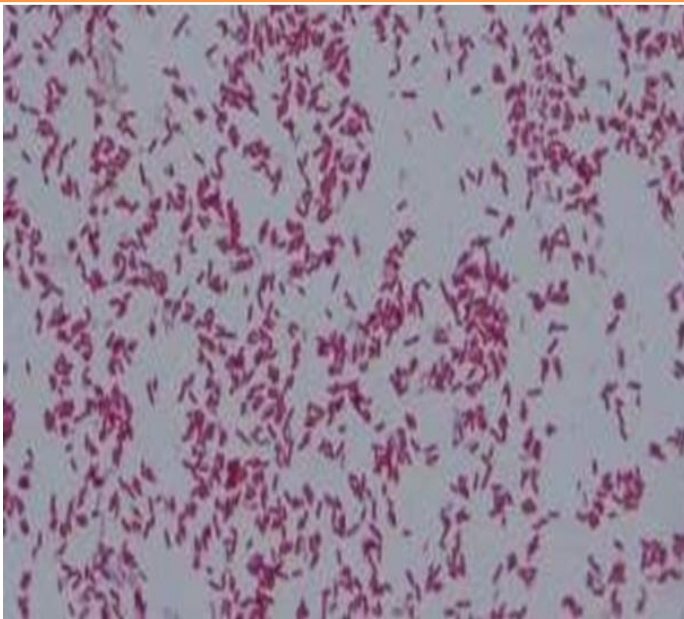




PENUNTUN PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI II PRODI DIII TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS



STIKES MITRA KELUARGA 2019

Oleh:
Maulin Inggraini, M.Si
Noor Andryan Ilsan, S.Pd., M.Si

KATA PENGANTAR

Segala Puja dan Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, atas segala hikmah dan karuniaNya yang telah diberikan kepada tim penyusun buku petunjuk praktikum Bakteriologi II. Keahlian dan keterampilan kerja di laboratorium sangat membantu dalam memahami teori yang telah diperoleh di kuliah, sehingga dapat tercipta korelasi yang saling membangun antara teori dengan kenyataan.

Buku petunjuk praktikum ini disusun secara rinci dan sistematis, dilengkapi dengan gambar sehingga memudahkan praktikan memahami dan mempersiapkan diri sebelum melakukan kegiatan praktikum. Harapan kami, buku ini dapat bermanfaat bagi praktikan Bakteriologi II serta bagi mahasiswa yang memerlukannya. Segala kritik dan saran yang bersifat membangun tentang isi buku ini sangat dihargai demi perbaikan kualitas lebih lanjut.

Jakarta, Agustus 2019

Tim Penyusun

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikan **wajib** mengikuti semua kegiatan praktikum, bagi yang tidak bisa hadir karena sakit atau izin harus mengajukan praktikum pengganti
2. Praktikan harus telah mengenakan jas lab dan sepatu saat memasuki laboratorium dan bekerja dengan peralatan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi.
3. Praktikan yang datang terlambat lebih dari 20 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum, dan akan mengikuti praktikum susulan sesuai jadwal yang disepakati antara dosen dan mahasiswa terkait.
4. Setelah masuk laboratorium praktikan wajib:
 - a. Mengisi daftar hadir
 - b. Mengumpulkan laporan awal / jurnal
5. Selama praktikum berlangsung, praktikan:
 - a. Wajib mengikuti pengarahan dari asisten atau dosen pengampu
 - b. Tidak diperkenankan keluar-masuk laboratorium, makan dan minum, membawa *handphone*, membuat keributan dan mengenakan perhiasan berlebihan
 - c. Mengikuti kuis yang dapat berupa *pretest* atau *posttest* untuk mengetahui sejauh mana kompetensi yang dicapai.
6. Setelah praktikum selesai, praktikan:
 - a. Membersihkan semua peralatan dan meja praktikum
 - b. Membuat laporan yang dikumpulkan paling lambat 1 minggu setelah praktikum berlangsung
7. Dilarang membuang zat sisa atau habis pakai dan pewarna sisa disembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan oleh asisten.
8. Laporkan segera jika terjadi kecelakaan seperti kebakaran dan ketumpahan kepada asisten/dosen.
9. Apabila praktikan merusak atau memecahkan peralatan laboratorium, **wajib mengganti sesuai dengan spesifikasinya**

10. Pelanggaran dari ketentuan di atas dapat mengakibatkan sanksi akademik (skroking praktikum, tidak diperkenankan mengikuti ujian, dsb).

11. Penilaian praktikum:

- a. Laporan : 30%
- b. Kuis : 20%
- c. Ujian praktikum : 50%

Praktikan wajib mengikuti ujian praktikum sebanyak 3 kali, penilaian ujian praktikum:

- 1) Keterampilan : 60%
- 2) Konsep : 30%
- 3) Sikap : 10%

12. Aturan-aturan / tata tertib yang belum tercantum akan diputuskan kemudian.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
TATA TERTIB PRAKTIKUM	iii
DAFTAR ISI	v
I. Pengendalian Bakteri Secara Fisik	1
II. Pengendalian Bakteri Menggunakan Desinfektan dan Antiseptik	7
III. Pengendalian Bakteri Menggunakan Antibiotik	14
UJIAN PRAKTIKUM 1	
IV. Karakterisasi <i>Salmonella Typhi</i>	20
V. Karakterisasi <i>Staphylococcus aureus</i>	32
VI. Karakteristik <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
UJIAN PRAKTIKUM 2	
VII. Karakterisasi <i>Escherichia coli</i>	47
VIII. Karakterisasi <i>Vibrio cholerae</i>	54
IX. Karakterisasi <i>Proteus</i> sp.	61
UJIAN PRAKTIKUM 3	
DAFTAR PUSTAKA	67

PRAKTIKUM I
PENGENDALIAN BAKTERI SECARA FISIK

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui pengaruh suhu, sinar UV, salinitas dan pH terhadap pertumbuhan bakteri.

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, inkubator, *Hot plate* dan *stirer*, *Colony counter*, *Biology safety cabinet* (BSC), *show case*, tabung reaksi, drugalsky, cawan petri, pipet ukur, neraca analitik, erlenmeyer, *filler*, *sprayer*.

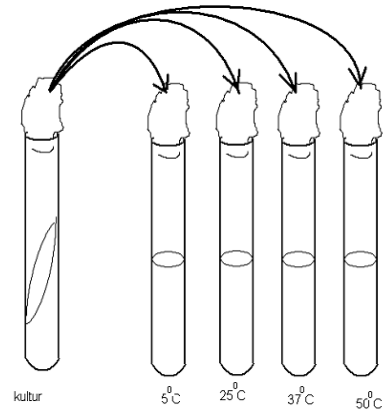
2. Bahan

Isolat *Eschericia coli*, isolat *Bacillus subtilis*, media NA, media NB, akuades, alkohol 70%, spirtus, HCl, KOH, NaCl.

3. Prosedur Kerja

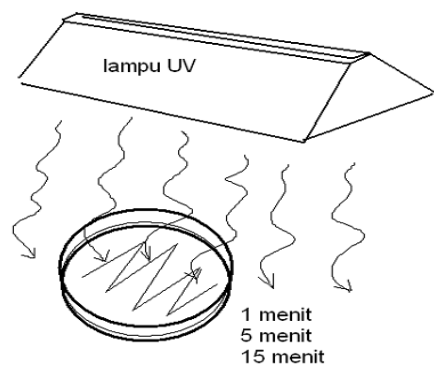
a. Pengaruh suhu

- 1) Bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada media NB
- 2) Bakteri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 5 °C, 25 °C, 37°C dan 50°C selama 2x24 jam dan beri label
- 3) Bandingkan derajat kekeruhannya



b. Pengaruh sinar UV

- 1) Inokulasikan *E. coli* dan *B.subtilis* masing - masing pada 4 cawan media NA secara *spread plate*
- 2) Media NA yang sudah diinokulasikan bakteri dipaparkan pada sinar UV



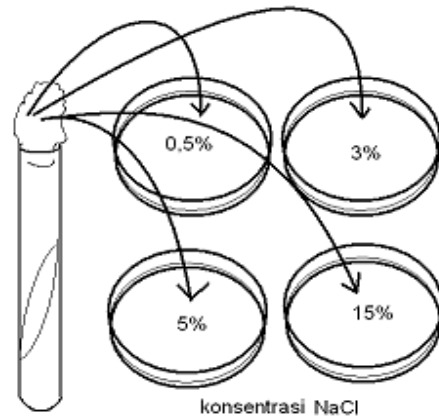
selama 1 menit, 5 menit, dan 15 menit dengan keadaan cawan terbuka dan lingkungan sekitar steril.

- 3) Jarak antara sinar UV dan cawan $\pm$ 12 inchi

- 4) 1 media NA tidak dipaparkan sinar UV, sebagai kontrol
- 5) Bakteri diinkubasi selama 2x24 jam, amati pertumbuhan koloninya

c. Pengaruh salinitas

- 1) Inokulasikan *E.coli* dan *B.subtilis* pada media cawan NA yang mengandung NaCl 0,5%, 3%, 5% dan 15% secara *spread plate* dan beri label
- 2) Inokulasikan juga *E. coli* dan *B. subtilis* pada media

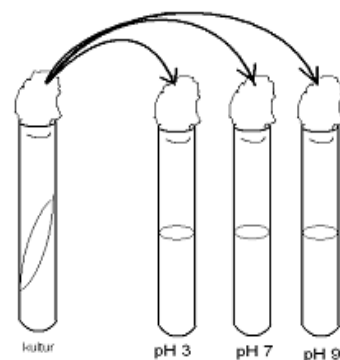


cawan NA yang tidak ditambah NaCl sebagai kontrol

- 3) Inkubasi selama 2x24 jam, amati pertumbuhannya

d. Pengaruh pH

- 1) Inokulasikan *E. coli* dan *B.subtilis* pada media NB dengan pH masing-masing 3, 7, dan 9, beri label
- 2) Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C
- 3) Amati derajat kekeruhannya



D. Hasil dan Pembahasan

1. Gambar

Gambar	Keterangan
Perlakuan : Suhu	
Perlakuan : Sinar UV	
Perlakuan : Salinitas	
Perlakuan : pH	

2. Tabel Pengamatan

No.	Perlakuan	Bakteri	
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
1.	Suhu 5 °C		
2.	Suhu 25 °C		
3.	Suhu 37 °C		
4.	Suhu 50 °C		
5.	Kontrol sinar UV		
6.	Sinar UV 1 menit		
7.	Sinar UV 5 menit		
8.	Sinar UV 15 menit		
9.	Kontrol salinitas		
10.	NaCl 0,5%		
11.	NaCl 3%		
12.	NaCl 5%		
13.	NaCl 15%		
14.	pH 3		
15.	pH 7		
16.	pH 9		

Ket : - = tidak tumbuh ++ = tumbuh 30 – 300 koloni
 + = tumbuh < 30 koloni +++ = tumbuh > 300 koloni

3. Pembahasan

(Penjelasan mengenai pengaruh suhu, sinar UV, salinitas dan pH terhadap pertumbuhan bakteri. Penjabaran mengenai suhu, sinar UV, salinitas dan pH yang optimum untuk pertumbuhan bakteri).

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM II
PENGENDALIAN BAKTERI
MENGUNAKAN DESINFEKTAN DAN ANTISEPTIK

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui efisiensi dan efektivitas pada berbagai desinfektan dan antiseptik

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Sprayer, botol spirtus, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas kimia, jarum ose, pipet ukur, *filler*, erlenmeyer, pinset, batang pengaduk, autoklaf, inkubator, neraca analitik, *hot plate* dan *stirer*.

2. Bahan

Akuades, alkohol 70%, spirtus, kapas, larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), media NA, isolat *E. coli*, isolat *B. Subtilis*, kapas, kasa, kertas cakram, asam sulfat (H_2SO_4), barium klorida dihidrat ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), wipol, lysol, betadin, detol, hand sanitizer, fenol, bayclean, sunlight.

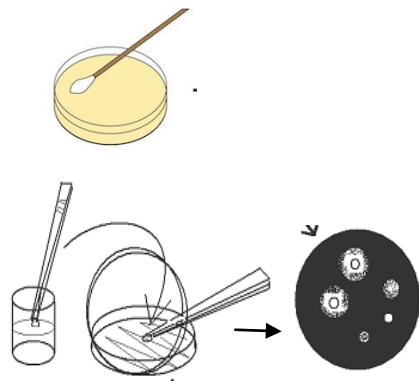
3. Prosedur Kerja

a. Pembuatan baku turbiditas bakteri

- 1) Membuat larutan barium klorida dihidrat 1,175% (1 g/100 ml)
- 2) Membuat larutan H_2SO_4 1 % (1 g/100 ml)
- 3) 0,1 ml barium klorida dihidrat 1,175% dicampurkan dengan 19,9 ml H_2SO_4 1%
- 4) Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml
- 5) Bakteri yang sudah tumbuh dimasukkan di dalam garam fisiologis ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml
- 6) Kekkeruhan pada garam fisiologis tersebut dengan larutan baku turbiditas disamakan, agar didapatkan turbiditas bakteri 10^9 sel/ml.

b. Pengujian desinfektan dan antiseptik dengan kertas cakram

- 1) Inokulasikan *E. coli* dan *B. subtilis* pada media NA cawan secara swab
- 2) Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam larutan desinfektan (wipol, sunlight, bayclin, lysol) dan larutan



antiseptik (betadin, detol, *hand sanitiser*). Setelah diangkat, sisa tetesan larutan yang berlebih pada kertas cakram diulaskan pada dinding wadah karena dikhawatirkan larutan akan meluas di permukaan media jika larutan terlalu berlebihan

- 3) Kertas cakram diletakkan di permukaan media dengan pinset. Tekan dengan pinset agar kertas cakram benar – benar menempel pada media
- 4) Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C
- 5) Ukur zona hambat yang terbentuk

c. Pengujian desinfektan dengan uji koefisien fenol (@Herafjrputri)

1) Pembuatan larutan stok fenol 5% b/v

Larutkan 5 g fenol dengan akuades sampai volume mencapai 100 ml

2) Seri pengenceran larutan fenol

- a) Larutkan 1 ml fenol 5% dengan akuades sampai volume mencapai 80 ml untuk konsentrasi fenol 1:80
- b) Larutkan 1 ml fenol 5% dengan akuades sampai volume mencapai 90 ml untuk konsentrasi fenol 1:90
- c) Larutkan 1 ml fenol 5% dengan akuades sampai volume mencapai 100 ml untuk konsentrasi fenol 1:100

3) Pembuatan larutan desinfektan

- a) Buat pengenceran desinfektan 1:40 dengan cara memipetkan 1 ml larutan desinfektan dan ditambahkan akuades sampai volume mencapai 40 ml
- b) Buat pengenceran desinfektan 1:60 dengan cara memipetkan 1 ml larutan desinfektan dan ditambahkan akuades sampai volume mencapai 60 ml
- c) Buat pengenceran desinfektan 1:80 dengan cara memipetkan 1 ml larutan desinfektan dan ditambahkan akuades sampai volume mencapai 80 ml

- d) Buat pengenceran desinfektan 1:100 dengan cara memipetkan 1 ml larutan desinfektan dan ditambahkan akuades sampai volume mencapai 100 ml

4) Uji koefisien fenol

- a) Dipipetkan inokulum sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan fenol 1:80, homogenkan.
- b) Tunggu sampai 5 menit
- c) Ambil 1 ose dari campuran dan inokulasikan pada media NA
- d) Lakukan hal yang sama untuk fenol 1:90, 1:100 dan desinfektan 1:40, 1:60, 1:80, 1:100
- e) Dipipetkan inokulum sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan fenol 1:80, homogenkan.
- f) Tunggu sampai 10 menit
- g) Ambil 1 ose dari campursan dan inokulasikan pada media NA
- h) Lakukan hal yang sama untuk fenol 1:90, 1:100 dan desinfektan 1:40, 1:60, 1:80, 1:100
- i) Dipipetkan inokulum sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan fenol 1:80, homogenkan.
- j) Tunggu sampai 10 menit
- k) Ambil 1 ose dari campuran dan inokulasikan pada media NA
- l) Lakukan hal yang sama untuk fenol 1:90, 1:100 dan desinfektan 1:40, 1:60, 1:80, 1:100
- m) Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C
- n) Amati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada setiap media

Pengenceran tertinggi zat kimia uji yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam waktu 5 menit

Koefisien fenol =

Pengenceran tertinggi larutan fenol yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam waktu 5 menit

Koefisien fenol < 1 = kurang efektif dari fenol

Koefisien fenol > 1 = lebih efektif dari fenol

D. Hasil dan Pembahasan

1. Gambar

Gambar	Keterangan
Perlakuan : Antiseptik dengan kertas cakram	
Perlakuan : Desinfektan dengan kertas cakram	
Perlakuan : Desinfektan dengan uji koefisien fenol	

2. Tabel Pengamatan

Waktu	Fenol			Desinfektan			
	1:80	1:90	1:100	1:40	1:60	1:80	1:100
5 menit							
10 menit							
15 menit							

3. Pembahasan

(efektivitas dan efisiensi desinfektan dan antiseptik, koefisien fenol dari masing-masing perlakuan, desinfektan yang efektif dan kurang efektif dari fenol. Bandingkan hasil yang didapat dengan pustaka).

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

ACARA III
PENGENDALIAN BAKTERI MENGGUNAKAN ANTIBIOTIK

Tanggal Praktikum:

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui sensitivitas yang dimiliki antibiotik

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, filler, pinset, sprayer, inkubator, autoklaf.

2. Bahan

Cotton bud steril, akuades, alkohol 70%, spirtus, media Mueller Hinton Agar, kertas cakram, isolat *E. coli*, isolat *B. subtilis*, Chloramphenicol, tetracycline, ampicilin.

3. Prosedur Kerja

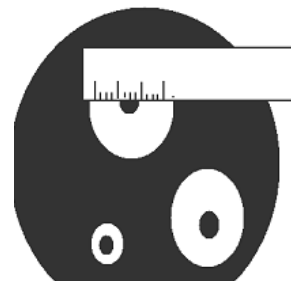
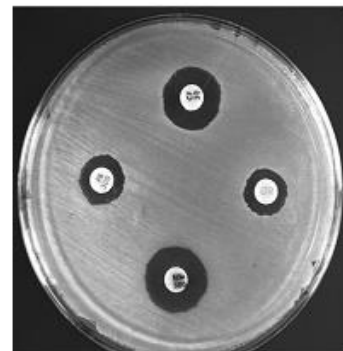
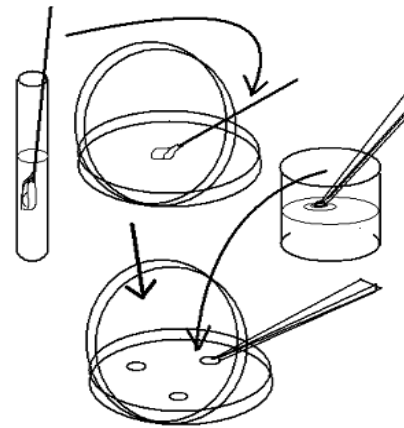
a. Penentuan kepadatan bakteri

- 1) Tanam bakteri *E. coli* dan *B. Subtilis* dalam media NB
- 2) Inkubasi goyang selama 24 jam
- 3) Setelah inkubasi 24 jam, samakan kepadatan bakteri dengan kepadatan mikroba standar untuk pengujian (0,5 Mc Farland atau setara dengan OD 0,08-0,1 pada panjang gelombang 625 nm menggunakan spektrofotometer)

b. Penentuan konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*)

- 1) Buat pengenceran antibiotik sebesar 250 mg/100 ml; 100 mg/100 ml; 50 mg/100 ml; 5 mg/100 ml. Langkah:
 - Buat larutan stok dengan cara melarutkan 1.000 mg antibiotik dalam 1.000 ml akuades
 - Buat konsentrasi antibiotik 250 mg/100 ml :
$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
$$V_1 \times 1.000 \text{ mg} = 100 \text{ ml} \times 250$$
$$V_1 = 25 \text{ ml}$$
 - Buat konsentrasi antibiotik 100 mg/100 ml; 50 mg/100 ml; 5 mg/100 ml.

- 2) Celupkan *cotton bud* / *cotton swab* steril dalam biakan bakteri, tekan ke sisi tabung agar air tiris
- 3) Ulaskan pada seluruh permukaan cawan *Mueller-Hinton Agar* secara merata
- 4) Diamkan selama 5 menit
- 5) Kertas cakram dicelupkan dalam larutan antibiotik dengan konsentrasi tertentu
- 6) Angkat, diamkan sejenak hingga tiris
- 7) Letakkan kertas cakram pada permukaan agar 1 cawan untuk 5 kertas cakram
- 8) Tekan dengan menggunakan pinset supaya menempel pada permukaan agar
- 9) Inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam
- 10) Ukur diameter zona hambat (mm), Bandingkan dengan tabel sensitivitas antibiotik



- 11) Pengenceran terakhir yang terbentuk zona bening disebut sebagai nilai Konsentrasi Hambat Minimumnya. Misalkan pada pengenceran 128, 64, dan 32 terbentuk zona bening sedangkan pada pengenceran 16, 8 dst tidak terbentuk zona bening, maka dapat disimpulkan bahwa nilai KHM antibiotik tersebut terhadap pertumbuhan bakteri patogen tersebut adalah 32 mg/L

Antibiotic	Resistant	Intermediate	Susceptible
Tetracycline	= 14	15-18	= 19
Ciprofloxacin	= 15	16-20	= 21
Enoxacin	= 14	15-17	= 18
Erythromycin	= 13	14-22	= 23
Penicillin Staphylococci	= 28		= 29
Oxacillin Staphylococci	= 10	11-12	= 13
Tobramycin	= 12	13-14	= 15
Ceftriaxone	= 13	14-20	= 21
Kanamycin	= 13	14-17	= 18
Clindamycin	= 14	15-20	= 21
Piperacillin Gram negatives	= 17	18-20	= 21
Ampicillin Gram negative enterics Staphylococci	= 13 = 28	14-16	= 17 = 29

Tabel 1. Penentuan Sensitivitas Antibiotik (diameter zona hambat dalam mm)

D. Hasil dan Pembahasan

1. Gambar

Gambar	Keterangan

Gambar	Keterangan

2. Pembahasan

(Penjelasan hasil yang didapat, sensitivitas antibiotik. Bandingkan hasil yang didapat dengan pustaka)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

ACARA IV
KARAKTERISASI *Salmonella typhi*

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Salmonella typhi*

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Salmonella typhi*, alkohol 70%, spirtus, akuades. Media reaksi biokimia: media Mac conkey (MCA), media *Salmonella-Shigella Agar* (SSA), MR-VP Broth Base, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa), media *Simmon's Citrate Agar* (SCA), media *Sulfate Indole Motility* (SIM). Reagensia: pewarna Gram, *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Hidrogen peroksida 3%, Tetramethyl-P-Phenylene Dihydrochloride 1%, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue / phenol red*

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Salmonella typhi* dilakukan dengan pengujian pada media selektif MCA dan SSA, pengujian biokimia diantaranya media TSIA, media SIM, media SCA, media gula-gula, MR, VP, pewarnaan Gram, uji katalase dan oksidase.

a. Pembuatan Reagensia

1) Reagen *Methyl Red* 1% b/v

- a) 1 gram *Methyl Red* dilarutkan dalam 90 ml alkohol 96%.
- b) Tambahkan akuades sampai volume mencapai 100 ml.
- c) Simpan dalam botol reagen coklat.

2) KOH 40% b/v

- a) 40 gram KOH Kristal ditambahkan dengan akuades sampai volume 100 ml.
- b) Homogenkan, kemudian simpan dalam botol coklat.

3) Alpha Naphtol

- a) 5 gram alpha naphtol ditambahkan dengan alkohol 96% sampai volume 100 ml.
- b) Homogenkan, kemudian simpan dalam botol coklat.

4) Hidrogen Peroksida 3 % v/v

- a) 8,5 ml hidrogen peroksida 35% dimasukkan kedalam botol reagen.
- b) Ditambahkan dengan akuades sampai 100 ml.
- c) Homogenkan, kemudian simpan dalam botol coklat.

5) Tetramethyl-P-Phenylene Dihydrochloride 1%.

- a) 1 gr Tetramethyl-P-Phenylene Dihydrochloride ditambahkan dengan 100 ml akuades.
- b) Homogenkan, kemudian simpan dalam botol coklat.

6) Iodine 1%

- a) 1 gr iodine dimasukkan ke dalam botol reagen ditambahkan dengan 100 ml akuades.
- b) Homogenkan, kemudian simpan.

b. Pembuatan media

1) Media MCA

- a) Larutkan 50 gram media MCA instan dalam 1 liter akuades
- b) Atur pH mencapai $7 \pm 0,2$
- c) Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit
- d) Tuang ke dalam cawan petri, dinginkan

2) Media SSA

- a) Larutkan 60 gram media MSA instan dalam 1 liter akuades
- b) Homogenkan dengan menggunakan *hot plate and stirer*,
JANGAN TERLALU LAMA MENDIDIH
- c) Media TIDAK PERLU DISTERILISASI, tuang dalam cawan petri
- d) Atur pH mencapai $7 \pm 0,2$
- e) Tuang ke dalam cawan petri, dinginkan

3) Media SIM

- a) Larutkan 30 gram media SIM instan dalam 1 liter akuades
- b) Homogenkan dengan menggunakan *hot plate and stirer*
- c) Atur pH mencapai $7,3 \pm 0,2$
- d) Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit

4) Media SCA

- a) Larutkan 22,5 gram media SCA instan dalam 1 liter akuades
- b) Atur pH mencapai $6,6 \pm 0,2$
- c) Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit
- d) Tuang ke dalam tabung miring, dinginkan

5) Media TSIA

- a) Larutkan 65 gram media TSIA instan dalam 1 liter akuades
- b) Atur pH mencapai $7,4 \pm 0,2$
- c) Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit
- d) Tuang ke dalam tabung miring, dinginkan

6) Media gula-gula

- a) 1 gram *peptone* dan 1 gram NaCl dimasukkan ke dalam gelas kimia
- b) Tambahkan 100 ml akuades (dilakukan di atas *hot plate and stirer* agar larut dengan sempurna)
- c) Masukkan 1% serbuk gula (glukosa / laktosa / manitol / maltosa / sukrosa) dengan cara memasukkan 1 gram gula ke dalam larutan *peptone*
- d) Tambahkan pewarna indikator *bromothymol blue* sebanyak 0,4%
- e) Tuang media ke dalam tabung reaksi sebanyak 3-5 ml
- f) Masukkan tabung durham, dan pastikan tidak ada udara yang terperangkap di dalam tabung durham
- g) Sterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit

c. Pengujian biokimia

1) Pewarnaan Gram

- a) Buatlah preparat ulas (*smear*) yang telah difiksasi dari bakteri *S. typhi*.
- b) Teteskan kristal violet (CV) sebagai pewarna utama pada kedua preparat, usahakan semua ulasan terwarnai dan tunggu selama ± 1 menit.
- c) Cuci dengan akuades mengalir.
- d) Teteskan *lugol's iodine*, lalu tunggu ± 1 menit.
- e) Cuci dengan akuades mengalir.
- f) Beri etanol 96% setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih. Jangan sampai terlalu banyak (*overdecolorize*).
- g) Cuci dengan akuades mengalir.
- h) Teteskan safranin dan tunggu selama ± 45 detik.
- i) Cuci dengan akuades mengalir.
- j) Keringkan preparat dengan kertas *tissue* yang ditempelkan di sisi ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu biarkan mengering di udara.

2) Uji *Methyl Red*

- a) Ose dipanaskan sampai merah membara dan dibiarkan dingin.
- b) Satu ose isolat *S. typhi* diambil lalu ditempelkan pada dinding tabung media MR-VP *Broth Base*.
- c) Inkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C.
- d) Tetesi dengan reagen *Methyl Red* sebanyak 5 tetes melalui dinding tabung.
- e) Amati hasil reaksi

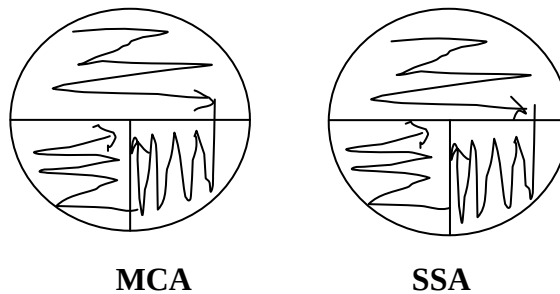
3) Uji *Voges-Proskauer*

- a) Ose dipanaskan sampai merah membara dan dibiarkan dingin.

- b) Satu ose isolate *S. typhi* diambil lalu ditempelkan pada dinding tabung media MR-VP Broth Base.
- c) Inkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C.
- d) Tambahkan 0,6 ml alpha naphthol, dilanjutkan dengan penambahan 0,2 ml reagen KOH 40%.
- e) Homogenkan dan amati hasil reaksi.

4) Uji media MCA dan SSA

- a) Buatlah preparat ulas (*smear*) yang telah difiksasi dari bakteri *S. typhi*.
- b) Inokulasi *S. Typhi* pada media MCA dan SSA dengan cara di streak pada 3 kuadran
- c) Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dalam posisi terbalik.



5) Uji media SIM

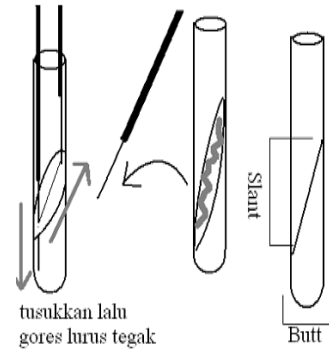
- a) Inokulasikan biakan pada media SIM dengan cara ditusukkan dengan menggunakan jarum *needle* ke dalam media sedalam $\frac{3}{4}$ bagian
- b) Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
- c) Interpretasikan hasil

6) Uji media SCA

- a) Inokulasikan *S. typhi* pada SCA agar miring.
- b) Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

7) Uji media TSIA

- Inokulasikan biakan pada media TSIA dengan cara inokulasi tusuk kemudian dilanjutkan dengan diulaskan lurus tegak pada agar miring
- Inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam
- Interpretasikan hasil

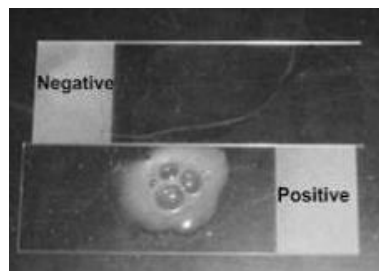
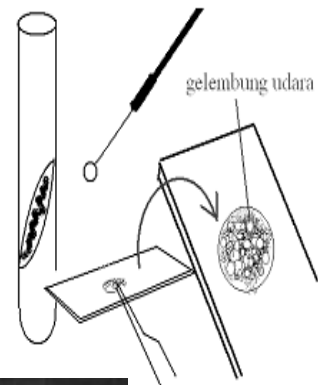


8) Uji gula-gula

- 1 ose isolat *S. typhi* diinokulasikan pada media gula (glukosa / laktosa / manitol / maltosa / sukrosa)
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
- Interpretasikan hasil

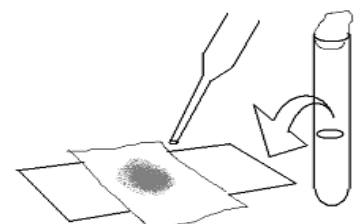
9) Uji Katalase

- Koloni bakteri diambil satu ose secara aseptis dan diinokulasikan di atas *object glass*
- Teteskan 3% H₂O₂ secukupnya pada *object glass*
- Amati adanya gelembung untuk hasil positif dan tidak ada gelembung untuk hasil negatif

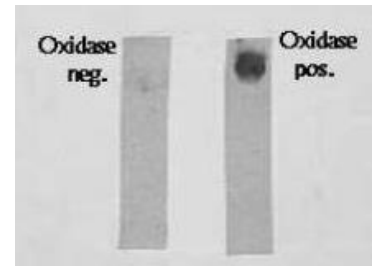


10) Uji Oksidase

- Koloni bakteri diambil 1 tetes secara aseptis dan diinokulasikan di atas *object glass*
- Letakkan kertas merang di atas *object glass*, sehingga tetesan tersebar pada kertas.
- Tetesi dengan reagen *tetramethyl-D-phenylenediamine dihydrochloride*.



- d) Amati perubahan yang terjadi, jika warna berubah menjadi biru maka hasil positif, sedangkan apabila tidak terjadi perubahan warna maka hasil uji negatif. Hasil uji positif tertunda jika warna biru muncul antara 10 – 60 detik setelah ditetesi.



D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media MCA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Karakteristik koloni Media SSA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:

Gambar	Keterangan
	Pewarnaan Gram Bentuk: Warna: Gram:
	Karakter Biokimia Uji Methyl red
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer
	Karakter Biokimia Uji media SIM Sulfit Indol Motility
	Karakter Biokimia Uji media SCA

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media TSIA H ₂ S = Slant = Butt = Gas =
	Karakter Biokimia Uji media gula-gula Glukosa = Laktosa = Manitol = Maltosa = Sukrosa =
	Karakter Biokimia Uji Katalase
	Karakter Biokimia Uji Oksidase

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

ACARA V
KARAKTERISASI *Staphylococcus aureus*

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Staphylococcus aureus*

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Staphylococcus aureus*, alkohol 70%, spirtus, akuades, media reaksi biokimia: media *Blood Agar* (BA), media Mannitol Salt Agar (MSA), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), MR-VP *Broth Base*, media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa) darah domba. Reagensia: pewarna Gram, *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Hidrogen peroksida 3%, Tetramethyl-P-Phenylene Dihydrochloride 1%, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue / phenol red*, plasma sitrat

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan pengujian pada media selektif BA dan MSA, pengujian biokimia diantaranya TSIA, media gula-gula, MR, VP, pewarnaan Gram, uji katalase dan koagulase.

a. Pembuatan Media BA

- 1) Larutkan 40 gram *Blood Agar Base* dalam 1 liter aquadest
- 2) Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
- 3) Dinginkan hingga suhu media ± 50 °C
- 4) Tambahkan 4-8% darah domba, homogenkan
- 5) Tuang dalam cawan petri, hindari adanya gelembung

b. Pembuatan Media MSA

- 1) Larutkan 108 gram Media MSA instan dalam 1 liter aquadest
- 2) Atur pH mencapai $7 \pm 0,2$
- 3) Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

c. Pembuatan Plasma Sitrat

Sampel darah vena dengan antikoagulan trisodium sitrat 3,2% (0,109 M) perbandingan 9:1. Sentrifuse 3.000 rpm selama 10 menit

d. Uji koagulase

- 1) Letakkan 1 koloni bakteri pada object glass
- 2) Teteskan dengan plasma sitrat sebanyak 4 tetes
- 3) Amati adanya aglutinasi dengan pengamatan secara langsung atau dilihat di bawah mikroskop

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media BA Warna media: Warna koloni: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Karakteristik koloni Media MSA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Pewarnaan Gram Bentuk: Warna: Gram:

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji Methyl red
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer
	Karakter Biokimia Uji media TSIA H ₂ S : Butt : Slant :
	Karakter Biokimia Uji media gula -gula Glu : Lak : Suk : Maltosa : Manitol :
	Karakter Biokimia Uji katalase

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji koagulase

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

ACARA VI
KARAKTERISASI *Pseudomonas aeruginosa*

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Pseudomonas aeruginosa*

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Pseudomonas aeruginosa*, alkohol 70%, spirtus, akuades, media reaksi biokimia: media *Mac Conkey* (MCA), media *Citrimide Agar*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Sulfate Indole Motility* (SIM), media *Simmon's Citrate Agar* (SCA), MR-VP *Broth Base*, media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa). Reagensia: pewarna Gram, *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Hidrogen peroksida 3%, *Tetramethyl-P-Phenylene Dihydrochloride* 1%, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue / phenol red*.

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan pengujian pada media MCA, Citrimide Agar dan NA, pengujian biokimia diantaranya TSIA, media gula-gula, MR, VP, SIM, SCA, pewarnaan Gram, uji katalase dan koagulase.

a. Pembuatan Media *Citrimide Agar*

- 1) Larutkan 46,7 gram *Citrimide Agar* yang mengandung 10 ml gliserol dalam 1 liter aquadest
- 2) Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
- 3) Dinginkan hingga suhu media ± 50 °C
- 4) Tuang dalam cawan petri

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media MCA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Karakteristik koloni Media BA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Tipe melisiskan eritrosit:
	Karakteristik koloni Media NA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media <i>Citrimide Agar</i> Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Pewarnaan Gram Bentuk: Warna: Gram:
	Karakter Biokimia Uji Methyl red
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media TSIA Slant: Butt : H ₂ S :
	Karakter Biokimia Uji media gula -gula Glu : Lak : Suk : Maltosa : Manitol :
	Karakter Biokimia Uji katalase
	Karakter Biokimia Uji oksidase
	Karakter Biokimia Uji media SIM Sulfit : Indol : Motility :

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media SCA

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

ACARA VII
KARAKTERISASI *Escherichia coli*

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Escherichia coli*

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirrer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Escherichia coli*, alkohol 70%, spirtus, akuades. Media reaksi biokimia: media Mac conkey (MCA), MR-VP Broth Base, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa), media *Simmon's Citrate Agar* (SCA), media *Sulfate Indole Motility* (SIM), media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Reagensia: pewarna Gram, *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Hidrogen peroksida 3%, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue*, *phenol red*

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan pengujian pada media selektif MCA dan SCA, pengujian biokimia diantaranya TSIA, SIM, media EMBA, media gula-gula, MR, VP, pewarnaan Gram dan uji katalase.

a. Pembuatan Media EMB

- 1) Larutkan 37,5 gram EMB instan dalam 1 liter akuades
- 2) Dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate and stirrer* sampai mendidih
- 3) Sterilisasi dalam autoklaf
- 4) Atur pH mencapai $6,8 \pm 0,2$
- 5) Media dituangkan ke dalam cawan petri
- 6) Diamkan hingga memadat

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media MCA Warna media: Warna koloni: Bentuk: bulat Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Pewarnaan Gram Bentuk: Warna: Gram:
	Karakter Biokimia Uji Methyl red
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media SIM Sulfit : Indol : Motility :
	Karakter Biokimia Uji media TSIA Slant : H ₂ S : Gas :
	Karakter Biokimia Uji media SCA
	Karakter Biokimia Uji media EMBA

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media gula-gula G : L : S : Manitol : Maltosa :
	Karakter Biokimia Uji Katalase

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

ACARA VIII
KARAKTERISASI *Vibrio cholerae*

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Vibrio cholerae*

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Vibrio cholerae*, alkohol 70%, spirtus, akuades. Media reaksi biokimia: media *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose* agar (TCBS agar), MR-VP Broth Base, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa), media *Simmon's Citrate Agar* (SCA), media *Sulfate Indole Motility* (SIM). Reagensia: pewarna Gram, *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Hidrogen peroksida 3%, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue / phenol red*

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Vibrio cholerae* dilakukan dengan pengujian pada media selektif TCBS agar, pengujian biokimia diantaranya media TSIA, media SCA, media SIM, media gula-gula, MR, VP, pewarnaan Gram, uji katalase.

a. Pembuatan Media TCBS agar

- 1) Larutkan Akuades disterilisasi sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer
- 2) Media TCBS instan ditimbang sebanyak 8,8 gram
- 3) Media TCBS dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi akuades steril
- 4) Dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate and stirer*
- 5) Atur pH mencapai $8,6 \pm 0,2$
- 6) Media dituangkan ke dalam cawan petri
- 7) Diamkan hingga memadat

Note: media TCBS tidak perlu disterilisasi di dalam autoklaf

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media TCBS agar Warna media: Warna koloni: Bentuk koloni: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:
	Pewarnaan Gram Bentuk: Warna: Gram:
	Karakter Biokimia Uji Methyl red

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer
	Karakter Biokimia Uji media SIM Sulfid : Indol : Motility :
	Karakter Biokimia Uji media TSIA Slant : Butt : H ₂ S : Gas :
	Karakter Biokimia Uji media SCA

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media gula-gula Glukosa : Manitol : Sukrosa : Laktosa : Maltosa :
	Karakter Biokimia Uji Katalase positif

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

ACARA IX
KARAKTERISASI *Proteus* sp.

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

Mahasiswa mampu mengetahui karakter morfologi dan biokimia *Proteus* sp.

B. Dasar Teori

C. Metode Kerja

1. Alat

Autoklaf, mikroskop, *show case*, BSC, *hot plate and stirer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, botol spirtus, erlenmeyer, spatula, gelas kimia, jarum ose, jarum *needle*, batang pengaduk

2. Bahan

Isolat *Proteus* sp. alkohol 70%, spirtus, akuades. Media reaksi biokimia: media *Blood Agar* (BA), MR-VP Broth Base, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa, manitol, maltosa), media *Simmon's Citrate Agar* (SCA), media *Sulfate Indole Motility* (SIM). Reagensia: *Methyl red*, KOH 40%, Alpha naftol, Iodin 1%, Peptone, NaCl, *bromothymol blue / phenol red*

3. Prosedur Kerja

Karakterisasi bakteri *Proteus* sp. dilakukan dengan pengujian pada media selektif BA, pengujian biokimia diantaranya media TSIA, media SCA, media SIM, media gula-gula, MR, VP.

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

Gambar	Keterangan
	Karakteristik koloni Media BA Warna media: Warna koloni: Bentuk: Permukaan: Tepi: Elevasi: Ukuran:

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji Methyl red
	Karakter Biokimia Uji Voges-Proskauer
	Karakter Biokimia Uji media SIM Sulfit : Motility : Indol :
	Karakter Biokimia Uji media TSIA Slant : Butt : H ₂ S : Gas : <i>Proteus vulgaris:</i>

Gambar	Keterangan
	Karakter Biokimia Uji media SCA
	Karakter Biokimia Uji media gula-gula Glukosa : Laktosa : Manitol : Sukrosa :
	Pewarnaan Gram Gram : Bentuk : Warna :

2. Pembahasan

(Bahas setiap intepretasi hasil dari masing-masing uji)

E. Kesimpulan

F. Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Cappuccino, J.G. 2008. *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. Jakarta: EGC.
- Irianto, Koes. 2013. *Mikrobiologi Medis*. Bandung: Alfabeta.
- Pakpahan. M., C.N. Ekowati dan K. Handayani. 2013. Karakteristik fisiologi dan Pertumbuhan Isolat Bakteri *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Naungan di Lingkungan Universitas Lampung.