembuat)

5. Sterilisasi media yang telah dibuat dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. (Catatan : Prosedur penggunaan autoklaf harus dikuasai sebelum menggunakan alat tersebut)
6. Setelah steril, biarkan dahulu pada suhu kamar sampai suhunya sama dengan suhu kamar, kemudian masukkan ke dalam lemari pendingin untuk disimpan. Media dan larutan pengencer ini, akan dipergunakan pada praktikum selanjutnya.
7. Amati apakah media dan larutan pengencer tersebut tetap steril (tetap jernih) atau telah terkontaminasi (menjadi keruh) selama penyimpanan. Pengamatan dilakukan selama dua minggu.

1.5 HASIL PENGAMATAN

Nama Media dan Larutan Pengencer	Kondisi	
	Minggu I	Minggu II
1. Nutrien Agar		
2. Nutrien Broth		
3. NaCl 0,9%		

PERCOBAAN 2

CARA INOKULASI, MEMBUAT PEREMAJAAN BIAKAN DALAM MEDIA PADAT DAN CAIR, PENGECERAN DAN *GROWTH PROMOTION TEST* (GPT)

2.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat melakukan teknik kerja aseptik dan dapat melakukan inokulasi dengan baik, secara goresan maupun tusukan, pada media padat maupun media cair.

2.2 PRINSIP

Inokulasi, pembuatan dan peremajaan biakan dalam media padat dan cair merupakan teknik menanam inokula (bahan yang mengandung mikroba atau biakan mikroba) yang dilakukan secara aseptik ke dalam media biakan steril, baik dalam media padat maupun cair dengan cara goresan maupun tusukan. *Growth Promotion Test* (GPT) merupakan cara untuk membuktikan kesesuaian media uji terhadap penggunaannya.

2.3 TEORI UMUM

Inokulasi adalah menanam inokula secara aseptik ke dalam media steril. Inokula adalah bahan yang mengandung mikroba atau biakan mikroba, baik dalam keadaan cair maupun padat. Inokulasi dapat dilakukan pada media padat (secara goresan atau tusukan), serta pada media cair.

Semua pengerjaan mikrobiologi (seperti : pengambilan contoh, inokulasi, isolasi, pengenceran, dan lain-lain), harus dilakukan secara aseptik, untuk menghindari segala kemungkinan kontaminasi. Salah satu cara bekerja dengan cara aseptik adalah dengan menyalakan api Bunsen di meja kerja. Bekerjalah di sekitar nyala api biru dari pembakar Bunsen yang memberikan daerah “steril” dalam radius 20 cm. Udara ruangan tempat bekerja, tangan, rambut dan pakaian dari praktikan merupakan sumber kontaminasi. Sehingga dianjurkan untuk mencuci tangan dengan cairan antiseptik sebelum bekerja dan tidak berbicara selama melakukan inokulasi.

Bila suatu pengerjaan aseptik telah selesai, perkecil api Bunsen dan matikan. Sebelum meninggalkan laboratorium, cucilah tangan memakai cairan antiseptik dan sabun, lalu bilas dengan air.

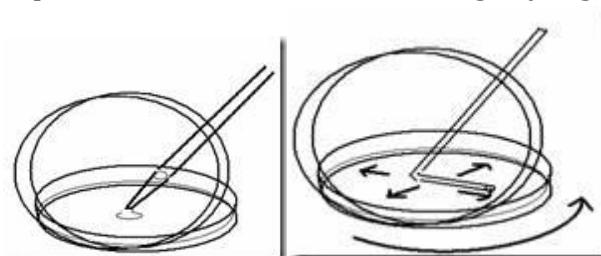
A. Teknik Inokulasi

Inokulasi adalah teknik menanam benih mikroba ke dalam media. Secara umum inokulasi ini memiliki beberapa tujuan yaitu sebagai berikut:

- Pengkayaan sel viabel mikroba
- Pemurnian atau memperoleh koloni spesifik
- Pengamatan karakteristik mikroba, misal motilitas menggunakan medium, uji biokimia, uji resistensi, uji Camp, dll
- Penghitungan mikroba

a) *Spread Plate* (metode semai)

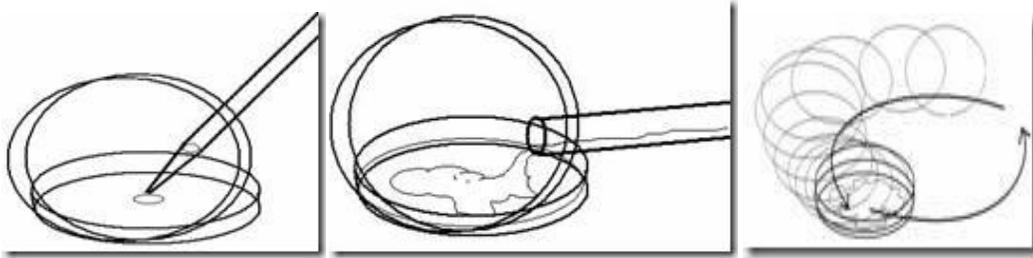
Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur yang relatif merata sehingga dapat dihitung. Pada metode sebar sejumlah biakan (umumnya 0,1 - 0,5 mL) disebar pada permukaan agar, dengan menggunakan *spreader* (batang bengkok) steril. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu sesuai dengan yang dipersyaratkan.



Gambar 2.1. Metode Semai

b) Pour Plate (metode tuang)

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ($>45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan Petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh di permukaan agar yang kaya O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang kurang mengandung oksigen.



Gambar 2.2. Metode Tuang

Mengapa jumlah suspensi mikroba pada *spread plate* 0,1 – 0,5 mL sedangkan pour plate 1 mL?

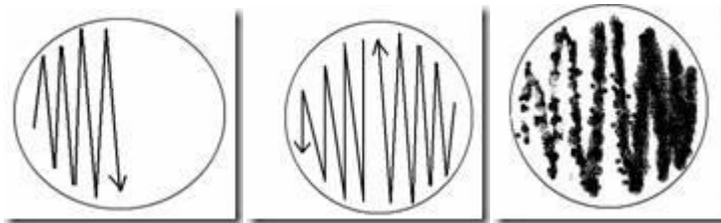
c) Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

Teknik penanaman dengan goresan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan (memperkaya) kultur ke dalam medium baru.

i. Goresan Sinambung

Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

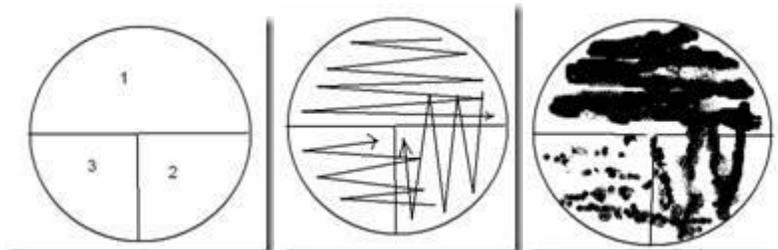
- Sentuhkan inokulum loop (jarum Ose) pada koloni atau suspensi mikroba dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar.
- Jangan pijarkan loop, lalu putar cawan 180°C lanjutkan goresan sampai habis.



Gambar 2.3 Continuous Streak

ii. Goresan T

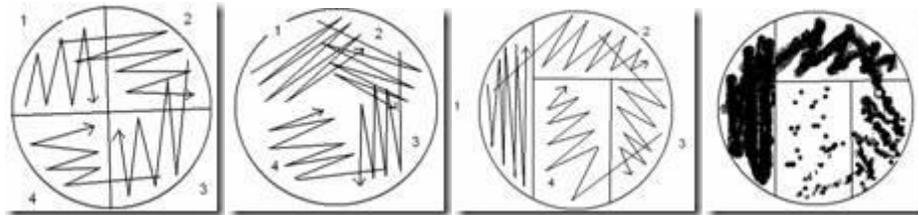
- Bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker
- Inokulasi daerah 1 dengan *streak zig-zag*
- Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan *streak zig-zag* pada daerah 2 (*streak* pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna
- Lakukan hal yang sama pada daerah 3



Gambar 2.4. T Streak Ways

iii. Goresan Kuadran (*Streakquadrant*)

- Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat.
- Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganismenya.
- Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.



Gambar 2.5. Four Streak Ways

iv. Teknik Apus (*Swab*)

Teknik ini pada dasarnya sama dengan teknik gores menggunakan jarum ose atau loop hanya yang menjadi pembeda adalah media alat pada teknik ini adalah Swab (semacam cotton bud yang steril)

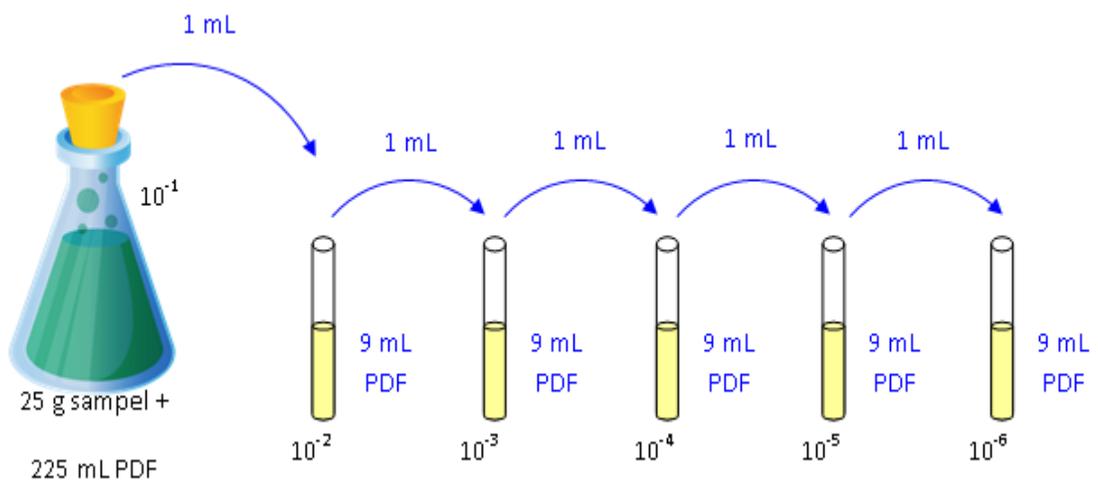
v. Inokulasi Agar Miring

- * Siapkan biakan, media agar miring dan jarum ose.
- * Nyalakan pembakar bunsen / lampu spiritus dan bakar ose sampai membara.
- * Setelah dingin cuplik biakan yang diinginkan, goreskan cuplikan pada dasar permukaan agar miring hingga atas dengan pola zig-zag

Catatan:

Setiap inokulasi wajib diberi keterangan minimal nama mikroba, tanggal inokulasi dan atau keterangan pengenceran

B. Teknik Pengenceran



Gambar 2.6. Skema Teknik Pengenceran

C. Growth Promotion Test (GPT)

Dalam Farmakope Indonesia dinyatakan sebagai uji fertilitas media. Pembuktian kesesuaian media uji yang dalam penggunaannya mampu menjadi tempat perbenihan mikroba dalam jenis pengujian yang dilakukan. Uji ini dilakukan terhadap media siap pakai, media kering (dehydrated) dan media yang dibuat sendiri dari komponen-komponennya (racikan) baik media padat (agar) atau cair (broth). (Wusmin Tambunan, 2014)

2.4 PROSEDUR KERJA

A. PROSEDUR KERJA ASEPTIK

1. Atur nyala api Bunsen sehingga diperoleh nyala api biru untuk memperoleh daerah “steril”. Biarkan api menyala selama kurang lebih 10 menit sebelum bekerja.
2. Pinset diflambir, kapas penutup tabung reaksi yang akan digunakan ditarik perlahan-lahan dengan pinset sedemikian rupa, sehingga cukup untuk ditarik dengan cara menjepit di antara jari kelingking dan telapak tangan kanan. Tabung reaksi tadi diletakkan pada rak tabung di sebelah kiri praktikan.
3. Jarum Ose diflambir sampai ujungnya pijar, kemudian pemanasan diteruskan perlahan-lahan ke arah pegangan jarum sampai batas kawat. Pekerjaan ini dilakukan sebanyak tiga kali.
4. Dengan tangan kiri diambil tabung reaksi yang berisi inokula. Kapas penutup tabung ditarik dengan cara menjepit di antara jari kelingking dan telapak tangan kanan. Mulut tabung yang telah terbuka diflambir dengan cepat.
5. Jarum Ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi inokula tanpa menyentuh dinding untuk mengambil inokula. Kemudian jarum Ose ditarik keluar dan dipegang tetap pada jarak 10 cm sekitar nyala api bunsen.
6. Mulut tabung reaksi diflambir, kemudian tutup kapasnya dimasukkan kembali ke dalam mulut tabung. Tabung dikembalikan ke raknya.
7. Tabung yang berisi media steril yang akan diinokulasikan, diambil dengan tangan kiri. Sumbat kapasnya ditarik dengan tangan kanan, dengan cara menjepit diantara kelingking dan telapak tangan. Sementara itu jarum Ose yang telah memuat inokula tetap dipegang dengan tangan kanan pula. Mulut tabung diflambir.
8. Jarum Ose dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media steril dan dilakukan inokulasi (goresan atau tusukan). Jarum Ose ditarik keluar, mulut tabung diflambir kemudian sumbat kapasnya dimasukkan kembali dan selanjutnya tabung diletakkan kembali ke raknya.
9. Jarum Ose diflambir sampai pijar sebanyak tiga kali, sebelum disimpan lagi di rak.
10. Beri etiket/label pada tiap tabung yang telah berisi biakan.

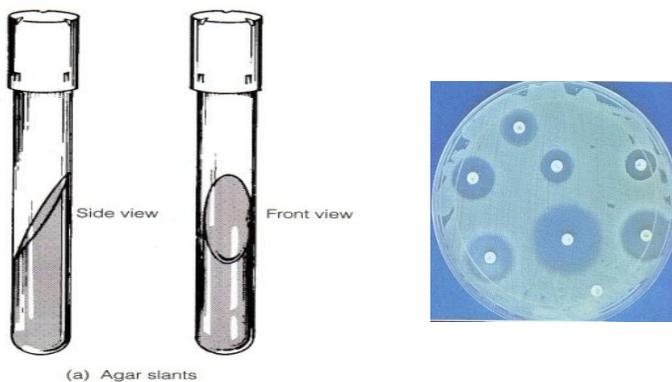
B. PEMBUATAN PLAT AGAR, AGAR MIRING, AGAR TEGAK, DAN MEDIA CAIR DALAM TABUNG

ALAT DAN BAHAN

- Cawan petri steril, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, pipet agar 20 mL steril, pipet ukur 10 mL, pinset, Ose bundar dan lurus, bunsen, papan pembentuk agar miring
- Media Nutrien Agar yang telah cair dan suhunya 50°C dan media Nutrien Broth.

PROSEDUR PERCOBAAN

1. Nyalakan bunsen dan atur nyala api bunsen sehingga diperoleh nyala api biru untuk memperoleh daerah “steril”. Biarkan menyala selama 10 menit sebelum anda bekerja.
2. Siapkan dan letakkan tabung reaksi steril pada rak tabung reaksi dan cawan petri steril di antara nyala dua api bunsen.
3. Pembuatan plat agar : pipet 20 mL cc media Nutrien Agar yang telah cair dan suhunya 50°C ke dalam cawan petri steril, lalu biarkan padat.
4. Pembuatan agar miring : pipet 3 mL cc media Nutrien Agar yang telah cair dan suhunya 50°C ke dalam tabung reaksi steril, lalu letakkan miring pada papan pembentuk agar miring dan biarkan padat
5. Pembuatan agar tegak : pipet 5 mL cc media Nutrien Agar yang telah cair dan suhunya 50°C ke dalam tabung reaksi steril, lalu letakkan tegak pada rak tabung reaksi dan biarkan padat
6. Pembuatan media cair : pipet 5 mL cc media Nutrien Broth yang suhunya telah sama dengan suhu kamar ke dalam tabung reaksi steril
7. Pekerjaan di atas dilakukan dengan memperhatikan prosedur kerja aseptik.



Bentuk-bentuk media agar padat

C. TEKNIK INOKULASI PADA PLAT AGAR, AGAR MIRING, AGAR TEGAK DAN MEDIA CAIR

ALAT DAN BAHAN

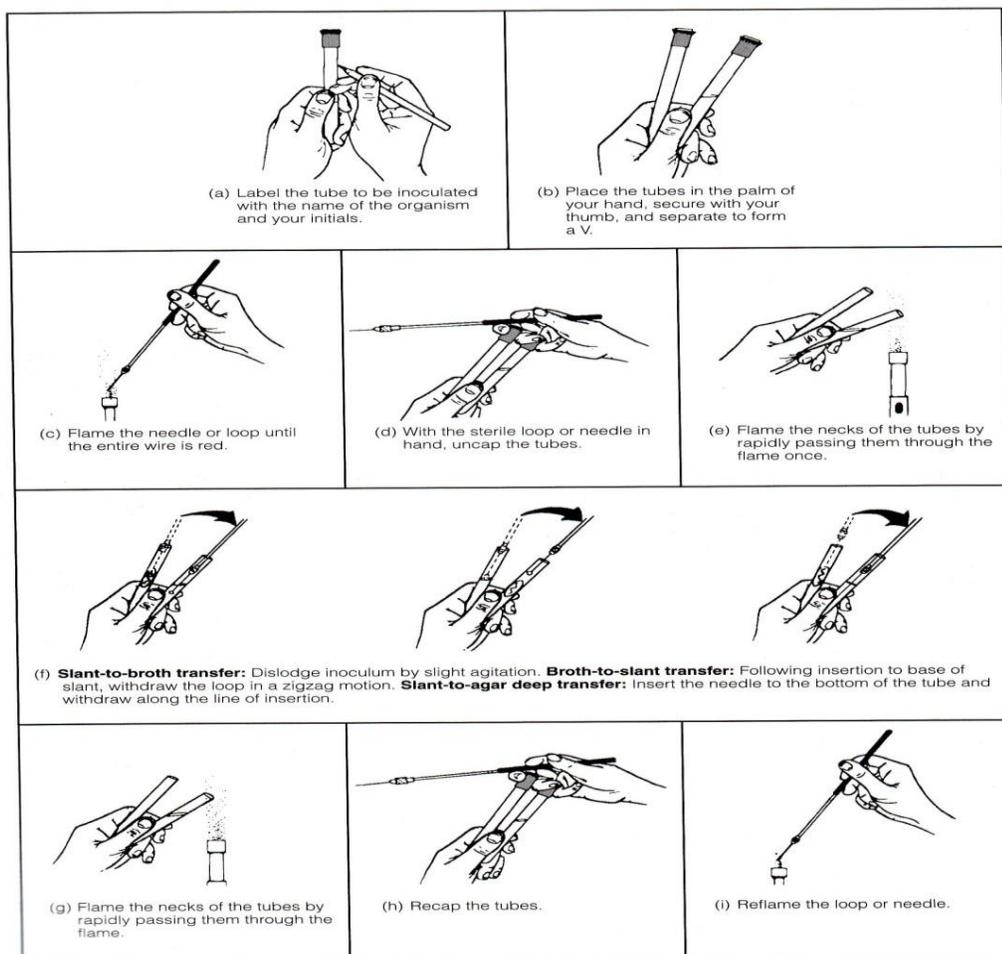
- Plat Agar, Agar miring Nutrien Agar, Agat tegak Nutrien Agar, Nutrien Broth pada tabung reaksi dan larutan NaCl 0,9% b/v.
- Ose bundar, Ose lurus, rak tabung reaksi, pipet ukur 5 mL steril, tabung reaksi steril, bunsen, pinset, inkubator 37°C
- Biakan bakteri : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, dan *Sterptococcus thermophyllus*.

PROSEDUR PERCOBAAN

1. Pembuatan Inokula :
Masukkan 5 mL NaCl 0,9% b/v steril ke dalam tabung reaksi steril. Inokulasikan biakan yang berasal dari agar miring, dengan menggunakan jarum Ose bundar, kemudian disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% b/v steril, dengan cara mencelupkan jarum Ose yang berisi inokula hingga semua massa inokula masuk dan tersebar dengan rata ke dalam larutan NaCl (NaCl tersebut menjadi keruh). Inokula ini yang akan dipergunakan dalam pengerjaan inokulasi pada plat agar, agar miring, agar tegak, dan media cair.
2. Inokulasi pada media cair
Bila inokula berasal dari suspensi bakteri (biakan cair), inokulasi sebaiknya dilakukan dengan menggunakan pipet Pasteur. Tetapi bila inokula berasal dari biakan agar miring, maka diambil dengan menggunakan jarum Ose bundar, kemudian disuspensikan dalam media Nutrien Broth, dengan cara mencelupkan jarum Ose yang berisi inokula

hingga semua massa inokula masuk dan tersebar dengan rata ke dalam media cair (seperti pada pembuatan inokula).

3. Inokulasi pada plat agar
Bagian luar plat agar dibagi menjadi empat bagian dengan menggunakan spidol. Ambil inokula dengan menggunakan jarum Ose bundar, lalu inokulasikan ke setiap bagian dari plat agar dengan goresan yang rapat.
4. Inokulasi pada media padat dengan cara goresan
Bila media berupa agar miring dalam tabung reaksi, inokulasi dilakukan dengan cara goresan rapat memakai jarum Ose bundar, dimulai dari bagian bawah secara zigzag sampai bagian atas media
5. Inokulasi pada media padat dengan cara tusukan
Bila media berupa agar tegak dalam tabung reaksi, inokulasi dilakukan dengan cara memasukkan jarum Ose lurus yang telah memuat inokula secara tusukan lurus ke dalam media, tepat pada poros tengah tabung sampai mendekati dasar tabung, kemudian ose ditarik kembali perlahan-lahan.
6. Semua pekerjaan di atas dilakukan dengan memperhatikan prosedur kerja aseptik
7. Inkubasi semua media yang telah diinokulasi ke dalam inkubator 37°C selama 24 jam dan amati pertumbuhan yang terjadi.



Prosedur inokulasi

D. GROWTH PROMOTION TEST (GPT) (Jeffeta Pradeko Putra, 2014)

ALAT DAN BAHAN

- Bahan : TSA (Trypticase Soya Agar)
- Mikroba : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404
- Alat : Waterbath, Inkubator 20-25 dan 30-35°C, Spreader

PROSEDUR PERCOBAAN

Growth Promotion Test (yang selanjutnya disebut GPT) dapat dibagi menjadi 3 yaitu:

a) GPT media uji enumerasi mikroba

- Siapkan suspensi mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404 dengan konsentrasi <100 cfu/mL
- Media enumerasi kapang/khamir
 - Tuang \pm 20 mL Sabouraud Dextrose Agar atau media enumerasi kapang/khamir lain ke dalam minimal 3 Petri kosong steril, biarkan memadat
 - Inokulasikan *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Aspergillus niger* ATCC 16404 <100cfu masing-masing ke dalam 1 cawan.
 - Sebar-ratakan dengan menggunakan batang spreader
 - Inkubasi semua cawan 20 – 25 °C \leq 5 hari dengan posisi cawan tidak dibalik.
 - Hitung jumlah koloni masing-masing cawan \leq 5 hari

b) Media enumerasi bakteri aerob mesofil

- Siapkan media Soybean-Casein Digest Agar steril atau media enumerasi bakteri lain dengan suhu sekitar \pm 45°C dan simpan di dalam *waterbath* atau inkubator 50°C
- Inokulasikan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebanyak <100 cfu masing-masing ke dalam Petri kosong
- Tuang \pm 20 mL Soybean-Casein Digest Agar (atau media enumerasi yang akan diuji) ke dalam cawan berisi suspensi mikroba, goyang Petri, biarkan memadat
- Inkubasi semua cawan 30 – 35 °C \leq 3 hari dengan posisi cawan dibalik
- Hitung total koloni masing-masing cawan \leq 3 hari

Syarat:

- Media cair dapat digunakan jika pertumbuhan mikroba uji terlihat jelas dan sebanding dengan inokulum yang telah sesuai dengan hasil uji fertilitas betas media sebelumnya (umumnya dibuktikan melalui foto)
- Untuk media padat dilakukan cara tuang atau cara sebar, pertumbuhan koloni yang diperoleh tidak boleh berbeda dua kali dari nilai hitung inokulum standard

c) GPT media uji mikroba spesifik metode Farmakope

Prosedur:

- Siapkan suspensi mikroba uji sesuai tabel 2.1 dengan konsentrasi < 100 cfu/mL
- Inokulasikan masing-masing mikroba sesuai media yang diuji sebanyak < 100 cfu/mL
- Inkubasi sesuai dengan karakteristik mikroba tersebut (umumnya bakteri 30 – 35 °C \leq 3 hari dan jamur 20 – 25 °C \leq 5 hari)

Syarat:

- Media dapat digunakan jika pertumbuhan mikroba uji terlihat jelas dan sebanding dengan inokulum yang telah sesuai dengan hasil uji fertilitas betas media sebelumnya (umumnya dibuktikan melalui foto)
- Untuk parameter daya hambat tidak boleh tumbuh

Tabel 2.1 *Growth Promotion Test* Media Uji Mikroba Spesifik,

Uji / Media	Sifat	Mikroba Uji
Uji Toleransi Empedu Bakteri Gram-negatif		
Media Cair Pengkaya <i>Enterobacteriaceae</i> Mossel	Fertilitas	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, atau NBRC 13275
	Daya Hambat	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276
<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>	Fertilitas + Indikatif	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, atau NBRC 13275
Uji <i>Escherichia coli</i>		
<i>MacConkey Broth</i>	Fertilitas	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972
	Daya Hambat	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276
<i>MacConkey Agar</i>	Fertilitas + Indikatif	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972
Uji <i>Salmonella</i>		
<i>Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth</i>	Fertilitas	<i>Salmonella enteric subsp. Enteric serovar Typhimurium</i> ATCC 14028 atau <i>Salmonella enteric subsp. Enteric serovar Abony</i> NBRC 100797, NCTC 6017, atau CIP 80.39
	Daya Hambat	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276
<i>Xylose lysine Deoxycholate Agar</i>	Fertilitas + Indikatif	<i>Salmonella enteric subsp. Enteric serovar Typhimurium</i> ATCC 14028 atau <i>Salmonella enteric subsp. Enteric serovar Abony</i> NBRC 100797, NCTC 6017, atau CIP 80.39

Uji / Media	Sifat	Mikroba Uji
Uji <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Cetrimide Agar</i>	Fertilitas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, atau NBRC 13275
	Daya Hambat	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972
Uji <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Mannitol Salt Agar</i>	Fertilitas + Indikatif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276
	Daya Hambat	<i>E.coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, atau NBRC 3972
Uji <i>Clostridia</i>		
<i>Reinforced Medium For Clostridia</i>	Fertilitas	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 atau ATCC 11437, NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651
<i>Columbia Agar</i>	Fertilitas	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 atau ATCC 11437, NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651
Uji <i>Candida albicans</i>		
<i>Sabourad Dextrose Broth</i>	Fertilitas	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, atau NBRC 1594
<i>Sabourad Dextrose Agar</i>	Fertilitas + Indikatif	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, atau NBRC 1594

d) GPT media uji sterilitas yang digunakan untuk pengujian produk, proses dan lingkungan produksi sediaan steril

Akan dibahas di bab Uji Sterilitas

2.5 HASIL PENGAMATAN

Nama bakteri	Pertumbuhan pada media			
	Plat Agar	Agar Miring	Agar Tegak	Media Cair
<i>Staphylococcus Aureus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Sterptococcus thermophyllus</i>				

Catatan : Tuliskan bentuk, warna, serta morfologi bakteri yang anda amati pada media.

PERCOBAAN 3
KUALIFIKASI DAN MONITORING RUANGAN
(LINGKUNGAN LABORATORIUM DAN ALAT *LAMINAR AIR FLOW*)

3.1 TUJUAN

Mahasiswa mampu menentukan kualifikasi ruangan, ruang steril/ non steril. Serta memonitoring ruangan sesuai dengan kualifikasinya. Mahasiswa mampu menggunakan alat LAF sesuai dengan sistem operasional prosedur yang berlaku, serta mampu mengevaluasi alat LAF berfungsi dengan baik atau tidak dengan cara berbagai.

3.2 PRINSIP

Melakukan kualifikasi ruangan berdasarkan persyaratan berdasarkan CPOB.

3.3 TEORI UMUM

Kualifikasi dan monitoring ruangan steril maupun non steril memiliki peran yang sangat penting dalam menjamin bahwa lingkungan primer produksi dan pemastian mutu produk farmasi dan kosmetik memenuhi persyaratan yang berlaku, sekaligus menjadi *tools control* dalam melakukan tindakan perbaikan, pencegahan dan peningkatan berkelanjutan.

Ruangan bersih atau *clean room* adalah suatu ruangan tertutup di mana jumlah partikel dalam udara, temperatur, kelembaban, dan tekanan dikontrol sesuai persyaratan dan dapat terdiri dari satu atau lebih area bersih. (White, 2001). Pada dasarnya ruangan bersih atau *clean room* dibatasi hanya oleh jumlah partikel suatu ruangan namun demikian banyak regulasi yang mengatur tentang parameter uji lain untuk meyakinkan kualitas ruangan yang akan digunakan.

Pedoman yang digunakan untuk pembagian ruangan bersih di Indonesia diatur dalam buku Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB) yang dibagi menjadi kelas A, B, C, D, E, F dan G yang diadopsi sebagian pada klasifikasi ruangan bersih versi EU GMP. Berikut adalah persyaratan ruangan bersih berdasarkan CPOB di Indonesia.

1. Jumlah mikroba (jika ruangan tidak digunakan minimal tiap bulan sekali)

Tabel 3.1 Persyaratan Jumlah Mikroba

Kelas	Batas yang disarankan untuk cemaran mikroba (*)			
	Sampel udara <i>cfu/m³</i>	Cawan papir (dia. 90 mm) <i>cfu/4 jam</i> (**)	Cawan kontak (dia. 55 mm) <i>cfu/plate</i>	Sarung tangan 5 jari <i>cfu/sarung tangan</i>
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Catatan: (*) Nilai rata-rata

(**) Cawan papir dapat dipaparkan kurang dari 4 jam

(Suplemen I CPOB, 2009)

2. Jumlah partikel (jika ruangan tidak digunakan minimal tiap bulan sekali)

Tabel 3.2 Syarat Jumlah Partikel

Kelas	JUMLAH MAKSIMAL PARTIKEL/ m ³			
	Non-operasional		Operasional	
	≥ 0,5 μm	≥ 5 μm	≥ 0,5 μm	≥ 5 μm
A	3.520	20	3520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	20.000
D	3.520.000	29.000	Tidak Ditetapkan	Tidak Ditetapkan

(Suplemen I CPOB, 2009)

3. Kecepatan aliran udara (jika ruangan tidak digunakan minimal tiap bulan sekali)

Hanya berlaku untuk ruangan bersih kelas A di bawah udara laminar yaitu 0,3 m/s untuk aliran vertikal dan 0,45 m/s untuk aliran horisontal. Atau $0,35 \pm 0,025$ m/s (Esco)

4. Suhu, kelembaban dan tekanan (Dilakukan setiap hari atau jika bekerja 24 jam maka dilakukan 3 kali/hari) yang secara umum memiliki persyaratan 24 - 28°C, Kelembaban: 60 - 80% (Petunjuk Operasional Penerapan CPOB edisi 2001) dan tekanan ruangan dengan kelas kebersihan yang berbeda mempunyai perbedaan tekanan berkisar 10 - 15 pascal (CPOB, 2013)

Tabel 3.3 Frekuensi monitoring Ruang Kelas A, B, C, dan D
(CPOB, 2012)

Ruang	Kelas	Bilangan Partikel		Sampel Udara Volumetris		Cawan Kontak ³⁾		Cawan Papar ³⁾		Sarung Tangan Lima Jari		Pakaian Personil	
		Frekuensi	Kondisi	Frekuensi	Kondisi	Frekuensi	Kondisi	Frekuensi	Kondisi	Frekuensi	Kondisi	Frekuensi	Kondisi
LAF	A	Terus-menerus selama pengisian ⁴⁾	Operasional dan non-operasional ¹⁾	Tiap kali pengisian ⁴⁾	Operasional								
Pengisian	B	Tiap kali pengisian ⁴⁾	Operasional dan non-operasional ²⁾	Tiap kali pengisian ⁴⁾	Operasional								
Penyangga	B	-	-	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	-	-	-	-
Ganti	C	-	-	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	-	-	-	-
Pencampuran	C	Tiap minggu	Operasional dan non-operasional	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	Tiap minggu	Operasional	Tiap bulan ⁵⁾	Operasional	Tiap minggu	Operasional
Koridor	C	Tiap minggu	Operasional dan non-operasional	Tiap minggu	Operasional	-	-	-	-	-	-	-	-
Ruang capping	D	Tiap minggu	Operasional dan non-operasional	Tiap minggu	Operasional	-	-	Tiap minggu	Operasional	-	-	-	-

- 1) Tambahkan pemantauan minimal 6 bulan sekali diperiksa pada kondisi non-operasional
 2) Tambahkan pemantauan minimal 1 tahun sekali diperiksa pada kondisi non-operasional (bersamaan dengan rekualifikasi tahunan HVAC)
 3) Di masing-masing titik pemeriksaan
 4) Minimal satu kali seminggu bila tidak ada aktivitas
 5) Minimal satu kali tiap bulan pada akhir shift

Jeffeta Pradeko Putra, S.Farm., M.Si

3

3.4 PROSEDUR PERCOBAAN DAN HASIL PENGAMATAN

ALAT DAN BAHAN

- Bahan : *Tryptic Soy Agar* (TSA)
- Alat : Air Sampler, Inkubator 37 dan 22 °C, Particle Counter, Thermobarohyrometer, dan Velocitymeter / Anemometer.

A. PEMANTAUAN JUMLAH MIKROBA RUANGAN
PROSEDUR PERCOBAAN

a. Sampel Udara (Active Sampling)

- Tentukan jumlah titik pemantauan

1. Rumus

$$JT = \frac{VR}{(Wm \times V)}$$

JT = Jumlah Titik

VR= Volume ruangan (m³)

Wm= Waktu sampling Maksimum yang direkomendasikan (menit)

V= Kecepatan Vakum Alat (L/menit)

- 2. Tiap ruangan ≥ 1000 Liter (WHO, 2012)**

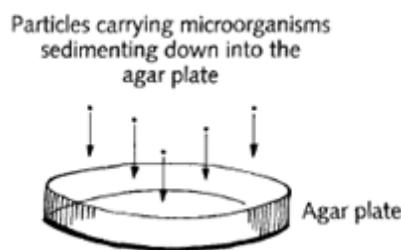
- Tentukan jumlah titik pemantauan
- Lakukan pengujian sesuai dengan manual alat
- *Inkubasi pada suhu 20 - 25 °C, selama 4 hari, kemudian lanjutkan inkubasi pada suhu 30 - 35 °C selama 48 jam.*
- Hitung serta catat jumlah bakteri dan jamur yang tumbuh pada setiap cawan
- Dalam Satu Plate dihitung dan dikonversi ke m³, Misal: 10 cfu/500 L maka dikonversi menjadi 20 cfu/m³

Ruangan	Hasil Pemantauan selama 2 Menit (cfu)	Interpretasi Sampel Udara (cfu/m ³)
1		
2		
3		
4		

Catatan: Hendaknya Air Sampler kelas A *dedicated* dengan ruangan

b. Cawan Papar (Settle Plate)

- Tentukan jumlah titik pemantauan dengan rumus = $\sqrt{\text{luas area (m}^2\text{)}}$, contoh: luas area 10 m², maka jumlah titik pemantauan ada 3,3 dibulatkan menjadi 4 titik pemantauan. Letak titik pemantauan ditetapkan berdasarkan analisis risiko pada titik yang paling mungkin dan paling berdampak pada hasil produksi ataupun pengujian.
- Bawa cawan Petri steril dan TSA steril ke dalam *laminar air flow*
- Dinginkan TSA sampai $\pm 50^\circ\text{C}$ dan tuangkan ke cawan Petri sebanyak 15 – 20 mL dan biarkan memadat
- Inkubasi cawan Petri pada suhu 35 – 37°C selama 48 jam
- Periksa adanya pertumbuhan mikroorganismenya pada setiap lempeng agar
- Lempeng yang tumbuh mikroorganismenya sebelum diuji harus disingkirkan
- Setiap lempeng agar diberi label dengan keterangan tanggal uji, no lempeng agar dan nama ruangan yang dipantau
- Masukkan lempeng agar ke dalam wadah plastik atau baja tahan karat yang sebelumnya sudah didesinfeksi dengan larutan alkohol 70% dan bawa ke ruangan yang akan dipantau
- Petugas yang akan memapar media pembiakan harus berpakaian laboratorium yang bersih, memakai masker dan sarung tangan
- Lakukan pemaparan cawan Petri (90 mm) selama 4 jam ditempat dan lokasi yang telah ditentukan. Letakkan tutup cawan disamping media yang berisi media pembiakan seperti berikut:



Gambar 3.1. Cawan Papar (Ramstorp, 2000)

- Inkubasi pada 35-37°C selama 48 jam, lanjutkan inkubasi pada 20 – 25°C selama 4 hari.
- Hitung jumlah bakteri dan jamur yang tumbuh pada setiap cawan dan catat dalam formulir yang telah disediakan.
- Lakukan *trend analysis* per periode waktu

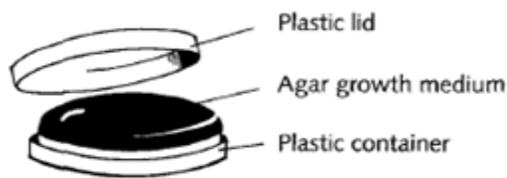
HASIL PENGAMATAN

Cawan ke-	Jumlah Bakteri (35-37°C)	Jumlah Jamur (20 – 5°C)	Jumlah
	Hari ke-2	Hari ke-4	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
Total			

Syarat: Jumlah mikroba pada masing-masing cawan tidak boleh melebihi batas yang telah ditetapkan (Tabel 3.2)

c. Cawan Kontak (*Contact Plate*)

- Siapkan Contact plate dengan menaruh media pertumbuhan dalam suatu cetakan untuk mencapai bentuk agar yang cembung, mirip dengan cetakan bantal seperti terlihat pada gambar berikut ini.



Gambar 3.2 *Contact Plate* (Ramstorp, 2000)

- Tekan media agar yang cembung ke permukaanyang akan diuji selama tiga sampai lima detik, partikel yang berada pada permukaan uji akan berpindah pada mediapertumbuhan *contact plate*.
- Inkubasi pada 35-37°C selama 48 jam, kemudian lanjutkan inkubasi pada 20 – 25°C selama 4 hari dan lakukan *trend analysis* per periode waktu

HASIL PENGAMATAN

Cawan ke-	Jumlah Koloni Bakteri (35-37°C)	Jumlah Koloni Jamur (20 – 25°C)
	Hari ke-2	Hari ke-4
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		

Syarat: Jumlah mikroba pada masing-masing cawan tidak boleh melebihi batas yang telah ditetapkan (tabel 3.2)

d. Sarung tangan 5 jari (*finger dabs*)

- Siapkan cawan yang berisi media TSA steril
- Kenakan sarung tangan steril
- Tekan media dengan masing-masing jari dalam cawan selama tiga sampai lima detik
- Inkubasi pada 35-37°C selama 48 jam, kemudian lanjutkan inkubasi pada 20 – 25°C selama 4 hari.

HASIL PENGAMATAN

Cawan	Jumlah Bakteri (35-37°C)	Jumlah Jamur (20-25°C)	Jumlah
	Hari ke-2	Hari ke-4	
1.			
2.			
Total			

Syarat: Jumlah mikroba pada masing-masing cawan tidak boleh melebihi batas yang telah ditetapkan (tabel 3.2)

B. PEMANTAUAN JUMLAH PARTIKEL RUANGAN

Menggunakan alat *Particle Counter*, prosedur tergantung dari merk dan jenis *particle counter* yang ada. Lakukan analisis pola hasil pemantauan per periode

C. PEMANTAUAN LAJU ALIR

Laju alir dipantau dengan menggunakan anemometer. Lakukan analisis trend tiap periode waktu

D. PEMANTAUAN SUHU DAN KELEMBABAN RUANGAN

Ukur suhu, kelembaban dan tekanan (jika perlu) menggunakan alat thermobarohyrometer atau alat yang sesuai.

Catatan: *Output* anda: Tiap kelompok melakukan *Trend analysis* jumlah mikroba, suhu, dan kelembaban selama 2 bulan (Tanyakan Asisten)

PERCOBAAN 4 ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN KONFIRMASI MIKROBA

4.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat mengetahui dan melakukan cara isolasi, identifikasi dan konfirmasi terhadap mikroba, terutama mikroba patogen.

4.2 PRINSIP

Setiap mikroba mempunyai sifat dan kebutuhan zat pertumbuhan yang berlainan antara yang satu dengan yang lainnya. Hal ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi satu jenis mikroba dari kumpulan mikroba dengan cara mengisolasi pada media tertentu (media selektif).

4.3 TEORI UMUM

Pembiakan mikroba memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai bagi mikroba tersebut. Zat hara digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi bagi metabolisme dan pergerakan. Lazimnya, media biakan mengandung :

1. Air
2. Sumber energi, seperti karbohidrat dan protein
3. Zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen serta trace element.
4. Faktor penunjang pertumbuhan, seperti : asam amino dan vitamin

Kebutuhan nutrisi mikroba berkisar dari kebutuhan senyawa anorganik sederhana sampai kepada macam-macam vitamin. Oleh karena itu, tidak mungkin untuk membuat media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan semua jenis mikroba.

Untuk mengisolasi mikroba jenis tertentu dari kumpulan mikroba, dapat digunakan media selektif. Sebagian besar media selektif mengandung zat-zat inhibitor yang menekan pertumbuhan mikroba kontaminan (selain mikroba yang dicari). Misal : Mac Conkey Agar (MCA), mengandung zat warna yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, tetapi bakteri gram negatif tetap dapat tumbuh atau Sabouraud Dextrose Agar merupakan media selektif untuk kapang (fungi), karena pHnya = 5,6 dan kadar gulanya yang tinggi menunjang pertumbuhan kapang dan ragi, tetapi secara selektif menghambat pertumbuhan bakteri. Ada juga media yang dibuat selektif dengan jalan menambahkan antibiotika yang akan menghambat pertumbuhan dari mikroba yang peka terhadap antibiotika tersebut.

4.4 PROSEDUR PERCOBAAN

ALAT DAN BAHAN

- Suspensi bakteri : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, dan *E. coli*.
- Media MCA (Mac Conkey Agar), VJA (Vogel Johnson Agar), CETA (Cetrimide Agar) dan XLDA (Xylosa Lysin Desoksicholate Agar)
- Media IMVIC (Indol, Metil Merah, Voges Proskauer, Simmons Sitrat) + TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
- Pereaksi Indol, Metil Merah, dan Voges Proskauer
- Jarum Ose bundar dan lurus, pinset, Bunsen, dan inkubator 37°C

PROSEDUR

1. Inokulasikan suspensi bakteri pada media MCA, VJA, CETA, dan XLDA. Inkubasikan pada inkubator 37°C selama 1 minggu. Amati setiap hari, pertumbuhan dan warna koloni yang terjadi pada setiap media.

Hasil pengamatan :

- MCA : positif *E. coli* , bila terdapat koloni berwarna merah

- VJA : positif *Staphylococcus aureus*, bila terdapat koloni hitam dengan atau tanpa lingkaran kuning
 - CETA : positif *Pseudomonas aeruginosa*, bila terdapat koloni hijau kebiruan
 - XLDA : positif *Salmonella*, bila terdapat koloni merah
2. Inokulasikan juga suspensi bakteri tersebut pada media IMVIC + TSIA. Indol, Metil Merah dan Voges Proskauer dalam bentuk media cair, sedangkan Simons Sitrat berbentuk agar miring. TSIA merupakan kombinasi antara agar miring dengan agar tegak. Inkubasikan pada inkubator suhu 37°C selama 1 minggu dan amati tiap hari.

Hasil pengamatan untuk tes IMVIC + TSIA :

▪ Indol

Kepada biakan usia 24 jam tambahkan 3 - 4 tetes pereaksi Kovacs. Kocok, bila timbul warna merah pada lapisan permukaan, berarti Indol positif. Contoh bakteri yang reaksi Indolnya positif : *E. Coli*.

▪ Metil Merah

Kepada biakan usia 48 jam, teteskan 1 - 2 tetes pereaksi Metil Merah, kocok. Terjadinya warna merah berarti reaksi positif. Contoh bakteri yang reaksi Metil Merahnya positif : *Salmonella, Shigella, E.coli*.

▪ Voges Proskauer

Kepada biakan usia 48 jam tambahkan : 0,5 mL larutan alfa naftol dan 1 mL larutan KOH 16%. Kocok kuat-kuat, biarkan 10 menit pada suhu kamar. Bila timbul warna rosa atau merah pada permukaan/merata pada seluruh biakan berarti reaksi positif. Contoh bakteri yang reaksi VP-nya positif : *Klebsiella, Enterobacter, Serratia*.

▪ Simmons Sitrat

Pada Simmons Sitrat yang positif akan terjadi perubahan warna dari warna hijau menjadi biru. Contoh bakteri yang sitratnya positif : *Klebsiella* dan *Enterobacter*.

▪ TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Amati perubahan yang terjadi pada biakan agar TSIA yang berusia 48 jam atau lebih.

Glukosa : amati pada bagian agar tegaknya, positif bila terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning.

Laktosa dan sakarosa : amati pada bagian agar miringnya, positif bila media menjadi kuning.

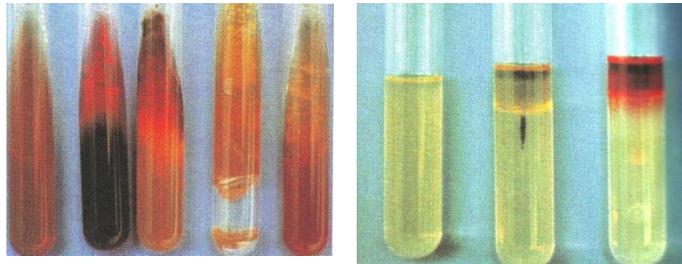
Pembentukan gas : timbul gelembung gas pada bagian tegak.

Gas H₂S : positif, bila terjadi warna hitam pada bagian tengah yang merupakan batas antara bagian tegak dan bagian miring.

Reaksi dari Beberapa Spesies Famili *Enterobacteriaceae*

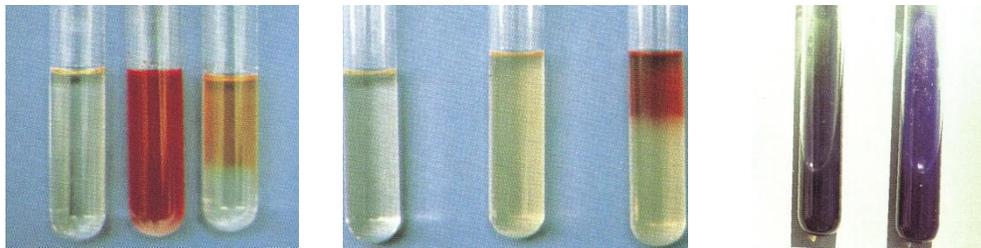
Nama Bakteri	Bagian miring	Bagian Tegak		H ₂ S
	Laktosa dan Sakarosa	Glukosa	Gas	
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+	+/-	-
<i>Shigella</i>	-	+	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	+	+	+/-
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	+/-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-
<i>Serratia</i>	+/-	+	-	-

3. Ambil kesimpulan mengenai mikroba apa yang diinokulasikan dengan mendiskusikan hasil-hasil yang didapat!



Uji pada media TSIA

Uji pembentukan Indol



Uji pada media Metil Merah

Uji Voges-Proskauer

Uji penggunaan sitrat

4.5 DATA PENGAMATAN

Nama Media	Pengamatan pada hari ke							Kesimpulan
	1	2	3	4	5	6	7	
MCA								
VJA								
CETA								

XLDA								
Metil Merah								
Voges Proskauer								
Indol								
Simmons Sitrat								
TSIA								

PERCOBAAN 5 PEWARNAAN GRAM

5.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat mengenal dan melakukan salah satu pewarnaan terhadap bakteri; untuk membantu dalam mempelajari morfologi, struktur, sifat-sifat bakteri dan juga membantu dalam melakukan identifikasi bakteri.

5.2 PRINSIP

Preparat yang diwarnai kristal violet akan menyebabkan semua bakteri menjadi ungu (zat warna diserap dinding sel dan protoplasma). Pemberian lugol menyebabkan terbentuknya kompleks ungu - kristal iodium yang berwarna ungu tengguli. Pencucian dengan alkohol menyebabkan diferensiasi dari 2 macam bakteri, bakteri yang tetap berwarna ungu dan bakteri yang tidak berwarna (sebab zat warna dilarutkan oleh alkohol dan keluar dari sel bakteri). Fukhsin sebagai pewarna kontras akan mewarnai bakteri yang tidak berwarna menjadi merah.

5.3 TEORI UMUM

Untuk mempelajari morfologi, struktur, sifat-sifat bakteri dan untuk membantu identifikasinya, bakteri perlu diwarnai. Agar memperoleh hasil pewarnaan yang baik, perlu diperhatikan faktor-faktor sebagai berikut :

1. Kaca objek harus bersih dan bebas lemak
2. Umur biakan 18-24 jam
3. Tebal-tipisnya preparat

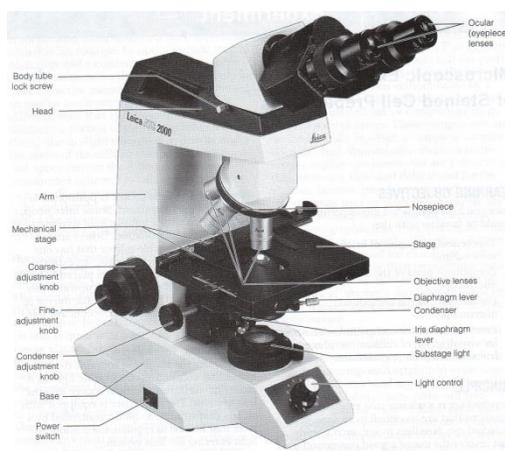
Ada beberapa jenis pewarnaan, yaitu :

1. Pewarnaan negatif, memakai zat warna negrosin/tinta bak
2. Pewarnaan sederhana, pewarnaan yang hanya menggunakan 1 macam zat warna (zat warna biru metilen/ kristal violet)
3. Pewarnaan diferensial, menggunakan lebih dari 1 macam zat warna (misal : pewarnaan gram dan pewarnaan tahan asam)
4. Pewarnaan khusus, dipakai untuk mewarnai bagian-bagian sel bakteri yang tidak bisa diwarnai dengan pewarnaan biasa. Contoh : pewarnaan spora.

5.4 PROSEDUR PERCOBAAN

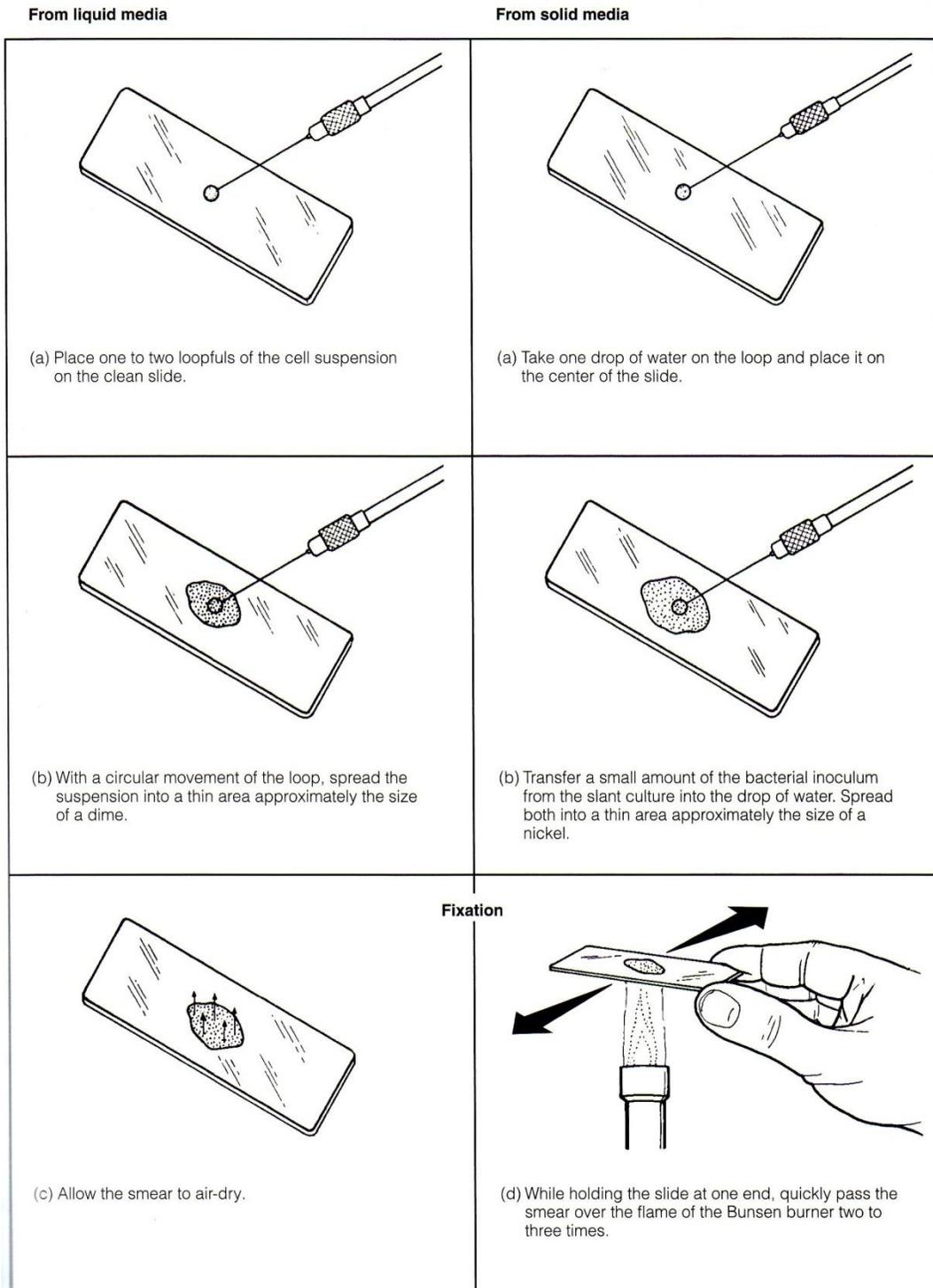
ALAT DAN BAHAN

- Biakan agar miring bakteri
- Pereaksi pewarnaan gram
- Mikroskop, kaca objek, Ose bundar, pinset, kertas lensa, kertas tissue, Bunsen
- Oli imersi, Akuades

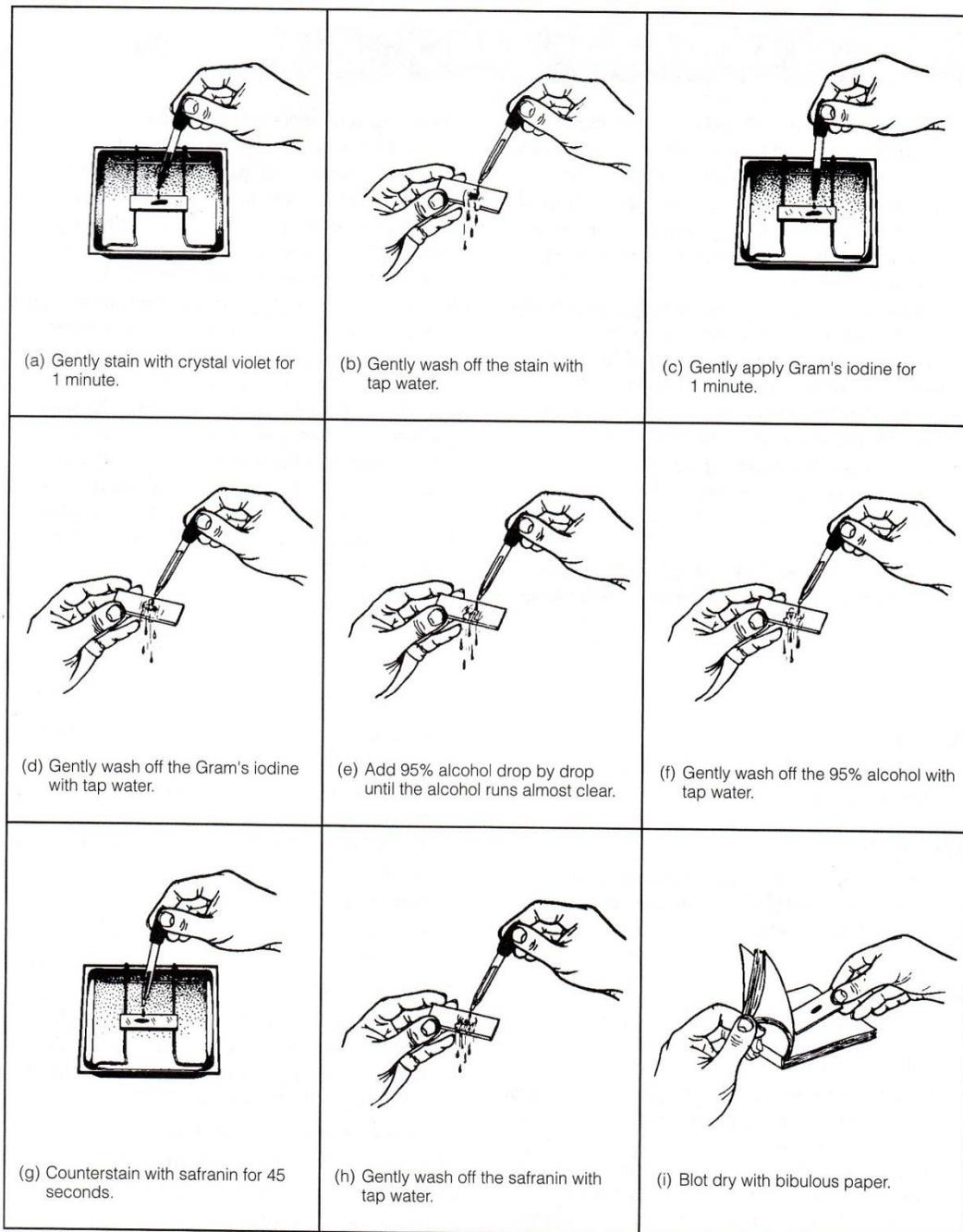


PROSEDUR PERCOBAAN

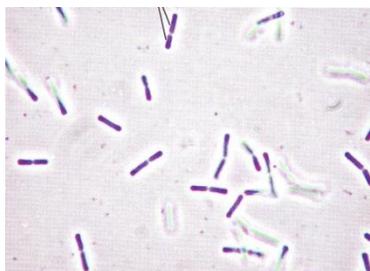
1. Bersihkan kaca objek yang akan digunakan dengan alkohol hingga bebas lemak. Setelah itu flambir tiga kali dengan cara melewatkan kaca objek tersebut pada nyala api bunsen. Beri tanda nama bakteri pada bagian bawah kaca objek.
2. Buat preparat dari biakan bakteri yang akan diwarnai dengan cara :
 - Letakkan 1 tetes akuades di atas kaca objek. Suspensikan 1 Ose biakan bakteri dalam tetesan akuades tersebut, dan sebarkan setipis mungkin membentuk lingkaran dengan diameter kurang lebih 1 cm
 - Preparat dibiarkan mengering di udara atau dengan cara menghangatkan di atas api bunsen
 - Preparat siap diwarnai.
3. Preparat diwarnai/ditetesi dengan kristal violet selama kurang lebih 1 menit.
4. Zat warna dibuang. Tuangkan lugol untuk membuang sisa kristal violet (kristal violet dibilas oleh lugol). Lalu tutup preparat dengan larutan lugol, biarkan kurang lebih 30 detik.
5. Larutan lugol dibuang. Preparat dibilas dengan alkohol 96%, tetes demi tetes sampai tetes bilasan alkohol terakhir tetap jernih.
6. Preparat dicuci dengan akuades dan diwarnai dengan zat warna Fukhsin selama 30 detik.
7. Bilas dengan akuades dan biarkan kering.
8. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 100 x dengan memakai oli imersi.
9. Catat warna, susunan dan bentuk bakteri yang didapat.



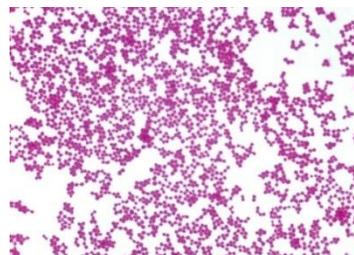
Penyiapan preparat bakteri



Prosedur pewarnaan Gram



Bakteri basillus dan diplobasilus



Bakteri kokus



Pewarnaan Gram : Gram-negative *E.coli* (3000 x)

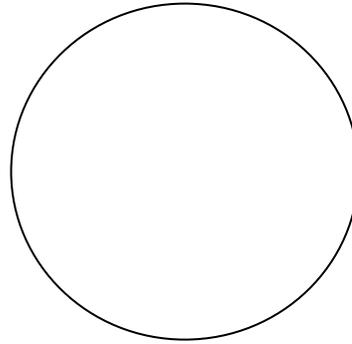
5.5 DATA PENGAMATAN

Warna bakteri :

Susunan :

Bentuk :

Gram :



PERCOBAAN 6 UJI CEMARAN MIKROBA DAN UJI STERILITAS

6.1 UJI CEMARAN MIKROBA

A. TUJUAN

Mahasiswa dapat melakukan penetapan jumlah cemaran mikroba yang terdapat pada sediaan farmasi (baik obat, kosmetika, maupun bahan baku), makanan serta minuman.

B. PRINSIP

Jika mikroorganisme yang hidup/ada dalam suatu bahan/cuplikan, ditumbuhkan pada media dengan kondisi yang sesuai, suhu optimal dan nutrisi yang cukup, maka sel akan berkembangbiak dan membentuk koloni yang dapat diamati dengan mata. Tiap sel yang hidup akan berkembang menjadi 1 koloni. Jumlah koloni yang muncul pada cawan merupakan petunjuk bagi jumlah mikroorganisme hidup yang terkandung dalam bahan/cuplikan tersebut.

C. TEORI UMUM

Jumlah mikroorganisme di dalam suatu sediaan, baik sediaan obat, obat tradisional, makanan ataupun kosmetika dapat ditentukan dengan menghitung jumlah sel atau koloni. Hal ini biasa dilakukan terutama untuk mengetahui tingkat cemaran mikroorganisme dalam produk tertentu atau untuk mengetahui apakah sediaan tersebut bebas dari cemaran atau tidak. Penetapan jumlah sel mikroorganisme hidup (*viable count*) adalah jumlah minimum mikroorganisme, karena koloni yang tumbuh pada lempeng agar merupakan gambaran mikroorganisme yang dapat tumbuh dan berbiak dalam media dan suhu inkubasi tertentu.

Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme, karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung untuk berkelompok. Bila ditumbuhkan pada media dan lingkungan yang sesuai, kelompok bakteri ini hanya akan menghasilkan satu koloni. Berdasarkan hal tersebut, seringkali digunakan istilah *Colony Forming Units* (cfu/ml) untuk penghitungan jumlah mikroorganisme hidup.

Sebaiknya, penghitungan koloni dilakukan pada lempeng agar yang mengandung 30 – 300 koloni. Lempeng agar dengan jumlah koloni yang tinggi (>300 koloni) sulit untuk dihitung, sehingga kemungkinan kesalahan perhitungan sangat besar. Pengenceran sampel membantu untuk memperoleh perhitungan jumlah yang benar, namun pengenceran yang terlalu tinggi akan menghasilkan lempeng agar dengan jumlah koloni yang kecil (<30 koloni). Lempeng agar demikian tidak absah secara statistik untuk digunakan dalam penghitungan.

D. ALAT, BAHAN DAN PROSEDUR PERCOBAAN

ALAT DAN BAHAN

- Media Nutrien Agar (NA) atau media Plat Count Agar (PCA)
- Media Sabouraud Dekstrosa Agar (SDA) atau media Potato Dekstrosa Agar (PDA) + kloramfenikol 100 mg/1 liter media
- Larutan NaCl 0,9% b/v
- Cawan petri steril, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, pipet agar 20 mL steril, pipet ukur 10 mL steril, pipet ukur 1 mL steril
- Sampel yang akan diperiksa.

PROSEDUR PERCOBAAN

1. Cairkan media dalam tangas air. Setelah cair, biarkan dalam water bath 45-50°C selama kurang lebih 30 menit.
2. Buat pengenceran desimal dari sampel dengan menggunakan NaCl 0,9% b/v steril, sampai didapat pengenceran 10%.
3. Tandai cawan petri dengan nama media dan tingkat pengencerannya.

4. Pipet 1 mL dari masing-masing pengenceran dan masukkan ke dalam cawan petri yang sesuai.
5. Tuangkan agar cair yang suhunya kurang lebih 50°C dan homogenkan dengan cara menggoyangkan cawan dengan gerakan searah jarum jam 5x dan gerakan berlawanan sebanyak 5x. Usahakan supaya tidak tumpah. Lakukan duplo untuk setiap pengenceran dan lakukan pula kontrol media untuk setiap media.

Keterangan :

Media NA untuk penetapan jumlah bakteri aerob

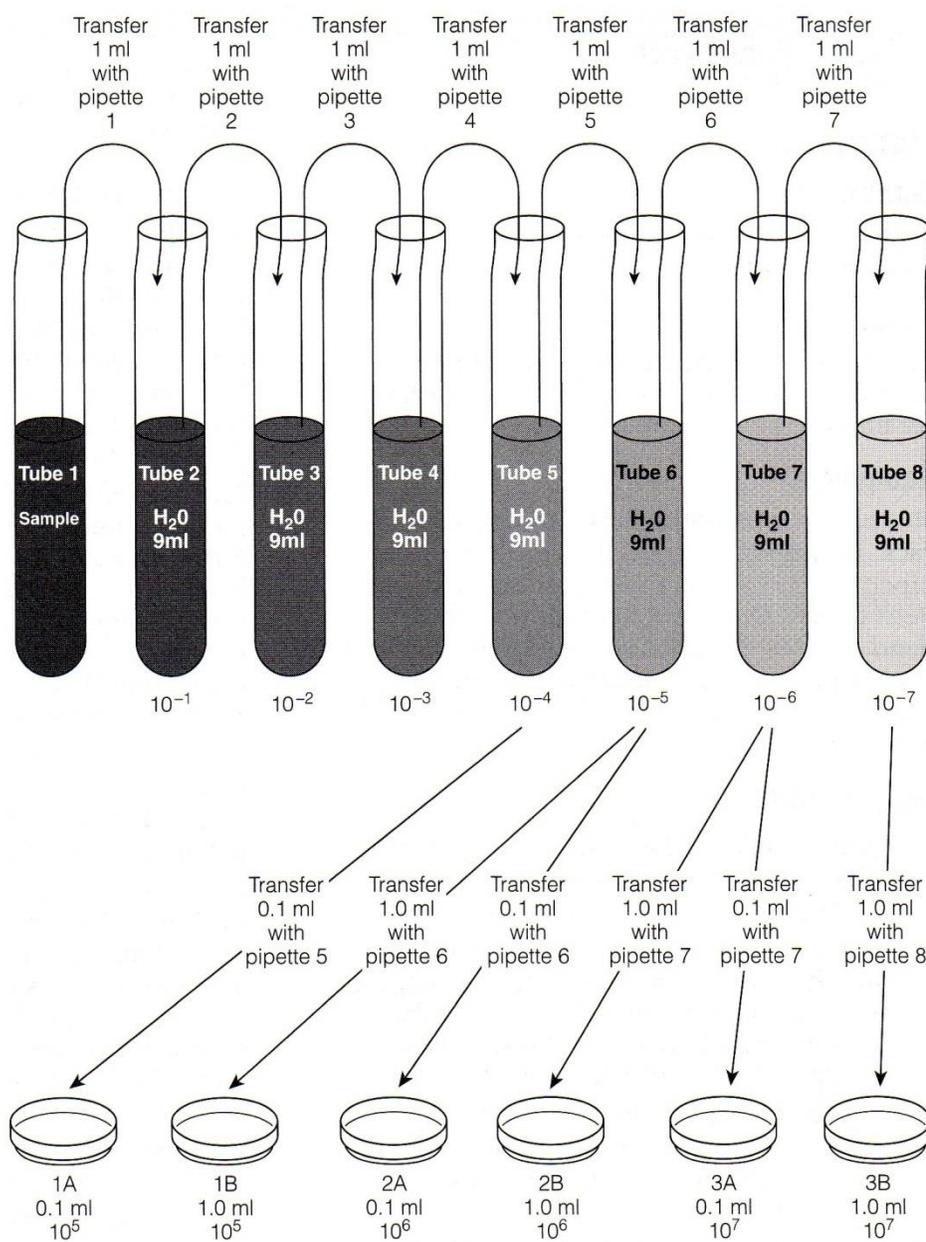
Media SDA untuk penetapan jumlah kapang dan khamir

6. Biarkan agar padat, setelah itu inkubasi pada suhu yang sesuai.

Media NA pada suhu 37°C, amati 1 – 5 hari

Media SDA pada suhu 20°C, amati 1 – 7 hari

7. Hitung jumlah koloni bakteri, kapang dan khamir yang tumbuh pada lempeng agar dan nyatakan dalam satuan cfu/mL.



Prosedur penghitungan jumlah mikroba pada lempeng agar dengan cara pengenceran

E. HASIL PENGAMATAN

1. Media NA	Jumlah Koloni pada hari ke						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol media							
Pengenceran 10 ⁻¹							
Pengenceran 10 ⁻²							
Pengenceran 10 ⁻³							
Pengenceran 10 ⁻⁴							

2. Media SDA	Jumlah Koloni pada hari ke						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol media							
Pengenceran 10 ⁻¹							
Pengenceran 10 ⁻²							
Pengenceran 10 ⁻³							
Pengenceran 10 ⁻⁴							

6.2 UJI STERILITAS

A. TUJUAN

Mahasiswa dapat menentukan apakah sediaan/alat yang harus ada dalam kondisi steril, memenuhi syarat sterilitas sebagai bagian persyaratan resmi dari pengawasan mutu.

B. PRINSIP

Menentukan ada/tidaknya pertumbuhan mikroba pada media yang diinokulasikan dan diinkubasikan pada suhu yang sesuai.

C. TEORI UMUM

Pengujian sterilitas dilakukan untuk menentukan apakah suatu sediaan, bahan/alat yang harus dalam keadaan steril telah memenuhi syarat sterilitas, sebagai bagian dari pengawasan mutu. Sterilitas dapat diartikan bahwa suatu sampel hanya dapat diyakini steril jika sampel tersebut seutuhnya bebas dari mikroba viable. Kriteria sterilitas merupakan persyaratan resmi untuk sediaan/bahan yang harus dalam kondisi steril, seperti sediaan parenteral (injeksi), obat tetes mata, jarum suntik, alat kontrasepsi, benang bedah, dan lain-lain.

Pengujian sterilitas dilakukan terhadap hanya suatu bagian kecil dari suatu batch atau lot sediaan, tetapi hasilnya harus dapat merefleksikan keadaan dari keseluruhan batch/lot tersebut. Jumlah sampel yang diambil untuk pemeriksaan sterilitas harus mewakili seluruh batch dan jumlahnya harus cukup agar hasilnya dapat memenuhi batas-batas keyakinan yang memadai.

Zat-zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang ada dalam sediaan yang diperiksa harus dinaktifkan atau dipisahkan dahulu sebelum inkubasi. Salah satu cara adalah dengan penggunaan membran filtrasi dan kemudian dilakukan inkubasi dari membran tersebut di atas media biakan.

Uji sterilitas dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan cara inokulasi langsung sediaan ke dalam media uji dan dengan teknik penyaringan membran. Cara penyaringan terutama berguna untuk sediaan yang mengandung cairan atau serbuk yang dapat larut yang bersifat bakteriostatik atau fungistatik.

D. ALAT, BAHAN DAN PROSEDUR PERCOBAAN

ALAT DAN BAHAN

- Media Fluid Thioglycolat (FTM)
- Media Tryptic Soybean Broth (TSB)
- Suspensi *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans*
- Tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril, Bunsen, dan pinset.

PROSEDUR PERCOBAAN

Uji sterilitas meliputi beberapa tahap pengujian sebagai berikut :

1. Uji Sterilitas Media

Uji sterilitas media digunakan untuk melihat apakah media yang akan digunakan itu steril atau tidak. Hasil yang didapat harus steril (media tetap jernih/tidak ada pertumbuhan mikroba).

Cara : Masukkan 10 mL media FTM dan TSB ke dalam tabung reaksi.

Inkubasi pada suhu 37°C untuk FTM dan 20°C untuk TSB, amati selama 1 - 14 hari. Lakukan duplo.

2. Uji Fertilitas

Uji fertilitas ini untuk melihat apakah media yang akan digunakan memenuhi syarat dapat menumbuhkan mikroba uji atau tidak.

Cara : Inokulasikan 1 mL suspensi mikroba uji ke dalam 9 mL media dalam tabung reaksi.

Bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada media FTM dan diinkubasikan pada suhu 35-37°C, amati selama 1 - 14 hari.

Candida albicans diinokulasikan pada media TSB dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C, amati selama 1 - 14 hari. Pengerjaan ini dilakukan duplo.

3. Uji Bakteriostatik dan Fungistatik

Sebelum melakukan uji sterilitas cara inokulasi langsung terhadap suatu sediaan, tetapkan dahulu tingkat aktivitas bakteriostatik dan fungistatik yang mungkin terdapat dalam sediaan yang akan diperiksa.

Cara : Inokulasikan 1 mL suspensi mikroba dan 1 mL sediaan ke dalam 9 mL media pada tabung reaksi.

Media FTM diinokulasikan dengan *Bacillus subtilis* dan sediaan, inkubasikan pada suhu 35-37°C, amati 1 - 14 hari.

Media TSB diinokulasikan dengan *Candida albicans* dan sediaan, inkubasikan pada suhu 20-25°C, amati 1 - 14 hari. Pengerjaan ini dilakukan duplo.

Jika sediaan uji menunjukkan adanya aktivitas bakteriostatik/fungistatik (sediaan uji menghambat pertumbuhan mikroba uji, yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan mikroba uji/media tetap jernih), maka dilakukan pengujian sterilitas dengan cara penyaringan. Dengan penyaringan, zat bakteriostatik/fungistatik yang terdapat dalam sediaan uji akan melewati membran. Sedangkan bila dalam sediaan uji terdapat mikroba, maka mikroba akan tertahan pada membran. Membran ini yang akan diinokulasikan ke dalam media.

4. Uji Sterilitas Cara Inokulasi Langsung

Cara : inokulasikan 1 mL sediaan uji ke dalam 9 mL media pada tabung reaksi.

Media FTM dan TSB, masing-masing diinokulasikan dengan 1 mL sediaan uji.

Inkubasikan di suhu 37°C untuk FTM dan 20°C untuk TSB, amati selama 1 - 14 hari. Pengerjaan ini dilakukan duplo.

E. HASIL PENGAMATAN

Nama Pengujian	Pengamatan hari ke														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Uji Sterilitas Media (FTM) Uji Fertilitas Uji Bakteriostatik Uji Sterilitas															
Uji Sterilitas Media (TSB) Uji Fertilitas Uji Fungistatik Uji Sterilitas															

Keterangan : (+) = terdapat pertumbuhan/keruh
 (-) = tidak terdapat pertumbuhan/tetap jernih

PERCOBAAN 7

PENENTUAN KONSENTRASI HAMBAT MINIMUM (KHM) DARI SUATU SEDIAAN UJI YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIBIOTIK

7.1 TUJUAN

Menentukan Minimum Inhibitory concentration (MIC) suatu sediaan uji terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif, dengan menggunakan metoda MIC cair atau MIC padat.

7.2 PRINSIP

7.3 TEORI UMUM

Suatu antibiotika mempunyai MIC yang berlainan terhadap bakteri tertentu. Kepekaan mikroba terhadap antibiotik dapat di lihat dari konsentrasi minimum untuk inhibisi oleh suatu antibiotika terhadap mikroba tertentu. Penetapan MIC dapat dilakukan dengan menguji sederetan konsentrasi yang di buat dengan pengenceran, metode yang digunakan dapat dengan cara turbidimetri ataupun cara difusi agar. Konsentrasi terendah dimana pertumbuhan bakteri terhambat dinyatakan sebagai konsentrasi minimum untuk inhibisi (MIC)

Penentuan kepekaan mikroba terhadap antibiotika harus dilakukan secara invitro yang dinyatakan dalam MIC dan aktivitas penghambatannya pada MIC tersebut. MIC ini tidak dapat di anggap akan setara dengan MIC in vivo karena dalam tubuh manusia terjadi biotransformasi antibiotika, terjadi penguraian atau fiksasi antibiotika pada protein plasma sehingga aktivitas antibiotika akan berkurang. Setiap antibiotika mempunyai sifat farmakokinetika yang berbeda tergantung pada sifat fisikokimianya dan karakteristik fisiologi individual pemakai.

7.4 PROSEDUR PERCOBAAN

A. METODE MIC CAIR

ALAT DAN BAHAN

- Alat : mortir dan stamper, tabung reaksi besar dan kecil, rak tabung, pipet volum berukuran 1 mL dan 10 mL, Labu ukur 100 mL, Ose dan kompor spirtus, inkubator.
- Bahan : Sediaan uji, Berbagai suspensi bakteri gram positif dan gram negatif, Nutrien Broth (NB) double strenght, Nutrien Broth (NB), pelarut sediaan uji, Air Suling.

PROSEDUR

1. Masukkan sediaan uji kedalam labu ukur, larutkan dengan sedikit pelarutnya. Kemudian tambahkan air suling steril sampai tanda batas. Jika sediaan uji berbentuk padat, gerus dahulu dalam mortir, sebelum dimasukkan dalam labu ukur.
2. Rencanakan pengenceran dan perhitungan konsentrasi campuran pada masing-masing tabung besar dan tabung-tabung kecil.
3. Buat pengenceran bertingkat larutan uji dengan air suling dalam tabung-tabung reaksi besar.
4. Isi tabung reaksi kecil pertama dengan 1 mL NB Double Strenght, sedangkan tabung-tabung reaksi selanjutnya dengan 1 mL NB biasa.
5. Pipet 1 mL hasil pengenceran terakhir ke dalam tabung 1 berisi NB double strength, kocok sampai homogen.
6. Pipet 1 mL campuran dari tabung 1 ke tabung 2, kocok sampai homogen.
7. Ulangi langkah tersebut sampai tabung terakhir. Buang 1 mL campuran dari tabung terakhir.

8. Tambahkan 1 ose bakteri kedalam masing-masing tabung kecil, kocok sampai homogen.
9. Ulangi langkah 3 sampai 7 untuk bakteri yang lain.
10. Buat kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif terdiri dari 1mL NB dan 1 ose bakteri (salah satu saja). Kontrol negatif hanya berisi 1mL NB
11. Inkubasikan semua tabung kecil pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Amati kekeruhan yang terjadi, bandingkan dengan kontrol positif dan negatif.
12. Tentukan dimana MIC nya. MIC terletak pada tabung bening yang terakhir atau sebelum tabung keruh pertama.

B. METODA MIC PADAT

ALAT DAN BAHAN

- Alat : Mortir dan Stamfer, tabung reaksi besar, rak tabung reaksi, cawan petri, pipet volum berukuran 1 mL dan 10 mL, labu ukur 100mL, ose dan kompor spirtus, inkubator.
- Bahan : Sediaan uji, berbagai suspensi bakteri gram positif maupun gram negetif, *Nutrien Agar* (NA), pelarut sediaan uji, air suling.

PROSEDUR

1. Masukkan sediaan uji kedalam labu ukur, larutkan dengan sedikit pelarutnya. Kemudian tambahkan air suling steril sampai tanda batas. Jika sediaan uji berbentuk padat, gerus dahulu dalam mortir, sebelum dimasukkan dalam labu ukur.
2. Rencanakan pengenceran dan hitung konsentrasi campuran pada masing-masing tabung besar dan cawan-cawan petri.
3. Buat pengenceran bertingkat larutan sediaan uji dengan air suling dalam tabung-tabung reaksi besar.
4. Bagi permukaan dasar cawan menjadi area-area sama besar. Beri label nama bakteri yang akan digunakan pada setiap area.
5. Pipet 1 mL masing-masing pengenceran kedalam cawan-cawan petri tambahkan 19 mL NA cair bersuhu 40-50°C, goyangkan beberapa saat, lalu diamkan sampai membeku.
6. Goreskan masing-masing bakteri pada area yang terpisah dengan menggunakan ose. Buat kontrol positif yang terjadi dari 20 mL NA dalam cawan petri, yang digoreskan oleh bakteri-bakteri yang digunakan di area yang terpisah.
7. Inkubasikan semua cawan petri pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Amati pertumbuhan bakteri dari koloni-koloni yang tampak. Bandingkan morfologi koloni-koloni tersebut dengan kontrol positif.
8. Tentukan dimana MIC-nya. MIC terletak pada cawan petri terakhir yang tidak tampak koloni bakteri.

7.5 DATA PENGAMATAN
A. METODA MIC CAIR

PENGAMATAN	TABUNG REAKSI							
	1	2	3	4	5	6	7	n
KEKERUHAN								

Keterangan :
(+) : Bening
(-) : keruh

B. METODA MIC PADAT

JENIS BANKTERI	CAWAN PETRI		
	1	2	3

Keterangan :
(+) : tidak ada pertumbuhan
(-) : ada pertumbuhan

PERCOBAAN 8 UJI AKTIVITAS PENGAWET

8.1 TUJUAN

Mahasiswa mampu dan mengerti praktikum ini untuk menetapkan efektivitas antimikroba meliputi penentuan kesesuaian dan kinerja minimal pengawet dalam kosmetika dan obat. Mampu memastikan dan mengevaluasi efektifitas kesesuaian pengawet dan kinerja minimal pengawet.

8.2 PRINSIP

- Uji tantang terhadap produk bebas cemaran dengan menggunakan mikroba baku yang telah ditetapkan, kemudian produk yang telah diinokulasi tersebut disimpan pada suhu yang telah ditetapkan.
- Penghitungan jumlah mikroba baku yang bertahan hidup dalam produk yang diuji, pada interval waktu yang ditentukan dengan metode angka lempeng.
- Penentuan produk yang memenuhi kriteria, merupakan produk yang menggunakan pengawet yang sesuai, baik untuk proses pembuatan maupun penggunaan oleh konsumen
- Penentuan produk yang tidak memenuhi kriteria, merupakan produk yang tidak menggunakan pengawet yang sesuai.

8.3 TEORI DASAR

Merupakan Metode Kompendial yang mengevaluasi kemampuan zat preservatif pada sampel dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur pada kondisi yang sesuai dan dinyatakan dengan satuan log reduksi.

Pengawet adalah zat yang ditambahkan pada sediaan non steril atau sediaan steril untuk melindungi produk dari pertumbuhan mikroba *adverten* pada:

- *Pre & post market* → Sediaan Non Steril
- Pemakaian Berulang → Sediaan Steril

Uji Efektivitas Pengawet perlu dilakukan karena untuk memastikan bahwa sediaan farmasi memiliki kadar pengawet yang efektif dan tidak toksik bagi manusia serta merupakan Mandat Regulatory

- Perka BPOM HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 → Kosmetika
- Farmakope (FI IV, USP, JP, EP, dll) → Sediaan Farmasi
- UU No 8 tahun 1999 ttg Perlindungan Konsumen

8.4 ALAT, BAHAN DAN PROSEDUR PERCOBAAN

ALAT DAN BAHAN

Biohazard cabinet, Otoklaf, Oven, Inkubator suhu $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ dan $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, Vortex mixer, Butir kaca (glass beads), Pipet ukur berskala, Cawan Petri, Hemositometer dan mikroskop fase-kontras (jika ada), Spektrofotometer/kolorimeter (jika ada), Alat hitung koloni (colony counter), Timbangan top-loading, pH meter

MEDIA DAN PEREAKSI

Media bentuk kering dengan fungsi setara, yang telah diuji sterilitas dan kemampuannya dalam menumbuhkan mikroba baku yang sesuai, terdiri dari:

- Nutrient Agar atau yang setara (Tryptic Soy Agar/TSA)
- Lethen Agar atau Tryptic Soy Agar + 1% Tween 80 (TSAt)
- Mycophil Agar pH 4,7 atau Potato Dextrose Agar + antibiotik (PDAA)/SDAA atau Sabouraud Dextrose Agar + 1% Tween 80 (SDAt)
Lethen Broth atau Peptone Salin + 1% Tween 80

- Larutan Dapar Klorida atau yang setara
- Larutan Pengencer 1 steril (0,1% Peptone dalam NaCl 0,9%)
- Larutan Pengencer 2 steril (0,05% Tween 80 dalam NaCl 0,9%)
- Mc. Farland (BaSO₄) no.2 (jika tersedia),

MIKROBA UJI

- Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, CIP 82.118, atau yang setara
- Staphylococcus aureus ATCC 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83, NCTC 10788)
- Candida albicans ATCC 10231 (NCPF 3179, IP 48.72)
- Enterobacter aerogenes ATCC 13048
- Aspergillus niger ATCC 16404 (IMI 149007, IP 1431.83)

PEMELIHARAAN MIKROBA UJI

Mikroba uji dipelihara pada media yang sesuai:

- Bakteri dengan Nutrient Agar (TSA atau yang setara)
- Kapang dan khamir dengan Mycophil Agar pH 4,7 (PDAA/SDAA atau yang setara).

PROSEDUR PERCOBAAN

A. PENYIAPAN UJI MIKROBA

1. Mikroba hidup yang digunakan dalam uji harus tidak boleh lebih dari turunan kelima biakan asli ATCC.
2. Goreskan stok biakan Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, dan Enterobacter aerogenes pada agar miring TSA dan inkubasi pada 35 °C selama 18-24 jam.
3. Goreskan stok biakan Candida albicans pada agar miring SDAA dan inkubasi pada 25 °C selama 48 jam.
4. Goreskan stok biakan Aspergillus niger pada agar miring SDAA dan inkubasi pada 25 °C selama 7-14 hari atau sampai sporulasi sempurna.

B. PEMANENAN BIAKAN MIKROBA UJI

1. Cuci setiap biakan bakteri dan khamir dengan 2 x 2,5 mL larutan pengencer 1; dan biakan kapang dengan 2 x 2,5 mL larutan pengencer 2, lepaskan biakan dari permukaan agar dengan bantuan butir kaca steril. Pindahkan suspensi ke dalam tabung reaksi steril dan campur menggunakan vortex mixer agar tersebar merata.
2. Sesuaikan setiap pencucian dengan pengencer yang sama untuk menghasilkan 10⁸ cfu/mL suspensi bakteri dan 10⁷ cfu/mL suspensi khamir dan kapang. Bandingkan suspensi dengan larutan standar Mc. Farland (BaSO₄) no.2, pengukuran absorbansi atau metode lain yang berkaitan dengan Angka Lempeng Total (ALT) sebagaimana akan dijelaskan dalam poin C dan D.

C. PENENTUAN JUMLAH BAKTERI UJI DENGAN METODE ALT-CARA SEBAR

1. Permukaan Tuang sekitar 15 - 20 mL TSA yang telah dicairkan pada cawan Petri steril dan biarkan memadat.
2. Isi masing-masing dari 10 tabung steril dengan 9 mL larutan pengencer 1.
3. Inokulasi 1 mL dari masing-masing suspensi bakteri (Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, dan Enterobacter aerogenes) ke dalam tabung reaksi pertama yang mengandung 9 mL pengencer 1 (tandai sebagai 10⁻¹). Ulangi proses pengenceran 10-kali hingga 10⁻¹⁰. Campur menggunakan vortex mixer untuk menjamin distribusi yang homogen.

4. Pipet 0,5 mL suspensi dari pengenceran 10⁻⁴ hingga 10⁻¹⁰ dan sebarkan ke permukaan TSA, dilakukan secara duplo.
5. Setelah suspensi diserap oleh media, balikkan cawan dan inkubasi pada 35± 2°C selama 24-48 jam.
6. Catat pertumbuhan antara 30-300 koloni. Total koloni merupakan hasil penjumlahan koloni dari kedua cawan Petri, dikalikan faktor pengenceran. Gunakan suspensi mengandung 10⁸ cfu/mL bakteri uji.
7. Gunakan bakteri segera atau simpan di kulkas pada 2-8°C selama tidak lebih dari 72 jam.

D. PENENTUAN JUMLAH KAPANG DAN KHAMIR UJI DENGAN METODE ALT-CARA TUANG

1. Cairkan SDAa dan jaga suhu pada 45-50 °C dalam tangas air.
2. Isi masing-masing 10 tabung reaksi steril dengan 9 mL pengencer (pengencer 1 untuk *Candida albicans* dan pengencer 2 untuk *Aspergillus niger*).
3. Inokulasi 1 mL *Candida albicans* ke dalam tabung reaksi pertama yang berisi pengencer 1 dan *Aspergillus niger* ke dalam tabung reaksi pertama berisi pengencer 2. Ulangi proses dengan menginokulasi 1 mL suspensi dari tabung reaksi pertama ke dalam tabung reaksi kedua. Lakukan seri pengenceran kelipatan 10 hingga 10⁻¹⁰. Campur menggunakan vortex mixer untuk menjamin homogenitas contoh.
4. Pipet 1 mL suspensi dari pengenceran 10⁻⁴ hingga 10⁻¹⁰ ke dalam cawan petri steril, lakukan secara duplo. Tuang sekitar 15-20 mL SDAa yang telah dicairkan ke dalam setiap cawan, tutup, goyang perlahan dan biarkan memadat.
5. Inkubasi pada 25±2°C selama 48 jam (khamir) dan 72 jam (kapang) dalam posisi cawan dibalik.
6. Catat pertumbuhan antara 30-300 koloni. Total koloni merupakan rata-rata koloni dari kedua cawan Petri, dikalikan faktor pengenceran.
7. Gunakan suspensi yang mengandung 10⁷ cfu/mL khamir dan kapang untuk uji.
8. Gunakan mikroba segera atau simpan di kulkas pada 2-8°C selama tidak lebih dari 72 jam.

E. PENYIAPAN UJI SAMPLING

Siapkan 5 x 100 g contoh dalam 5 wadah gelas yang sesuai. Tandai dengan tepat (3 wadah untuk mikroba uji bakteri dan 2 wadah untuk kapang dan khamir).

1. **Kosmetik cair.** Gunakan produk secara langsung untuk uji.
2. **Krim dengan dasar air dan losion.** Larutkan menggunakan larutan dapar klorida dengan perbandingan sama (1:1). Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan vortex mixer dengan bantuan butir kaca.
3. **Padat dan serbuk.** Campur produk dengan larutan dapar klorida dengan perbandingan yang sama. Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan vortex mixer dengan bantuan butir kaca.
4. **Produk berbasis minyak/lemak.** Campur 100 g contoh dengan 20 g minyak mineral sehingga terbentuk pasta. Tambahkan 80 mL larutan dapar klorida. Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan vortex mixer dengan bantuan butir kaca.

5. **Aerosol.** Simpan seluruh wadah dalam refrigerator (2-8C) selama 30 menit. Pindahkan 50 g aerosol ke dalam wadah yang berisi 50 mL larutan dapar klorida. Homogenkan menggunakan vortex mixer dengan bantuan butir kaca.

PROSEDUR UJI SAMPLING

1. Contoh harus diverifikasi tidak adanya pertumbuhan bakteri, khamir dan kapang, menggunakan metode uji "Penetapan Angka Kapang Khamir dan Uji Angka Lempeng Total dalam Kosmetika". Hal ini harus dilakukan sebelum melangkah ke proses lebih lanjut.
2. Inokulasi masing-masing wadah contoh dengan 1 mL suspensi dari tiap mikroba uji yang mengandung 1,0 hingga $9,9 \times 10^6$ cfu/mL (untuk bakteri) atau 1,0 hingga $9,9 \times 10^5$ cfu/mL (untuk khamir dan kapang) [volume suspensi sebaiknya tidak melebihi 1% dari jumlah contoh yang diuji]. Homogenkan menggunakan vortex mixer.
3. Pindahkan masing-masing 20 g dari contoh yang telah diinokulasi (sebagaimana tercantum dalam NO 2) ke dalam 4 wadah yang berbeda untuk diuji dalam jangka waktu 2, 7, 14 dan 28 hari. Untuk tujuan validasi, uji kontrol harus dilakukan bersamaan dengan uji contoh: hari ke-0, 2, 7, 14, dan 28
 - Inokulasi 100 g contoh tanpa pengawet atau 100 g larutan fisiologis NaCl steril yang mengandung 1% Tween 80 dengan 1 mL suspensi dari salah satu mikroba uji untuk menghasilkan 1,0 hingga $9,9 \times 10^6$ cfu/mL (untuk bakteri) atau 1,0 hingga $9,9 \times 10^5$ cfu/mL (untuk khamir dan kapang) sebagai kontrol.
 - Pindahkan 1 mL contoh dalam waktu 30 menit dari masing-masing wadah untuk diuji pada hari ke-0, 2, 7, 14 dan 28 hari. Lakukan pengujian dengan melakukan seri pengenceran kelipatan 10 menggunakan larutan pepton salin yang mengandung 1% polisorbitat 80.
 - Catatan: contoh yang belum diuji disimpan pada suhu ruangan (20-25°C) selama pengujian.
 - Tentukan jumlah mikroba hidup dengan menggunakan metode ALT cara sebar permukaan pada TSA_t untuk bakteri dan metode ALT cara tuang dengan menggunakan SDA_t untuk khamir dan kapang. Lakukan secara duplo.
 - Inkubasi bakteri pada $35 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 - 48 jam, khamir dan kapang pada $25 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 3 - 5 hari. Hitung jumlah mikroba yang bertahan hidup tiap g atau mL contoh.
 - Identifikasi mikroba dengan pewarnaan Gram

CARA PERHITUNGAN

A. **Persentase Reduksi**, dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Reduksi} = \frac{\text{jumlah inokulum } (t_0) - \text{jumlah inokulum produk } (t_1)}{\text{jumlah inokulum } (t_0)} \times 100\%$$

catatan:

t_0 adalah jumlah koloni yang diperoleh dari hasil pengujian hari ke-0

t_i adalah jumlah koloni yang diperoleh dari hasil pengujian hari ke-i (hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-28)

B. **Log Reduksi** dihitung dengan rumus:

$$\text{Log Reduksi} = \log \text{jumlah inokulum } t_0 - \log \text{jumlah pada interval produk } t_i$$

C. Interpretasi Data

Pengawet harus menunjukkan aktivitas terhadap mikroba uji sebagai berikut:

- Jumlah bakteri dan khamir harus menunjukkan penurunan sekurang-kurangnya 99,0% (2 log) pada hari ke 2 dan 99,9% (3 log) pada hari ke 7 untuk setiap mikroba uji dan tidak ada peningkatan lagi selama uji selanjutnya dalam variasi data yang normal.
- Jumlah kapang seharusnya menunjukkan penurunan 90,0% (1 log) pada hari ke 14 dan 99,0% (2 log) pada hari ke 28.

PERCOBAAN 9

PENENTUAN KERENTANAN SUATU ANTIBIOTIK TERHADAP SEDIAAN ANTIBIOTIKA

9.1 TUJUAN

Menentukan kerentanan suatu bakteri terhadap berbagai sediaan antibiotika, melalui tes resistensi dengan metoda cakram kertas (*paper disk plate*).

9.2 TEORI UMUM

Resistensi bakteri terhadap antibiotika membawa masalah tersendiri yang dapat menggagalkan terapi dengan antibiotika. Resistensi dapat merupakan masalah individual dan epidemiologik. Resistensi adalah ketahanan mikroba terhadap antibiotika tertentu yang dapat berupa resistensi alamiah, resistensi karena adanya mutasi spontan (resistensi kromosomal) dan resistensi karena adanya faktor R pada sitoplasma (resistensi ekstrakromosomal) atau resistensi karena pemindahan gen yang resisten atau faktor R atau plasmid (resistensi silang).

Beberapa mikroba tidak peka terhadap antibiotika tertentu karena sifat mikroba secara alamiah tidak dapat diganggu oleh antibiotika tersebut. Hal ini disebabkan oleh tidak adanya reseptor yang cocok atau dinding sel mikroba tidak dapat ditembus oleh antibiotika. Resistensi kromosomal terjadi karena mutasi spontan pada gen kromosom. Resistensi kromosomal dapat dibagi dalam dua golongan yaitu:

1. Resistensi kromosomal primer, dimana mutasi dapat terjadi sebelum pengobatan dengan antibiotika dan selama pengobatan terjadi seleksi bibit yang resisten
2. Resistensi kromosomal sekunder, dimana mutasi terjadi selama kontak dengan antibiotika kemudian terjadi seleksi bibit yang resisten.

Kecepatan timbulnya resistensi bervariasi untuk berbagai antibiotika. Kelompok aminoglikosida, makrolida dan rifampisin termasuk kelompok yang cepat menimbulkan resistensi mikroba, sedangkan kelompok tertasiklin dan kelompok kloramfenikol digolongkan ke dalam kelompok yang tidak terlampau cepat menimbulkan resistensi. Kelompok yang lambat menimbulkan resistensi umumnya karena terjadi mutasi langsung dan kelompok lain umumnya termutasi setelah berkembangbiak beberapa tahap.

Penyebab terjadinya resistensi mikroba adalah penggunaan antibiotika yang tidak tepat, misalnya penggunaan dengan dosis yang tidak memadai, pemakaian yang tidak teratur atau tidak kontinyu, demikian jugawaktu pengobatan yang tidak cukup lama. Maka untuk mencegah atau memperlambat timbulnya resistensi mikroba, harus diperhatikan cara penggunaan antibiotika yang tepat.

9.3 ALAT DAN BAHAN

ALAT

- Cawan petri
- Lidi kapas dan kompor spirtus
- Inkubator
- Jangka sorong

BAHAN

- Suspensi bakteri uji
- *Nutrient Ager* (NA)
- Berbagai cakram kertas antibiotika dengan konsentrasi tertentu

9.4 PROSEDUR PERCOBAAN

1. Tuangkan 20 ml NA cair bersuhu 40-50°C ke dalam masing-masing cawan petri, lalu diamkan sampai membeku.
2. Dengan menggunakan lidi kapas steril, ulaskan suspensi bakteri uji ke seluruh permukaan agar dalam cawan-cawan petri sampai merata. Biarkan selama kurang lebih 1 jam.
3. Letakkan cakram-cakram antibiotika pada permukaan agar dengan jarak sedemikian rupa, sehingga diharapkan tidak terjadi penumpukkan zona inhibisi.
4. Inkubasikan semua cawan petri pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Ukur zona inhibisi yang terjadi dengan menggunakan jangka sorong.

9.5 HASIL PENGAMATAN

CAWAN PETRI	ZONA INHIBISI (mm)				
	A	B	C	D	E
1					
2					

Keterangan:

A, B, C, D, E : Cakram-cakram antibiotika dengan konsentrasi tertentu

PERCOBAAN 10 UJI KOEFISIEN FENOL

10.1 TUJUAN

Mahasiswa mampu 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

10.2 PRINSIP

Pertumbuhan bakteri uji pada media yang sesuai setelah bakteri tersebut kontak dengan disinfektan dalam waktu 5, 10, dan 15 menit.

10.3 TEORI UMUM

Untuk menentukan kualitas desinfektan yaitu menentukan daya bunuh desinfektan terhadap kuman adalah dengan menggunakan metode koefisien fenol. Fenol adalah jenis desinfektan yang paling kuno dan karena kekuatannya telah diketahui maka kualitas desinfektan selalu dibandingkan dengan fenol.

Koefisien fenol adalah bilangan pecahan yang menunjukkan perbandingan kekuatan daya bunuh dari desinfektan dibandingkan dengan kekuatan daya bunuh dari fenol sebagai pembanding dalam kondisi yang sama, yaitu jenis bakteri yang sama dan waktu kontak yang sama. Waktu untuk menguji antibiotika adalah 18-24 jam. Sedangkan untuk mata tidak mungkin selama itu. Oleh karena itu, digunakan waktu tertentu dengan metode kontak secara konvensional, waktu yang paling cepat adalah 2,5 menit, paling lama 15 menit. Kekuatan fenol untuk menguji desinfektan adalah tidak lebih besar dari 5%.

Ciri-ciri suatu desinfektan yang ideal adalah memenuhi hal-hal sebagai berikut:

1. Aktifitas antimikrobial, pada konsentrasi rendah harus mempunyai aktivitas antimikrobial dengan spektrum luas.
2. Kelarutan, harus dapat larut dalam air atau pelarut lain sampai taraf yang diperlukan untuk dapat digunakan secara efektif.
3. Stabilitas perubahan yang terjadi pada substansi bila dibiarkan beberapa hari harus seminimal mungkin dan tidak boleh menghilangkan antimikrobialnya secara nyata.
4. Tidak bersifat racun
5. Homogen
6. Tidak bergabung dengan bahan organik
7. Aktivitas antimikrobal pada suhu kamar
8. Tidak menimbulkan karat dan warna
9. Kemampuan menghilangkan bau yang kurang sedap
10. Memiliki kemampuan sebagai detergen
11. Tersedia dalam jumlah yang besar dengan harga yang pantas

10.4 ALAT DAN BAHAN

ALAT

- * Tabung reaksi
- * Ose
- * Pencatat waktu (stopwatch)
- * Mc Farland III (109 kuman/ml)
- * Vortex
- * Stiker label
- * Spiritus

BAHAN

- * Nutrient Broth
- * Air suling steril

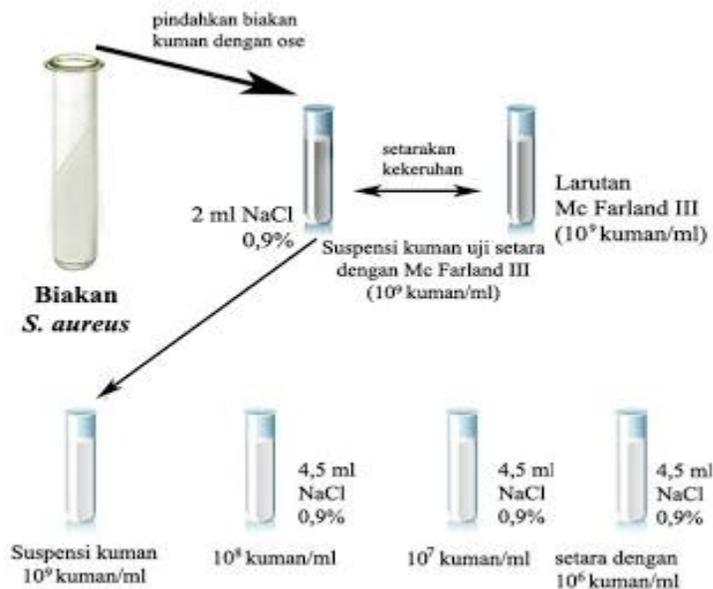
- * *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 dalam agar nutrisi (Gram +)
- * *Salmonella thyphosa* ATCC 6539 dalam agar nutrisi (Gram -)
- * Larutan NaCl fisiologis 0,9%
- * Fenol standar
- * Desinfektan uji

10.5 PROSEDUR PERCOBAAN

A. PEMBUATAN MEDIA

Nutrient Broth dimasukkan dalam 12 tabung reaksi ukuran 20 x 150 mm, volume masing-masing dibuat 5 ml. Komposisi perliter terdiri dari pepton 10 g, ekstrak daging 5 g, dan NaCl 5 g; pH akhir 6,8.

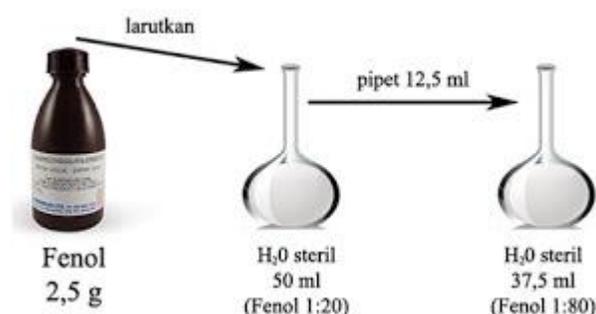
B. PEMBUATAN INOKULUM



Bakteri *Salmonella thyphosa* atau *Staphylococcus aureus* sebelumnya telah ditanam pada agar nutrisi (Nutrient Agar) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Tahap pengenceran bakteri uji adalah sebagai berikut:

1. Siapkan tabung reaksi berisi 2 ml NaCl fisiologis 0,9%
2. Pindahkan biakan *S. thyphosa* atau *S. aureus* tersebut (pilih salah satu) ke dalam larutan NaCl dengan ose, dan setarakan kekeruhannya dengan larutan Mc Farland III (109 kuman/mL)
3. Suspensi kuman tersebut kini diperkirakan berisi 109 kuman/mL
4. Siapkan 3 buah tabung reaksi masing-masing berisi 4,5 ml NaCl fisiologis 0,9%
5. Pipet 0,5 mL dari suspensi kuman sebelumnya (109 kuman/mL), pindahkan ke salah satu tabung reaksi berisi 4,5 ml NaCl. Suspensi kuman kini berkonsentrasi 108 kuman/mL
6. Lakukan pengenceran kedua dengan mengambil 0,5 ml dari suspensi kuman 108 dan memindahkannya ke dalam tabung berisi 4,5 NaCl yang kedua. Suspensi kuman kini berkonsentrasi 107 kuman/mL
7. Pengenceran terakhir dilakukan dengan memindahkan 0,5 mL dari suspensi kuman 107 ke dalam tabung terakhir NaCl. Suspensi kuman telah setara dengan 106 kuman/ml. Suspensi bakteri dengan konsentrasi inilah yang akan digunakan untuk melakukan uji praktikum ini.

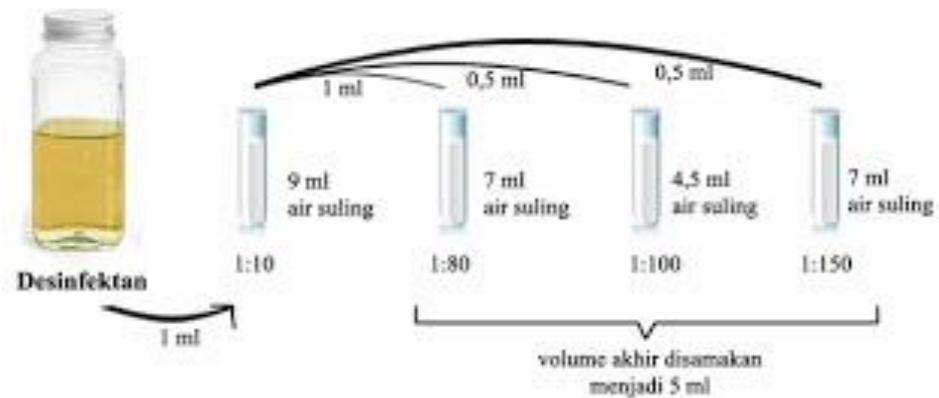
C. PEMBUATAN BAKU FENOL



Dibuat larutan persediaan baku fenol 5% dengan cara menimbang 2,5 g fenol dalam 50 ml air suling steril. Kemudian dilakukan pengenceran konsentrasi menjadi 1:80 dengan mempipet 12,5 ml larutan fenol 5%

ditambahkan dengan 37,5 ml air suling steril pada tabung steril ukuran 25 x 150 mm.

D. PEMBUATAN LARUTAN DESINFEKTAN



Pengenceran larutan desinfektan dilakukan pada tabung steril berukuran 25 x 150 mm. Tahapannya adalah sebagai berikut:

- Siapkan 4 buah tabung steril berisi aquades dengan volume yang berbeda-beda di dalamnya yaitu 9 ml, 7 ml, 4,5 ml, dan 7 ml, secara berurutan
- Lakukan pengenceran pertama dengan memipet 1 ml larutan desinfektan ke dalam 9 ml air suling sehingga konsentrasi menjadi 1:10
- Pengenceran selanjutnya adalah dengan memindahkan 1 ml desinfektan 1:10 ke dalam tabung berisi 7 ml air suling. Konsentrasi desinfektan pada tabung ini adalah 1:80
- Pindahkan 0,5 ml desinfektan 1:80 ke dalam 4,5 ml aquades sehingga konsentrasi kini 1:100
- Pipet 0,5 ml desinfektan 1:100 ke dalam tabung berisi 7 ml air suling sehingga konsentrasi pada tabung ini adalah 1:150
- Desinfektan yang akan dipakai selanjutnya adalah yang konsentrasinya 1:80, 1:100, dan 1:150. Oleh karena itu, samakan volumenya masing-masing menjadi 5 ml

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 F5', F10', F15', 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'.

Uji Fenol

Pipet inokulum berkonsentrasi 106 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam larutan fenol 1:80. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung berlabel F5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung F10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung F15'.

Uji 1:80

Pipet inokulum berkonsentrasi 106 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam desinfektan 1:80. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran

tersebut ke dalam tabung berlabel DES 1:80 5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:80 10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:80 15'.

Uji II 1:100

Pipet inokulum berkonsentrasi 10^6 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam desinfektan 1:100. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung berlabel DES 1:100 5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:100 10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:100 15'.

Uji III 1:150

Pipet inokulum berkonsentrasi 10^6 kuman/ml sebanyak 0,5 ml ke dalam desinfektan 1:150. Tunggu sampai 5 menit, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung berlabel DES 1:150 5'. Lima menit kemudian, ambil lagi 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:150 10'. Setelah lima menit kemudian, ambil 1 ose dari campuran tersebut ke dalam tabung DES 1:150 15'.

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

10.6 HASIL PENGAMATAN

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

JENIS PENGECERAN		WAKTU / MENIT		
		5	10	15
FENOL	1 : 80			
DESINFEKTAN	1 : 80			
DESINFEKTAN	1 : 100			
DESINFEKTAN	1 : 150			

PERCOBAAN 11 PENETAPAN RESPON ANTIMIKROBA TERHADAP ZAT ANTIMIKROBA

11.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat melakukan penetapan respon mikroba terhadap zat antimikroba, yang salah satu contoh pengujiannya adalah penetapan potensi antibiotika.

11.2 PRINSIP

Membandingkan respon dari mikroba yang peka, dalam kondisi pertumbuhan yang sama (identik) dari dosis sediaan uji (sampel) terhadap sediaan atau zat baku (standar) yang telah diketahui konsentrasi dan potensinya. Respon tersebut berupa efek hambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji.

11.3 TEORI UMUM

Penetapan potensi antibiotika termasuk kepada cara-cara penetapan dengan menggunakan metoda hayati, dimana jasad hayati yang digunakan adalah mikroba.

Teknik penetapan potensi antibiotika yang umum digunakan meliputi dua cara, yaitu :

1. Cara Difusi (cara lempeng)

Zat yang diuji berdifusi dari pencadang (reservoir) ke dalam media agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba penguji. Setelah inkubasi, diameter hambatan pertumbuhan diukur dan dibandingkan.

2. Cara Tabung (cara turbidimetri)

Pada cara ini digunakan media cair. Kekeruhan yang disebabkan oleh pertumbuhan mikroba diukur dengan mempergunakan instrumen yang cocok, misalnya spektrofotometer.

Selain perbedaan dalam teknik pengerjaannya, kedua cara di atas mempunyai dasar yang sama yaitu :

- Membandingkan sediaan uji yang tidak diketahui potensinya terhadap baku pembanding (standar) yang telah diketahui potensinya.
- Mengukur efek hambatan dari pertumbuhan mikroba yang dipergunakan.
- Adanya hubungan kuantitatif antara konsentrasi zat aktif dan respon.
- Hubungan kuantitatif tersebut, sama-sama diberikan baik oleh sediaan baku pembanding maupun sediaan uji.

11.4 PROSEDUR PERCOBAAN

ALAT DAN BAHAN

- Cawan petri, tabung reaksi, Ose bundar, pinset, labu takar 25 mL dan 10 mL, rak tabung reaksi, pipet agar 20 mL, pipet ukur 1 mL, erlenmeyer, pipet tetes, bunsen, pencadang logam, jangka sorong
- Inkubator 37°C, *Antibiotic Zone Reader*, Spektrofotometer, pH meter
- Media Nutrien Agar, Akuades steril (pelarut), larutan dapar pH 8,0 (larutan pengencer)
- Suspensi *Escherichia coli* dengan transmitan 25%
- Kloramfenikol standar
- Sampel Uji

PROSEDUR

- Beri tanda cawan petri yang akan dipergunakan sesuai pola dengan menggunakan spidol.
- Pembuatan Agar inokula 2%
Agar inokula adalah campuran dari nutrien agar dengan suspensi mikroba, yaitu untuk 100 mL agar ditambahkan 2 mL suspensi mikroba. Pencampuran

ini dilakukan dalam Erlenmeyer, yang kemudian setelah tercampur homogen dituangkan ke dalam cawan petri yang telah bertanda sebanyak 20 mL. Biarkan padat.

3. Persiapan kloramfenikol standar
Ditimbang sejumlah tertentu **ampisillin** standar dan dilarutkan dalam aquadest steril hingga diperoleh larutan induk standar dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan dapar pH 8,0 hingga diperoleh dosis S₁ – S₅.
4. Persiapan Larutan Uji
Larutan uji dibuat dengan konsentrasi dosis sama dengan S₃ atau R.
5. Setelah agar inokula padat, letakkan pencadang logam di atas agar tersebut. Kemudian teteskan larutan standar dan larutan uji sebanyak 0,1 mL pada tiap-tiap pencadang yang bertanda sama dengan larutan yang akan ditetaskan.
6. Pre inkubasi pada suhu kamar, selama 20 – 30 menit. Kemudian inkubasikan pada suhu 37°C, selama 18 – 24 jam.
7. Amati diameter hambatan yang terjadi dan ukur. Hitung dengan menggunakan perhitungan regresi.

11.5 DATA PENGAMATAN

Diameter hambatan (mm x 10)

Seri I	S ₁	R	S ₁	R	S ₁	R
Cawan 1						
Cawan 2						
Cawan 3						
Seri II	S ₂	R	S ₂	R	S ₂	R
Cawan 1						
Cawan 2						
Cawan 3						
Seri III	S ₄	R	S ₄	R	S ₄	R
Cawan 1						
Cawan 2						
Cawan 3						
Seri IV	S ₅	R	S ₅	R	S ₅	R
Cawan 1						
Cawan 2						
Cawan 3						
Seri V	U	R	U	R	U	R
Cawan 1						
Cawan 2						
Cawan 3						

PERCOBAAN 12 ELEKTROFORESIS DNA DAN PROTEIN

12.1 TUJUAN

Mahasiswa dapat melakukan pemisahan DNA dan protein dengan metode elektroforesis. Mahasiswa dapat menentukan berat molekul DNA/protein target.

12.2 PRINSIP

DNA dan protein merupakan molekul yang bermuatan sehingga bila diletakkan dalam medan listrik akan bergerak ke daerah yang muatannya berlawanan, dengan kecepatan migrasi berdasarkan berat molekulnya.

12.3 TEORI UMUM

DNA dan protein merupakan senyawa polimer yang terdapat dalam sel makhluk hidup. Apabila dilakukan isolasi DNA atau protein tertentu baik dari sel mikroba, tanaman ataupun manusia biasanya masih berupa campuran sehingga perlu dilakukan pemisahan dan karakterisasi lebih lanjut. Salah satu metode yang digunakan adalah elektroforesis, dimana DNA dan protein dalam matriks yang berpori (gel) diletakkan pada medan listrik yang memiliki kutub negatif dan positif. Berdasarkan berat molekulnya, DNA dan protein akan terpisah dan bergerak ke kutub yang muatannya berlawanan. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke kutub positif. Protein dibuat linier dan bermuatan negatif dengan pemanasan, penambahan senyawa pereduksi dan Sodium Dodeksil Sulfat (SDS) sehingga akan bergerak ke kutub positif. Gel yang digunakan pada elektroforesis DNA biasanya gel agarosa sedangkan untuk protein digunakan gel poliakrilamid. Elektroforesis protein disebut SDS-PAGE (SDS-poliacrylamid Gel electrophoresis). Tahap akhir elektroforesis adalah visualisasi DNA/protein menggunakan pewarna/molekul yang dapat mengikat atau berinteraksi dengan DNA/protein. Untuk menentukan berat molekul, elektroforesis dilakukan bersamaan dengan suatu marka DNA/protein yang telah diketahui berat molekulnya. Berat molekul DNA/protein target dihitung berdasarkan kurva logaritma berat molekul senyawa target terhadap jarak migrasinya.

12.4 ALAT DAN BAHAN

- Alat elektroforesis DNA dan protein
- Larutan TAE 1X steril
- dd H₂O steril
- EtBr (Etidium Bromida) 10 mg/mL
- *Loading Buffer* DNA/protein
- Agarosa
- Akrilamid 30
- *Separating buffer*
- *Stacking buffer*
- APS 10% (Amonium persulfat)
- TEMED
- Bufer elektroforesis
- Larutan staining dan destaining

12.5 PROSEDUR PERCOBAAN

A. Elektroforesis DNA

1. Agarose ditimbang 0,32 g dan dilarutkan dalam 40 mL TAE 1x untuk mendapatkan gel agarose 0,8%.
2. Larutan agarosa dipanaskan sampai mendidih, sementara itu cetakan/*tray* disiapkan untuk elektroforesis. Sisir elektroforesis ditempatkan untuk membentuk sumur gel.
3. Setelah larutan agarosa mendidih, didiamkan sampai suhu sekitar 60 °C.
4. Larutan agarosa dituang ke cetakan/*tray* yang sudah disiapkan dan dibiarkan sampai membeku.

5. Setelah membeku, penutup tray dan sisirnya dibuka, kemudian *tray* ditempatkan pada *chamber* elektroforesis yang sudah berisi bufer TAE 1x.
6. Semua sampel DNA ditambah *loading buffer 1x* dan dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis.
7. Marka DNA juga dimasukkan ke salah satu sumur.
8. Elektroforesis dijalankan pada 90 V selama 45 menit.
9. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan EtBr selama 5-10 menit kemudian dilihat dibawah sinar UV.

B. Elektroforesis protein

1. Elektroforesis SDS-PAGE dilakukan menggunakan alat Bio-Rad Mini Protean II.
2. Lempengan kaca, *spacer* dan alat pencetak gel (*gel sandwich*) dibersihkan dan dikeringkan.
3. *Gel Sandwich* disusun dengan menyelipkan lempengan kaca yang disisipi *spacer* dan kemudian untuk memastikan tidak adanya kebocoran dimasukkan aquadest ke ruang pencetak gel.
4. Disiapkan *separating gel* 12% (b/v) dan *stacking gel* 4% (b/v) dengan komposisi seperti pada tabel di bawah ini :

Jenis gel Bahan	Separating Gel	Stacking Gel
	12 %	4 %
Akrilamid/ bisAkrilamid 30%	4 ml	0,325 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M TrisHCl pH 6,8	-	0,625 ml
10 % SDS	100 µl	25 µl
H ₂ O	3,35 ml	1,525 ml
APS 10%	50 µl	15 µl
TEMED	15 µl	5 µl

5. APS 10% dan TEMED dimasukkan paling akhir. Campuran dihomogenkan dengan mem-pipet naik-turun secara perlahan. Polimerisasi mulai terjadi pada tahap ini, larutan harus segera dituang ke *gel sandwich*.
6. Secara perlahan larutan *separating gel* dimasukkan ke dalam *gel sandwich* hingga mencapai garis batas dengan *stacking gel* (sekitar 0,5 mm dari ujung sisir pencetak sumur gel pada *stacking gel*)
7. Segera dimasukkan aquadest dibagian atas *separating gel* untuk mendapatkan permukaan gel yang rata.
8. *Separating gel* didiamkan hingga menjadi padat (sekitar 30 menit).
9. Setelah *separating gel* padat, aquadest pada bagian atas dibuang
10. Pada *stacking gel* yang telah disiapkan, ditambahkan APS 10% dan TEMED untuk memulai proses polimerisasi.
11. Secara perlahan *stacking gel* dimasukkan ke *gel sandwich* hingga penuh.
12. Sisir pencetak sumur diselipkan pada *stacking gel* secara berhati-hati sampai menyentuh bagian atas dari *separating gel*.
13. *Stacking gel* didiamkan hingga menjadi padat (sekitar 15 menit).
14. Sambil menunggu gel memadat, sampel protein disiapkan. Sampel protein diambil dalam jumlah yang setara (untuk protein murni minimal mencapai 1 µg atau lebih) dan ditambahkan bufer sampel 2x (10 µL sampel protein, 10 µL bufer sampel).
15. Campuran sampel protein dididihkan selama 5-10 menit. Sampel protein di-*spin* sebentar dan siap untuk dimasukkan ke sumur gel.
16. Pada *stacking gel* yang sudah memadat, sisir pencetak sumur ditarik dan gelembung udara pada sumur dikeluarkan dengan menambahkan aquadest. Gel dikosongkan kembali.
17. *Gel sandwich* yang berisi gel siap pakai dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis dan chamber diisi dengan bufer elektroforesis hingga sumur penuh.
18. Sampel protein dimasukkan menggunakan *Hamilton syringe* sebanyak 20 µL dan juga marka protein.

19. SDS-PAGE dilakukan menggunakan pada tegangan 200 V selama 45 menit. Gel hasil elektroforesis selanjutnya diwarnai dengan merendam gel dalam *staining solution* Coomasie blue selama 15 menit
20. Selanjutnya gel di-*destaining* untuk menghilangkan sisa *staining*.

PERCOBAAN 13

DIAGNOSIS MOLEKULER PENYAKIT TUBERKOLOSIS MENGGUNAKAN MULTIPLEX PCR SOUTHERN BLOT

13.1 TUJUAN

Mendeteksi bakteri TB dalam specimen klinik

13.2 TEORI UMUM

Diagnosis penyakit dapat dilakukan secara langsung dengan deteksi mikroorganisme penyebab dan secara tidak langsung dengan deteksi kelainan yang diakibatkan atau deteksi antibody. Salah satu cara deteksi langsung adalah deteksi materi genetik mikroorganisme penyebab infeksi dengan teknik molekuler. Pemeriksaan mikrobiologi molekuler merupakan cara yang sensitive, spesifik, dan aman dalam menegakkan diagnosis penyakit infeksi. Jumlah laboratorium yang memiliki fasilitas memadai bagi penerapan pemeriksaan molekuler untuk tujuan diagnostic dan kemampuan sumber daya manusia masih terbatas di Indonesia. Pemeriksaan mikrobiologi medic molekuler bertujuan mendeteksi materi genetik mikroorganisme patogen baik dalam bentuk DNA (asam deoksiribosa nukleat) maupun RNA (asam ribonukleat) pada specimen klinik. (Andi Yasmon, dan Beti Ernawati Dewi, 2012)

13.3 ALAT DAN BAHAN

Bahan yang digunakan untuk operasional multiplex PCR adalah Ladder 50 bp (Promega #G4521), TrackIt 50 bp DNA ladder (Invitrogen #1207924), agarosa LE *Analytical grade* (Promega #V3121), *tris borate EDTA* (TBE) dapar 10x, (Promega #V4251), 1x *Tris-EDTA (TE) Buffer with reduced Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA) pH 8,0 (1st Base #BUF-3021-1X1L), SYBR Green I *Nucleic Acid gel stain* (Invitrogen #S7585), PrepmanTM *ultra sample preparation reagent* (Applied Biosystems #4318930), QIAGEN®, QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN #206143) terdiri dari 2X Qiagen mPCR *master mix*, Q-solution, *RNA-se free water*, Primer Set (Macrogen): ET1, ET2, ET3, RD81, dan RD8r. Sputum Mahasiswa dalam wadah steril yang ditambah vaksin BCG 0,1 mL.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain otoklaf, *laminar air flow*, inkubator, tabung mikro 1,5 mL steril, tabung PCR steril 0,2 mL, mikropipet 0,5 – 10 μ L, mikropipet 10 – 100 μ L, tips (steril, bebas DNA dan RNA) 0,5 – 10 μ L dan 10 -100 μ L, *thermo mixer*, mesin sentrifuga, spektrofotometer, mesin *thermocycler*, perangkat elektroforesis horizontal, perangkat dokumentasi gel.

13.4 PROSEDUR PERCOBAAN

A. Pembuatan pereaksi / media

Pembuatan stok primer dan campuran primer

Masing-masing primer *freeze dry* direkonstitusi dengan dapar TE pH 8,0 hingga 100 μ M (larutan stok primer). Lalu 100 μ L stok larutan dari 13 primer tersebut, diencerkan dengan dapar TE pH 8,0 hingga semua primer memiliki kadar 10 μ M kecuali ET1, ET3 dengan kadar 5 μ M. Semua proses pembuatan larutan stok primer dilakukan dalam wadah berisi es. Kemudian primer 10 μ M atau 5 μ M tadi dipipet masing-masing dengan volume 3,2 μ L (kecuali ET1 dan ET3 masing-masing sebanyak 6,4 μ L) ke dalam tabung PCR steril 2 mL, dan ditambahkan 83,84 μ L dapar TE pH 8,0 hingga volume total primer mix menjadi 160 μ L.

Tabel 13.1 Primer yang Digunakan Dalam *Multiplex PCR* (Bedwell, 2001)

Potongan DNA	Nama Primer	Nomor Urutan <i>Accession</i>	Urutan Primer (5' - 3')	Primer Site Awal
RD1	ET1	U34848	AAGCGTTGCCGCGACCGACC	2230
	ET2	U34848	CTGGCTATATTCCTGGGCCCCGG	11785
	ET3	U34848	GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	11930
RD8	RD8l	Z96800	ACTCCTAGCTTTGCTGTGCGCT	16687
	RD8r	Z96800	GTACTGCGGGATTTGCAGGTTC	17158

Pembuatan master mix multiplex PCR

RNA-se free water dipipet 15 µL (kecuali untuk kontrol negatif 20 µL) ditambah 25 µL 2xQiagen Master Mix dan 5 µL *primer mix*.

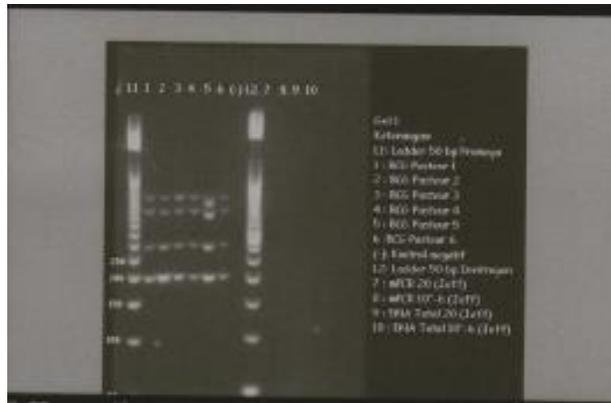
B. Ekstraksi DNA

1. Masukkan 500 µL sputum ke dalam tabung PCR 2 mL
2. Tambahkan 200 µL µL *Prepman™ ultra sample preparation*, vortex selama 10 - 30 detik.
3. Panaskan Tabung PCR pada suhu 100°C selama 10 menit
4. Sentrifugasi selama 2 x 3 menit pada 16.000 g.
5. Pindahkan Supernatan hasil isolasi DNA ke dalam tabung PCR 100 µL baru dan disimpan pada suhu -20°C

Ampifikasi dan analisis multiplex PCR

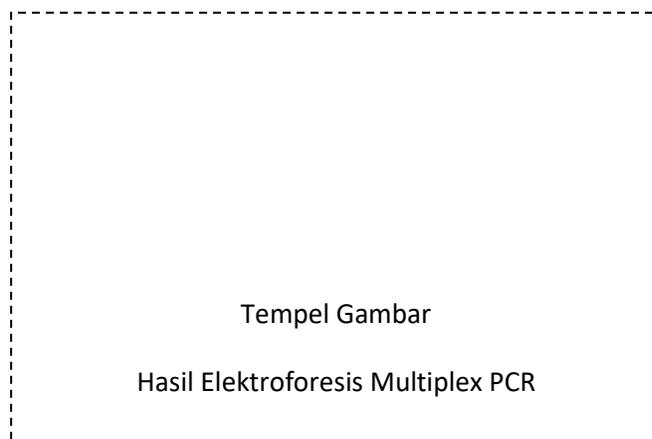
1. Campur *Master mix multiplex PCR* dengan 5 µL DNA *template*.
2. Masukkan ke dalam *thermocycle PCRr*,
3. Atur dengan sistem termal denaturasi awal 95°C selama 15 menit, denaturasi 94°C (30 detik), *annealing* 59°C (90 detik), tahap polimerisasi (*extension*) 72°C selama 60 detik, polimerisasi akhir 72°C (30 menit) dan akhirnya tahap pendinginan pada suhu 4°C.
4. Timbang Agarose sebanyak 1,2 g,
5. Tambah 40 mL TBE 1x dan dididihkan selama 1 - 2 menit hingga terbentuk larutan jernih.
6. Pada suhu sekitar 60°C tambahkan 5 µL SYBR *Green I Nucleic Acid Stain* aduk perlahan tanpa membentuk gelembung,
7. Tuang dalam cetakan gel yang dilengkapi sisir kecil (15 lubang), dibiarkan hingga mengeras dan angkat sisir kecil perlahan hingga terbentuk sumur.
8. Template agar yang telah mengeras direndam TBE 1x dalam wadah elektroforesis.
9. Tentuka peta urutan PCR dibuat sesuai dengan kebutuhan.
10. Tambahkan 3 µL *loading dye* 6x dipipet (sesuai jumlah sampel PCR) di atas parafilm.
11. Campur 15 µL produk PCR dengan *loading dye* hingga bervolume 18 µL dan masukkan ke dalam *well* cetakan gel.
12. Tiap pengujian disertai juga dengan Ladder 50 bp yang dimasukkan ke dalam sumur gel tersendiri pada tiap template agar.
13. Tutup wadah alat elektroforesis ditutup sesuai dengan katoda dan anoda dan beri tegangan konstan 80 volt selama 150 menit.
14. Setelah selesai, visualisasi gel dengan perangkat dokumentasi gel atau sinar UV 240 nm.

15. DNA hasil isolasi dapat terdeteksi dengan timbulnya bagian DNA yang berpendar di bawah pemaparan sinar UV.
16. Apabila dalam satu sampel DNA timbul 2 bagian berukuran 196 bp (RD1), 276 bp dan 472 bp (RD8) maka specimen yang diuji positif TB.



Gambar 13.1 Hasil Multiplex PCR Mycobacterium (Jeffeta Pradeko Putra dkk, 2014)

Hasil:



PERCOBAAN 14

PENGUJIAN ENDOTOKSIN DALAM AIR UNTUK INJEKSI

14.1 TUJUAN

Sebagai petunjuk untuk melakukan pengujian LAL dengan benar sehingga didapatkan hasil yang dapat dipercaya.

14.2 PRINSIP

Gel protein terbentuk akibat aktivasi Proclotting enzim dalam pereaksi Limulus Amebocyte Lysate (LAL) oleh endotoksin setelah diinkubasi pada suhu 37 ± 1 °C selama 60 ± 2 menit.

14.3 TEORI UMUM

Pirogen adalah suatu zat yang apabila disuntikkan secara parenteral dapat meningkatkan suhu tubuh. Pirogen dapat berasal dari pasien (endogen) atau dari faktor eksternal (eksogen) misalnya dari zat kimia atau bakteri.

Produk farmasi yang diberikan secara parenteral harus diusahakan agar terhindar dari cemaran pirogen yang berasal dari dinding sel bakteri gram negatif. Pirogen yang berasal dari dinding sel gram negatif disebut juga endotoksin.

Secara *in vivo*, pirogen dapat dideteksi dengan uji kelinci. Secara *in vitro*, pirogen dideteksi dengan LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) test. Secara *in vivo*, uji kelinci dapat mendeteksi seluruh pirogen. Sedangkan uji LAL hanya dapat mendeteksi endotoksin. Tidak seluruh pirogen berasal dari endotoksin, namun endotoksin merupakan sumber utama pirogen dari sediaan parenteral. Dibandingkan dengan uji kelinci, uji LAL lebih cepat, lebih akurat, reproducible, dan juga lebih efisien dari segi biaya.

14.4 ALAT DAN BAHAN

- Botol steril bebas pirogen
- Inkubator dengan range suhu berkisar antara 36-38°C
- LAF unit
- Pipet ukur bebas pirogen atau syringe bebas pirogen
- Rak tabung reaksi
- 3 buah vial Pyrotel Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 0,125 EU/ml atau sensitivitas lain yang sesuai
- 1 buah vial kontrol Standar Endotoksin 5000 EU/vial
- LAL reagent water

14.5 PROSEDUR

A. Aturan umum

- Wadah gelas yang digunakan untuk pengujian harus dicuci dengan bersih, sisa sabun harus benar-benar dihilangkan. Wadah gelas juga harus bebas pirogen dengan cara memanaskan wadah gelas dalam oven sterilisator 200°C selama 1 jam.
- Untuk mencegah kontaminasi mikroba, seluruh tahapan pengujian harus dilakukan secara aseptis.
- Temperatur saat reaksi harus berkisar antara 36-38°C.

- pH larutan harus berkisar antara pH 5-7. Apabila diperlukan lakukan penyesuaian pH dengan 0,1 N HCl, 0.1 N NaOH, atau larutan buffer yang sesuai.
- Waktu reaksi adalah 1 jam.
- Setiap uji harus disertai dengan kontrol negatif dan kontrol positif.
- Pada saat pengujian harus diusahakan agar area bebas dari getaran.
- Simpan pyrotel, CSE vial, atau larutan stok endotoksin sesuai dengan instruksi dari pemasok.

B. Kondisi penyimpanan LAL dan Control Standard Endotoksin

- Simpan Pyrotel Limulus Amebocyte Lysate pada refrigerator (suhu -20 hingga +8 °C).
- Simpan Control Standard Endotoksin pada refrigerator (suhu 2-8 °C).
- Larutan stok endotoksin yang sudah diencerkan dengan LAL reagent water dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama 4 minggu. Beri label tanggal pembuatan dan tanggal kadaluarsa pada wadah larutan stok endotoksin.
- Pyrotel Limulus Amebocyte Lysate dan Control Standard Endotoksin yang disimpan pada refrigerator aktifitasnya akan tetap baik sampai dengan tanggal kadaluarsanya.

Uji LAL pada Water For Injection

i. Prosedur pembuatan larutan stok Endotoksin

- Encerkan vial Control Standard Endotoksin (5000 EU/ vial) dengan 5 ml LAL reagent water sehingga diperoleh konsentrasi 1000 EU/ml (larutan A).
- Pipet 1.0 ml larutan A dan encerkan dengan LAL reagent water hingga 10 ml (larutan B).
- Pipet 1.0 ml larutan B dan encerkan dengan LAL reagent water hingga 10 ml (larutan C).
- Pipet 0.25 ml Larutan C dan encerkan dengan LAL reagent water hingga 10 ml (larutan D= Larutan stok 0.25 EU/ml).

ii. Prosedur Kerja

- Keluarkan 3 buah tabung Pyrotel Limulus Amebocyte Lysate 0.125 EU/ mL, LAL reagent water dan larutan stok endotoksin dari lemari pendingin.
- Diamkan 30 menit hingga temperaturnya sama dengan temperatur kamar (25 - 30°C).
- Tambahkan ke dalam tabung pyrotel 0.125 EU/ml masing-masing:
 - 0,2 ml sampel WFI
 - 0.2 ml LAL reagent water (sebagai kontrol negatif)
 - 0.2 ml larutan stok endotoksin 0.25 EU/ml (sebagai kontrol positif) secara aseptis dibawah LAF.
- Goyang tabung selama 20 hingga 30 detik agar tercampur homogen.
- Masukkan tabung pyrotel ke dalam inkubator atau water bath suhu 37 ±1°C.
- Inkubasi selama 1 jam.
- Amati tabung yang berisi sampel, kontrol positif dan negatif
- Catat hasilnya

Penafsiran Hasil

- Apabila pada tabung berisi sampel terbentuk gel dan jika vial di putar 180° dan gel tetap tertinggal pada dasar vial maka hasil pengujian LAL dinyatakan positif.
- Hasil pengujian LAL dinyatakan negatif apabila tidak terbentuk secara perlahan-lahan gel dan cairan mengalir apabila vial diputar hingga 180°.
- Kontrol positif harus memberikan hasil yang positif terhadap LAL
- Kontrol negatif harus memberikan hasil yang negatif terhadap LAL.
- Catat hasil pengujian LAL.

Aspek K3L (Kesehatan, Keselamatan Kerja dan Lingkungan)

- Buang pyrotell dan kontrol standar endotoksin yang sudah digunakan sebagai limbah farmasi

DAFTAR PUSTAKA

- ASEAN Countries, 1993, **Standard of ASEAN Herbal Medicine**, Vol.1, ASEAN Countries, Jakarta
- Atlas, R.M., **Handbook of Microbiological Media**, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2006. **Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik**. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2012. **Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik**. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan.
- Bedwell, J., Kairo, S. K., Behr, M. A. dan Bygraves, J. A. (2001) : **Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR**, Vaccine, 19, 2146 – 2151.
- Board, RG., **A Modern Introduction to Food Microbiology**, Blackwell Sci.Publ., London, 1983
- Buckle, K.A, et.al. (Eds.), **Foodborne Microorganisms of Public Health Significance**, 4th ed., AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group, NSW, 1989.
- Deacon, J.W., **Modern Mycology**, 3rd edition, Blackwell Science Ltd.,1997.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1995) : **Farmakope Indonesia edisi IV**, Jakarta, 10 – 14, 855 – 863.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2009) : **Suplemen I Farmakope Indonesia edisi IV**, Jakarta, 1512 – 1519.
- Farmakope Indonesia edisi IV**, Dep.Kes RI, 1995.
- Frazier WC., et al, **Food Microbiology**, Tata McGraw Hill, Bombay, 1992.
- Gams, W., van der Aa, H.A., van der Plaats-Niterink,A.J., Samson R.A., and Stalpers J.A., CBS Course of Mycology, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Delft, 1987.
- Harmonization Of Asean Cosmetic Methods, 2004, **Microbiological Methods for Cosmetics**, Thailand
- Hitchin, A.D. Tony, T.T. and James, E.M., 1992, **Microbiological Methods for cosmetics in Bacteriological Analytical Manual**, 7th ed, AOAC International, Arlington, USA.
- International Organization for Standardization (ISO). 1999. **Classification of Airborne Particulates in Ruang Bersih and Associated Controlled Environments-Part 1**. Geneva: ISO 14644-1.
- J.Jay, Van Nostrand, **Modern Food Microbiology**, New York, 1998
- Jawetz, E., Melnick J.L., Adelberg E.A., Brooks G.F., Butel J.S., and Ornston L.N., **Medical Microbiology**, 18th ed., Lange medical book, 1989.
- Koneman EW., Allen SD., Janda WM., Schreckenberger PC., and Winn WC., **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th ed., Lippincott Co. Publ., 1997.

Peraturan Kepala BPOM HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

Refai, M.K., 1979, **Manual Of Food Quality Control, 4**, Microbiological Analysis, FAO, Rome

Singh K, et.al., **An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-Borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and Their Mycotoxins, Danish Govern.** Institute of Seed Pathology, Lyngby, 1991.

United State Pharmacopeial Convention (2014): **The United States Pharmacopoeia 37 / The National Fomulary 32**, Rockville, 71 – 76.

UU No 8 tahun 1999 ttg Perlindungan Konsumen

White, R.G and Timbury, M.C., **Essential of Immunology and Microbiology**, Pitman Medical, bath, 1973.

White, W. 2001. **Cleanroom Design**. Second Edition. Chichester: John Wiley and Sons. 22-26; 38-39.