

BAB 2

METODE LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

A. STERILISASI DAN DISINFEKSI

Pemahaman prinsip dasar sterilisasi dan disinfeksi merupakan dasar dalam pekerjaan di laboratorium mikrobiologi. Teknik baru mengenai sterilisasi dan disinfeksi secara terus-menerus dikembangkan. Meskipun sejumlah bahan kimia sederhana yang digunakan dalam terapi sudah diganti oleh bahan kemoterapeutik yang lebih spesifik, tetapi beberapa dari kelompok bahan tersebut tetap memiliki kepentingan sebagai antiseptik atau disinfektan yang efektif untuk menghancurkan mikroorganisme pada lingkungan yang tak-hidup.

Sterilisasi, mutlak dibutuhkan untuk inaktivasi total seluruh bentuk kehidupan mikroba, yang berkaitan dengan kemampuan reproduksi mikroba. Akhiran **-sida** ditambahkan ketika melibatkan peran bahan yang bersifat membunuh, sedangkan **-statis** ditambahkan jika melibatkan peran yang bersifat menghambat pertumbuhan atau mencegah perbanyakan mikroorganisme. Suatu bakterisida merupakan bahan yang merusak bakteri. Disinfektan merupakan salah satu germisida berupa bahan yang mampu membunuh mikroba penyebab infeksi. Istilah disinfektan biasanya digunakan pada benda tak hidup. Antiseptik merupakan suatu bakteriostatik yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan bakteri. Suatu **antiseptik**, melawan sepsis atau pembusukkan serta membunuh atau mencegah pertumbuhan mikroba. Istilah antiseptik tersebut sering digunakan untuk pemakaian pada jaringan hidup.

Antibiotik ialah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat memusnahkan mikroba jenis lain. Dewasa ini banyak antibiotik dibuat secara semisintetik atau sintetik penuh. Namun dalam praktek sehari-hari anti-mikroba sintetik yang tidak dihasilkan dari produk mikroba (misalnya sulfonamid dan kuinolon) juga sering digolongkan sebagai antibiotik.

Obat yang digunakan untuk memusnahkan mikroba patogen pada manusia, harus memiliki syarat **sitotoksitas selektif** setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk membunuh mikroba patogen golongan tertentu, tetapi relatif tidak toksik atau tidak menimbulkan efek yang merugikan bagi inang. Namun

demikian sifat obat yang memiliki toksisitas selektif yang absolut belum atau mungkin tidak akan diperoleh.

Pemilihan prosedur atau bahan ditentukan melalui situasi khusus, dimana bahan tersebut sangat dibutuhkan untuk membunuh semua mikroorganisme atau hanya spesies tertentu. Sebagai contoh, penghancuran seluruh mikroorganisme yang terdapat dalam atau pada bahan-bahan penting dalam prosedur pembedahan, pada persiapan seluruh media dan alat-alat gelas yang digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, dan dalam pengalengan makanan berprotein-tinggi tidak-asam. Melindungi manusia dari penyakit menular, menghancurkan patogen, penting untuk mencegah penyebaran infeksi terhadap orang yang rentan. Untuk kepentingan tersebut, suatu disinfektan cukup dan biasa digunakan dalam proses pembersihan.

Dinamika Sterilisasi dan Disinfeksi

Kecepatan kematian mikroorganisme. Informasi mengenai kinetika kematian suatu populasi bakteri sangat penting untuk memahami dasar sterilisasi suatu bahan yang mematikan. Kriteria kematian pada mikroba adalah hilangnya kemampuan untuk berreproduksi yang berisifat “irreversible”. Hal ini biasanya ditentukan melalui teknik lempeng agar dengan menghitung jumlah koloni yang bertahan hidup.

Ketika suatu populasi bakteri dipapar suatu bahan yang mematikan, maka berdasarkan selang waktu tertentu terdapat penurunan jumlah yang hidup secara progresif. Kinetika kematian suatu populasi mikroba biasanya eksponensial, artinya jumlah yang hidup menurun menurut waktu. Jika logaritma jumlah yang hidup diplot sebagai fungsi waktu paparan, diperoleh suatu garis lurus, berupa kemiringan negatif (garis menurun) sebagai kecepatan kematian (gambar 7-1). Kecepatan kematian, hanya menerangkan bagian populasi awal yang bertahan hidup pada masa paparan oleh bahan anti-mikroba. Untuk menentukan jumlah yang benar-benar hidup, pertama harus diketahui ukuran populasi awal. Secara matematik, hubungan tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :

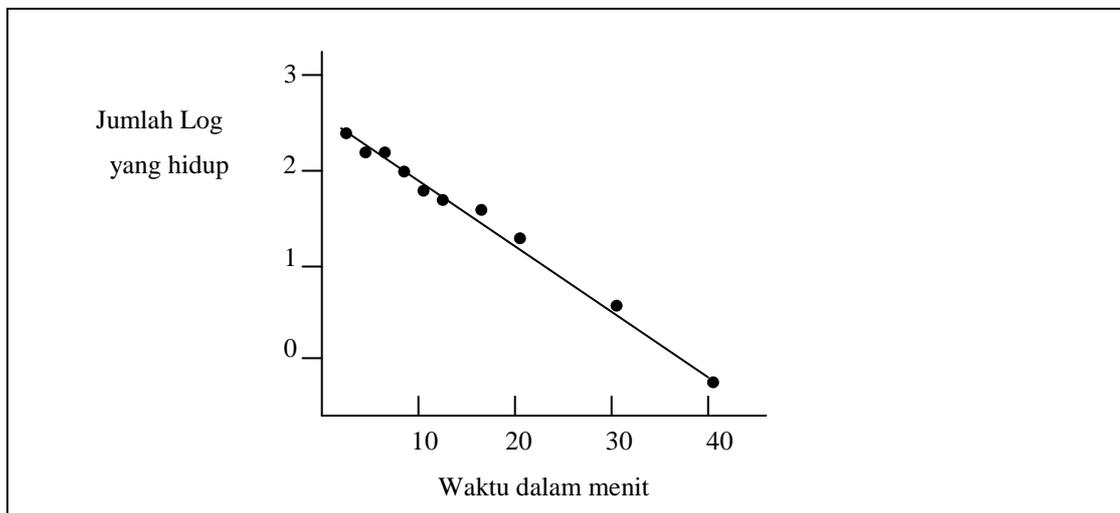
$$K = -\frac{l}{b} \log \frac{B}{t}$$

Dimana K adalah jumlah kematian sel mikroorganisme; B adalah jumlah mikroorganisme awal dan b adalah jumlah yang tetap hidup setelah waktu t .

Meskipun secara matematik kurva logaritmik sangat baik dan hampir mendekati kebenaran untuk penggunaan suatu disinfektan dengan konsentrasi yang relatif tinggi. Namun penggunaan disinfektan dengan konsentrasi rendah akan diperoleh kurva sigmoid, artinya kecepatan menjadi lambat pada tahap awal, selanjutnya kecepatan diperoleh pada sebagian besar proses disinfeksi, dan akhirnya menurun perlahan sampai habis bahan tersebut.

Pada proses sterilisasi penting melihat rata-rata kemiringan kurva menjelang akhir proses tersebut. Hal ini berguna untuk lebih memperpanjang atau memperkuat perlakuan pemberian bahan disinfektan untuk menghancurkan mikroba yang resisten yang kemungkinan berada pada awal populasi mikroba yang jumlahnya tinggi.

Bentuk kurva waktu “*survivor*” eksponensial, diperoleh karena jumlah sel mikroba patogen awal sebagian besar terbunuh. Hal ini menyebabkan dibutuhkan perpanjangan atau perlakuan yang lebih kuat untuk sterilisasi. Umumnya kecepatan daya bunuh terhadap mikroba patogen dari suatu disinfektan bervariasi, terutama tergantung pada konsentrasi disinfektan.

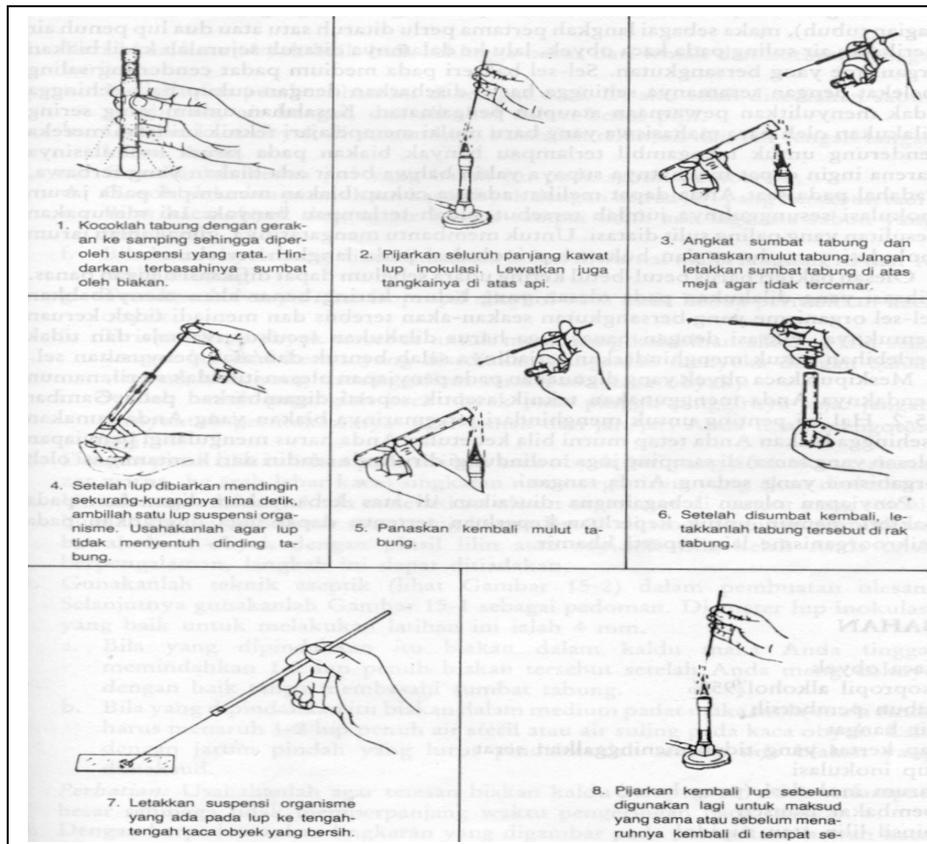


Gambar 11.1. Kecepatan kematian *E. coli*, ketika dipapar oleh fenol 0,5% pada suhu 20°C.

B. TEKNIK ASEPTIK

Sebelum mulai membiakan mikroba, pertama-tama kita harus mempertimbangkan bagaimana cara menghindari kontaminan. Mikroba terdapat dimana-mana, tersebar di udara atau pada permukaan suatu benda, oleh karena itu kita harus melakukan sterilisasi media segera setelah disiapkan, yang biasa dilakukan dengan pemanasan. Hal ini perlu dilakukan untuk menghilangkan mikroba kontaminan. Maka semua bahan dan alat yang bersentuhan dengan suatu biakan murni harus steril.

Teknik yang digunakan dalam pencegahan kontaminasi selama membuat dan mensterilkan medium kultur disebut Teknik aseptik. Penguasaan teknik ini diperlukan dalam keberhasilan laboratorium mikrobiologi dan hal tersebut merupakan salah satu metode permulaan yang dipelajari oleh ahli mikrobiologi pemula (gambar 2.1).



Gambar 2-1. Teknik aseptik pemindahan biakan mikroorganisme (sumber:Ratna Siri,1985)

Kontaminan asal udara sering terdapat dalam medium, karena udara selalu mengandung partikel debu tempat komunitas mikroba. Transfer aseptik suatu biakan dari satu tabung medium ke tabung lainnya biasa dilakukan dengan menggunakan jarum inokulasi atau ose yang disterilkan dengan cara membakar di atas api. Biakan juga dapat dipindahkan dari permukaan lempeng agar, sebagai tempat perkembangan koloni dimana sel mengalami pertumbuhan dan pembelahan. Metode utama yang digunakan untuk memperoleh kultur murni dari komunitas mikroba yang mengandung beberapa mikroba yang berbeda dilakukan dengan memilih koloni-koloni yang terpisah dan menggoreskan pada lempeng agar dengan metode gores, sehingga diperoleh koloni mikroba yang murni.

C. TEKNIK ISOLASI DAN PEMBENIHAN MIKROORGANISME

Karakteristik mikroorganisme dapat dipelajari dengan baik jika kita memiliki biakan murni (kultur murni). Biakan murni merupakan suatu kultur yang terdiri dari satu macam mikroorganisme. Untuk memperoleh kultur murni, kita harus dapat menumbuhkan mikroorganisme di laboratorium. Untuk kebutuhan tersebut harus tersedia nutrisi dan keadaan lingkungan yang mendukung pertumbuhannya. Hal ini juga penting untuk mencegah masuknya organisme lain ke dalam kultur, seperti organisme yang tidak diinginkan yang disebut kontaminan, yang terdapat dimana-mana. Teknik mikrobiologi yang tepat diperlukan untuk menghindari kontaminan. Sekali kultur murni diperoleh, selanjutnya kita dapat menggunakannya untuk meneliti sifat biokimia, fisiologi, genetika, dan karakteristiknya.

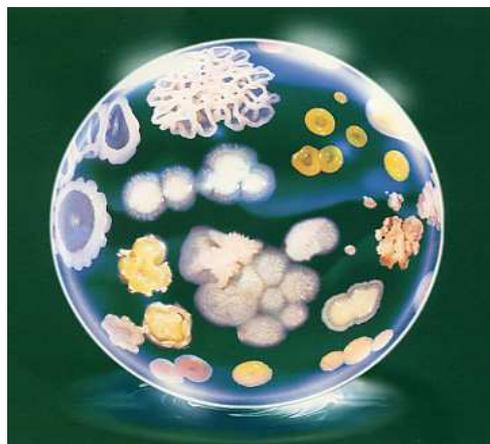
1. Medium Biakan

Mikroorganisme dapat dibiakan dalam air yang sudah ditambah dengan nutrisi yang sesuai. Medium biakan adalah larutan encer yang mengandung nutrisi penting, yang menyediakan kebutuhan bagi sel mikroba supaya dapat tumbuh dan menghasilkan banyak sel yang serupa. Di samping sumber energi berupa senyawa organik dan anorganik atau cahaya, medium biakan harus memiliki sumber karbon, nitrogen dan nutrisi penting lainnya. Medium biakan dapat disiapkan dalam keadaan cair maupun gel (semi padat). Dari cair dapat diubah menjadi padat dengan penambahan agar. Medium biakan yang mengandung agar dapat disimpan

dalam bentuk lempeng pada cawan Petri tertutup, dimana sel mikroba dapat tumbuh dan membentuk massa yang terlihat sebagai koloni sel. Disamping itu medium biakan yang mengandung agar dapat pula disimpan dalam tabung reaksi dengan kemiringan tertentu, dimana sel mikroba dapat tumbuh dengan memberikan karakteristik pertumbuhan yang khas.

2. Konsep Biakan Murni

Medium agar merupakan substrat yang baik untuk memisahkan campuran mikroba sehingga masing-masing jenis dapat terpisah. Teknik yang sering digunakan untuk menumbuhkan mikroba pada medium agar diharapkan mikroba tersebut dapat tumbuh agak berjauhan dari sesamanya, juga setiap selnya berhimpun membentuk koloni. Koloni merupakan sekelompok masa sel yang dapat dilihat dengan mata langsung. (gambar 2.1). Semua sel dalam koloni itu sama; dianggap semua sel itu merupakan keturunan (progeny) satu mikroorganisme dan karena itu mewakili sebagai biakan murni.



Gambar 2.2 Koloni bakteri pada suatu medium lempeng agar
(sumber: Todar,K.,2001)

3. Postulat Koch

Percobaan Robert Koch dan para peneliti mikrobiologi lainnya di laboratorium membuktikan bahwa mikroba tertentu menyebabkan timbulnya penyakit tertentu pula dan hal ini telah menuntun pada kriteria yang mendasari ditariknya kesimpulan semacam itu. Kriteria ini dikenal dengan **postulat Koch**, dan

menjadi pedoman tetap yang dipakai dalam mengungkap suatu agen penyebab penyakit sampai kini. **Postulat Koch** tersebut adalah:

1. Mikroorganisme tertentu selalu dapat dijumpai berasosiasi dengan penyakit tertentu
2. Mikroorganisme itu dapat diisolasi dan ditumbuhkan menjadi biakan murni di laboratorium
3. Biakan murni dari mikroorganisme tersebut akan menimbulkan penyakit yang sama dengan jenis penyakit yang disebabkan sebelumnya, bila disuntikan pada hewan yang rentan (suseptibel)
4. Penggunaan prosedur laboratorium memungkinkan diperolehnya kembali mikroorganisme penyebab penyakit yang disuntikan itu dari hewan yang sengaja diinfeksi dalam percobaan.

Sejak ditemukannya bahwa jasad renik merupakan penyebab penyakit tertentu, maka banyak perhatian ditunjukkan kepada pengembangan cara-cara untuk pencegahan dan pengobatan penyakit tersebut. Penyebab etiologis (agen kausatif) untuk sebagian besar infeksi bakteri patogen yang dikenal dewasa ini, seperti antraks, Gonorrhoe, demam tifoid, infeksi luka, TBC, difteri dan kolera, tetanus, meningitis dan sebagainya telah diketahui penyebabnya dan telah dikembangkan upaya pencegahannya dengan berbagai cara, misalnya dengan vaksinasi..

D. MIKROSKOP

Berbagai macam mikroskop yang digunakan dalam laboratorium mikrobiologi adalah sebagai berikut:

1. **Mikroskop Cahaya (*Light Microscopy*)** terdiri dari;
 - a. **Mikroskop Medan Terang (*Brightfield Microscopy*)** : mikroskop jenis ini digunakan untuk memeriksa bahan dan kultur dari sediaan basah atau sediaan yang diwarnai.
 - b. **Mikroskop Medan Gelap (*Darkfield Microscopy*)** : mikroskop ini mempunyai kondensor yang mencegah cahaya ditransmisikan melalui bahan, tapi sebaliknya menyebabkan cahaya merefleksikan bahan pada sudut tertentu, sehingga obyek kelihatan lebih besar bersinar dengan latar belakang

yang gelap. Mikroorganisme dapat diamati dalam keadaan hidup sehingga gerakannya juga dapat diamati.

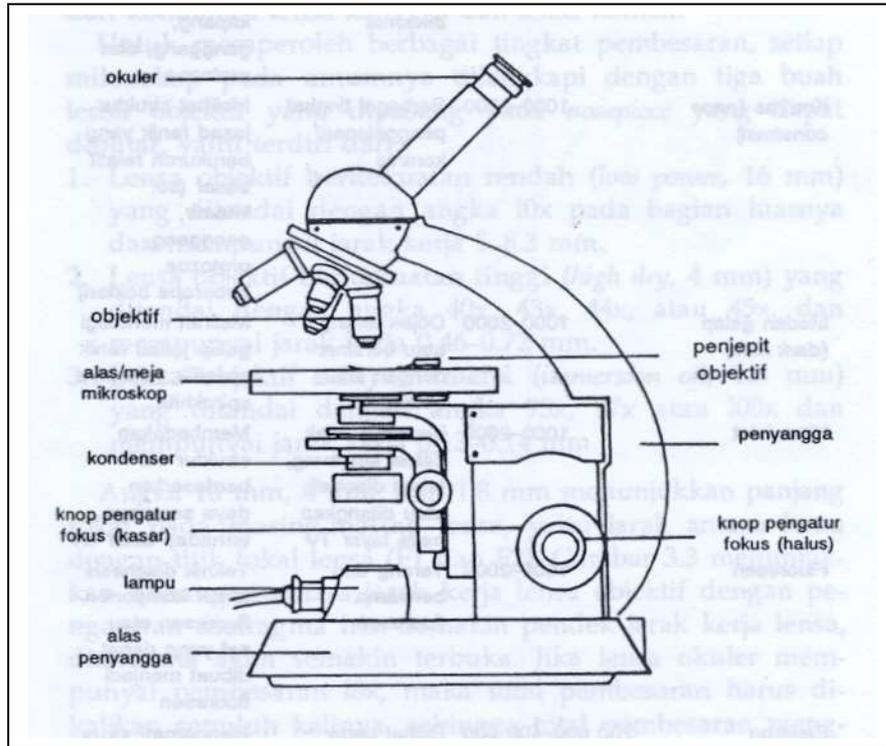
- 2. Mikroskop Fase Kontras (*Phase-contrast Microscopy*)** : mikroskop ini sekarang sudah jarang digunakan dalam laboratorium diagnostik. Mikroskop fase kontras adalah suatu tipe mikroskop cahaya yang memungkinkan terjadi kontras yang lebih besar dalam indeks refraksi dan kepadatan antara sel hidup dengan cairan dimana organisme berada, sehingga menghasilkan gambaran yang lebih kontras daripada yang terlihat pada mikroskop medan terang.

Mikroorganisme hidup sulit dilihat karena masing-masing partikelnya mempunyai indeks bias cahaya yang berbeda dan mempunyai ketebalan yang berbeda. Mikroskop ini memungkinkan mikroba hidup dilihat dengan organel di dalamnya, yang tidak dapat dilihat dengan mikroskop cahaya biasa.

- 3. Mikroskop Fluoresen (*Fluorescence Microscopy*)** : mikroskop fluoresen telah menjadi prosedur dan banyak digunakan di laboratorium klinis. Beberapa substansi biologi memang pada dasarnya berfluoresen, tapi bahan lain dapat juga diwarnai dengan zat warna fluoresen dan diamati dengan mikroskop yang memakai sumber cahaya sinar ultraviolet. Mikroskop ini banyak digunakan dalam mikrobiologi dan imunologi, dan telah dikembangkan untuk mendeteksi antigen mikroba pada bahan pemeriksaan dengan jalan mewarnainya dengan antibodi spesifik yang telah diberi tanda/label dengan zat warna fluoresen (*immunofluorescence*).

- 4. Mikroskop Elektron (*Electron Microscopy - EM*)**

Mikroskop elektron memiliki berkas gelombang sinar sangat pendek (0,005 nm) yang dihasilkan oleh elektron dari tabung hampa udara, yang menggantikan sumber cahaya sehingga memungkinkan dicapainya perbesaran sampai hampir jutaan kali. Dengan memakai mikroskop elektron ini, maka dapat dilihat virus dan molekul-molekul yang sangat kecil lainnya.



Gambar 2.3 Mikroskop cahaya dan bagian-bagiannya (Sumber: Brock & Madigan, 1991)

RANGKUMAN

Ruang lingkup pekerjaan laboratorium mikrobiologi bertujuan untuk mempelajari karakteristik mikroorganisme serta pertumbuhannya. Untuk itu diperlukan metode laboratorium dengan prosedur standar yang dapat mendeskripsikan karakteristik baik morfologi, fisiologi dan pertumbuhan mikroorganisme. Metode laboratorium mikrobiologi digunakan untuk mendapatkan suatu jenis mikroorganisme dalam bentuk biakan murni (kultur murni) dari suatu campuran mikroorganisme yang tumbuh dalam suatu medium.

Prinsip dasar prosedur laboratorium mikrobiologi adalah mencegah terjadinya kontaminasi dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Metode tersebut diantaranya dengan cara-cara teknik aseptik dan sterilisasi.

Penggunaan alat bantu mikroskop di laboratorium mikrobiologi sangat penting, karena dapat membantu dalam mempelajari karakteristik mikroorganisme, terutama bentuk dan ukuran sel dari suatu jenis mikroorganisme. Beberapa tipe mikroskop telah dikembangkan mulai dari yang sederhana sampai pada yang

canggih.

PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Jelaskan prinsip dasar prosedur laboratorium mikrobiologi !
2. Jelaskan perbedaan antara sterilisasi dan Pasteurisasi !
3. Jelaskan apa yang dimaksud dengan:
 - a. teknik aseptik
 - b. antiseptik
 - c. desinfektan
 - d. bakterisidal
 - e. bakteriostatik
4. Sebutkan 4 macam tipe mikroskop dan apa fungsinya ?

ISTILAH PENTING

- Sterilisasi
- Disinfeksi
- Teknik aseptik
- Mikrobisida
- Mikrobistatis
- Antibiotika
- Mikroskop elektron
- Biakan murni
- Bakterisida
- Bakteriostatik
- Teknik isolasi
- Biakan murni