

BUKU PANDUAN PRAKTIKUM
Mikrobiologi Umum

Oleh:

Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si.
Ir. Liliek Harianie, AR., MP.
Nur Kusmiyati, M.Si.
Prilya Dewi Fitriyanti, M.Sc.



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2018

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga buku petunjuk praktikum mikrobiologi umum ini.

dapat diselesaikan sesuai waktu yang dijadwalkan. Buku ini disusun dengan harapan dapat membantu para mahasiswa untuk lebih mudah mempelajari mikrobiologi, dan sebagai pedoman dalam melaksanakan praktikum mikrobiologi.

Topik-topik praktikum yang ada di dalam buku ini disusun dengan memperhatikan fasilitas yang tersedia disamping memperhatikan pengetahuan dan keterampilan dalam bidang biologi yang perlu dikuasai oleh mahasiswa biologi. Penulis rasakan masih ada kekurangan dalam penyusunan buku petunjuk praktikum mikrobiologi ini. Segala macam kritikan yang membangun dan saran dari semua pihak akan dihargai dan diterima dengan lapang hati.

Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi pemakainya.

Malang, Februari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Tata Tertib Praktikum

Topik 1	Media Pertumbuhan Mikroba, Teknik Aseptis dan Sterilisasi.....	4
Topik 2	Teknik Isolasi, Pemurnian, Pemeliharaan Kultur dan Penghitungan Mikroba	9
Topik 3	Respirasi Bakteri	23
Topik 4	Pewarnaan Bakteri, Endospora Bakteri, dan Kapang.....	25
Topik 5	Uji Kualitas Air berdasar Nilai MPN Coliform	33
Topik 6	Determinasi Bakteri dengan Uji Biokimiawi	37
Topik 7	Kurva Pertumbuhan Bakteri	41

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Dalam praktikum mikrobiologi, saudara bekerja dengan mikroorganisme, oleh karena itu hendaknya berhati-hati karena mikroorganisme ini sangat kecil atau kasat mata dan tidak berwarna sehingga sukar dilihat atau diketahui keberadaannya. Walaupun bahan yang disediakan umumnya tidak berbahaya bagi kesehatan namun tetap harus berhati-hati dengan mikroorganisme. Laksanakan dengan tertib dan seksama semua petunjuk yang telah diberikan oleh pembimbing, serta patuhilah semua tata tertib laboratorium sebagai berikut:

1. Letakkan tas dan benda-benda lain milik saudara yang tidak diperlukan pada tempat yang telah disediakan. Jangan sekali-kali meletakkan barang-barang lain diatas meja praktikum
2. Dilarang melakukan aktivitas makan dan minum didalam laboratorium mikrobiologi
3. Gunakanlah jas laboratorium selama praktikum berlangsung karena saudara akan bekerja dengan bahan-bahan kimia dan mikroorganisme
4. Lepaskanlah sepatu dan gunakanlah sandal khusus laboratorium saudara, gunakanlah masker dan sarung tangan (hands glove steril) bila perlu
5. Sebelum mulai bekerja dipelajari betul apa yang akan dilakukan. Buatlah skema kerja yang baik sehingga saudara dapat bekerja dengan tepat, cepat dan teliti
6. Kondisi steril penting dalam praktikum mikrobiologi, oleh karena itu ikutilah selalu cara kerja secara tepat dan steril. Apabila hal ini diabaikan maka tidak menutup kemungkinan saudara akan mengalami kegagalan
7. Jauhkan tangan saudara dari mulut, hidung, telinga selama bekerja di laboratorium
8. Kalau terjadi kesalahan atau kecelakaan segera lapor kepada asisten dan pembimbing
9. Setelah praktikum selesai, bersihkan semua alat-alat yang telah digunakan menurut ketentuan laboratorium. Meja dibersihkan dengan menggunakan desinfektan atau alkohol setelah selesai mengerjakan praktikum
10. Setiap kali selesai praktikum **DIWAJIBKAN** menyerahkan jurnal pekerjaan atau laporan sementara kepada asisten pendamping masing-masing untuk mendapatkan persetujuan keabsahannya
11. Sebelum meninggalkan laboratorium, matikan gas atau kompor pemanas, lampu, air dan jangan lupa mencuci tangan dengan desinfektan

TOPIK 1

MEDIA PERTUMBUHAN MIKROBA, TEKNIK ASEPTIS DAN STERILISASI

A. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mempelajari cara pembuatan media
2. Mempelajari macam-macam teknik sterilisasi
3. Mengetahui prinsip kerja autoklaf sebagai alat untuk sterilisasi

B. DASAR TEORI

Media untuk Pertumbuhan Mikroba

Kelangsungan hidup dan pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh adanya nutrisi dan faktor lingkungan. Bahan nutrisi yang tersedia dapat berupa bahan alami dan dapat pula berupa bahan sintetis. Bahan nutrisi yang digunakan mikroorganisme biasanya berupa senyawa sederhana yang tersedia secara langsung atau berasal dari senyawa yang kompleks yang kemudian dipecah oleh mikroorganisme menjadi senyawa yang sederhana melalui proses enzimatik. Bahan nutrisi ini dapat berupa cairan atau padatan setengah padat (semi solid) yang disebut sebagai media.

Berdasarkan Komposisi atau susunan bahannya

a. Media alami

Komposisi media ini tidak diketahui secara pasti baik jenisnya maupun ukurannya. Media ini sudah tersedia secara alami misalnya air, nasi, buah, biji, daging dan lain-lain

b. Media sintetis

Sering juga disebut media buatan. Komposisi senyawa berikut takarannya diketahui secara pasti, tidak tersedia secara alami tapi dibuat. Media sintetis sering digunakan untuk mempelajari sifat genetika mikroorganisme. Senyawa organik dan anorganik ditambahkan dalam media sintetis harus murni sehingga harganya mahal, misalnya: sabouroud agar, czapek's dox agar, cairan hanks dan lain-lain.

c. Media semi sintetis

Komposisinya sebagian diketahui secara pasti, sebagian lagi tidak disebut juga media setengah buatan misalnya potato dextrose agar, nutrient agar dan lain-lain.

Berdasarkan Bentuknya

a. Media cair

Komposisi dapat sintetis dapat pula alami. Keadaan cair karena tidak ditambahkan bahan pematat.

b. Media padat

Sama halnya dengan media cair hanya bedanya disini ditambahkan bahan pematat (agar-agar, amilum atau gelatin).

c. Media semi padat

Sebenarnya media ini termasuk media padat tapi karena keadaannya lembek disebut semisolid. Bahan pematat yang ditambahkan kurang dari setengah medium padat sedangkan komposisinya sama dengan yang lainnya.

Berdasarkan Kegunaannya

a. Media umum

Media ini digunakan secara umum artinya media ini dapat ditumbuhi oleh berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur misalnya NA (nutrient agar) dan lain-lain.

b. Media selektif

Media ini dipakai untuk menyeleksi mikroorganisme sesuai dengan yang diinginkan, jadi hanya satu jenis mikroorganisme saja yang dapat tumbuh dalam media ini atau hanya satu kelompok tertentu saja, misalnya media salmonella sigella agar yaitu media khusus untuk mengamati atau menyelidiki salmonella atau shigella dari makanan atau bahan lain.

c. Media diferensial

Media ini digunakan untuk menyeleksi mikroorganisme. Medium ini dapat ditumbuhi berbagai jenis mikroorganisme tapi salah satu diantaranya dapat memberikan salah satu ciri yang khas sehingga dapat dibedakan dari yang lain dan dapat dipisahkan

d. Medium pengaya

Medium ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme untuk keperluan tertentu. Dibiakkan dalam medium ini supaya sel-sel mikroorganisme tertentu dapat berkembang dengan cepat sehingga diperoleh populasi yang tinggi. Komposisi medium sangat diperluka dan sangat menguntungkan bagi pertumbuhan sel mikroorganisme yang bersangkutan.

Sterilisasi

Suatu alat dan bahan disebut steril apabila bahan tersebut bebas dari mikroorganisme. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu: cara kimia, mekanik atau fisik.

a. Sterilisasi cara kimia

Bahan atau senyawa kimia yang memiliki sifat membunuh mikroorganisme dapat digunakan untuk sterilisasi atau desinfektan, misalnya dibidang kedokteran. Contohnya alkohol 70%, detergen, karbol, lisol, merkurokrom dan lain-lain

b. Sterilisasi cara mekanik

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan alat penyaring yang sangat halus atau disebut metode filtrasi.

c. Sterilisasi cara fisik

Umumnya dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu tinggi. Salah satu contohnya adalah menggunakan alat autoklaf, disterilkan pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 kg/cm² (15 lbs) dalam jangka waktu tertentu bergantung pada apa yang disterilkan.

C. PROSEDUR KERJA

1. Pembuatan Media

Alat dan bahan

- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| a. Timbangan | h. Kompor pemanas |
| b. Gelas ukur 500 ml | i. Aquades |
| c. Labu erlenmeyer 500 ml dan 1000 ml | j. Kapas |
| d. Tabung reaksi | k. Kain kasa |
| e. Kaca pengaduk | l. Benang atau tali |
| f. Autoklaf | m. alkohol 70% |
| g. Beaker glass 500 ml dan 1000 ml | |

Membuat medium umum untuk bakteri (Nutrient Agar/NA dan Nutrien Broth/NB)

- | | |
|------------------------------|----------|
| a. NB manual | |
| Daging sapi tanpa lemak..... | 500 gram |
| Peptone..... | 5 gram |
| Aquades..... | 1000 ml |
| b. NB instan | |
| NB..... | 20 gram |
| Aquades | 1000 ml |
| c. NA manual | |
| Daging sapi tanpa lemak..... | 500 gram |
| Peptone..... | 5 gram |
| Agar-agar..... | 15 gram |
| Aquades..... | 1000 ml |
| d. NA instan | |
| NA..... | 20 gram |
| Aquades | 1000 ml |

Cara Kerja

A. Media NA dan NB Manual

1. Cuci bersih daging sapi, buang bagian lemak jika masih ada
2. Iris daging dengan ukuran 1x1 cm², dimasukkan dalam beaker glass atau wadah dan ditambah akuades sebanyak 500 mL
3. Rebus atau masak daging selama 25 menit atau sampai daging lunak (*jaga agar volume air tetap, jika berkurang tambahkan akuades*)
4. Saring rebusan daging sehingga diperoleh air kaldu, campurkan dengan pepton, agar dan akuades hingga volume akhir 1000 mL (*pada pembuatan NB, tidak perlu ditambahkan agar*)
5. Panaskan kembali campuran kaldu, pepton dan agar, aduk hingga homogen dan tunggu sampai mendidih, dinginkan pada suhu ruang
6. Cek pH medium menggunakan pH meter dan atur pada pH 7
7. Masukkan medium kedalam tabung reaksi masing-masing 10 ml untuk media tegak dan 5-7 ml untuk media miring
8. Tutuplah tabung berisi medium dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa

9. Sterilkan dengan autoklaf. Media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung

B. Media NA dan NB Instan

1. Timbang media sesuai kebutuhan (penghitungan jumlah mengacu pada takaran yang tertera pada kemasan)
2. Larutkan 20 gram bubuk atau serbuk NA/NB instan ke dalam 1000 ml akuades
3. Aduk hingga serbuk larut, panaskan diatas penangas ditunggu hingga mendidih (*larutan terlihat jernih*)
4. Dinginkan dan dituang pada cawan petri maupun tabung reaksi serta disterilisasi dengan autoklaf

Membuat medium untuk jamur (*Potato Dextrose Agar*)

a. Manual

Kentang.....	200 gram
Dextrose.....	10 gram
Agar-agar.....	15 gram
Aquades.....	1000 ml

b. Instan (d disesuaikan dengan kemasan PDA instan)

PDA.....	39 gram
Aquades.....	1000 ml

Cara Kerja

A. Media PDA Manual

1. Kupaslah kentang lalu bersihkan, potong bentuk dadu berukuran 1x1 cm² kemudian timbang hingga diperoleh 200 g kentang.
2. Potongan kentang dimasak dalam 500 ml akuades dan biarkan mendidih, jaga agar volume tetap (*tambahkan akuades jika menyusut*)
3. Saring ekstrak kentang dan ambil filtratnya
4. Tambahkan dekstrose dan agar-agar serta akuades hingga volume akhir 1000 mL aduk hingga homogen
5. Panaskan pada api sedang sambil diaduk hingga homogen atau mendidih
6. Masukkan pada tabung reaksi masing-masing 10 ml untuk media tegak dan 5-7 ml untuk media miring
7. Tutuplah tabung berisi medium dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa
8. Sterilkan dengan autoklaf
9. Setelah disterilkan untuk media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung

B. Media PDA Instan

1. Timbang media sesuai kebutuhan (penghitungan jumlah mengacu pada ukuran yang tertera di kemasan 39 g / L)
2. Larutkan serbuk PDA instan ke dalam 1000 ml akuades

3. Aduk hingga serbuk larut, panaskan diatas penangas ditunggu hingga mendidih (*larutan terlihat jernih*)
4. Dinginkan dan tuang pada cawan petri maupun tabung reaksi serta disterilisasi dengan autoklaf

2. Teknik Aseptis Meja Kerja dan Tangan (Sterilisasi secara kimia)

Alat dan bahan

- a. Alkohol 70 %
- b. Botol semprot
- c. Kertas Tissue/kain lap bersih

Cara Kerja

1. Sebelum mulai bekerja cucilah tangan dengan menggunakan air dan keringkan
2. Semprotkan alkohol 70% pada bagian telapak dan punggung tangan, keringkan.
3. Bersihkan meja yang akan digunakan dari barang atau alat yang tidak dipergunakan
4. Semprotkan alkohol 70% pada permukaan meja kerja
5. Bersihkan sisa semprotan alkohol menggunakan kertas tissue bersih dengan arah yang sama atau searah

3. Sterilisasi menggunakan autoklaf (Sterilisasi secara fisika)

Alat dan bahan

- a. Cawan Petri dan alat gelas lain serta media yang akan disterilisasi
- b. Kertas HVS
- c. Plastik tahan panas
- d. Autoklaf
- e. Karet gelang
- f. Alumunium foil

Cara Kerja

1. Bungkus cawan petri dengan kertas HVS kemudian masukkan ke dalam plastik tahan panas. Alat gelas yang lain dibungkus menggunakan alumunium foil dan atau plastik tahan panas.
2. Isilah autoklaf dengan aquades setinggi batas sarangan, masukkan alat dan bahan (media) yang akan disterilisasi.
3. Aturilah suhu sebesar 121°C, dengan tekanan 1 atm dan aturlah waktu yang akan digunakan sampai pada angka 15-20 menit.
4. Tutup autoklaf dan pastikan dalam kondisi terpasang rapat.
5. Pastikan lubang uap dalam keadaan tertutup (EXHAUST CLOSE)
6. Tarik tuas power ke arah ON, lalu tekan tombol ON (push) untuk memulai sterilisasi, apabila lampu hijau menyala maka dapat dipastikan autoklaf dalam keadaan bekerja.
7. Setelah alarm berbunyi maka tarik tuas power hingga ke titik OFF kemudian bukalah lubang uap dengan cara memutarnya kearah OPEN.
8. Diamkan autoklaf selama 15 menit untuk memastikan bahwa uap telah keluar dan autoklaf dalam keadaan tidak panas.
9. Bukalah tutup autoklaf dan keluarkan alat-alat yang telah steril

TOPIK 2

TEKNIK ISOLASI, PENANAMAN (KULTIVASI), PEMURNIAN (PURIFIKASI) DAN PENGHITUNGAN JUMLAH (ENUMERASI) MIKROBA

A. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mempelajari langkah-langkah pengambilan sampel
2. Mempelajari cara-cara pemindahan mikroba secara aseptis
3. Mempelajari teknik-teknik isolasi dan penanaman mikroba
4. Mempelajari morfologi koloni mikroba pada media
5. Mengetahui metode penghitungan jumlah mikroba *Total Plate Count*

B. DASAR TEORI

Mikroorganisme terdapat dimana-mana, baik didalam tanah, air, udara maupun pada makhluk hidup termasuk pada jaringan tubuh kita sendiri (kulit dan selaput lendir). Mikroba sangat beragam jumlahnya, yang umumnya berada dalam suatu populasi campuran. Dalam keadaan sebenarnya (di alam bebas) tidak ada bakteri yang hidup tersendiri terlepas dari spesies lainnya. Kerap kali bakteri patogen terdapat bersama-sama bakteri yang tidak berbahaya sehingga beberapa teknik isolasi dan pemurnian mikroba sangat diperlukan untuk memisahkan tiap jenis mikroba tersebut sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut (Waluyo, 2004).

Teknik pengambilan sampel untuk mendapatkan mikroba yang diinginkan merupakan suatu aspek penting yang harus diperhatikan ketika melakukan penelitian mikrobiologi. Sampel yang diambil haruslah merupakan representasi dari seluruh bagian yang diteliti. Untuk itu diperlukan teknik yang benar agar terhindar dari kesalahan yang mengakibatkan sampel menjadi bias. Beberapa prinsip pengambilan sampel antara lain adalah; sampel yang diambil merupakan perwakilan dari keseluruhan bagian yang diteliti; sampel yang diambil benar-benar dari sumbernya dan sampel tetap terjaga kondisinya seperti saat pengambilan sampai dilakukan tahap pembiakan dan analisa sampel.

Morfologi mikroba serta jumlahnya dapat diobservasi dengan cara mengisolasi dan membiakkannya pada media agar nutrisi terlebih dahulu. Koloni bakteri dapat diamati pertumbuhannya setelah diinkubasi selama 1 x 24 atau 2 x 24 jam pada suhu yang sesuai, sedangkan jamur dapat diamati setelah 5-7 hari inkubasi. Karakteristik morfologi tiap koloni perlu dicatat sesuai dengan ciri-ciri yang ditunjukkan sebagai bagian dari proses identifikasi bakteri.

Isolasi dan Penanaman Mikroba

Mengisolasi suatu mikroba didefinisikan sebagai proses memisahkan mikroba dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan (Jutono dkk, 1980). Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikrobia adalah: 1). *Spread plate method* (cara tebar/sebar), 2). *Streak plate method* (cara gores), 3). *Pour plate method* (cara tabur). Namun demikian, untuk mengurangi kepadatan mikroba yang diperoleh dari suatu sampel diperlukan adanya proses pengenceran bertingkat atau *serial dilution*.

a. Teknik Preparasi Sampel

Sampel yang telah diambil perlu dipreparasi sehingga memudahkan untuk proses isolasi mikroba. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung pada bentuk sampel:

Pencucian.

Ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. Pencucian merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam aquades dengan perbandingan 1: 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan aquades 45 ml. Selanjutnya air cucian diinokulasikan ada media yang telah disiapkan. Amati pertumbuhan mikrobial yang terjadi pada media setelah diinokulasikan selama 3 sampai 7 hari di ruang dengan suhu kamar.

Teknik Pengulasan (*Swab*)

Teknik ini bertujuan untuk memindahkan mikroba yang berada di permukaan sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan dengan menggunakan *cotton swab* / *cotton bud*. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu, kulit dll. Teknik ini dilakukan dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Hasil ulasan akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan attraktan (contoh pepton water).

Penghancuran (Maserasi)

Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antar lain biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1:9 (w/v).

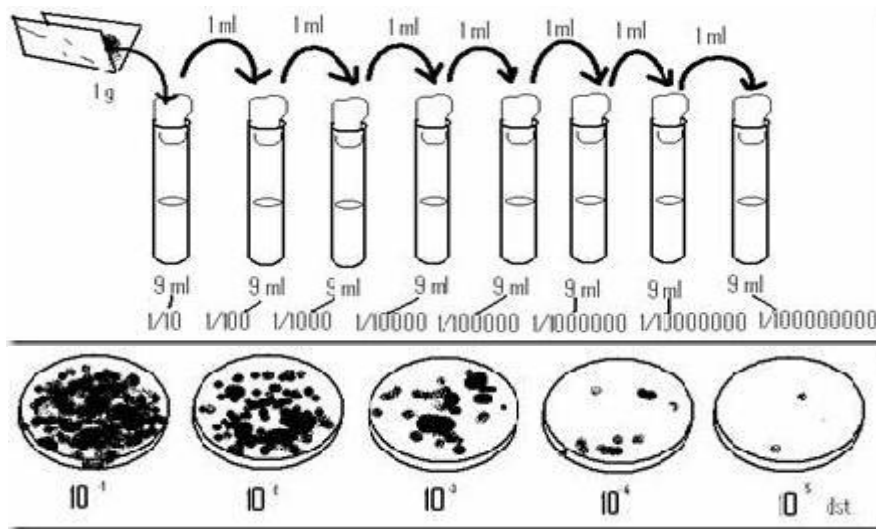
Untuk sampel dari tanah tidak perlu dimaserasi. Hasil maserasi selanjutnya di inokulasikan pada media yang telah disiapkan. Selanjutnya inkubasikan cawan petri yang telah diinokulasikan tersebut pada suhu ruang. Setelah 3 sampai 7 hari masa inkubasi, amati mikrobial yang tumbuh pada media tersebut.

b. Teknik *Serial Dilution* (Pengenceran bertingkat/berseri)

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1:9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya (Gambar 1).

Cara Kerja:

1. Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1: 9 (jika memakai teknik pencucian dan pengolesan maka akuades/larutannya sudah termasuk pengencer 10^{-1}). Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya sampai homogeny atau menggunakan vortex.
2. Ambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Pindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. **Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.**



Gambar 1. Teknik pengenceran bertingkat dan penanaman pada media

c. Teknik Isolasi dan Penanaman Mikroba

Penanaman dari suspensi

Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil suspensi dari beberapa tabung pengenceran terakhir.

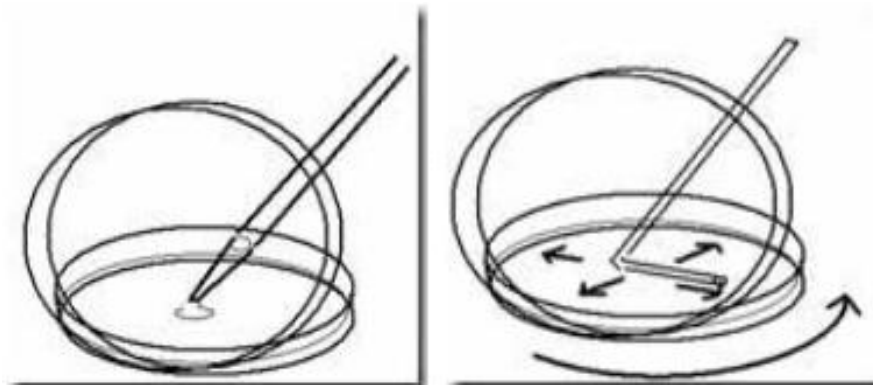
Spread Plate Method (Metode cawan tebar/sebar)

Teknik *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat.

Cara kerja:

- a. Pindahkan 0,1 mL suspensi berisi bakteri secara aseptis ke permukaan media yang telah memadat dalam cawan petri menggunakan pipet.

- b. Sterilisasi spreader/batang bengkok/batang Drigalsky dengan cara dicelupkan dalam alkohol 70% kemudian dibakar dengan dilewatkan diatas api, biarkan spreader dingin.
- c. Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan *spreader* secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar 2).
- d. Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar ataupun inkubator dan amati pertumbuhannya.



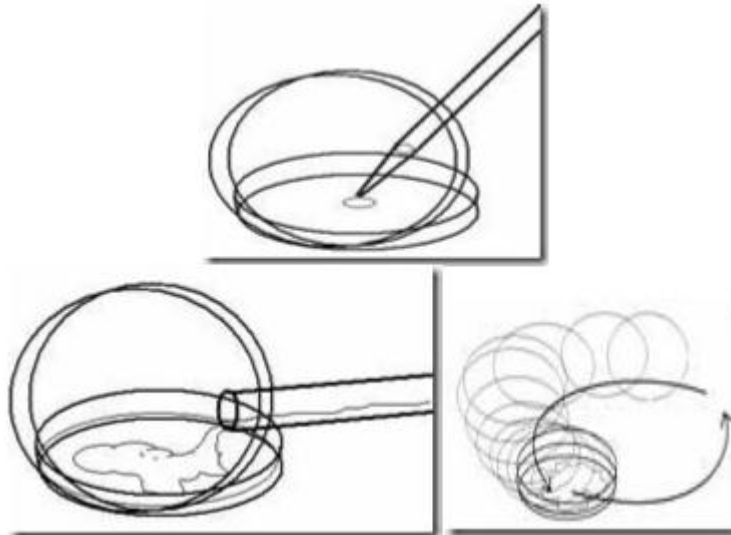
Gambar 2. Teknik *Spread plate*

Pour Plate Method (Metode cawan tuang)

Tujuan dari teknik ini adalah untuk menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan medium agar saja melainkan sel terendam dalam medium (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya O₂ dan ada yang tumbuh di dalam agar dengan kandungan oksigen sedikit. Teknik ini memerlukan agar yang belum padat (>45°C) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat.

Cara kerja:

- a. Teteskan 1 ml suspensi sel kedalam cawan petri kosong yang telah steril secara aseptis
- b. Tuangkan media agar yang hangat (suhu 45 – 50 °C) ke cawan yang telah berisi suspensi bakteri tersebut dan tutup (Gambar 3)
- c. Homogenkan campuran media dan suspensi dengan cara goyangkan atau putar cawan petri secara perlahan membentuk angka delapan (8) di atas meja yang rata dalam kondisi aseptis (Gambar 3).
- d. Setelah agar memadat cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu kamar ataupun inkubator selama 24 jam. Amati pertumbuhannya.



Gambar 3. Teknik *pour plate*

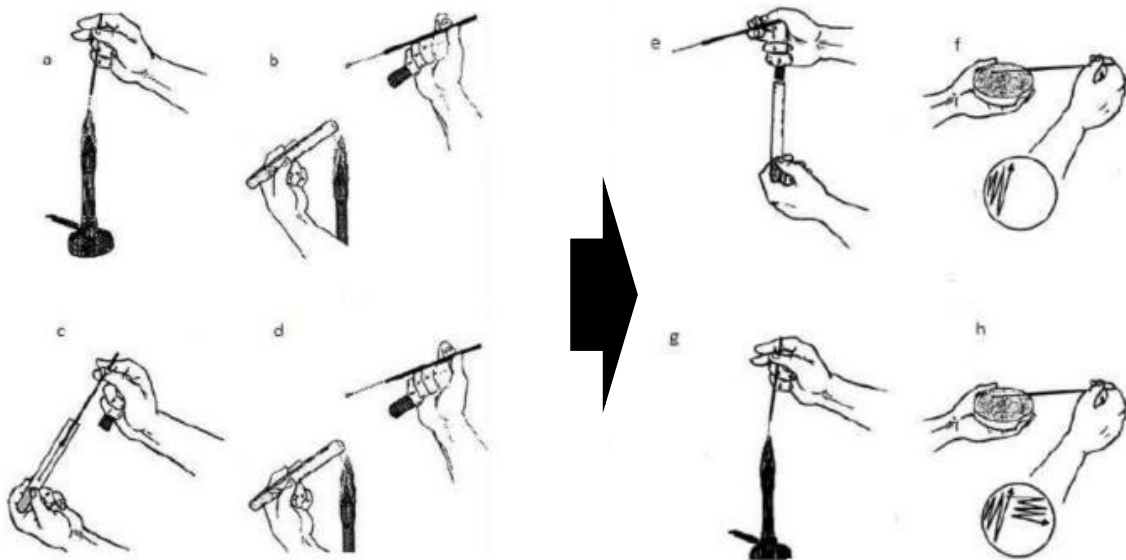
Streak Plate Method (Metode cawan gores)

Teknik penanaman mikroba dengan goresan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru. Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada medium-agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium-agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat dikultur lebih lanjut (Jutono dkk, 1980).

Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan medium yang basah. Pencegahan terjadinya penyebaran koloni harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994).

Cara Kerja:

- a. *Perhatikan teknik transfer aseptis / memindahkan biakan mikroba secara aseptis (Gambar 4).* Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian beri jarak dari bunsen dan diamkan hingga dingin.
- b. Gunakan ose yang telah dingin untuk mengambil kultur murni bakteri (ambil sebanyak 1 ose).
- c. Goreskan pada permukaan medium-agar dimulai dari satu ujung (*Perhatikan teknik / tipe penggoresan*). **Hati-hati saat menggores, jangan sampai medium rusak!** Ose yang disentuh pada permukaan medium sebaiknya tidak ditekan terlalu dalam.
- d. Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
- e. Inkubasikan cawan petri berisi mikroba dengan posisi terbalik pada suhu ruang atau pada suhu tertentu dalam incubator selama 24-48 jam dan amati pertumbuhannya.



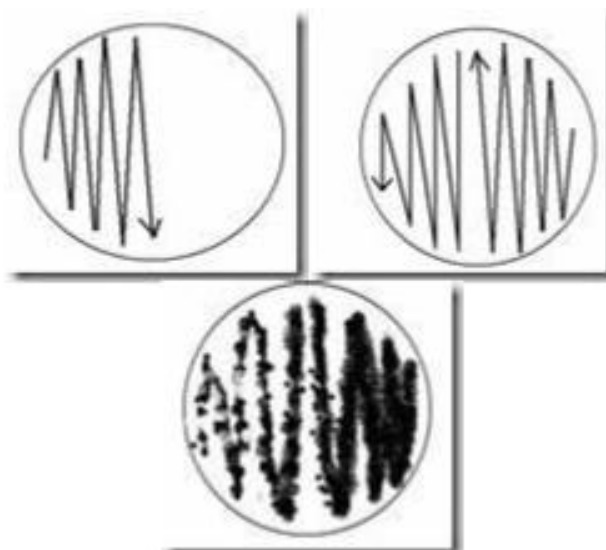
Gambar 4. Teknik transfer aseptis kultur mikroba dari tabung reaksi ke cawan petri (Tabo, 2004).

Metode cawan gores dibagi menjadi beberapa tipe, diantaranya:

- **Goresan Sinambung**

Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru

Cara kerja: Sentuhkan ujung ose pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar. Putar cawan 180° lanjutkan goresan sampai habis (Gambar 5). Tipe goresan sinambung/kontinyu juga dilakukan pada media agar miring dalam tabung reaksi.



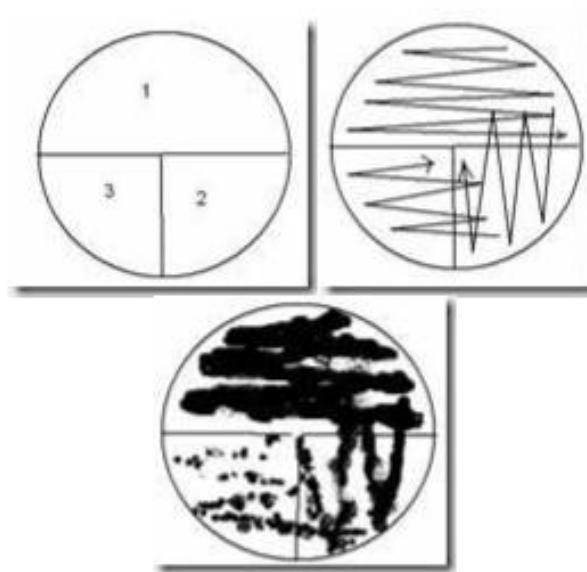
Gambar 5. Tipe goresan sinambung

- **Goresan T**

Tipe goresan T digunakan untuk mendapatkan koloni tunggal dengan membagi wilayah goresan menjadi 3.

Cara kerja: Tandai bagian luar-bawah cawan petri dengan membagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker, inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag. Panaskan jarum ose dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2. Cawan diputar untuk memperoleh

goresan yang sempurna. Lakukan hal yang sama pada daerah 3 (Gambar 6).

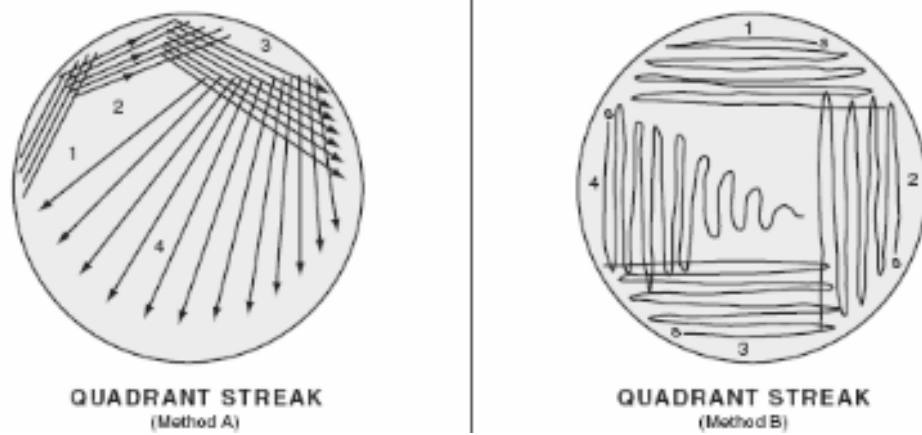


Gambar 6. Tipe goresan T

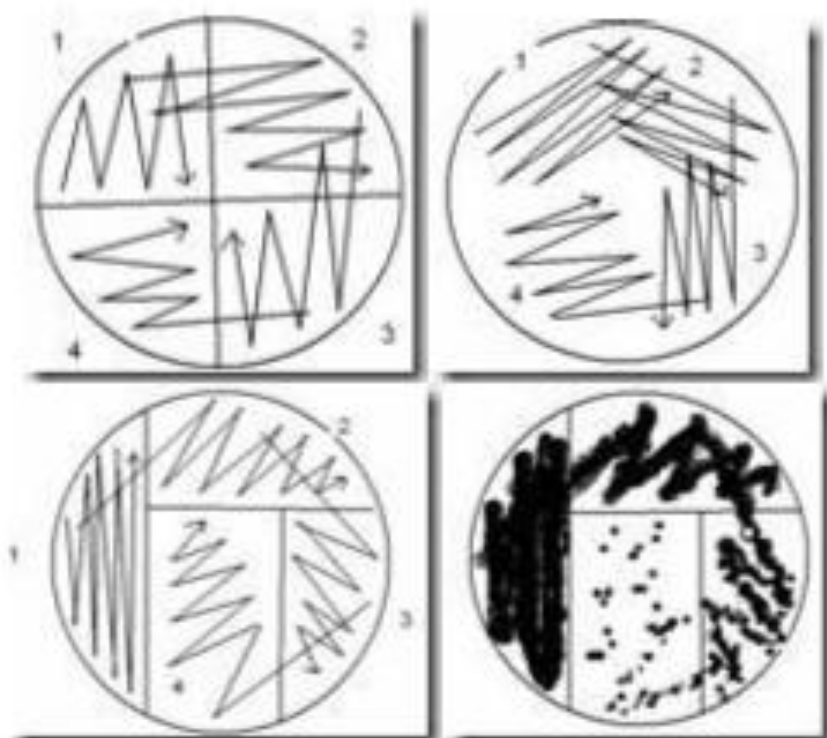
- **Goresan kuadran**

Tipe goresan kuadran hampir sama dengan goresan T namun pola goresan dibagi ke dalam 4 bagian/wilayah. Pembagian 4 wilayah diharapkan akan memisahkan koloni bakteri dengan lebih baik sehingga diperoleh koloni tunggal bakteri. Tipe goresan kuadran dapat dilakukan dengan menggores secara zig-zag maupun secara terputus (Gambar 7a).

Cara kerja: Tandai bagian luar-bawah cawan petri dengan membagi cawan menjadi 4 bagian menggunakan spidol marker, inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag/terputus. Panaskan jarum ose dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak pada daerah 2. Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna. Lakukan hal yang sama pada daerah 3 dan 4 (Gambar 7b).



Gambar 7a. Model penggoresan secara terputus (metode A) dan zig-zag (metode B) pada teknik goresan kuadran



Gambar 7b. Tipe goresan kuadran

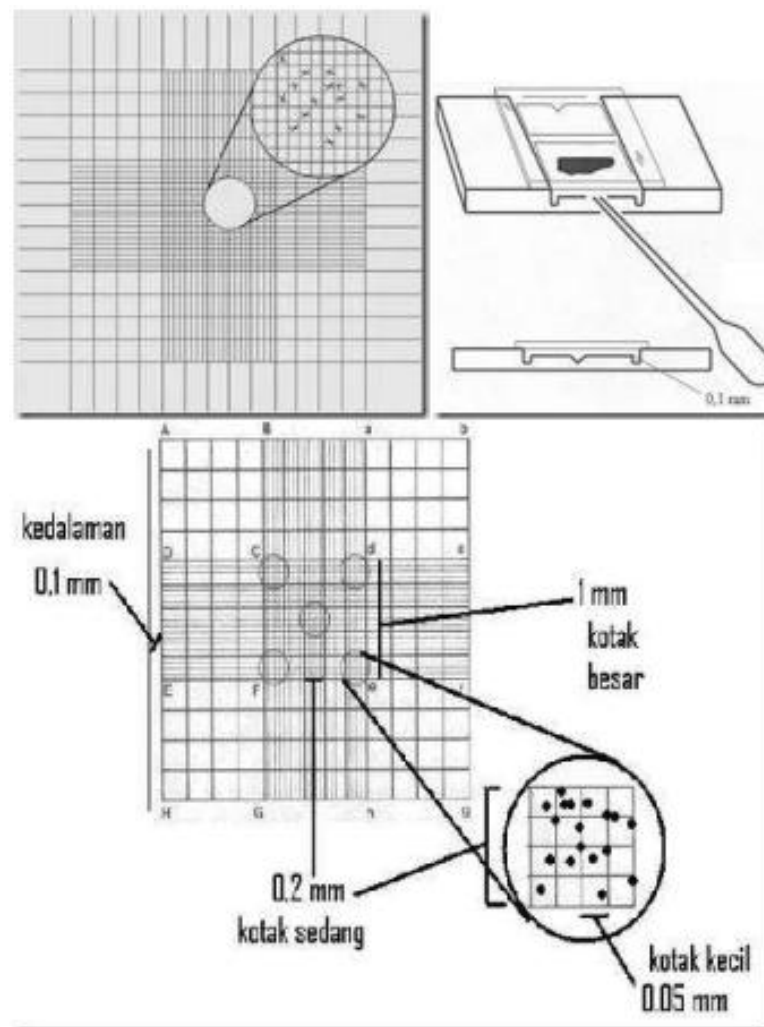
Penghitungan Jumlah Mikroba

Penghitungan jumlah sel mikroba dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, antara lain secara langsung dengan hitung mikroskopik (*direct microscopic count*) menggunakan *haemocytometer* dan secara tidak langsung dengan hitung cawan (*plate count*), selain itu juga terdapat penghitungan menggunakan metode MPN dan turbidimetri menggunakan alat spektrofotometer.

a. Penghitungan langsung menggunakan haemocytometer

Hitung mikroskopik merupakan metode yang cepat dan murah tetapi mempunyai beberapa kelemahan antara lain: sel-sel yang mati tidak dapat dibedakan dari sel hidup, sel-sel yang berukuran sngat kecil sulit dilihat sehingga kadang-kadang tidak terhitung.

Pada haemocytometer ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel bakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui (Gambar 8).



Gambar 8. Haemocytometer beserta kotak hitungnya

Cara Penghitungan:

Luas kotak sedang

$$\begin{aligned}\text{Luas kotak sedang} &= p \times l \\ &= 0,2 \times 0,2 = 0,04 \text{ mm}^2\end{aligned}$$

(Rumus 1)

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{\text{Jumlah sel rata-rata tiap petak} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm)}}$$

Prosedur kerja:

1. Bersihkan haemocytometer dan gelas penutupnya (*coverslip*) dengan menggunakan larutan deterjen, bilas dengan akuades lalu bersihkan lagi dengan alkohol, kering anginkan atau tempelkan lap atau pengering berbahan lembut (jangan menggunakan tissue dengan serat yang kasar karena akan menggores kotak-kotak haemocytometer).
2. Letakkan haemocytometer beserta gelas penutupnya pada mikroskop, cari kotak-kotak (ruang pengamatan) yang ada di haemocytometer dengan menggunakan perbesaran lemah terlebih dahulu, jika sudah berhasil menemukan, dilanjutkan perbesaran yang lebih kuat. Tentukan 5 kotak pengamatan yang akan dihitung (umumnya dipilih kotak ukuran sedang pada pojok kanan atas, kanan bawah, kiri atas, kiri bawah dan tengah)
3. Homogenkan suspensi mikroba (bakteri/yeast) yang akan dihitung jumlah selnya dengan cara digojog menggunakan vortex.
4. Ambil sampel mikroba pipet steril dari media cair secukupnya (0,1 - 0,5 ml) lalu masukkan ke dalam parit-parit pada haemocytometer (jangan sampai berlebihan). Perhatikan / cari kembali kotak-kotak pengamatan.
5. Hitunglah jumlah sel mikroba dengan rumus diatas (rumus 1).

b. Penghitungan tidak langsung : hitung cawan / Angka Lempeng Total / *Total Plate Count* untuk bakteri / Angka Kapang Khamir (AKK) untuk jamur

Prinsip metode hitung cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel mikroba itu akan berbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung dengan mata telanjang, dan disebut dengan "*colony forming unit*" = cfu.

Metode hitungan cawan dapat dilakukan dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*). Penghitungan jumlah mikroba dianggap valid jika dalam satu cawan tumbuh koloni sebanyak 30-300, sehingga jika pertumbuhan mikroba terlalu padat, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu.

(Rumus 2)

Faktor pengenceran = FP

FP = pengenceran awal x pengenceran selanjutnya x jumlah yang ditumbuhkan (volume yang dimasukkan dalam cawan petri (0,1 mL atau 1 mL))

$$\text{Koloni per mL (cfu/mL)} = \text{Jumlah koloni} \times (1/\text{FP})$$

Cara menghitung jumlah koloni pada cawan harus memenuhi kaidah sebagai berikut (Schlegel, 2001):

- Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300
- Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloni diragukan, dapat dihitung sebagai satu koloni.
- Suatu deretan (rantai) yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.
- Data yang dilaporkan harus mengikuti peraturan yaitu hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka ke dua dibelakang koma.
- Jika semua pengenceran menghasilkan angka kurang dari 30 koloni, hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung. Jika semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan Petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung.
- Jika terdapat lebih dari satu cawan yang mempunyai jumlah koloni yang memenuhi syarat, maka dihitung nilai rata-ratanya.

Satu koloni bakteri yang terpisah dengan koloni lainnya dapat diamati tipe pertumbuhan pada masing-masing media, diantaranya dilakukan terhadap konsistensi, bentuk koloni, warna koloni dan permukaan koloni (Gambar 9) (Lim, 2000)

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25 °C dan dinyatakan dalam satuan koloni /mL (Soekarto, 2008). Prinsip uji AKK (Angka Kapang Khamir) yaitu pertumbuhan kapang dan khamir yang telah diisolasi menggunakan metode *pour plate* ataupun *spread plate* pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25 °C. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya.

C. PROSEDUR KERJA

1. Isolasi Bakteri dari Tanah

Alat dan bahan:

- a. Auger / Gurdi
- b. Sarung tangan steril
- c. Plastik klip steril
- d. Neraca
- e. Tabung reaksi
- f. NaCl steril
- g. Medium NA
- h. Antifungi
- i. Mikropipet dan tip

Cara Kerja:

1. Carilah lahan yang akan diambil sampel tanahnya
2. Cabuti rumput atau tanaman lain yang mungkin tumbuh di atas bagian lahan yang akan diambil sampel tanahnya
3. Pasang sarung tangan
4. Tancapkan auger. Jika tidak ada auger, bisa dilakukan dengan sendok atau spatula steril. Tanah yang diambil minimal 4 cm dari permukaan tanah.
5. Masukkan tanah ke dalam plastik klip steril, bawa ke laboratorium
6. Timbang 1 gram sampel tanah dengan prosedur aseptis
7. Siapkan tabung reaksi sebanyak 7 tabung berisi media NaCl steril untuk proses dilusi (sipakan tabung berlabel $10^{-1} - 10^{-7}$), tiap tabung berisi 9 mL NaCl steril.
8. Masukkan tanah yang telah ditimbang ke dalam tabung pengenceran pertama 10^{-1} secara aseptis (dekat api)
9. Homogenkan tabung pada pengenceran pertama (10^{-1}) menggunakan vortex, pindahkan 1 mL ke tabung kedua (10^{-2}) dan seterusnya (**Lihat prosedur Teknik Dilusi/Pengenceran**), ambil suspensi sebanyak 0,1 mL pada tiga pengenceran terakhir untuk ditanam pada medium NA yang telah ditambah antifungi menggunakan metode/teknik *Pour Plate* (**Lihat prosedur Teknik Pour Plate**)
10. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam.
11. Hitung koloni yang tumbuh dengan metode hitung cawan (**Lihat prosedur hitung cawan**) dan amati karakter morfologinya (Lihat gambar 9).
12. Koloni yang tumbuh terpisah atau yang berbeda karakternya dipilih untuk kemudian dipurifikasi menggunakan metode *streak plate* (**Lihat prosedur streak plate**)

2. Isolasi Kapang dari Tanah

Alat dan bahan:

- a. Auger / Gurdi
- b. Sarung tangan steril
- c. Plastik klip steril
- d. Neraca
- e. Tabung reaksi
- f. NaCl steril
- g. PDA
- h. Antibakteri kloramfenikol 100 mg/liter media. Larutan kloramfenikol = 1 gram/100 mL akuades steril.
- i. Spreader/ Drigalsky
- j. Batang kawat ujung lurus / jarum enten
- k. Mikropipet dan tip

Cara Kerja:

1. Carilah lahan yang akan diambil sampel tanahnya
2. Cabuti rumput atau tanaman lain yang mungkin tumbuh di atas bagian lahan yang akan diambil sampel tanahnya
3. Pasang sarung tangan

4. Tancapkan auger. Jika tidak ada auger, bisa dilakukan dengan sendok atau spatula steril. Tanah yang diambil minimal 4 cm dari permukaan tanah.
5. Masukkan tanah ke dalam plastik klip steril, bawa ke laboratorium
6. Timbang 1 gram sampel tanah dengan prosedur aseptis
7. Siapkan tabung reaksi sebanyak 7 tabung berisi media NaCl steril untuk proses dilusi (sipakan tabung berlabel $10^{-1} - 10^{-7}$), tiap tabung berisi 9 mL NaCl steril.
8. Siapkan media PDA pada cawan petri (tuang PDA hangat sebanyak 10-15 mL dalam cawan petri secara aseptis, biarkan padat).
9. Masukkan tanah yang telah ditimbang ke dalam tabung pengenceran pertama 10^{-1} secara aseptis (dekat api)
10. Homogenkan tabung pada pengenceran pertama (10^{-1}) menggunakan vortex, pindahkan 1 mL ke tabung kedua (10^{-2}) dan seterusnya (**Lihat prosedur Teknik Dilusi/Pengenceran**), ambil suspensi sebanyak 0,1 mL pada tiga pengenceran terakhir untuk ditanam pada medium PDA yang sudah ditambah antibakteri menggunakan metode/teknik *spread plate* (**Lihat prosedur Spread Plate**)
11. Inkubasi pada suhu 20-25 °C selama 5-7 hari.
12. Hitung koloni yang tumbuh dengan metode hitung cawan untuk kapang/jamur (**Lihat prosedur hitung cawan**) dan amati karakter morfologinya.
13. Koloni yang tumbuh terpisah atau yang berbeda karakternya dipilih untuk kemudian dipurifikasi dengan cara mencuplik/mengambil potongan hifa menggunakan batang kawat ujung lurus (jarum enten) dan dipindahkan ke medium baru secara aseptis.

3. Isolasi Bakteri/Jamur dari Kulit (Teknik Swab)

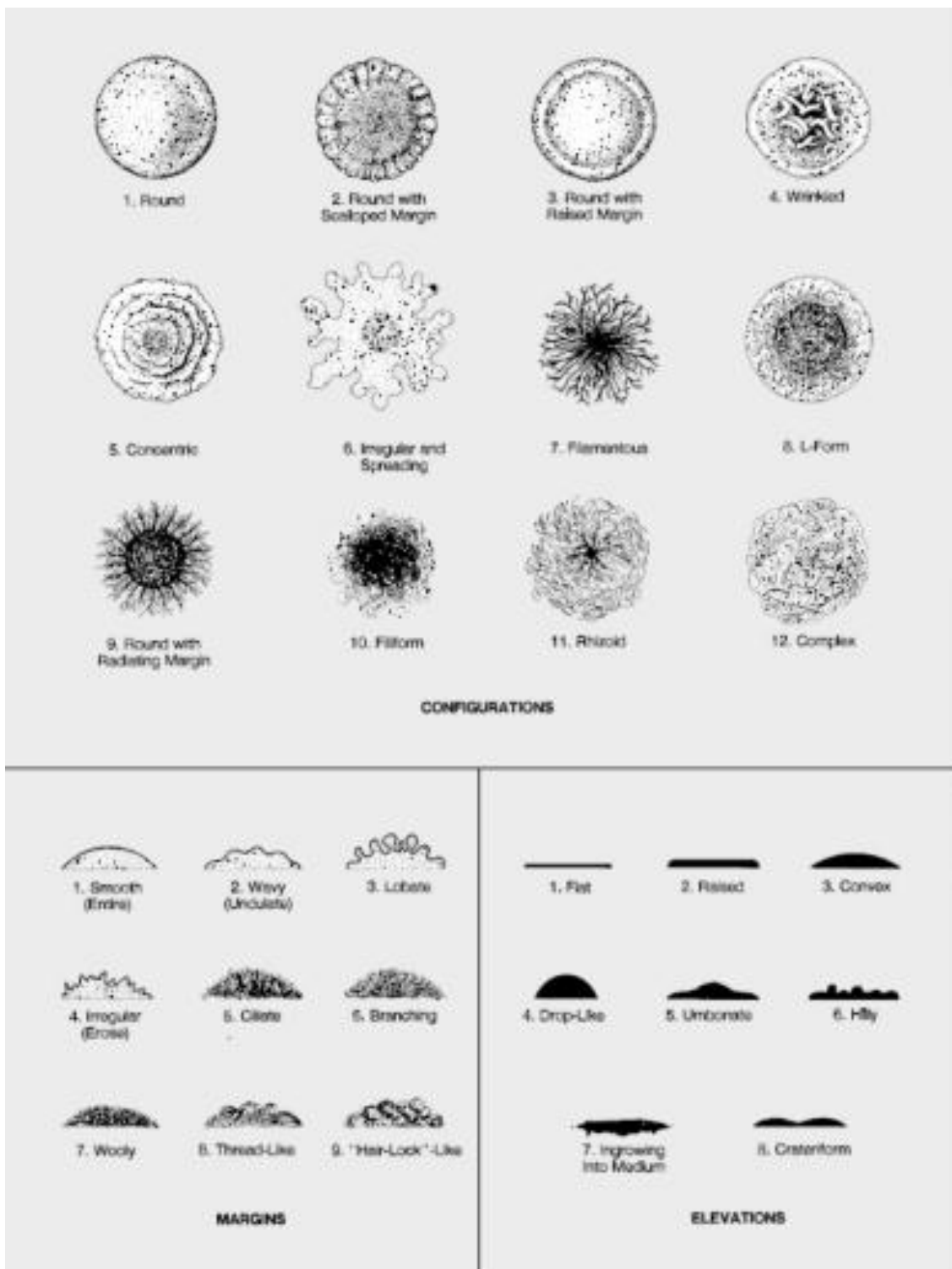
Alat dan bahan:

- a. Swab steril
- b. Larutan NaCl 0,85 %
- c. Medium NA dan PDA

Cara Kerja:

1. Celupkan swab steril ke dalam larutan NaCl 0,85 %
2. Oles permukaan kulit dengan swab
3. Oles swab ke media agar (NA dan PDA)
4. Inkubasi selama 24 jam
5. Lakukan pengamatan terhadap koloni mikroba

*Bentuk koloni bakteri dapat dilihat seperti dibawah ini :



Gambar 9. Karakteristik koloni bakteri (Companies, 2001)

TOPIK 3 RESPIRASI BAKTERI

A. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mengamati sifat respirasi bakteri
2. Mengetahui karakteristik bakteri berdasarkan sifat respirasinya

B. DASAR TEORI

Kebutuhan akan oksigen bebas dari udara bagi bakteri untuk respirasi sangat berbeda, tergantung pada adanya enzim biooksidatif yang ada pada tiap spesies sehingga dikenal adanya istilah aerob dan anaerob. Respirasi yang menggunakan oksigen bebas sebagai penerima elektron disebut respirasi aerob, sehingga yang menggunakan senyawa anorganik sebagai penerima elektron disebut respirasi anaerob.

Pangamatan terhadap kelompok bakteri yang mempunyai perbedaan sifat respirasi dapat dilakukan pada media pertumbuhan bakteri baik media padat maupun media cair. Pada media padat, koloni yang tumbuh dipermukaan media dengan elevasi tinggi cembung dan sebagainya merupakan kelompok bakteri yang memerlukan oksigen bebas dari udara. Sedangkan koloni yang tumbuh dibagian atau didalam media adalah kelompok bakteri yang tidak memerlukan oksigen bebas dari udara.

Untuk memperjelas pengamatan terhadap sifat respirasi bakteri biasanya digunakan media cair. Dalam media cair pertumbuhan bakteri tersebut dapat diamati lebih jelas dengan cara mengamati akumulasi dari sel-sel bakteri yang tumbuh, bakteri aerob akan berada diatas permukaan media karena ia akan mengambil oksigen bebas dari udara, bakteri anaerob akan berada didasar jauh dari permukaan. Bakteri yang anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar pada medium cair tersebut, sebagai bakteri mikroaerofil akan tumbuh sedikit dibawah permukaan.

C. PROSEDUR KERJA

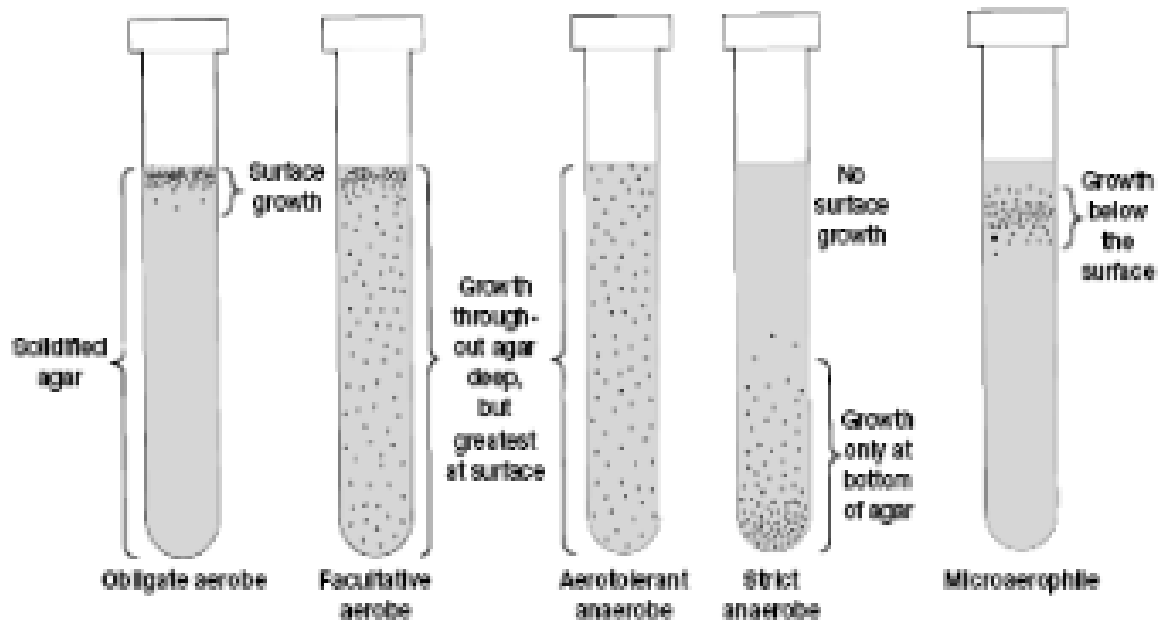
Alat dan bahan:

- a. Biakan murni bakteri sampel tanah dalam media agar miring yang berumur 1 x 24 jam
- b. Media NB
- c. Tabung kultur atau tabung reaksi

Cara Kerja:

1. Siapkan media cair dalam tabung kultur yang steril
2. Ambil biakan murni bakteri dari praktikum sebelumnya (bakteri dari sampel tanah)
3. Inokulasikan sebanyak satu ose saja masing-masing biakan kedalam media cair secara aseptik (buat duplo untuk tiap bakteri)
4. Ratakan suspensi inokulum tadi dengan cara memutar-mutar atau memilin tabung kultur di antara kedua telapak tangan
5. Inkubasikan pada suhu ruang (atau inkubator sesuaikan suhu dari tanah yang diperoleh) selama 1 x 24 jam, serta sebagai kontrol inkubasi juga pada kotak anaerob.

6. Setelah 24 jam, amati pertumbuhan bakteri pada media cair apda bagian atas, bawah, tengah ataupun merata (media keruh)
7. Kelompokkan bakteri yang diamati kedalam kelompok bakteri: aerob, anaerob, anaerob fakultatif dan mikroaerofil (Gambar 10)



Gambar 10. Pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanisme respirasinya
Harley Prescott (Companies, 2002)

TOPIK 4 PEWARNAAN BAKTERI, ENDOSPORA DAN KAPANG

A. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mengetahui teknik pembuatan apusan bakteri
2. Mengetahui teknik pewarnaan mikroba
3. Melihat bentuk sel, letak endospora dan sifat Gram bakteri
4. Mengamati morfologi kapang

B. DASAR TEORI

Bakteri hidup yang ada di lingkungan berukuran mikroskopis, selain itu juga umumnya tidak berwarna dan transparan sehingga tidak terlihat kontras dengan lingkungannya. Oleh karena itu, penting dilakukan suatu pewarnaan menggunakan teknik tertentu. Fungsi pewarnaan pada mikroba adalah a). memberi warna pada sel atau bagian-bagiannya sehingga kontras dan tampak lebih jelas, b). untuk menunjukkan bagian-bagian struktur sel, c). membedakan antar-mikroba dan d). menentukan pH dan potensial oksidasi reduksi ekstraseluler dan intraseluler (Jutono, dkk., 1980).

Pewarnaan secara umum digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri, namun terdapat pula teknik pewarnaan untuk mengetahui beberapa bagian dari sel bakteri seperti endospora, kapsul dan flagella. Beberapa teknik pewarnaan yang sering digunakan diantaranya: Pewarnaan negatif (*negative staining*), pewarnaan sederhana, pewarnaan asam (*acid fast staining – Ziehl-Neelsen and Kinyoun*), pewarnaan endospora (*Endospore staining – Schaeffer-Fulton or Wirtz-Conklin*), pewarnaan Gram (*Gram staining*), dsb. Konfirmasi jenis Gram bakteri dapat dilakukan menggunakan KOH 10%. Pewarnaan untuk jamur diantaranya menggunakan teknik: *Lactophenol blue stain*, *PAS and methenamine silver staining* dan *Gomori methenamine silver (GMS) stain*.

Lactophenol cotton blue (LCB) adalah pewarna yang digunakan untuk membuat preparat semi permanen fungi/kapang. Komposisi LCB diantaranya yaitu a. *phenol* untuk mematikan organisme hidup, *lactic acid* untuk mengawetkan atau menjaga struktur kapang dan *cotton blue* untuk mewarnai kitin dan selulosa pada dinding sel kapang sehingga tampak berwarna biru.

Pengecatan atau pewarnaan Gram dikembangkan pertama kali oleh Hans Christian Joachim Gram (1884) dan termasuk pengecatan diferensial karena dapat membedakan bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif mengikat cat utama (*crystal violet*) yang berwarna ungu dengan kuat sehingga tidak dapat dilunturkan oleh cat peluntur dan tidak diwarnai lagi oleh cat lawan (safranin), hal ini disebabkan karena sifat dinding sel dan sitoplasmanya yang mempunyai afinitas kuat terhadap kompleks *crystal violet* dan iodine (iodium). Bakteri Gram negatif tidak mengikat cat utama secara kuat, sehingga dapat dilunturkan oleh peluntur dan dapat diwarnai oleh cat lawan sehingga tampak berwarna merah. Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan gram negatif tidak mutlak tegas dan spesifik, tetapi masih tergantung pada beberapa faktor yang dapat menyebabkan variasi dalam pengecatan Gram.

Beberapa sel bakteri memiliki struktur yang aktif berupa sel vegetatif dan struktur yang pasif yaitu spora. Spora selain merupakan struktur yang inaktif

juga dapat tahan terhadap kondisi yang kurang menguntungkan bagi bakteri. Spora sepertinya halnya sel vegetatif dapat diwarnai sehingga dapat diamati lebih seksama. Teknik pewarnaan adalah pewarnaan differensial, yaitu menggunakan lebih dari satu pewarna yang hasilnya dapat membedakan spora dari sel vegetatif.

Pembuatan apusan bakteri merupakan tahap awal sebelum dilakukan pewarnaan (Gambar 11). Pembuatan preparat bakteri atau apusan bakteri yang paling banyak digunakan dalam pengecatan bakteri adalah dengan membuat lapisan suspensi/pulasan bakteri di atas gelas benda, kemudian dikeringanginkan dan dilalukan beberapa kali di atas api spirtus (Jutono dkk., 1980). Dalam pembuatan pulasan bakteri yang siap diwarnai, perlu dilakukan fiksasi terlebih dahulu yang bertujuan antara lain: a). mencegah mengkerutnya globula-globula protein sel, b). merubah afnitas cat, c). mencegah terjadinya otolisis sel, d). dapat membunuh mikroba secara cepat dengan tidak menyebabkan perubahan-perubahan bentuk atau strukturnya, e). melekatkan bakteri di atas gelas benda dan f). membuat sel-sel lebih kuat/keras.

C. PROSEDUR KERJA

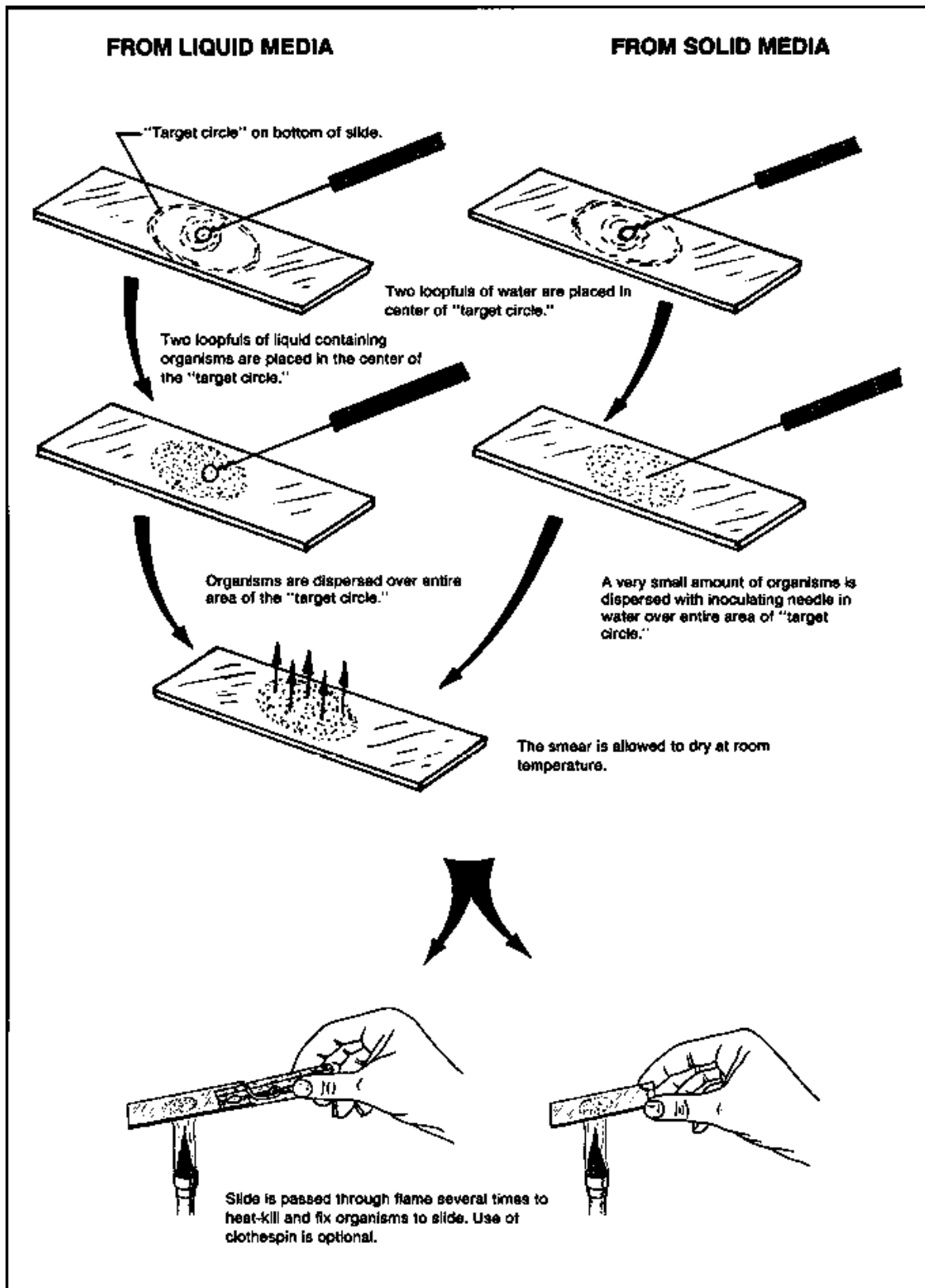
1. Pembuatan apusan/pulasan bakteri

Alat dan bahan:

- a. *Objek glass* / gelas benda
- b. Jarum ose
- c. Bunsen dan spirtus
- d. Kertas label / marker pen
- e. Aquadest steril / NaCl
- f. Kultur murni bakteri
- g. Penjepit gelas benda

Cara kerja:

1. Labellah gelas benda yang kering dan bersih. Sterilkan jarum ose dengan memijarkannya pada nyala bunsen dan dinginkan.
2. Jika kultur dalam bentuk cair (suspensi), ambillah 1 ose penuh dan letakkan di tengah-tengah gelas benda dan ratakan seluas $\pm 1 \text{ cm}^2$.
3. Jika kultur dalam medium padat, ambillah dengan jarum ose satu bagian kecil kultur dan letakkan di tengah gelas benda yang sebelumnya telah diberi aquadest steril/NaCl dan ratakan
4. Biarkan kering dengan mengangin-anginkan gelas benda
5. Fiksasi pulasan bakteri dengan melewati di atas nyala bunsen (*hati-hati, jangan sampai terlalu kering/gosong*), tergantung jenis pengecatannya.
6. Pulasan bakteri siap diwarnai.



Gambar 11. Cara pembuatan apusan bakteri

2. Pewarnaan sel bakteri dengan Cat Gram (Gambar 12)

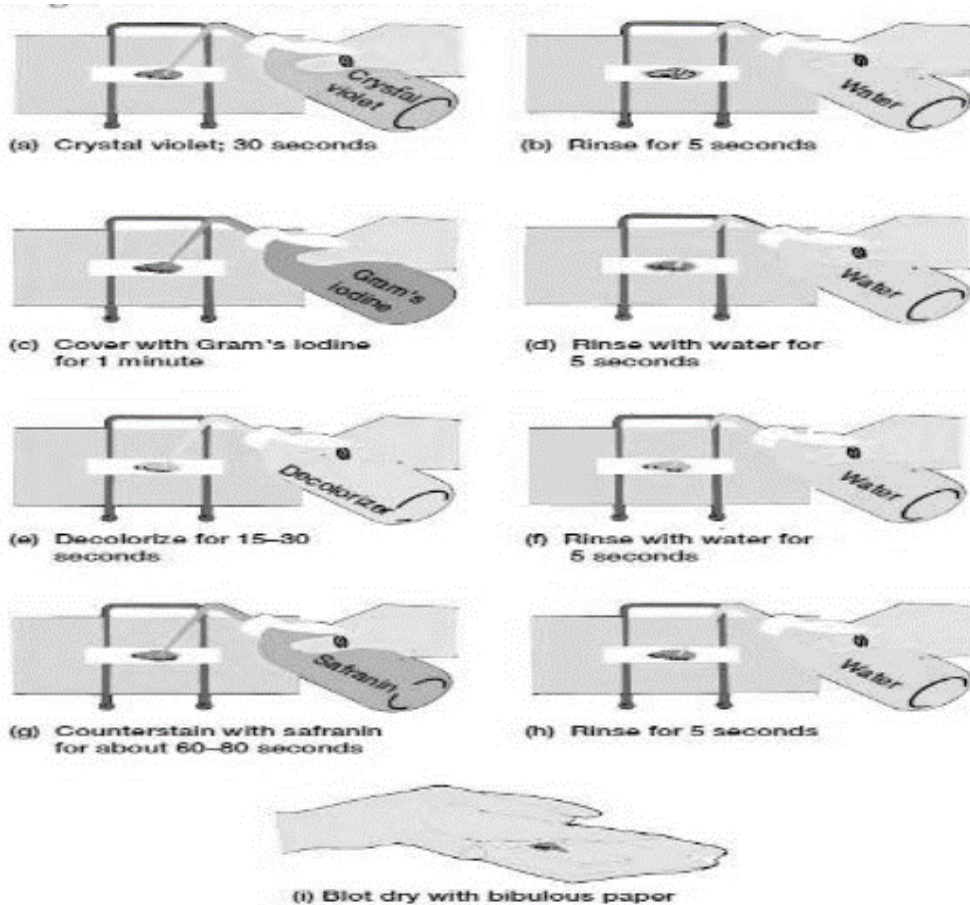
Alat dan bahan:

- a. Mikroskop
- b. Jarum ose
- c. Bunsen dan spirtus
- d. Kertas label / marker pen
- e. *Objek glass*
- f. Rak wadah pewarna
- g. Penjepit gelas benda
- h. Botol semprot berisi air
- i. Kultur murni bakteri
- j. Crystal violet (cat Gram A)
- k. Larutan iodine (cat Gram B)
- l. Alkohol 96% (cat Gram C)
- m. Safranin (cat Gram D)
- n. Minyak immersi

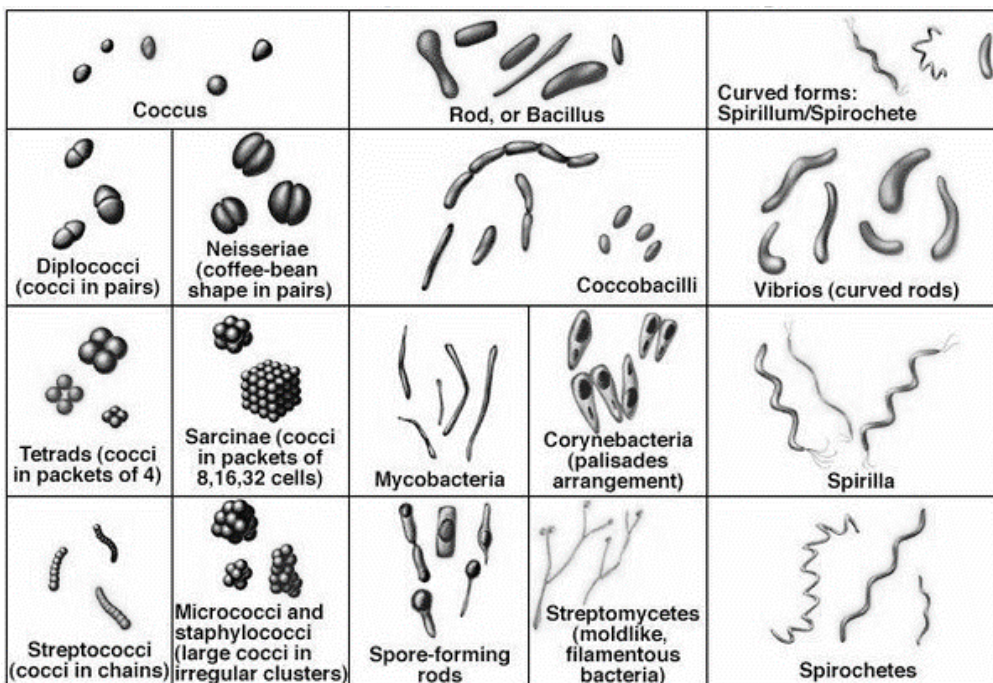
Cara kerja:

1. Bersihkan objek gelas menggunakan alkohol 70% dan tissue untuk menghilangkan noda dan lemak yang menempel.
2. Buatlah pulasan bakteri di atas gelas objek, keringkan dan fiksasi dengan api (*lihat teknik Pembuatan apusan/pulasan bakteri*)
3. Teteskan cat crystal violet (Gram A) dan diamkan 60 detik.
4. Buanglah sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir.
5. Teteskan larutan iodine (Gram B) dan diamkan selama 60 detik.
6. Buang sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir
7. Teteskan larutan peluntur yaitu alkohol (Gram C) diamkan kira-kira 30 detik. (**hati-hati jangan sampai berlebihan yang mengakibatkan kesalahan hasil**).
8. Buang sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir
9. Teteskan safranin (Gram D) dan diamkan selama 60 detik.
10. Cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dengan cara mengangin-anginkan di udara dan keringkan sisa airmenggunkana kertas tisu.
11. Amati menggunakan mikroskop perbesaran lemah sampai perbesaran kuat (1000x) dan diteteskkan minyak immersi.
12. Catat bentuk sel (Gambar 13) dan sifat Gramnya.

Konfirmasi sifat Gram menggunakan KOH 10%. Langkah kerja yaitu teteskan KOH 10% pada objek gelas bersih, campurkan dengan satu ose kultur bakteri. Tunggu 30 detik kemudian tarik ose secara perlahan dari objek gelas yang berisi suspensi bakteri tersebut. Bakteri Gram negatif akan membentuk lendir (saat ditarik ada lender) sedangkan bakteri Gram positif akan encer atau tetap.



Gambar 12. Prosedur pewarnaan Gram (Prescott, 2002).



Gambar 13. Berbagai bentuk sel bakteri (Talaro & Talaro, 1999)

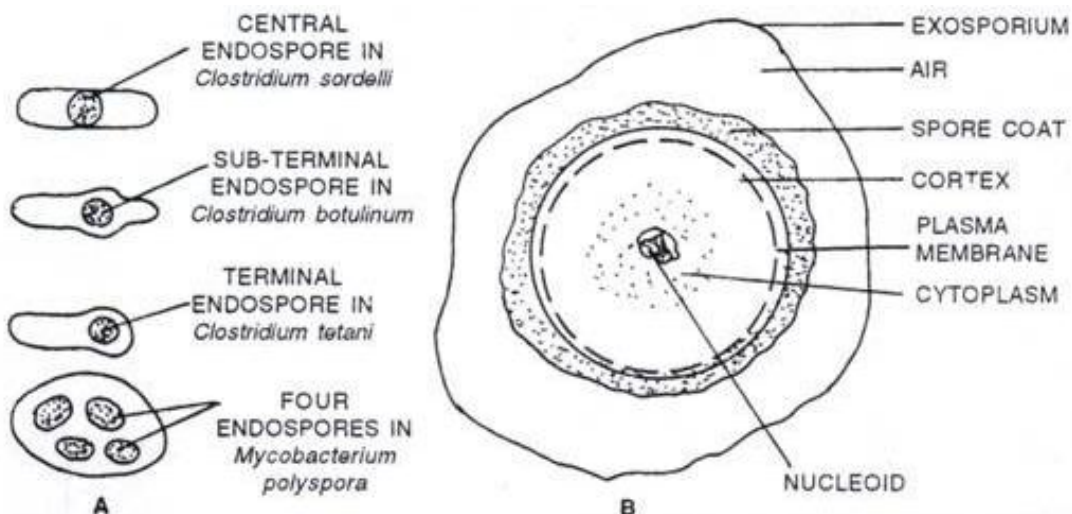
3. Pewarnaan endospora bakteri

Alat dan bahan:

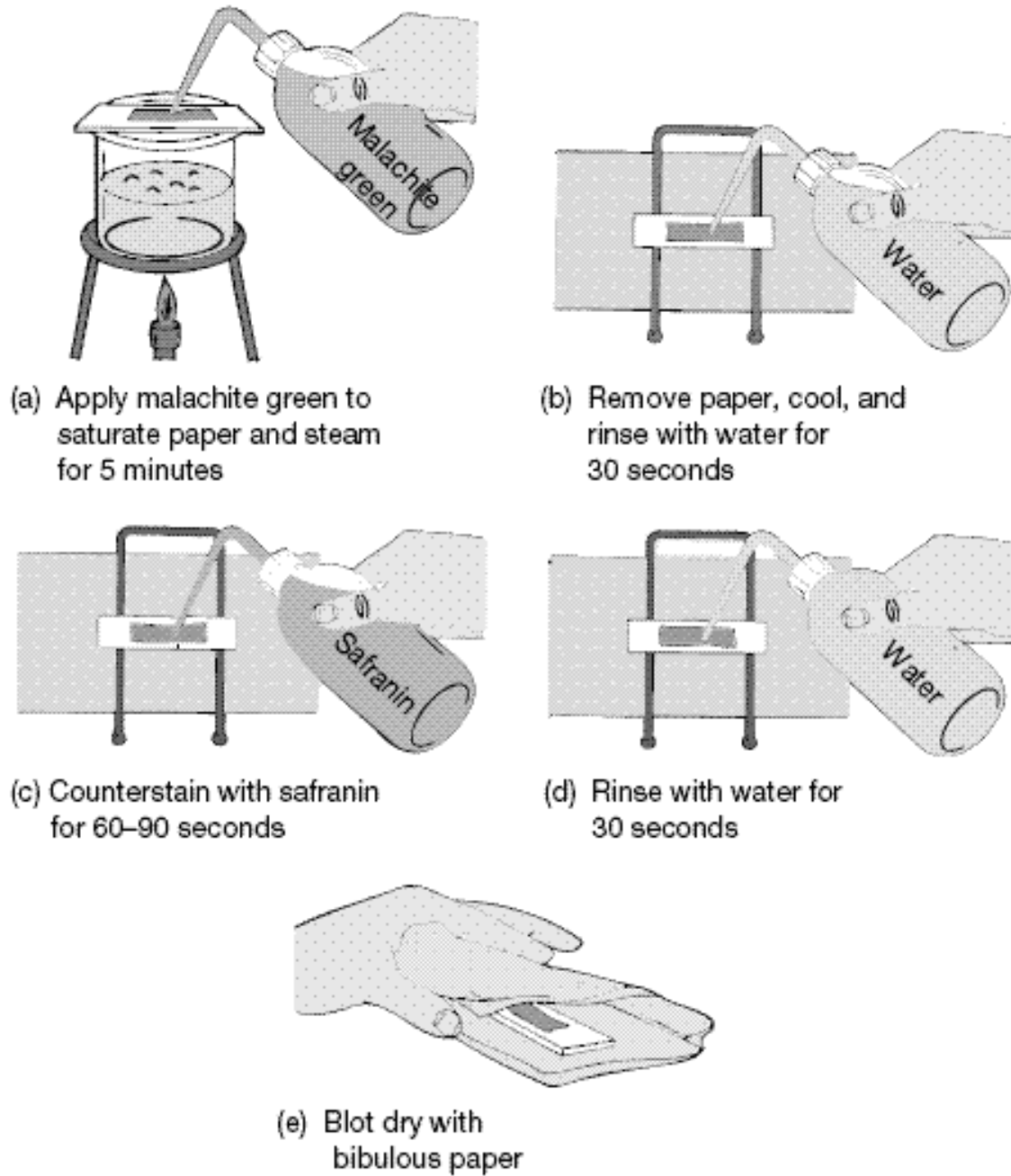
- a. Mikroskop
- b. Jarum ose
- c. Bunsen dan spirtus
- d. Kertas label / marker pen
- e. *Objek glass*
- f. Rak wadah pewarna
- g. Penjepit gelas benda
- h. Botol semprot berisi air
- i. Beaker glass
- j. Kawat ram
- k. Kertas saring
- l. Kultur murni bakteri
- m. Larutan pewarna hijau malakit (*malachite green*)
- n. Safranin
- o. Minyak immersi

Cara kerja:

1. Buat preparat apusan/pulasan bakteri (lihat Gambar 11).
2. Siapkan beaker glass berisi air dan didihkan air dengan *hot plate*. Letakkan kawat ram diatas *beaker glass*
3. Letakkan preparat bakteri di atas kawat ram dan tutup dengan kertas saring/kertas tisu (Gambar 15).
4. Teteskan larutan *malachite green* diatas kertas tisu hingga basah.
5. Biarkan selama 5-6 menit, tambahkan tetesan pewarna *malachite green* jika kertas tisu terlihat kering (***jangan biarkan preparat kering***)
6. Pindahkan gelas preparat dan ambil kertas tisu yang menutup preparat.
7. Biarkan hingga agak dingin.
8. Cuci preparat dengan air selama 30 detik, keringanginkan.
9. Teteskan pewarna safranin dan diamkan selama 90 detik.
10. Cuci dan bilas pewarna menggunakan air selama 30 detik.
11. Keringanginkan dan amati menggunakan mikroskop pada perbesaran lemah hingga perbesaran kuat (***tidak perlu ditutup cover glass***). Amati spora dan letak spora (Gambar 14). Spora bebas dan endospora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah.



Gambar 14. A. Letak endospora pada sel bakteri, B. Susunan endopsora



Gambar 15. Prosedur pewarnaan endospore (Prescott, 2002)

4. Pewarnaan jamur/fungi

Alat dan bahan:

- a. Mikroskop dan stereomikroskop
- b. Jarum enten, jarum pentul
- c. Bunsen dan spirtus
- d. Kertas label / marker pen
- e. *Objek glass* dan *cover glass*
- f. Penjepit gelas benda
- g. Kultur murni kapang/jamur
- h. Larutan *Lactophenol cotton blue* (LCB)

Cara kerja:

1. Bersihkan *objek glass* dan *cover glass* menggunakan alkohol 70% dan tissue untuk menghilangkan noda dan lemak yang menempel.
2. Teteskan sedikit larutan LCB di tengah permukaan objek glass.
3. Ambil sedikit hifa kapang yang berada di bagian tepi, taruh di permukaan objek glass yang telah ditetesi LCB.
4. Uraikan hifa secara hati-hati menggunakan dua jarum pentul steril sambil diamati menggunakan stereomikroskop.
5. Tutup sediaan kapang menggunakan *cover glass* secara hati-hati dan usahakan tidak ada gelembung udara dalam preparat.
6. Bersihkan kelebihan LCB dengan kertas hisap
7. Amati menggunakan mikroskop pada perbesaran lemah hingga kuat.
8. Amati morfologi kapang yang terlihat serta bagian-bagiannya.

TOPIK 5

UJI KUALITAS AIR BERDASARKAN NILAI MPN COLIFORM

A. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mengetahui tahap penentuan coliform dari sampel air
2. Menentukan ada tidaknya bakteri coliform dari sampel air

B. DASAR TEORI

Coliforms merupakan suatu grup bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi sanitasi yang tidak baik terhadap air, makanan, susu, dan produk-produk susu. Adanya bakteri koliform di dalam makanan atau minuman menunjukkan kemungkinan adanya mikroorganisme yang bersifat enteropatogenik dan atau toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan. Adanya bakteri coliform menentukan kualitas air yang umumnya dinyatakan dengan suatu nilai MPN coliform. Makin besar nilai MPN (melampaui nilai standart) maka kualitas air sangat rendah, sebaliknya makin kecil nilai MPN dari standart minimal maka kualitas semakin baik.

Total jumlah bakteri coliform (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*) pada sampel air dapat ditentukan menggunakan uji MPN. Uji ini melibatkan rangkaian proses fermentasi yang diamati menggunakan tabung Durham, dan dibagi menjadi 3 bagian yaitu: uji penduga (*presumptive test*), uji penguat/penegas (*confirmed test*) dan uji pelengkap (*completed test*) (Gambar 16).

Uji MPN biasanya dilakukan untuk menghitung jumlah mikroba di dalam sampel cair, meskipun dapat pula digunakan untuk sampel berbentuk padat dengan terlebih dahulu membuat suspensi 1:10. Penghitungan nilai MPN dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif yaitu yang ditumbuhi oleh bakteri coliform setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan atau terbentuknya gas di dalam tabung durham yang diletakkan pada posisi terbalik, yaitu untuk bakteri pembentuk gas. Pengenceran pada umumnya digunakan tiga atau lima seri tabung. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak (Lim, 2006).

C. PROSEDUR KERJA

Alat dan Bahan

- a. Tabung reaksi
- b. Tabung durham
- c. Pipet volume, mikropipet dan tip
- d. Inkubator
- e. Cawan petri
- f. Rak tabung reaksi
- g. Media Lactose broth
- h. Media Brilliant Green Lactase Bilebroth (BGLB)
- i. Media Eosin Methelin Blue (EMB)
- j. Sampel air yang diuji

Cara Kerja

A. Uji penduga (*presumptive test*)

1. Siapkan 9 tabung reaksi yang masing-masing berisi 10 ml media cair lactose steril yang sudah dilengkapi dengan tabung durham. Aturlah letaknya pada rak tabung dan masing-masing beri kode (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3).
2. Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi yang berkode A1, A2, A3.
3. Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi yang berkode B1, B2, B3.
4. Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 0,1 ml kedalam tabung reaksi yang berkode C1, C2, C3.
5. Diinkubasi semua medium yang sudah diinokulasi sampel air pada suhu 35-37 °C selama 24 jam.
6. Dicatat tabung-tabung setiap seri yang menunjukkan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya asam (perubahan warna media) dan gas pada tabung durham. Mikroba penghasil gas yang tumbuh pada tabung adalah kelompok mikroba yang mampu memfermentasikan laktosa.
7. Tabung-tabung biakan air sampel yang menunjukkan reaksi positif tapi belum terbentuk gas diinkubasi lagi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Bila tabung-tabung biakan tetap negatif, maka hasilnya dianggap negatif, tetapi bila hasilnya positif dilanjutkan ke uji penguat (*confirmed test*).

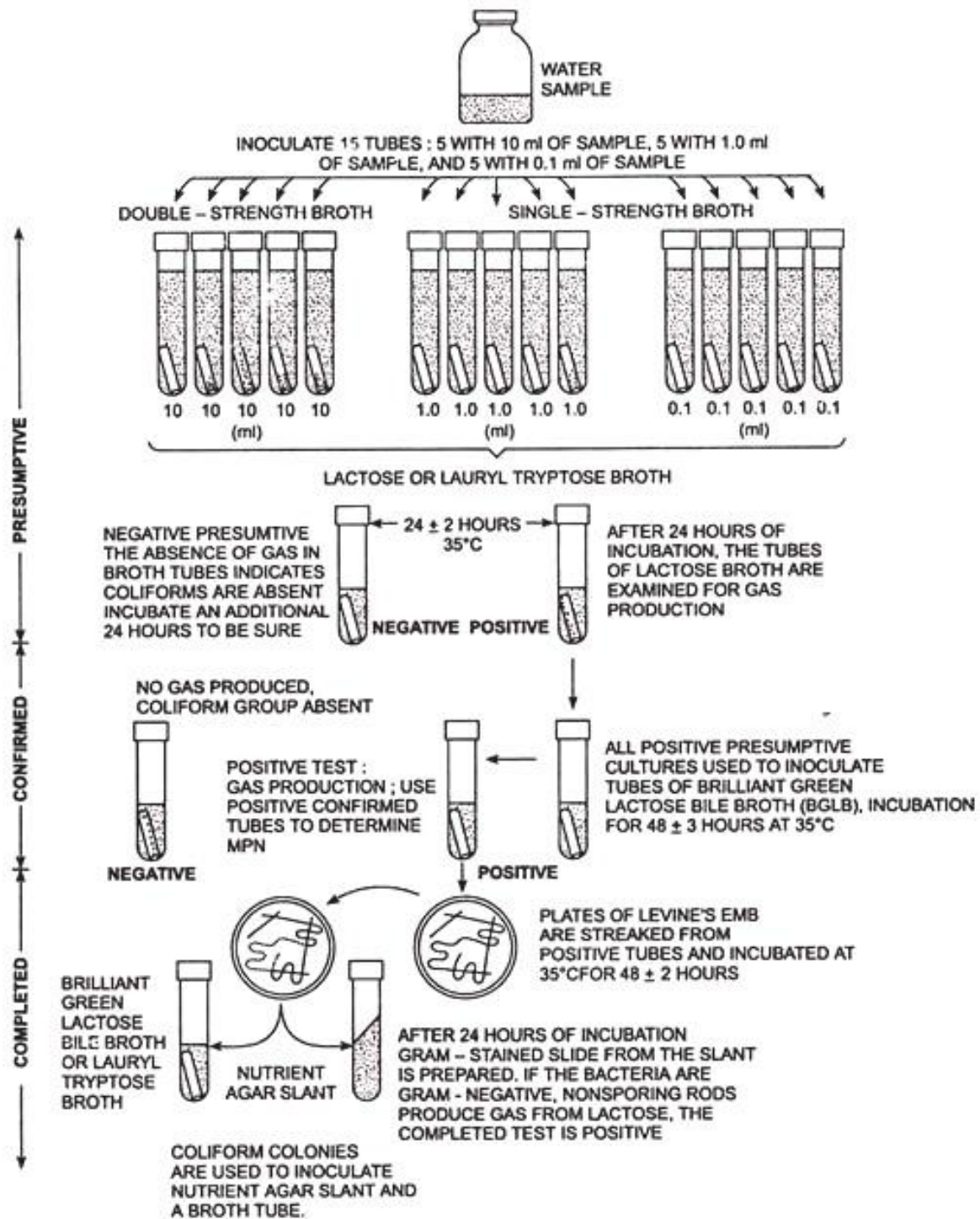
B. Uji penguat/penegas (*confirmed test*)

1. Siapkan tabung reaksi yang masing-masing berisi 10 ml media cair BGLB steril yang sudah dilengkapi dengan tabung durham. Aturlah letaknya pada rak tabung dan masing-masing beri kode misalnya: (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3), sehingga jumlahnya sama dengan jumlah tabung yang positif dari uji penduga.
2. Tuangkan air sampel yang sudah diinkubasikan dalam media kultur laktosa (hasil positif pada uji penduga) menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 1 ml ke dalam tabung berisi media BGLB.
3. Inkubasikan tabung reaksi yang sudah diperlukan pada suhu 45 °C selama 1x24 jam.
4. Dicatat tabung-tabung setiap seri yang menunjukkan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya asam (perubahan warna media) dan gas pada tabung durham. Mikroba penghasil gas yang tumbuh pada tabung adalah kelompok mikroba yang mampu memfermentasikan laktosa dan tahan terhadap suhu tinggi 45 °C mikroba ini disebut kelompok bakteri coliform fekal. Dilanjutkan ke uji pelengkap (*completed test*).

C. Uji pelengkap (*completed test*)

1. Inokulasi sampel perlakuan dari tabung yang positif pada uji penegasan sebanyak satu ose ke permukaan media EMB secara kuadran. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam.
2. Amati pertumbuhan koloni pada media EMB koloni yang menampilkan warna kilau hijau metalik adalah koloni bakteri coliform.

3. Selanjutnya dapat dipastikan lagi dengan cara setiap koloni yang berwarna hijau metalik pada setiap seri diinokulasikan dalam medium lactose broth dan nutrient agar miring kemudian diinkubasi biakkan dalam suhu 35-37 °Celcius selama 24 jam.
4. Amati terbentuknya gas dan asam pada tabung reaksi berisi media lactose broth dan catat hasilnya.
5. Buat apusan/pulasan bakteri dari kultur media NA miring dengan melakukan pengecatan Gram.
6. Amati di mikroskop, catat hasilnya. Bakteri coliform berbentuk batang, gram negatif dan tidak membentuk endospore.
7. Setelah semua pengujian selesai, tentukanlah nilai MPN Coliformnya. Cocokkan jumlah tabung yang positif dengan daftar indeks MPN dan dibandingkan jumlah coliform yang tumbuh dengan standar kualitas bahan pangan menurut BPPOM dan untuk kualitas air dibandingkan dengan standar baku mutu air.



Gambar 16. Metode uji MPN kualitas air (Prescott, 2002)

TOPIK 6 DETERMINASI BAKTERI DENGAN UJI BIOKIMIAWI

A. TUJUAN

1. Mengetahui teknik identifikasi bakteri melalui uji biokimia
2. mengetahui cara karakterisasi bakteri melalui uji biokimia

B. DASAR TEORI

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industri. Struktur sel bakteri relatif sederhana: tanpa nukleus/inti sel, kerangka sel, dan organel-organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Hal inilah yang menjadi dasar perbedaan antara sel prokariot dengan sel eukariot yang lebih kompleks (Colome, 2001).

Uji biokimia merupakan salah uji yang digunakan untuk menentukan spesies mikroba yang tidak diketahui sebelumnya. Setiap mikroba memiliki sifat biokimia yang berbeda sehingga tahapan uji biokimia ini sangat membantu proses identifikasi. Setelah sampel diinokulasikan pada media differensial atau selektif, kemudian koloni mikroba diinokulasikan pada media uji biokimia. Ada 12 jenis uji yang sering digunakan dalam uji biokimia walaupun sebenarnya masih banyak lagi media yang dapat digunakan (Adam, 2001). Pentingnya dilakukan praktikum ini adalah untuk melakukan teknik identifikasi dan karakterisasi jenis bakteri melalui uji biokimia.

C. PROSEDUR KERJA

Alat dan Bahan

- a. Isolat murni bakteri
- b. Nutrien Agar (NA)
- c. Reagen untuk test oksidase: tetramethyl-paraphenyldiamine
- d. Reagen untuk test katalase: 10% atau 30% H₂O₂
- e. Reagen untuk test O-F: media OF-yang mengandung 0.5-1% karbohidrat dan parafin cair
- f. Reagen untuk test sitrat: Simmons Citrate Agar yang mengandung indikator Brom Thymol Blue- BTB
- g. Reagen untuk test dekarboksilase lisin: media Lysin Iron Agar (LIA) yang mengandung Lisin dan indikator Brom Cresol Purple-BCP, media tanpa Lisin
- h. Gelatin
- i. Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
- j. Reagen untuk test pembentukan indol: media Tryptone Water, reagen Kovacs. Reagen untuk test MR-VP: media MR-VP, larutan 40% KOH, larutan 5% alphanaphtol
- k. Reagen untuk test Urease: media Urea Broth, indikator Phenol Red
- l. Buku panduan determinasi bakteri: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 2000)

- m. jarum ose
- n. pipet steril

Cara Kerja

A. Test Oksidase

1. Letakkan 2-3 tetes larutan tetramethyl-paraphenyldiamine pada kerassaring.
2. Ambillah suspensi isolat murni bakteri dalam nutrien cair dan inokulasikan pada kertas saring yang telah ditetesi reagen.
3. Amati dan laporkan hasil pengujian, reaksi positif terjadi jika timbul warna ungu tua atau hitam setelah didiamkan selama beberapa menit.
4. Kadangkala perubahan warna memakan waktu lebih lama sampai 10-30 menit.
5. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

B. Test Katalase

1. Letakkan 1-2 tetes 10 % atau 30% H₂O₂ pada gelas benda dan tambahkan 1 ose atau 2-3 tetes suspensi isolat murni bakteri.
2. Amati, katalase positif ditandai oleh pembentukan buih seketika.
3. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri)

C. Test O-F (Oksidasi Fermentasi)

1. Inokulasikan secara hati-hati isolat murni bakteri ke dalam 4 tabung berisi media O-F yang mengandung 0,5-1% karbohidrat (glukosa, laktosa, manitol, maltosa atau sukrosa) secara tusukan.
2. Tabung I ditutup dengan parafin lunak, tabung II tidak ditutup parafin, tabung III dan IV sebagai kontrol (ditutup paraffin dan tidak ditutup paraffin tanpa inokulasi bakteri).
3. Amati setelah 24 jam pada suhu kamar.
4. Bandingkan perlakuan dengan kontrol. Oksidasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang tidak ditutup paraffin) terjadi pada mikroba aerobik dan fermentasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang ditutup paraffin) terjadi pada mikroba anaerob.
5. Bandingkan dengan kontrol. Perhatikan perubahan warna media yang terjadi dan indikator yang terkandung dalam media O-F

D. Test Penggunaan sitrat

1. Isolat murni bakteri diinokulasikan secara goresan zig zag menggunakan ose dan secara tusukan menggunakan jarum inokulasi pada media Simmons Citrat Agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam.
2. Perhatikan perubahan warna dengan melihat perubahan warna dari hijau menjadi biru.
3. Bandingkan dengan kontrol

E. Test Dekarboksilase lisin

1. Pada medium yang mengandung lisin dan kontrol (media tanpa lisin) diinokulasi secara tusukan dengan isolat murni bakteri, inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam.

2. Positif jika terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan kembali ke ungu, sementara pada kontrol (media tanpa lisin) terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning

F. Test Hidrolisis Gelatin

1. Dengan cara tusukan, inokulasikan isolat murni bakteri pada media yang mengandung gelatin sedalam $\frac{3}{4}$ bagian dari lapisan permukaan.
2. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar.
3. Pada saat pengamatan, masukkan tabung perlakuan dan kontrol (media tanpa inokulasi bakteri) dalam almari es selama 30 menit. Positif berarti terjadi pencairan

G. Test H₂S dan fermentasi gula-gula

1. Dengan menggunakan media TSIA, inokulasikan isolat murni bakteri secara goresan menggunakan jarum ose dan secara tusukan menggunakan jarum inokulasi.
2. Inkubasikan selama 24 jam
3. Pembentukan H₂S ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warnahitam. Perubahan warna media TSIA dari merah menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi gula (glukosa, sukrosa, laktosa). Amati juga apakah terbentuk gas yang ditandai dengan pecahnya media atau terangkatnya media ke atas.
4. Bandingkan dengan kontrol (media tanpa inokulasi bakteri)

H. Test indol

1. Inokulasikan 1 tabung media Tryptone Water dengan 2 tetes isolat murni bakteri dan 1 tabung media untuk kontrol (tanpa inokulasi bakteri).
2. Inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam.
3. Setelah inkubasi, tiap-tiap tabung ditambah 5 ml larutan reagen Kovacs.
4. Terbentuknya warna merah/merah muda pada lapisan larutan reagen menunjukkan terbentuknya indol
5. Bandingkan dengan kontrol

I. Test MR (Methyl Red)

1. Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP (media Methyl Red-Voges Proskauer) dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar.
2. Tambahkan 5 tetes reagen Methyl Red ke dalam tabung berisi media MR-VP
3. Kocoklah hati-hati, Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen.
4. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri)

J. Test VP (Voges Proskauer)

1. Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar.
2. Tambahkan 0,6 ml larutan alpha-naphtol 5% dilanjutkan 0,2 ml KOH 40%.
3. Kocoklah hati-hati, longgarkan tutupnya, kocok kembali, ulangi setiap 5 menit, bacalah perubahan warnanya setelah 30 menit. Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen.
4. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri)

K. Test urease

1. Inokulasikan media Urea Broth yang mengandung indikator fenol merah dengan 1 tetes kultur murni bakteri.
2. Amatilah perubahan warna menjadi merah (phenol red) setelah 24 jam pada suhu kamar.
3. Bandingkan dengan kontrol

TOPIK 7 KURVA PERTUMBUHAN BAKTERI

A. TUJUAN

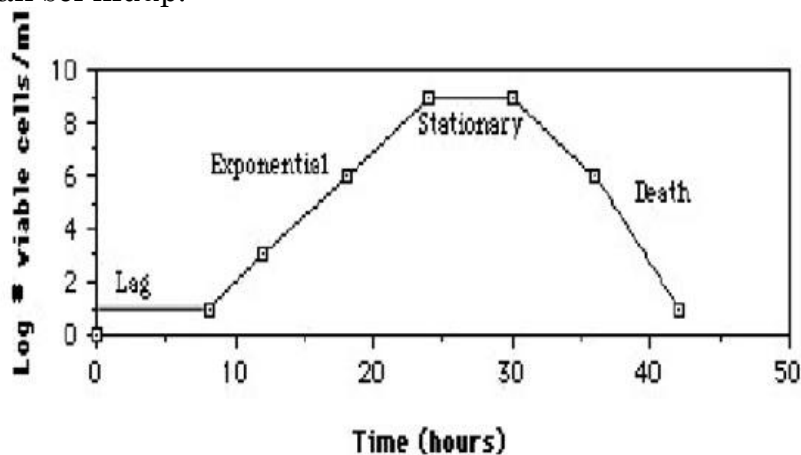
1. Mengetahui pertumbuhan bakteri dari pengamatan nilai absorbansi
2. Mampu membuat kurva standart pertumbuhan mikroba

B. DASAR TEORI

Studi mengenai pertumbuhan populasi bakteri memerlukan inokulasi sel-sel yang viabel ke dalam media cair steril, temperatur, dan pH optimum. Pada kondisi ini sel-sel akan secara cepat bereproduksi dan dinamika pertumbuhan mikroba dapat dipetakan dalam kurva pertumbuhan populasi, yang dibuat dengan memplotkan jumlah sel terhadap waktu inkubasi. Kurva pertumbuhan bakteri dapat digunakan untuk menggambarkan tahap-tahap dari siklus pertumbuhan bakteri. Kurva juga memudahkan pengukuran jumlah sel dan kecepatan pertumbuhan dari organisme pada kondisi yang distandarkan sebagai waktu generasi, yaitu waktu yang dibutuhkan oleh mikroba untuk mengganda.

Pembentukan kurva pertumbuhan kurang lebih memerlukan waktu sekitar 24 jam dalam labu kultur yang diinkubasi di shaker (Gambar 17). Metode langsung memerlukan penghitungan sel-sel viabel menggunakan pengenceran seri dari sampel kultur uji yang diambil tiap interval waktu. Sedangkan metode tidak langsung dilakukan dengan pengukuran peningkatan kekeruhan kultur bakteri menggunakan metode turbiditas dengan bantuan alat spektrofotometer. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlah selnya. Prinsip dasar metode turbidimetri adalah, jika cahaya mengenai sel, maka sebagian cahaya diserap dan sebagian cahaya diteruskan.

Jumlah cahaya yang diserap proposional (berbanding lurus) dengan jumlah sel bakteri. Atau jumlah cahaya yang diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah sel bakteri. Semakin banyak jumlah sel, semakin sedikit cahaya yang diteruskan. Lebar wadah atau kuvet. Jika dikali \log_{10} , maka $\log I/I_0 = -xI$. Karena $\log I/I_0 = OD = \text{absorbansi cahaya}$, maka diperoleh persamaan $OD = A = xI$. Metode ini mempunyai kelemahan, yaitu tidak dapat membedakan antara sel mati dan sel hidup.



Gambar 17. Kurva Pertumbuhan Bakteri (Anonim, 2018)

C. PROSEDUR KERJA

Alat dan Bahan

- a. Shaker inkubator
- b. Spektrofotometer
- c. Tabung cuvet
- d. Labu kultur/tabung reaksi
- e. Pipet steril 1 ml dan 10 ml
- f. Gelas beaker 1000 ml
- g. Bunsen
- h. Kultur bakteri *Escherichia coli*
- i. Nutrient Broth (NB)
- j. Nutrien Agar (NA)
- k. akuades steril

Cara Kerja

1. Siapkan 8 labu kultur yang berisi kultur *Escherichia coli* dalam media NB 10 mL, diinkubasi dalam Shaker inkubator.
2. Masing-masing labu kultur diberi label T₀, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇
3. T₀ diukur OD nya dengan Spektrofotometer. OD awal (t₀) harus berkisar antara 0.08 hingga 0.1 pada 610 nm.
4. Labu kultur dengan label T₁ dikeluarkan dari Shaker inkubator dan diukur OD nya dengan Spektrofotometer.
5. Pengukuran OD dilakukan dengan tabung cuvet dan diletakkan di dalam spektrofotometer. Dinding tabung cuvet harus bersih agar tidak menghalangi pembacaan Spektrofotometer.
6. Selanjutnya dilakukan terhadap T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇.
7. Hasil pengukuran absorbansi dilakukan pada grafik, dimana sumbu x menunjukkan waktu inkubasi sedangkan sumbu y menunjukkan absorbansi.
8. Dari kurva pertumbuhan yang diperoleh ditentukan umur inokulum terbaik yang akan digunakan pada tahap selanjutnya.

PANDUAN PENYUSUNAN LAPORAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

1. Masing-masing praktikan diwajibkan membuat dan membawa persyaratan untuk dapat mengikuti praktikum (**password/tiket masuk**) yaitu: a). Logbook berisi **judul praktikum, tujuan, alat dan bahan praktikum** serta **skema kerja**, b). Laporan praktikum.
2. Logbook praktikum / jurnal kegiatan praktikum berisi **judul praktikum, tujuan, alat dan bahan praktikum serta skema kerja** materi praktikum yang akan dilakukan, dan Laporan Sementara dari praktikum yang dilakukan.
3. Laporan diketik pada kertas HVS A4S 70 gram, dengan ketentuan:
 - a. *Margin* kiri dan atas : 3,5 cm
 - b. *Margin* kanan dan bawah : 3 cm
 - c. *Font* 12, Times New Roman, Normal
 - d. *Page number* posisi di tengah bawah
 - e. Spasi antar kalimat dan antar paragraf 1,5 kecuali untuk Daftar Pustaka spasi 1
 - f. Jilid menggunakan steples
4. Judul
 - a. Disesuaikan dengan praktikum yang dilaksanakan.
5. Tujuan
 - a. Tujuan praktikum disesuaikan dengan praktikum yang dilaksanakan.
 - b. Penulisan tujuan dapat dalam bentuk point atau kalimat.
6. Tinjauan Pustaka
 - a. Tinjauan Pustaka berupa pustaka yang dapat mendukung kesimpulan dari praktikum yang dilaksanakan.
 - b. Tinjauan pustaka bukan kliping Bahasa Indonesia ataupun kliping terjemahan, tetapi **parafrase** dari hasil membaca referensi baik pustaka Bahasa Inggris maupun Bahasa Indonesia.
 - c. Pustaka yang dimasukkan jangan terlalu meluas
 - d. Antar kalimat dan antar paragraf saling berhubungan.
 - e. Setiap paragraf terdiri dari 4-6 kalimat.
 - f. Gunakan kalimat baku yang sesuai dengan EYD.
 - g. Perhatikan penulisan kata, tanda baca dan susunan kalimat SPOK.
 - h. Minimalkan salah ketik.
7. Metode
 - a. Bahan, alat dan cara kerja ditulis dalam bentuk paragraf dan kalimat pasif.
 - b. Sebutkan fungsi dari masing-masing alat dan bahan yang digunakan.
 - c. Cantumkan ukuran (dan spesifikasi lebih baik) bahan dan alat yang digunakan, contoh:

- HCl_(aq) 12 mL (Merck), H₂SO_{4(aq)} 12 mL (Merck),
- Labu ukur 100 mL (pyrex), gelas ukur 100 mL (pyrex), autoclave (Hirayama)

8. Hasil dan Pembahasan

- Hasil dapat berupa tabel, grafik, diagram, ataupun gambar. Sebelum menuliskan hasil, terlebih dahulu diberi kalimat pengantar.
- Setiap tabel, grafik, diagram ataupun gambar yang ada di dalam Hasil dan Lampiran harus diacu.
- Setiap tabel, grafik, diagram ataupun gambar diberi judul.
- Di dalam pembahasan jangan menuliskan dasar teori baru (sitasi baru). Apabila akan menuliskan dasar teori untuk menguatkan pembahasan, gunakan dasar teori yang sudah dituliskan pada Tinjauan Pustaka.

9. Kesimpulan

Kesimpulan mengacu pada tujuan praktikum dan dalam bentuk paragraf.

Contoh:

a. Tujuan

Tujuan praktikum ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian auksin terhadap pertumbuhan kecambah *Vigna radiata*.

b. Permasalahan

Bagaimana pengaruh pemberian auksin terhadap pertumbuhan kecambah *Vigna radiata*?

c. Kesimpulan

Pemberian auksin mempercepat pertumbuhan kecambah *Vigna radiata*.

10. Daftar Pustaka

a. Daftar pustaka minimal 5 pustaka, yang terdiri dari:

- Minimal 2 buah jurnal (berbahasa inggris)
- Selebihnya dapat menggunakan textbook dengan tahun tertua Tahun 2000.

b. Jangan gunakan acuan yang berasal dari blog pribadi, situs wikepedia ataupun artikel dari situs yang tidak dapat dipertanggungjawabkan isinya.

c. Contoh penulisan daftar pustaka:

- Penulisan acuan di dalam sitasi
 - ...(Munro *et al.*, 2000)
 - ...(King dan Robins, 2006)
 - ...(Longe, 2010)
 - Menurut Calotta *et al.* (2009)
- Penulisan acuan di dalam daftar pustaka

Colatta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2009. Cancer-related Inflammation, the Seventh Hallmarks of Cancer: Links to Genetic Instability. *Carcinogenesis*, 30(7): 1073-1081.

- Kings, R.J.B. and M.W. Robins. 2006. *Cancer Biology 3rd ed.* Pearson. Prentice Hall. Pp. 33-37.
- Longe, J.L.L. 2010. *The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments 3rd ed.* Gale cengage learning. London. Pp. 110-112.
- Munro, M.H.G., R.T. Luibrand, and J.W. Blunt. 1999. Marine pharmacology in 1998: antitumor and cytotoxic compound. *The Pharmacologist*, 41(4): 159-164.

11. Lampiran

- a. Lampiran diberi judul dan harus diacu (Lampiran meliputi komposisi bahan yang digunakan, hasil penghitungan data secara rinci/lengkap, gambar-gambar hasil praktikum)

Laporan praktikum maksimal 20 halaman (tidak termasuk lampiran dan daftar pustaka).

(template sampul laporan)

**LAPORAN PRAKTIKUM
MIKROBIOLOGI UMUM**

JUDUL

Oleh:

Nama :

NIM :

Kelas / Kelompok :

Tanggal Praktikum :



**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

FORMAT PENULISAN DAN PENILAIAN LAPORAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

BAB I PENDAHULUAN (Nilai 10)

1.1 Latar Belakang

Latar belakang berisi kajian singkat tentang tema praktikum yang sedang dilakukan. Selain itu, latar belakang juga berisi alasan-alasan mengapa praktikum penting dilakukan dan urgensi dari praktikum juga perlu dikemukakan dalam latar belakang.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah berisi kalimat tanya tentang topik praktikum yang akan dilaksanakan. Kalimat tanya diawali dengan kata: apa, siapa, dimana, kapan dimana, mengapa dan bagaimana.

1.3 Tujuan

Tujuan dari praktikum adalah menjawab rumusan masalah yang telah dikemukakan sebelumnya.

1.4 Manfaat

Berisi manfaat dari praktikum secara umum

BAB II TINJAUAN PUSTAKA (Nilai 15)

Tinjauan pustaka merupakan argumentasi ilmiah yang dipakai sebagai referensi. Bahan-bahan tinjauan pustaka dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti hasil-hasil penelitian yang telah diuji kebenarannya, jurnal penelitian, laporan penelitian, buku teks, laporan seminar, diskusi ilmiah, dan terbitan-terbitan resmi pemerintah atau lembaga-lembaga lain. Akan lebih baik jika kajian teoritis dan telaah terhadap temuan-temuan penelitian didasarkan pada sumber kepustakaan primer.

Pemilihan sumber pustaka harus memenuhi dua persyaratan:

- a. Kemutakhiran sumber bacaan, artinya sumber bacaan yang kadaluwarsa diupayakan untuk ditinggalkan.
- b. Adanya keterkaitan antara isi bacaan dengan masalah yang dibahas.

BAB III METODE PRAKTIKUM (Nilai 10)

3.1 Waktu dan Tempat

3.2 Alat dan Bahan

3.3 Cara Kerja

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN
(Nilai 45)

Pada BAB ini berisi hasil disertai pembahasan yang didukung literatur sesuai hasil praktikum. Hasil dan Pembahasan tidak dibuat dalam subbab terpisah.

BAB V
PENUTUP
(Nilai 10)

4.1 Kesimpulan

Kesimpulan berisi jawaban dari rumusan masalah.

4.2 Saran

DAFTAR PUSTAKA (Nilai 5)

LAMPIRAN (Nilai 5)