

TOPIK 3

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PERTEMUAN KE : 3 (1x2.5 jam)

TOPIK : Sterilisasi SUB TOPIK : Sterilisasi cara fisik dan kimia

TIU:

Mahasiswa dapat menjelaskan berbagai proses sterilisasi dan desinfeksi

TIK:

Diakhir praktikum mahasiswa diharapkan dapat :

1. Menjelaskan dan melakukan sterilisasi secara fisik
2. Menjelaskan dan melakukan sterilisasi secara kimia

MATERI:

Sterilisasi dan Desinfeksi

Sterilisasi adalah suatu usaha (tindakan) membebaskan alat atau bahan dari segala macam kehidupan, terutama mikroorganisme serta mencegah mikroorganisme tersebut agar tidak hidup kembali. Sterilisasi ini biasanya dilakukan terhadap benda hidup maupun benda mati. Alat ataupun bahan dikatakan steril apabila padanya sudah tidak terdapat lagi mikroorganisme baik bakteri, jamur, virus, serta bentuk kehidupan lain. Sedangkan alat ataupun bahan dikatakan bersih apabila padanya sudah tidak terdapat materi-materi yang tampak secara visual. Desinfeksi adalah tindakan membunuh ataupun menghancurkan mikroorganisme patogen dengan cara fisik ataupun kimia, dilakukan terhadap benda mati. Sterilisasi dan desinfeksi sangat penting dalam pelayanan kesehatan (tindakan medis) maupun dalam penelitian-penelitian dan diagnosis dibidang mikrobiologi. Dalam bidang pelayanan kesehatan sterilisasi dan desinfeksi diperlukan khususnya dalam penyediaan alat-alat laboratorium dan medium yang steril, mengingat penelitian dan diagnosis terhadap suatu spesies mikroorganisme selalu didasarkan atas sifat biakan murni spesies, sehingga dapat dipisahkan mikroorganisme satu dengan yang lain.

Sterilisasi dapat dilakukan secara fisik, kimia, dan mekanik. Cara yang dipilih sangat tergantung pada macam bahan dan sifat bahan yang akan disterilkan, misalnya ketahanannya terhadap temperatur, bentuk bahannya cair atau padat.

Sterilisasi secara fisik adalah sterilisasi menggunakan faktor-faktor fisika, misalnya temperatur tinggi, penyinaran, uap air panas. Yang termasuk cara ini antara lain:

1. Sterilisasi dengan Pemanasan.

a. Pemanasan langsung (pemijaran)

Sterilisasi cara ini terutama digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang terbuat dari bahan logam, platina, nikrom seperti sengkelit/ose, pinset, scalpel, jarum, dan alat yang terbuat dari gelas seperti ujung-ujung pipet, bibir tabung, bibir botol Erlenmeyer dan sebagainya. Untuk bahan dari logam, platina maupun nikrom dilakukan dengan cara membakar di atas lampu spiritus sampai membara/pijar dan alat segera dipakai setelah menjadi dingin. Sedangkan dari bahan gelas dilakukan dengan cara memanaskan pada bibir/ujung alat yang disterilkan.

b. Pemanasan kering dengan udara panas (hot air sterilizer)

Sterilisasi ini dilakukan dengan alat oven/hot air oven, terutama untuk sterilisasi alat-alat gelas seperti pipet, piring petri, tabung dan juga untuk bahan-bahan minyak dan powder seperti talk.

Caranya :

- (i) Alat-alat yang akan disteril setelah dicuci kemudian dikeringkan. Untuk tabung-tabung gelas ditutup dengan kapas bebas lemak, kemudian dibungkus dengan kertas tahan panas.
- (ii) Di masukkan oven dalam keadaan dingin.
- (iii) Sumber panas dinyalakan, diatur sesuai dengan suhu yang dikehendaki yaitu antara 160° - 170° C selama 90-120 menit.
- (iv) Setelah selesai, sumber panas dimatikan dan alat-alat diambil setelah oven dingin kembali, karena apabila tiba-tiba dikeluarkan alat-alat gelas akan pecah. Bungkus alat-alat tersebut disimpan, dan baru dibuka apabila akan dipakai.

c. Pemanasan basah langsung.

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan alat sterilisator rebus tertentu atau dengan panci yang diisi air secukupnya. Alat-alat yang disterilkan misalnya gunting, pinset, skalpel, jarum, spuit injeksi dan sebagainya.

Caranya :

- (i) Alat-alat yang disterilkan dicuci kemudian di masukkan dalam sterilisator dan dipanasi sampai mendidih. Setelah mendidih diperlukan waktu 30 – 60 menit.
- (ii) Untuk mempercepat penghancuran spora dan mencegah berkaratnya logam, ditambah Na_2CO_3 1%.

Pemanasan basah tidak langsung (dengan uap air panas)

(i) Pemanasan dengan uap air panas tanpa tekanan.

Sterilisasi ini digunakan untuk media dan bahan cair yang tidak tahan panas. Alat yang digunakan adalah dandang biasa, sterilisator dari Koch Arnold (Arnold steam sterilizer) atau autoclave (otoklaf) dengan klep terbuka.

Caranya : Bahan dipanaskan dengan suhu 100°C selama 30 menit agar sel vegetative mikroorganisme terbunuh. Kemudian bahan tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar, hal ini untuk memberi kesempatan tumbuhnya spora. Sterilisasi diulang selama 3 kali berturut-turut.

(ii) Pemanasan basah dengan uap air basah bertekanan.

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan otoklaf dimana terjadi kenaikan suhu dalam ruangan tertutup/otoklaf sebagai akibat adanya kenaikan tekanan dalam ruang tersebut. Bahan yang disterilkan adalah bahan yang tahan tekanan, misalnya untuk sterilisasi medium pertumbuhan mikroorganisme. Caranya :

- Otoklaf dibuka dan diisi air secukupnya, kemudian bahan-bahan yang akan disterilkan diletakkan di atas rak.
- Otoklaf ditutup kembali, sekrup diputar seimbang agar tertutup rapat. Kemudian klep pengatur uap air dibuka. Sumber panas dinyalakan, setelah air mendidih 100°C tekanan 1 atm dan keluar uap air dari klep, maka klep segera ditutup.
- Uap air panas tidak akan keluar lagi, sehingga tekanan dalam otoklaf naik dan suhu akan naik lebih dari 100°C . Sterilisasi ini memerlukan suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 – 20 menit.
- Setelah cukup, sumber panas dimatikan. Alat ataupun bahan dikeluarkan sebaiknya setelah suhu dibawah 80°C dengan terlebih dahulu membuka klep uap air sedikit demi sedikit.
- Dalam sterilisasi dengan otoklaf harus ditunggu dan harus hati-hati dalam mengurangi tekanan saat akan membuka otoklaf, karena perubahan tekanan dan temperatur yang mendadak dapat menyebabkan cairan yang disterilkan meletus dan alat-alat gelas dapat pecah.

(iii) Pasteurisasi

Sterilisasi dilakukan dengan pemanasan kurang dari 100° C, dilakukan untuk sterilisasi bahan yang tidak tahan panas tinggi dan dilakukan 3 kali berturut-turut.

Contoh:

- Sterilisasi susu : pemanasan antara 60°-70° C selama 30 menit, 3x berturut-turut.
- Sterilisasi serum/vaksin : pemanasan antara 55°-60°C selama 60 menit/hari, dilakukan selama 5-6 kali berturut-turut.
- Sterilisasi media Louwenstein Jensen (disebut juga sterilisasi bertingkat):

Caranya : Hari I : 40° C selama 30 menit.

: 60° C selama 30 menit.

: 80° C selama 60 menit.

Hari II: 80° C selama 60 menit.

Hari III: 80° C selama 60 menit.

(iv). Thyndalisasi

Sterilisasi dilakukan dengan pemanasan 100°C selama 60 menit dilakukan 3 kali (hari) berturut-turut.

Contoh : Sterilisasi media agar 4% atau media gula-gula.

2. Sterilisasi dengan penyinaran (radiasi)

Berbagai macam sinar radioaktif dapat mengakibatkan kematian mikroorganisme.

Adapun sinar dengan gelombang elektromagnetik yang sering digunakan untuk sterilisasi adalah :

a. Sinar Ultra Violet

Sinar UV mempunyai panjang gelombang 15–390 nm, pada panjang gelombang 260–270 nm, sinar ini mempunyai efek bakterisidal dan paling kuat pada panjang gelombang 265 nm. Alat yang sering digunakan adalah lampu UV dan biasanya digunakan untuk sterilisasi ruangan seperti kamar bedah, kamar pengisian ampul obat, atau juga pada permukaan-permukaan benda.

b. Sinar X

Sinar ini mempunyai daya penetrasi yang lebih besar dari sinar UV.

c. Sinar Gamma

Sinar ini mempunyai daya penetrasi lebih besar dari sinar X, sehingga sering digunakan untuk sterilisasi material yang tebal seperti bungkus alat-alat medis/kedokteran, paket makanan, paket

minuman, dan sebagainya. Sinar gamma merupakan sinar tembus yang berasal dari sumber energi atom seperti cobalt radioaktif. Sinar ini menembus hampir melewati semua benda kecuali lapisan timbal yang tebal.

d. Sinar Katode

Sinar ini sering digunakan untuk menghapus hama pada suhu kamar terhadap barang-barang yang telah dibungkus.

3. Sterilisasi secara kimiawi

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan bahan atau zat-zat kimia. Menurut fungsinya dapat digolongkan dalam :

- a. Antiseptik adalah bahan kimia yang dipakai untuk mencegah aktivitas mikroorganisme baik secara menghambat maupun membunuh. Umumnya digunakan bagi obyek yang hidup, misalnya pada jaringan luar manusia (kulit). Tindakannya (usahanya) disebut antiseptis. Contoh antiseptik : fenol < 5%, iodium tinktur 2%, deterjen, savlon, povidon iodine (betadin), alkohol 50 – 70%.
- b. Desinfektan yaitu bahan-bahan kimia yang digunakan untuk desinfeksi, bersifat merusak jaringan sehingga digunakan untuk benda/obyek yang tak hidup. Contoh desinfektan : formalin, iodium tinktur > 4%, klorin, anti serangga. Antiseptik dapat berubah menjadi desinfektan apabila kadarnya tinggi ataupun terlalu tinggi sehingga mempunyai sifat merusak jaringan hidup.

Beberapa zat kimia yang mempunyai daya anti mikroorganisme :

1. Fenol dan derivatnya, dapat digunakan sebagai desinfektan ataupun antiseptik tergantung kadar yang dipakai. Cara kerjanya mempresipitasikan protein secara aktif atau merusak selaput sel dengan menurunkan tegangan permukaan.
2. Alkohol, pada kadar 50-70% memiliki sifat bakterisidal untuk bentuk vegetatif. Metanol sebaiknya tidak digunakan karena berbahaya untuk mata dan daya bakterisidalnya rendah. Cara kerja adalah merusak membran sel dan menginaktivasi enzim-enzim dengan cara denaturasi protein melalui dehidrasi dan melarutkan lemak.
3. Halogen dan gugusannya, misalnya : iodine yang sering digunakan untuk antiseptik kulit. Hipoklorit digunakan sebagai antiseptik atau desinfektan. Cara kerjanya adalah mengoksidasi protein sehingga merusak membran dan menginaktivasi enzim-enzim.

4. Aldehid, misalnya formalin yang digunakan sebagai desinfektan. Cara kerjanya adalah terjadinya denaturasi protein. Kadar biasanya 1%.
5. Logam berat dan gugusannya, misalnya merkurochrom dan methiolat yang biasanya digunakan sebagai antiseptik. Perak nitrat sebagai antiseptik mata. Cara kerjanya adalah dengan mempresipitasikan enzim-enzim atau protein esensial lain yang terdapat dalam sel.
6. Deterjen, dengan cara kerja merusak membran sitoplasma oleh gugus hipofilik dan hidrofilik yang terdapat pada deterjen.
7. Gas sterilisator, misalnya etilen oksida yang merupakan gas sterilisator bagi alat/bahan yang tidak tahan panas ataupun tidak bisa disterilkan dengan zat kimia cair. Gas ini memiliki daya penetrasi dan daya mikrobiosid tinggi, tetapi mempunyai sifat toksis dan mudah meledak sehingga jarang digunakan.

Pada pelaksanaan sterilisasi sering dijumpai istilah dengan akhiran 'cide' atau 'sid', akhiran tersebut menunjukkan bahwa zat (biasanya bahan kimia) yang dipakai mampu membunuh, misalnya bakterisid (membunuh bakteri), fungisid (membunuh jamur), virusid, sporosid. Adapula istilah dengan akhiran 'stistik', akhiran tersebut menunjukkan bahwa zat (biasanya bahan kimia) yang dipakai mampu mencegah pertumbuhan mikroorganisme tetapi tidak sampai membunuh termasuk sporanya.

4. Sterilisasi secara mekanik.

Sterilisasi cara ini biasanya dilakukan dengan penyaringan bahan yang akan disterilkan melalui saringan/filter yang tidak dapat dilalui oleh kuman sehingga diperoleh filtrat yang steril. Sterilisasi ini digunakan bagi bahan-bahan cair yang tidak tahan panas seperti : serum darah, vaksin, toksin, enzim ataupun bahan yang mengandung zat yang tidak tahan panas dan juga untuk bahan-bahan yang mengandung zat-zat yang tidak stabil misalnya : larutan gula, natrium bicarbonat, dan sebagainya. Sterilisasi cara ini masih bisa terkontaminasi oleh virus.

Macam-macam filter :

1. Filter Chamberland

Elemen penyaring pada alat ini adalah yang tidak dilapisi dengan email. Cairan yang akan difiltrasi ditempatkan pada tepi luar filter mantel yang terbuat dari gelas, filtrat yang dihasilkan ditampung dalam botol steril. Porositas filter ini bervariasi yaitu : L1, L2, L3, dan seterusnya. Yang biasa digunakan untuk penyaringan bakteri adalah L3.

2. Filter Berkefield

Elemen penyaring pada alat ini terbuat dari tanah diatomae, dengan tingkat porositas kasar (veil=V), normal (N) dan halus (wenig=W). Bentuk dan cara kerja seperti Chamberland. Untuk sterilisasi biasanya digunakan ukuran N dan W.

3. Filter Seitz (filter asbes)

Merupakan alat penyaring dari 'stainless steel' selinder tahan karat yang dilengkapi dengan penyaring asbes selulosa yang dapat diganti, sedangkan pada Chamberland dan Barkefield filter dapat dicuci.

4. Penyaring dari gelas

Filter terbuat dari gelas pyrex. Saringan ini lebih disukai karena lebih mudah dibersihkan daripada saringan lain.

Tugas Praktikan

A. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman.

Alat dan bahan :

1. Biakan kuman *E.coli* dalam tabung screw cup.
2. Media lempeng agar darah.
3. Lidi kapas steril.
4. Ose (sengkelit).
5. Lampu spiritus.

Cara kerja :

1. Dengan menggunakan spidol bagilah media agar darah menjadi 3 sektor (I,II,III).
2. Sterilkan ose (sengkelit) dengan memijarkan di atas lampu spiritus dari pangkal menuju ke ujung, kemudian dibiarkan dingin 3 menit.
3. Ambil 1 sengkelit biakan *E.coli* dan oleskan pada permukaan agar darah secara merata pada sektor I (sebagai kontrol).
4. Ulangi langkah 2.
5. Ambil 1 sengkelit biakan *E.coli*, kemudian langsung dilakukan sterilisasi seperti langkah 2.
6. Oleskan pada medium agar darah pada sektor II, kemudian ulangi langkah 2.
7. Sisa suspensi kuman dididihkan selama 15 menit. Kemudian dilanjutkan dengan langkah 3 untuk dioleskan pada agar darah sektor III.
8. Inkubasikan pada 37^o C selama 18-24 jam.
9. Hitunglah jumlah koloni kuman pada lempeng agar darah, kemudian bandingkan ketiganya (kalau koloni terlalu mengumpul dan tidak bisa dihitung tulislah dengan tingkat pertumbuhan misalnya +1, +3).

Hasil dan evaluasi:

| | Sektor I Tidak dipanaskan | Sektor II Dipijarkan | Sektor II Dididihkan |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Pertumbuhan kuman | | | |

B. Sterilisasi secara kimia

Alat dan bahan

1. NaCl fisiologis steril dengan lidi kapas steril
2. Media agar darah
3. Antiseptik : alkohol

Cara kerja :

1. Dengan spidol bagilah bagian bawah media agar menjadi 2 sektor (I,dan II).
2. Lidi kapas dibasahi dengan Nacl steril, kemudian diusapkan pada telapak tangan kemudian ditanam pada permukaan media agar darah pada sector I.
3. Bersihkan telapak tangan dengan menggunakan kapas yang sudah dibasahi alcohol 70%. Biarkan beberapa saat, sampai alcohol menguap.
4. Ambil kapas lidi yang sudah dibasahi NaCl steril, kemudiaan diusapkan pada telapak tangan yang sudah dibersihkan dengan alcohol. Kapas lidi diusapkan pada media agar darah pada sector II.
5. Inkubasikan media agar darah pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam.
6. Hitung pertumbuhan koloni dan masukkan dalam tabel untuk kemudian dibandingkan.

Hasil dan evaluasi :

| | Sektor I Kontrol | Sektor II Alkohol 70% |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Pertumbuhan kuman | | |