PENUNTUN PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI I PRODI DIII ANALIS KESEHATAN

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

STIKES MITRA KELUARGA
2019

\KATA PENGANTAR

Buku/ diktatPenuntunpraktikum Bakteriologi I ini disusun dengan maksud dan tujuan membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum Bakteriologi I. 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.

Penuntun praktikum ini disusun rinci dan sistematis, dilengkapi dengan gambar sehingga memudahkan praktikan memahami dan mempersiapkan diri sebelum melakukan kegiatan praktikum. Materi yang disajikan dalam diktat ini mencakup teknik dasar yang lazim dilakukan di Laboratorium Bakteriologi pada umumnya.Harapan kami, buku ini dapat bermanfaat bagi praktikan Bakteriologi I serta bagi mahasiswa yang memerlukannya.Segala kritik dan saran yang bersifat membangun tentang isi buku/diktat ini sangat dihargai demi perbaikan kualitas lebih lanjut.

Jakarta, Februari 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
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 (skrosing 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. Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Bakteriologi. 1

II. Teknik Pemindahan Biakan Bakteri 5

III. Isolasi bakteri 14

IV. Preservasi Isolat Bakteri 17

UJIAN PRAKTIKUM 1

V. Pewarnaan Sederhana 20

VI. Pewarnaan Gram 25

VII. Pewarnaan Endospora& Kapsul Bakteri 29

UJIAN PRAKTIKUM 2

VIII. Motilitas Bakteri 34

IX. Pengukuran sel bakteri 37

X. Penghitungan jumlah bakteri 41

XI. Pengujian Viabilitas Bakteri Hasil Preservasi 50

UJIAN PRAKTIKUM 3

DAFTAR PUSTAKA **53**

PRAKTIKUMI
PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM BAKTERIOLOGI

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu mengenal dan mengetahui fungsi dari tiap-tiap alat yang digunakan di dalam laboratorium bakteriologi.
2. Mahasiswa mampu menggunakan alat-alat yang digunakan dalam praktikum bakteriologi.

B. Dasar Teori

Antonie Van Leuwenhook adalah orang yang pertama kali melihat bakteri dengan menggunakan instrumen optik yang terdiri atas lensa bikonvens.Antonie Van Leuwenhook menemukan bakteri dalam berbagai cairan, diantaranya cairan tubuh, air, ekstrak lada, serta bir. Penemuan tersebut menjadi awal munculnya penelitian mengenai proses terjadinya fermentasi dan penemuan jasa renik penyebab penyakit.

Pengetahuan alat merupakan salah satu faktor yang penting untuk mendukung kegiatan praktikum. Mahasiswa akan terampil dalam praktikum apabila mempunyai pengetahuan mengenai alat-alat praktikum yang meliputi nama alat, fungsi alat, dan cara menggunakannya. Pengetahuan alat yang kurang akan mempengaruhi kelancaran saat praktikum.

Alat – alat yang digunakan pada praktikum Bakteriologi terbagi menjadi alat elektrik, alat gelas dan alat non gelas. Alat elektrik adalah alat laboratorium yang pada penggunaannya membutuhkan listrik, seperti mikroskop, autoklaf dan inkubator. Alat gelas adalah alat yang terbuat dari gelas atau kaca, seperti *object glass*, cawan pteri dan pipet ukur. Sedangkan alat non gelas adalah alat yang materialnya terbuat dari selain gelas, seperti *bulb*, pinset dan jarum ose.

C. Metode Kerja

1. Alat

Alat elektrik : Mikroskop cahaya, autoklaf, inkubator, *Hot Plate and Stirer*, *Colony counter*, *Biological Safety Cabinet* (BSC), Oven, refrigerator. **Alat gelas dan keramik :** cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, labu erlenmeyer, *mortar and pestle, beaker glass*, pembakar spirtus, gelas ukur, *drugalsky*. *Alat non gelas :* jarum inokulum / ose, pinset, *rubber bulb / filler*, rak tabung pH meter universal.

2. Bahan

Preparat awetan bakteri.

3. Prosedur Kerja

1. Alat – alat yang terdapat di laboratorium Bakteriologi disiapkan
2. Pembimbing/Dosen mendemonstrasikan alat-alat di laboratorium bakteriologi.
3. Praktikan memperhatikan serta menganalisis fungsi dari alat-alat yang dipresentasikan.
4. Gambar atau foto alat-alat tersebut.

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

(Bentuk alat-alat laboratorium bakteriologi : Carilah gambar dari masing-masing alat dan sebutkan tiap bagiannya).

a. Alat-alat elektrik

No.	Nama Alat	Gambar	Bagian-Bagian
1.	Mikroskop cahaya		
2.	Autoklaf elektrik		
3.	Inkubator		
4.	*Hot Plate*		
5.	*Colony counter*		

6.	Oven		
7.	*Biological Safety Cabinet* (BSC)		

b. Alat-alat gelas dan keramik

No.	Nama Alat	Gambar	Bagian-Bagian
1.	Cawan petri		
2.	Pipet ukur		
3.	Pipet tetes		
4.	Tabung reaksi		
5.	Labu Erlenmeyer		
6.	*Mortar & pestle*		
7.	*Beaker glass*		
8.	Pembakar Spirtus		
9.	Gelas ukur		
10.	*Drugalsky*		

c. Alat-alat non gelas

No.	Nama Alat	Gambar	Bagian-Bagian
1.	Jarum inokulum / ose		
2.	Pinset		
3.	*Rubber bulb / Filler*		
4.	Rak tabung		
5.	pH meter universal		

2. Pembahasan

(Penjelasan cara penggunaan, fungsidan prinsip kerja dari alat-alat yang telah di demonstrasikan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM II
TEKNIK PEMINDAHAN BIAKAN BAKTERI

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

- Mahasiswa mampu melakukan teknik pengambilan dan pemindahan bakteri secara aseptik untuk pembuatan subbiakan.
- Mahasiswa mampu melakukan sterilisasi yang benar pada alat inokulasi dengan nyala api pembakar Bunsen.
- Mahasiswa mampu memainkan jari-jemari secara benar untuk mengambil dan menutup kembali penutup tabung.

B. Dasar Teori

Bakteri selalu berada di udara dan dipermukaan perlengkapan, meja kerja, dan peralatan laboratorium. Bakteri tersebut dapat menjadi sumber kontaminasi eksternal sehingga mempengaruhi hasil percobaan, kecuali teknik yang benar dilakukan selama proses pembuatan subbiakan.

Bakteri dipindahkan dari satu media ke media yang lain dengan **teknik pembuatan subbiakan**. Teknik ini merupakan teknik dasar yang sangat penting dan digunakan secara rutin dalam menyiapkan dan memelihara biakan induk, serta pada prosedur pengujian bakteriologi.Uraian di bawah ini adalah langkah-langkah penting yang harus diikuti untuk pemindahan mikroorganisme secara aseptik.

1. Ose atau jarum inokulasi harus selalu disterilisasi dengan membakarnya pada bagian terpanas dari nyala api pembakar Bunsen, yaitu api berbentuk kerucut di bagian dalam yang berwarna biru, sampai seluruh kawat berwarna merah membara. Setelah itu, bagian atas dari pegangan dilewatkan secara cepat pada nyala api tersebut. Setelah dibakar, ose tidak boleh diletakkan dibawah, tetapi tetap dipegang pada posisi tidak terlalu jauh dari api, kemudian dibiarkan mendingin selama 10 sampai 20 detik. Tabung biakan induk dan tabung yang akan diinokulasi dipegang pada telapak tangan yang lain dan ditahan dengan ibu jari. Dua tabung itu kemudian dipisahkan sehingga membentuk huruf V pada tangan.

2. Tabung-tabung tersebut kemudian dibuka penutupnya dengan menjepit tutup tabung pertama dengan jari kelingking dan penutup tabung kedua dengan jari selanjutnya (jari manis), kemudian angkat penutup tersebut ke atas. *Catatan: setelah diangkat, kedua penutup itu harus tetap dijepit pada tangan yang memegang ose atau jarum inokulasi steril dengan bagian dalam penutup jauh dari talapak tangan*. Penutup tidak boleh diletakkan pada meja kerja laboratorium karena dengan melakukannya berarti telah melanggar prosedur steril. Setelah tutup tabung diangkat, leher tabung dilewatkan sekilas pada nyala api dan alat pemindah yang steril tersebut kemudian didinginkan dengan menyentuhkannya pada dinding bagian dalam tabung biakan yang steril sebelum mengambil sedikit sampel inokulum.
3. Ose atau jarum yang telah berisi inokulum dimasukkan ke dalam tabung subbiakan. Bila menggunakan media kaldu, ose atau jarum sedikit diguncang untuk melepaskan bakteri, bila menggunakan media agar miring, ose atau jarum digoreskan perlahan di atas permukaan pada dengan goresan lurus atau zigzag. Untuk inokulasi ke dalam tabung agar tegak, jarum lurus ditusukkan hingga ke dasar tabung dalam suatu garis lurus, kemudian tarik kembali dengan cepat mengikuti garis tusukan. Ini disebut inokulasi tusuk.
4. Setelah melakukan inokulasi, alat pemindah dijauhkan, leher tabung dilewatkan pada nyala api kembali, dan tutup tabung ditempatkan kembali pada tabung yang sama sesuai dengan asalnya.
5. Jarum atau ose dibakar kembali untuk mematikan bakteri yang tersisa.

C. Metode Kerja

1. Alat

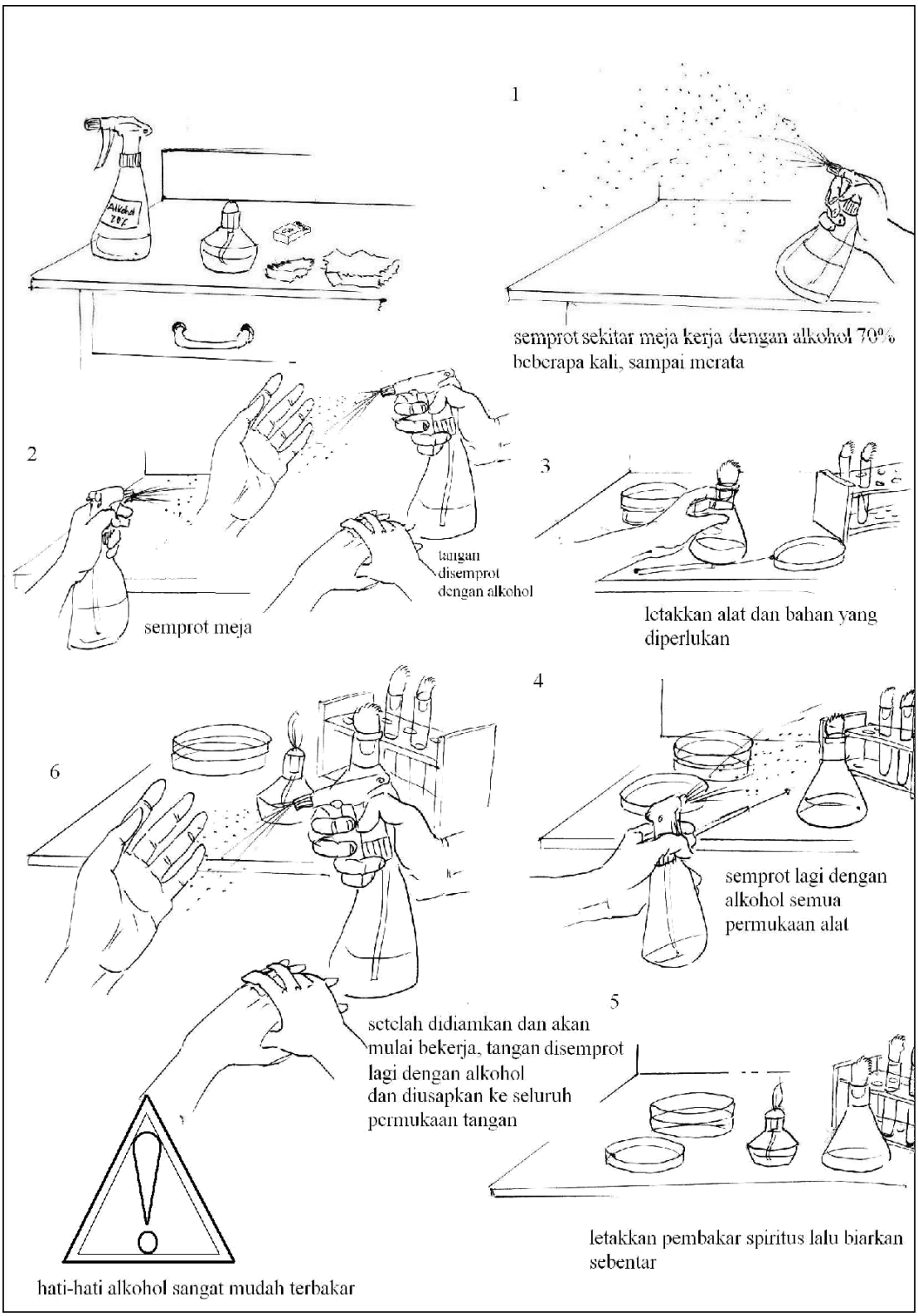
- Sprayer
- Botol spirtus
- Cawan petri
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Jarum ose
- Pipet ukur
- Filler
- Erlenmeyer
- Korek api

2. Bahan

- Akuades
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Kapas
- Kasa
- Media NA
- Isolat *Bacillus subtilis*
- Isolat *Escherichia coli*

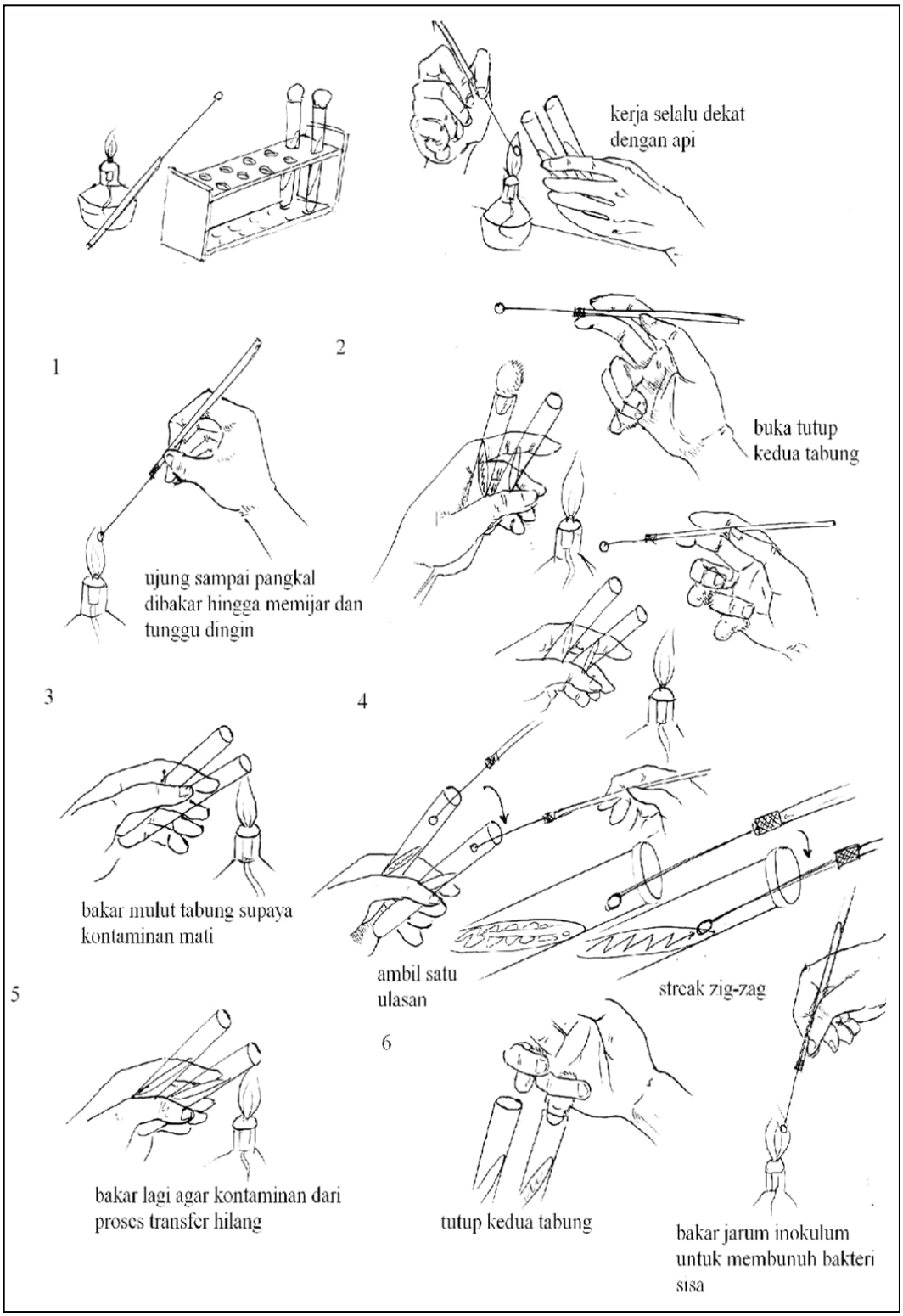
3. Prosedur Kerja

a. Desinfeksi Meja Kerja.



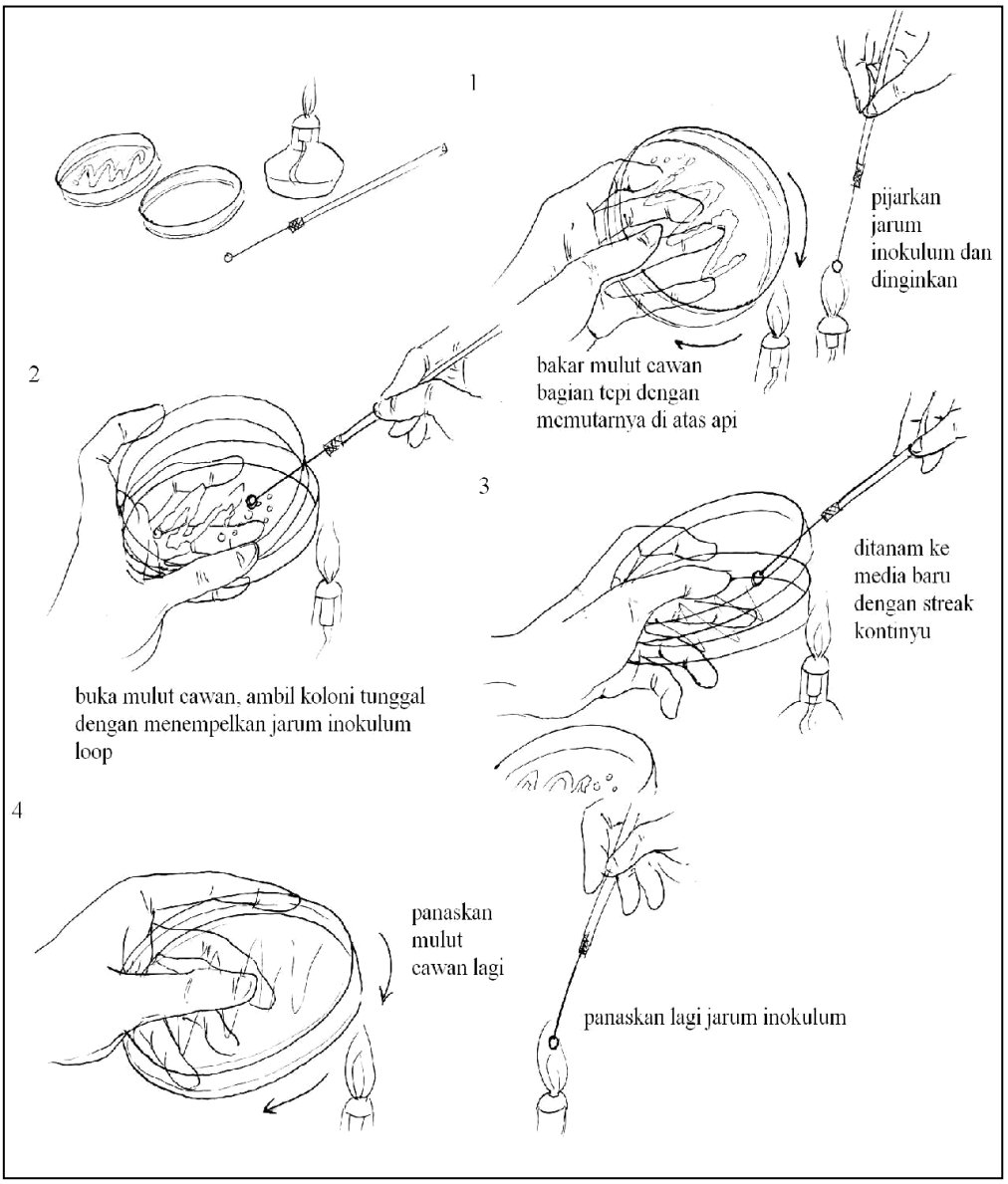
Gambar 1.Prosedur desinfeksi meja kerja.

b. Memindahkan biakan secara aseptis.



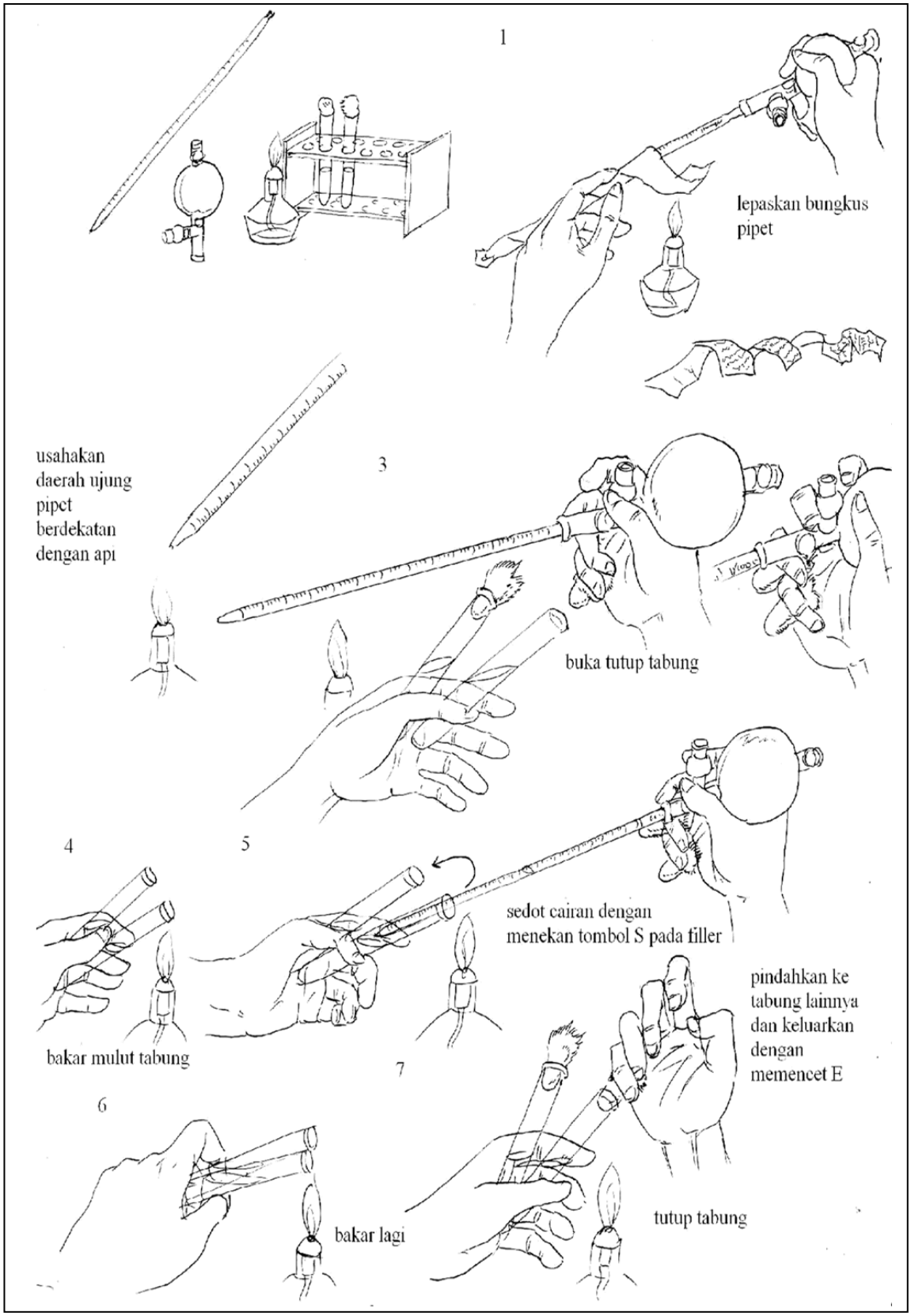
Gambar 2.Prosedur pemindahan biakan bakteri secara aseptis.

c. Memindahkan biakan dari cawan.



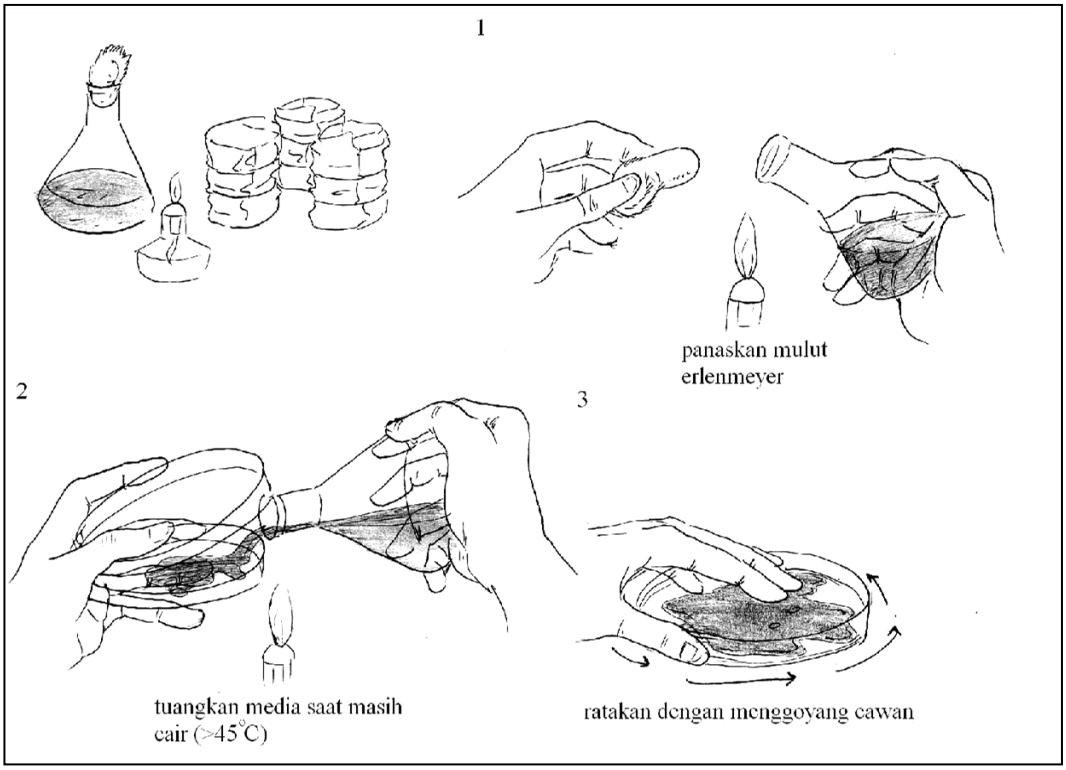
Gambar 3.Prosedur pemindahan biakan bakteri dari cawan.

d. Memindahkan cairan dengan pipet.



Gambar 4.Prosedur pemindahan cairan (suspensi) bakteri dengan pipet.

e. Menuang Media.



Gambar 5.Prosedur penuangan media bakteri.

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil**(gambar hasil pemindah biakan bakteri).
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM III
ISOLASI BAKTERI

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

1. Mahasiswa mengetahui cara mengisolasi bakteri dari kulit.
2. Mahasiswa mengetahui cara mengisolasi bakteri dari sampel tanah.

B. Dasar Teori

Bakteri di alam, populasinya tidak terpisah sendiri menurut jenisnya tetapi terdiri dari campuran berbagai macam sel. Populasi bakteri di dalam laboratorium dapat diisolasi menjadi kultur murni yang terdiri dari satu jenis bakteri.Biakan semacam ini biasanya dikenal dengan istilah biakan murni.Untuk melakukan hal ini, haruslah di mengerti jenis-jenis nutrient yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri.

Isolasi bakteri adalah proses mengambil bakteri dari medium atau lingkungan asalnya dan menumbuhkannya di medium buatan sehingga diperoleh biakan yang murni. Bakteri dipindahkan dari satu tempat ke tempat lainnya harus menggunakan prosedur aseptik. Aseptik berarti bebas dari sepsis, yaitu kondisi terkontaminasi karena mikroorganisme lain. Teknik aseptik juga melindungi praktikan dari kontaminasi bakteri (Singleton dan Sainsbury, 2006).

C. Metode Kerja

1. Alat

- Tabung reaksi
- Cawan petri
- Pipet ukur
- *Mortar and pestle*
- Botol spirtus
- *Filler / bulb*

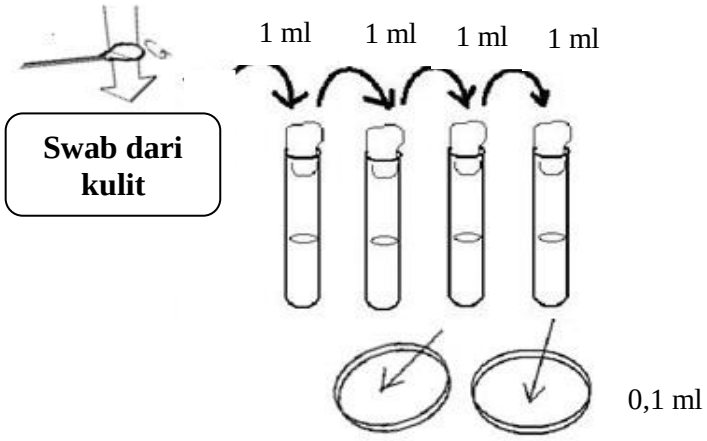
2. Bahan

- Akuades steril
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Sampel makanan
- Media NA
- *Cotton bud* steril

3. Prosedur Kerja

a. Isolasi bakteri dari kulit menggunakan teknik preparasi suspensi *Swab* (ulas).

1) *Cotton bud* steril dimasukkan ke dalam akuades steril/*peptone water*.
2) Usapkan *cotton bud* tersebut pada bagian kulit (agak lembab).
3) Kemudian *cotton bud* tersebut dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis.
4) Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-4}.
5) Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada medium NA.
6) Setelah selesai, inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 1 x 24 jam.
7) Amati jumlah dan keanekaragaman koloni bakteri.

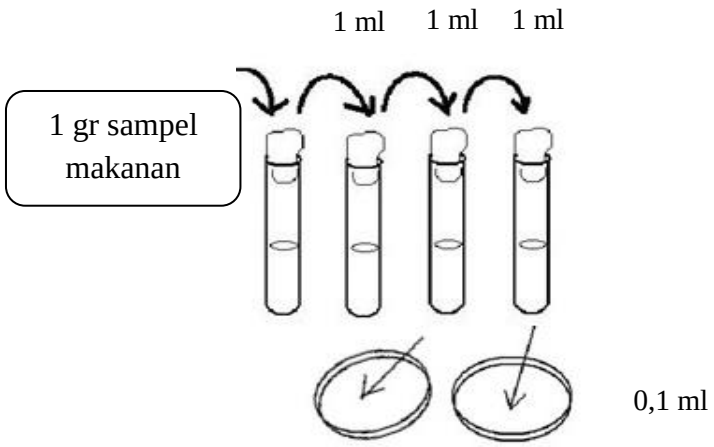


Gambar 6.Prosedur isolasi bakteri dari sampel kulit.

b. Isolasi bakteri dari sampel makanan

1) Sampel makananditimbang sebanyak 1 gram
2) Sampel makanan dihancurkan / dimaserasi dengan menggunakan *mortar and pestle*
3) Sebanyak 1 gr dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis.
4) Dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-4}.
5) Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditananm secara *spread plate* pada medium NA.

6) Inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 1 x 24 jam.
7) Amati jumlah dan keanekaragaman koloni bakteri.



Gambar 7.Prosedur isolasi bakteri dari sampel makanan.

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil** (Gambar hasil isolasi bakteri)
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan)

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMIV
PRESERVASI ISOLAT BAKTERI

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

1. Mahasiswa memahami teknik preservasi isolat bakteri menggunakan akuades steril.
2. Mahasiswa memahami teknik preservasi isolat bakteri menggunakan gliserol.

B. Dasar Teori

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati bakteri yang sangat tinggi.Berbagai jenis bakteri telah dimanfaatkan manusia sebagai penghasil antibiotik pada industri obat-obatan dan kedokteran, probiotik pada industri makanan, biofertilizer pada industri pertanian dan perikanan, agen bioremedasi pada pengolahan limbah dan penanganan pencemaran lingkungan.Bakteri selain sangat beragam jenisnya juga sangat dipengaruhi faktor lingkungan sehingga dapat mengalami perubahan karakter, baik fisiologis maupun genetik.Karena itulah para peneliti berupaya mencari berbagai teknik untuk menyimpan dan mengawetkannya agar ketersediaan isolat mikroba yang stabil dan pemanfaatannya dapat berkelanjutan.

Upaya penyimpanan dan pemeliharaan plasma nutfah bakteri dalam jangka waktu tertentu dan apabila suatu saat diperlukan dapat dengan mudah diperoleh kembali dengan kondisi yang relatif stabil merupakan **Preservasi bakteri**. Keberhasilan preservasi bakteri ditentukan olehpenguasaan teknologi, ketersediaan fasilitas dan ketersediaan tenaga yang terampil.Adapun tujuan preservasi adalah menahan laju aktivitas metabolisme bakteri sehingga viabilitas (daya tumbuh) nya dapat dipertahankan, memelihara isolat bakteri sehingga mempunyai *recovery* (daya tumbuh kembali) dan kelangsungan hidup yang tinggi dengan perubahan karakter yang minimum (Machmud, 2001).

C. Metode Kerja

1. Alat

- Tabung Reaksi
- Tabung Mikro (*Eppendorf*)
- Jarum ose
- Botol spirtus

2. Bahan

- Isolat bakteri *Bacillus subtilis*
- Isolat bakteri *Escherichia coli*
- Akuades
- Spirtus
- Gliserol
- Media NA

3. Prosedur Kerja

a. Preservasi dalam **akuades steril**.

1) Isolat murni bakteri ditumbuhkan dalam media agar miring dan telah diinkubasi selama 24-48 jam.
2) Akuades steril sebanyak 1-2 ml disiapkan dalam tabung bertutup ulir atau dalam tabung mikro (*eppendorf*).
3) Bakteri yang akan disimpan dimasukkan kedalam tabung yang telah berisi akuades steril sebanyak 1 ose atau 1 ml suspensi.
4) Tabung ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau suhu 10-15 ^{o}C.

b. Preservasi dalam **gliserol** konsentrasi rendah.

1) Isolat murni bakteri ditumbuhkan selama 24-48 jam dalam media miring agar.
2) Siapkan 1-2 ml akuades steril yangmengandung 15% gliserol dalam *eppendorf*.
3) 1-2 ose isolat bakteri dimasukkan kedalam *eppendorf*tersebut.*Eppendorf* ditutup rapat, larutan dihomogen dan disimpan pada suhu -15 ^{o}C – 4 ^{o}C.
4) Uji viabilitas bakteri dilakukan rutin (minimal satu bulan) dan recovery dilakukan dengan cara menanamnya secara langsung pada media cair atau media agar.

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil**(Gambar atau foto hasil preservasi isolat bakteri).
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari metode preservasi isolat bakteri).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMV
PEWARNAAN SEDERHANA

Tanggal Praktikum :

A. TUJUAN

1. Mahasiswa memahamiProsedur Kerja pewarnaan sederhana (Positif).
2. Mahasiswa memahami Prosedur Kerja pewarnaan sederhana (Negatif).
3. Mahasiswa mengetahui bentuk sel bakteri dari masing-masing pewarnaan.

B. DASAR TEORI

Mikroorganisme yang ada di alam ini mempunyai morfologi, struktur dan sifat-sifat yang khas, termasuk bakteri.Bakteri yang hidup hampir tidak berwarna dan kontras dengan air, dimana sel-sel bakteri tersebut disuspensikan. Salah satu cara untuk melihat dan mengamati bentuk sel bakteri dalam keadaan hidup sangat sulit, sehingga untuk diidentifikasi ialah dengan metode pengecatan atau pewarnaan sel bekteri, sehingga sel dapat terlihat jelas dan mudah diamati. Hal tersebut juga berfungsi untuk mengetahui sifat fisiologisnya yaitu mengetahui reaksi dinding sel bakteri melalui serangkaian pengecatan. Oleh karena itu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama dalam penelitian-penelitian bakteriologi.

Mikroba sulit dilihat dengan cahaya karena tidak mengadsorbsi atau membiaskan cahaya.Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme.Zat warna mengadsorbsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras mikroba dengan sekelilingnya dapat ditingkatkan.Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan strukur seperti spora, flagela, dan bahan inklusi yng mengandung zat pati dan granula fosfat (Entjang, 2003).

Pewarnaan sederhana yaitu pewarnaan dengan menggunakan satu macam zat warna dengan tujuan hanya untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk mengetahui morfologi dan susunan selnya.Pewarnaan sederhanaterdiri dari 2 macam yaitu pewarnaan positif dan negatif. Pewarnaan positif merupakan zat yang bersifat basa yang bekerja dengan cara mewarnai

struktur sel dari bakteri antara lain kristal violet, *metylen blue, fuchsin*, dan safranin (lay ,1994). Sedangkan pewarnaan negatif merupakan zat pewarna yang bersifat asam antara lain adalah eosin, nigrosin atau tinta cina. Zat pewarna negatif digunakan untuk mengamati morfologi bakteri yang sukar diwarnai oleh pewarna positif, dalam hal ini bakteri tidak diwarnai, tapi hanya mewarnai latar belakang.Pewarnaan negative ditujukan untuk bakteri yang sulit diwarnai, seperti spirochaeta.

C. Metode Kerja

1. Alat

- *Object glass*
- Jarum ose
- Botol spirtus
- Sprayer
- Penjepit tabung reaksi
- Bak pewarnaan
- Mikroskop

2. Bahan

- Isolat *Bacillus subtilis*
- Isolat *Escherichia coli*
- Akuades
- *Methytlen blue* / Safranin / *Crystal Violet.*
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Eosin / nigrosin

3. Prosedur Kerja

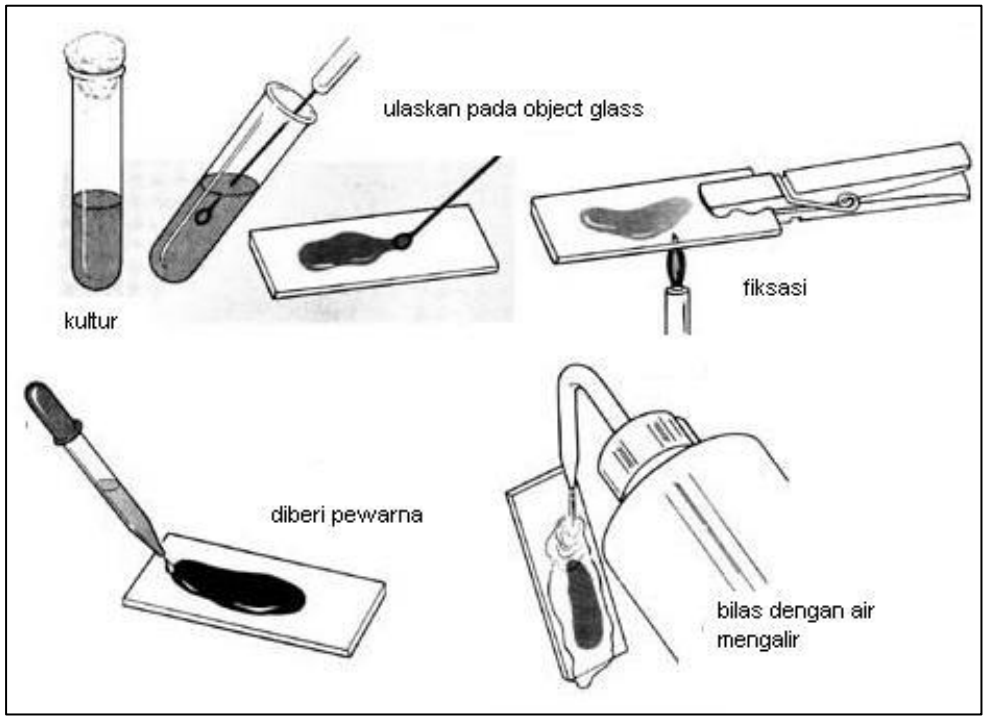
a. Pewarnaan sederhana (Positif)

Sebelum dilakukan pewarnaan dibuat ulasan bakteri di atas *object glass* yangkemudian difiksasi. Jangan menggunakan suspensi bakteri yang terlalu padat, tapijika suspensi bakteri terlalu encer, maka akan diperoleh kesulitan saat mencaribakteri dengan mikroskop. Fiksasi bertujuan untuk mematikan bakteri danmelekatkan sel bakteri pada *object glass* tanpa merusak struktur selnya.

1. Bersihkan *object glass* dengan kapas.
2. Jika perlu tulislah kode atau nama bakteri pada sudut *object glass.*
3. Bila menggunakan biakan cair maka pindahkan setetes biakan dengan pipettetes atau dapat juga dipindahkan dengan jarum inokulum. Jangan lupa biakan dikocok terlebih dahulu. Jika

digunakan biakan padat, maka biakan dipindahkan dengan jarum inokulum, satu ulasan saja kemudian diberi akuades dan disebarkan supaya sel merata.

4. Keringkan ulasan tersebut sambil memfiksasinya dengan api bunsen(lewatkan di atas api 2-3 kali).
5. Setelah benar-benar kering dan tersebar selanjutnya ditetesi dengan pewarna(dapat digunakan *Methylen blue*, *Safranin*, *Crystal Violet*) dan tunggu kuranglebih 30 detik.
6. Cuci dengan akuades kemudian keringkan dengan kertas *tissue*.
7. Amati sel bakteri menggunakan mikroskop (perbesaran 100 x 10).

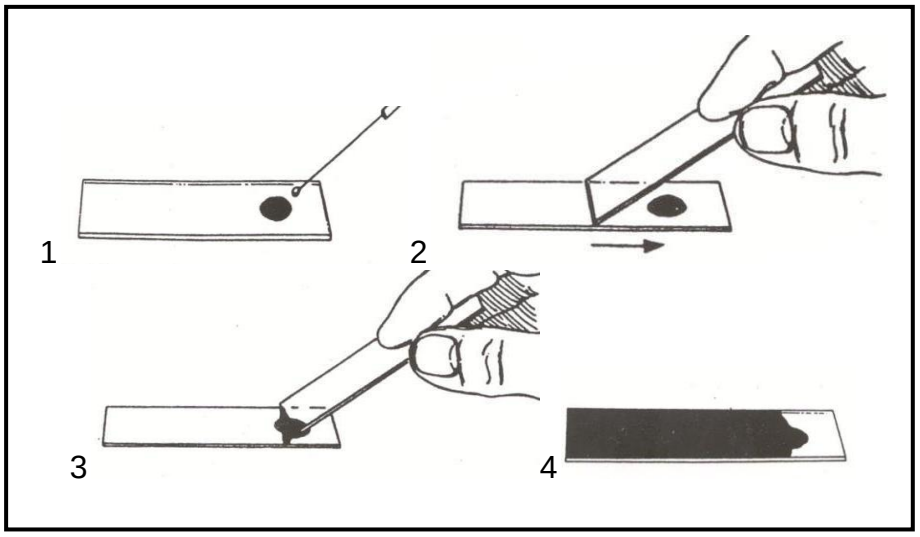


Gambar 8.Prosedur pewarnaan sederhana (positif).

b. Pewarnaan negatif

Beberapa bakteri sulit diwarnai dengan zat warna basa. Tapi mudah dilihatdengan pewarnaan negatif. Zat warna tidak akan mewarnai sel melainkan mewarnailingkungan sekitarnya, sehingga sel tampak transparan dengan latar belakang hitam.

1. Ambil dua object glass, teteskan eosin/nigrosin atau tinta cina di ujung kanan salahsatu *object glass*.
2. Biakan diambil lalu diulaskan atau diteteskan dalam tetesan eosin/nigrosin tadi, laludicampurkan.
3. Tempelkan sisi *object glass* yang lain kemudian gesekkan ke samping kiri.
4. Biarkan preparat mengering di udara, jangan difiksasi atau dipanaskan di atasapi.
5. Amati morfologi sel bakteri menggunakan mikroskop.



Gambar 9.Prosedur pewarnaan sederhana (negatif).

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil**(gambar morfologi sel bakteri pada masing-masing pewarnaan).
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM VI
PEWARNAAN GRAM

Tanggal Praktikum :

A. Tujuan

1. Mahasiswa memahami Prosedur Kerja pewarnaan gram pada isolat bakteri.
2. Mahasiswa memahami morfologi sel bakteri berdasarkan pewarnaan gram.
3. Mahasiswa mengetahui karakteristik bakteri berdasarkan pewarnaan gram.

B. Dasar Teori

Pewarnaan gram merupakan pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium bakteriologi, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi.Pewarnaan gram merupakan suatu metode empiris untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yakni gram posistif dan gram negative, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel bakteri. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuan Denmark Hans Christian Gram (1853-1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884 untuk membedakan antara Pneumokokus dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan **peptidoglikan** di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri.Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif.Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis.Sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel.

C. Metode Kerja

1. Alat

- *Object glass*
- Botol spirtus
- Sprayer
- Bak pewarnaan
- Jarum Ose

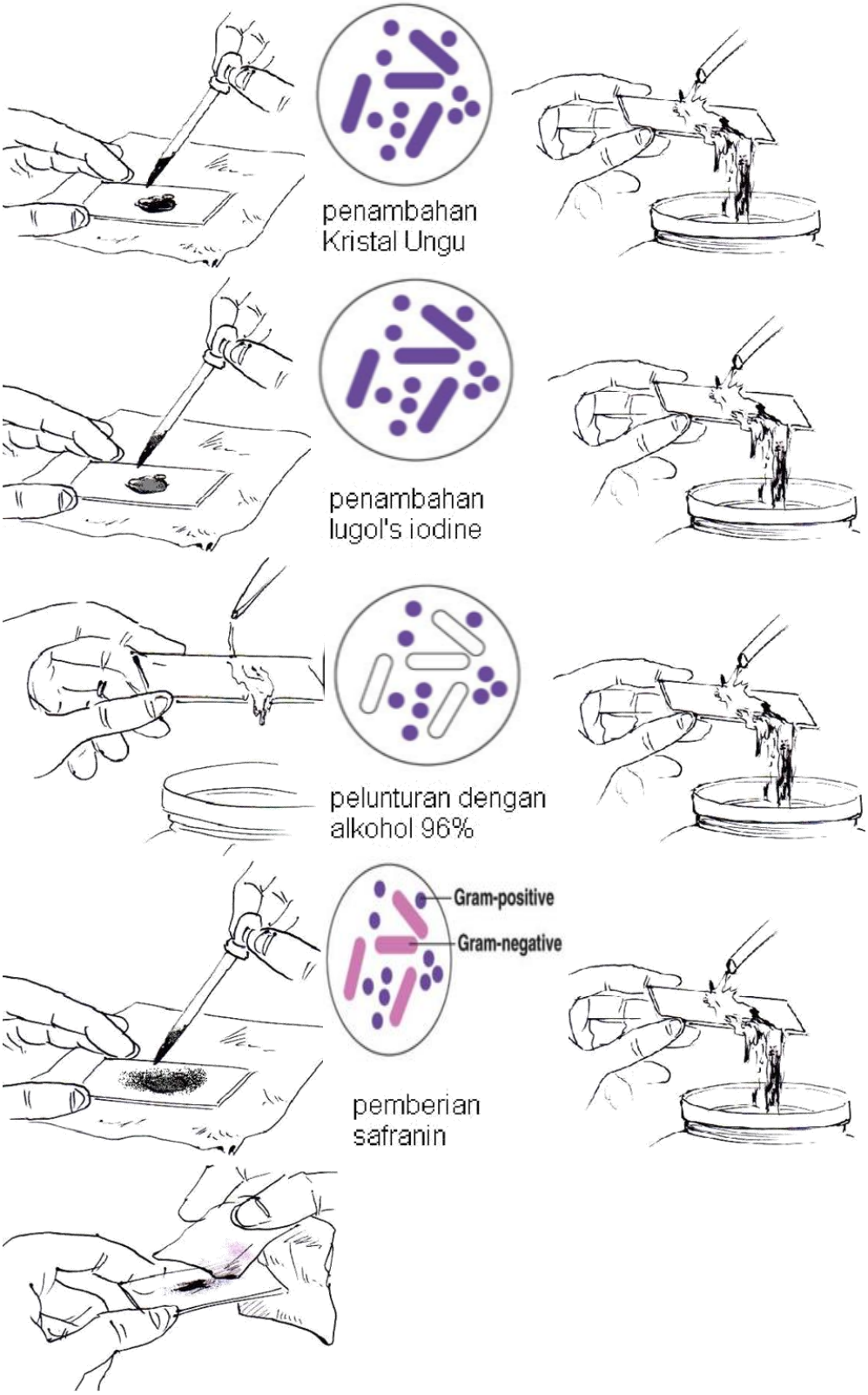
2. Bahan

- Isolat *Bacillus subtilis*
- Etanol 96%
- Isolat *Escherichia coli*
- Akuades

- Isolat *Staphylococcus aureus*
- Isolat *Salmonella typhi*
- Spirtus
- Kristal Violet
- Safranin
- *Lugol's Iodine*

3. Prosedur Kerja Pewarnaan Gram

No	Prosedur Kerja	Dampak / Hasil
1.	Buat preparat ulas (*smear*) yang telah difiksasi dari bakteri gram positif missal *Bacillus subtilis* dan gram negatif missal *Escherichia coli*.	Sel bakteri tertempel pada permukaan kaca (*object glass*).
2.	Teteskan Kristal Violet sebagai pewarna utama pada kedua preparat, usahakan semua ulasan terwarnai dan tunggu selama ± 1 menit.	Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri gram positif dan negative
3.	Cuci dengan akuades mengalir	
4.	Teteskan mordant (*lugol's iodine*) lalu tunggu ± 1 menit.	Adanya *lugol's iodine* menyebabkan adanya ikatan CV dengan *iodine* yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada gram positif dapat terbentuk *CV-iodine* pada dinding sel.
5.	Cuci dengan akuades mengalir	
6.	Beri larutan pemucat (etanol 96%) setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih. Jangan sampai terlalu banyak (*overdecolorize*).	Penetesan etanol absolute menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga komplek *CV-iodine* akan lepas dari permukaan sel gram negatif, sedangkan pada gram positif *CV-iodine* tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening.
7.	Cuci dengan akuades mengalir	
8.	Teteskan *counterstain* (safranin) dan tunggu selama ± 45 detik.	Safranin akan mewarnai sel gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. *Counterstain* hanya berfungsi sebagai pengontras saja.
9.	Cuci dengan akuades mengalir	
10.	Keringkan preparat dengan kertas tisu yang ditempelkan di sisi ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu biarkan mongering di udara.	



Gambar 10.Prosedurpewarnaan gram.

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil**(gambar hasil pewarnaan gram).
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM VII
PEWARNAAN ENDOSPORA& KAPSUL BAKTERI

Tanggal Praktikum :

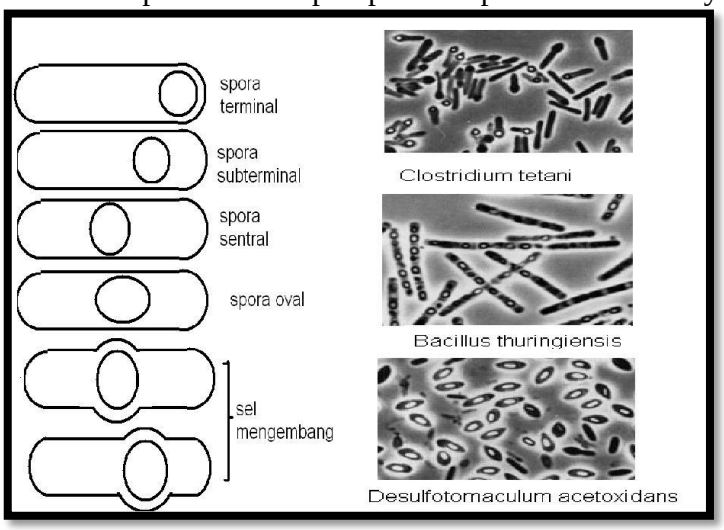
A. Tujuan

1. Mahasiswa mengetahui prosedur pewarnaan endospora & kapsul bakteri.
2. Mahasiswa mengetahui tipe endospora bakteri *Bacillus subtilis*.
3. Mahasiswa mengetahui bentuk kapsul bakteri*Bacillus subtilis*.

B. Dasar Teori

Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif, sehingga metabolismenya bersifat inaktif dan mampu bertahan dalam tekanan fisik dan kimia seperti panas, kering, dingin, radiasi dan bahan kimia.Bakteri yang menghasilkan endospora adalah anggota dari genus Clostridium, Desulfomaculatum dan Bacillus. Endospora tetap dapat dilihat di bawah mikroskop meskipun tanpa pewarnaan dan tampak sebagai bulatan transparan dan sangat refraktil.Namun jika dengan pewarnaan sederhana, endospora sulit dibedakan dengan badan inklusi (kedua-duanya transparan, sel vegetatif berwarna), sehingga diperlukan teknik pewarnaan endospora.

Berikut merupakan beberapa tipe endospora dan contohnya :



Gambar 11.Tipe endospora bakteri.

Beberapa jenis bakteri mengeluarkan bahan-bahan yangberlendir dan lengket pada permukaan selnya.Bila bahan berlendir tersebut kompak dan tampak sebagai suatu bentuk yang pasti (bundar/lonjong) maka disebut kapsul, tetapi bila bentuknya tidak teratur dan kurang menempel dengan erat pada sel bakteri disebut selaput lendir.

Kapsul dan lendir berfungsi sebagai makanan cadangan, perlindungan terhadap fagositosis (baik dalam tubuh inang maupun dialam bebas) atau perlindungan terhadap dehidrasi. Kemampuan menghasilkan kapsul merupakan sifat genetis, tetapi produksinya sangat dipengaruhi oleh komposisi medium tempat ditumbuhkannya sel-sel yang bersangkutan.Ukuran kapsul berbeda-beda menurut jenis bakterinya dan juga dapat berbeda diantara jalur-jalur yang berlainan dalam satu spesies.

Pewarnaan kapsul tidak dapat dilakukan sebagaimana melakukan pewarnaan sederhana, pewarnaan kapsul dilakukan dengan menggabungkan prosedur dari pewarnaan sederhana (positif) dan negatif. Permasalahannya adalah ketika memanaskan preparat dengan suhu yang sangat tinggi kapsul akan hancur, sedangkan apabila kita tidak melakukan pemanasan pada preparat, bakteri akan tidak dapat menempel dengan erat dan dapat hilang ketika kita mencuci preparat.

C. Metode Kerja

1. Alat

- *Object glass*
- Sprayer
- Jarum ose
- Botol spirtus
- Mikroskop
- Pipet tetes
- Bak pewarnaan

2. Bahan

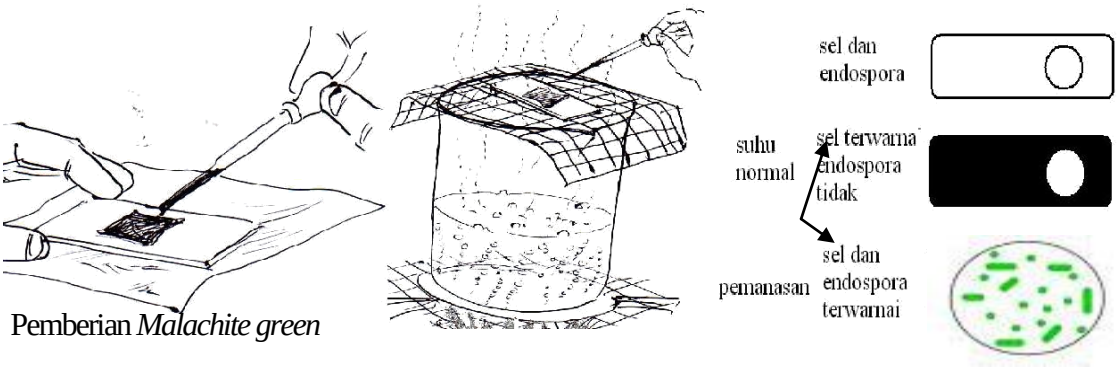
- Isolat *Bacillus subtillis*
- Alkohol 70%
- Akuades
- *Malachite Green*
- Tinta cina / nigrosin
- Spirtus
- *Copper sulfate*
- *Carbol fuchsin*
- *Tissue*
- Safranin

3. Prosedur Kerja

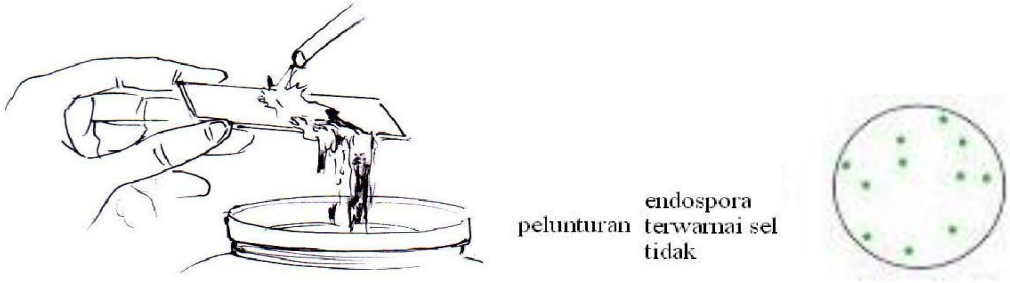
a. Pewarnaan Endospora

No.	Prosedur Kerja	Dampak / Hasil
1.	Buat preparat ulas dari *Bacillus subtilis* lalu tutup dengan kertas merang.	Sel bakteri menempel pada permukaan *object glass*.
2.	Tetesi ulasan pada *object glass* dengan *Malachite green* di atas kertas merang. Letakkan di atas air yang mendidih. Biarkan 5 menit dan dijaga jangan sampai kering. Jika bagian pinggir mulai mongering, tambahkan lagi *Malachite green*.	*Malachite green* akan mewarnai sel vegetative bakteri. Endospora sukar menyerap zat warna, sekali diberi zat warna, warna tersebut sulit dilunturkan. Untuk mewarnainya dilakukan pemanasan untuk mempermudah penetrasi *Malachite green* ke dinding endospora.
3.	Setelah dingin, bilas *object glass* dengan akuades mengalir.	Air digunakan sebagai agen dekolorisasi sel. Setelah perlakuan di atas *Malachite green* tidak melekat kuat dengan sel vegetatif. Pembilasan dengan akuades akan melunturkan *Malachite green* pada sel vegetatif.

4.	Tetesi dengan safranin sebagai *counter stain*, diamkan selama ± 45 detik.	Safranin akan mewarnai sel vegetatif menjadi merah, warna ini tidak mempengaruhi warna hijau endospora.
5.	Cuci kering anginkan.	

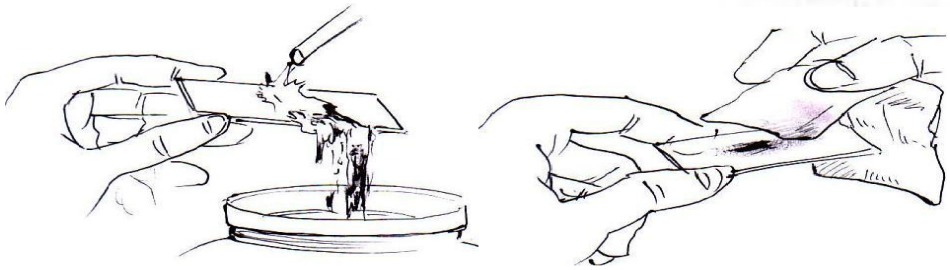


Pemberian *Malachite green*



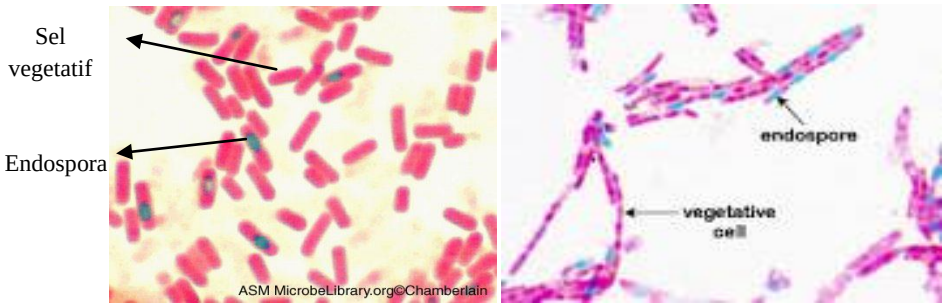
Pelunturan dengan air mengalir

Penambahan safranin



Cuci dan keringkan

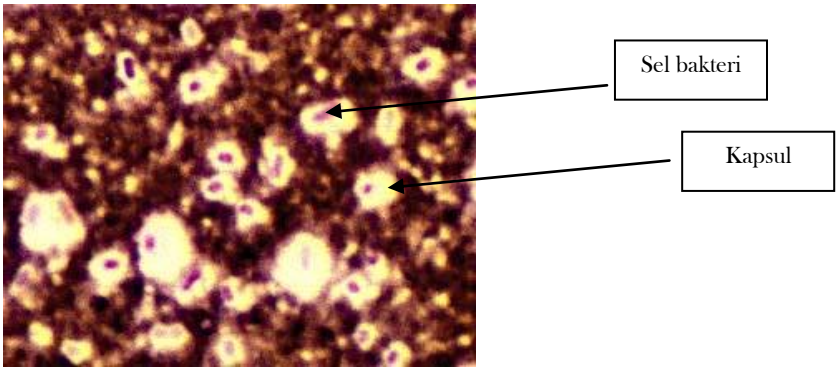
Gambar 12. Prosedur Pewarnaan Endospora.



Gambar 13. Pewarnaan Endospora.

b. Pewarnaan Kapsul (Metode Burry Gins)

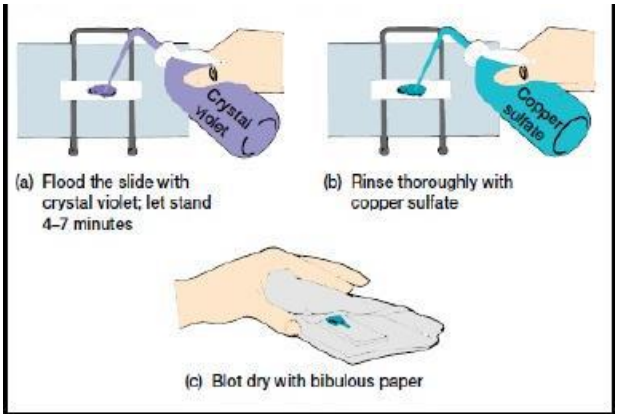
1. Teteskan 1 tetes tinta cina / nigrosin di ujung kanan *object glass*
2. Ambil 1 ose bakteri, campurkan pada tinta cina tersebut, homogenkan
3. Tempelkan sisi *object glass* yang lain kemudian gesekkan ke samping kiri
4. Fiksasi agar bakteri melekat di object glass, biarkan sampai dingin
5. Genangi apusan dengan fuchsin 1-2 tetes, biarkan selama 2 menit
6. Sisa pewarnaan dibuang dan keringkan
7. Amati di bawah mikroskop
8. Kapsul transparan, sel bakteri merah, latar belakang hitam kemerahan



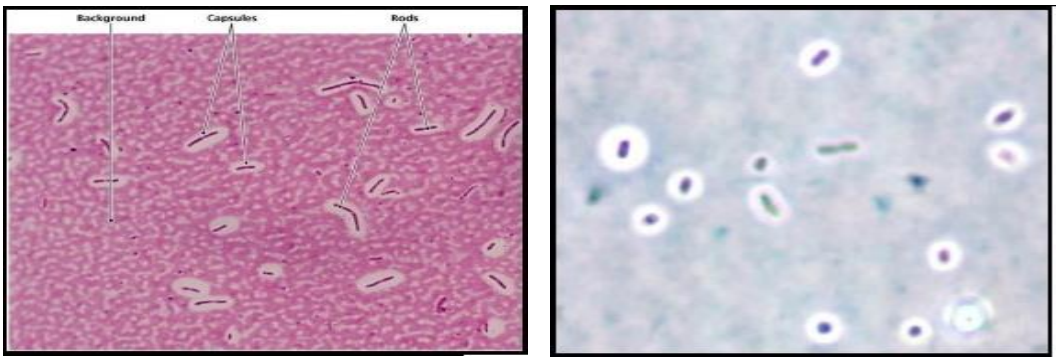
Gambar 14. Pewarnaan Kapsul Metode Burry Gins

c. Pewarnaan Kapsul (Metode Anthony)

1. Ambil 1 ose isolat *Bacillus subtilis* dan oleskan isolat tersebut pada *object glass*.
2. Teteskan kristal violet tunggu 4-7 menit.
3. Teteskan *Copper Sulfate* pada isolat tersebut.
4. Keringkan isolat menggunakan *tissue*.
5. Amati struktur kapsul menggunakan mikroskop.



Gambar 15. Metode Pewarnaan Kapsul Anthony



Gambar 16. Pewarnaan Kapsul Metode Anthony

D. Hasil dan Pembahasan

1. **Hasil**(Gambar hasil pewarnaan endospora dan kapsul bakteri).
2. **Pembahasan**(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMVIII
MOTILITAS BAKTERI

Tanggal Praktikum:

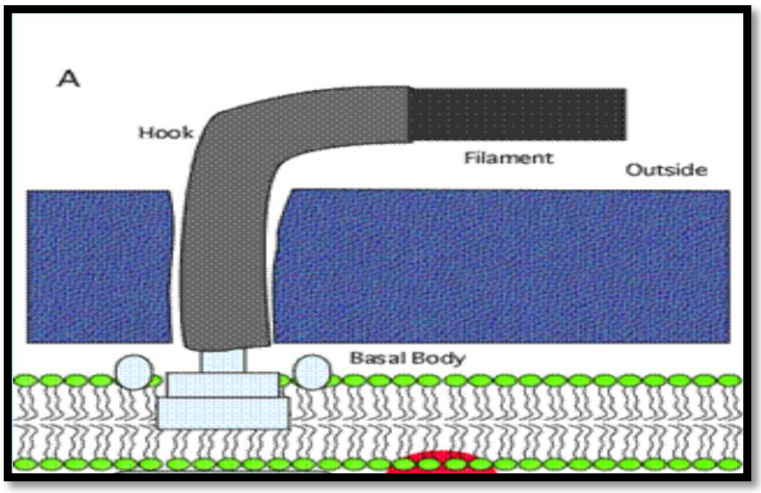
A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan pengamatan motilitas bakteri.

B. Dasar Teori

Motilitas merupakan kemampuan organisme untuk bergerak (volk, 1988). Pergerakan yang ditimbulkan dapat terjadi secara aktif dan pasif. Pergerakan secara pasif dapat terjadi karena faktor dari luar atau yang biasa disebut dengan gerak brown. Gerak brown adalah gerak pada partikel koloid yang tidak beraturan dan acak sehingga mengakibatkan sel bakteri bergerak secara tidak langsung. Pergerakan aktif terjadi karena bakteri memiliki alat khusus yang disebut dengan flagela.

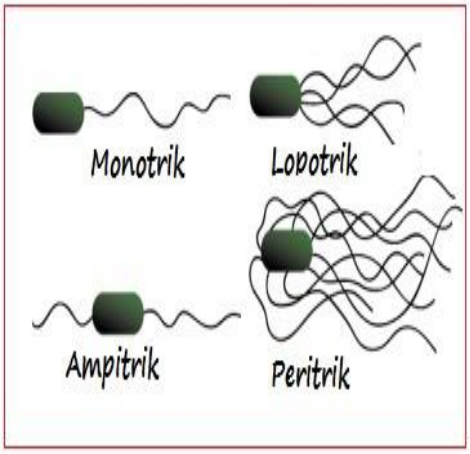
Flagella merupakan komponen tambahan pada sel yang menyerupai benang dan melekat pada dinding sel. Flagella berfungsi sebagai alat gerak pada bakteri. Sel bakteri yang memiliki flagella dapat menghampiri sumber nutrisi dan menghindari racun dengan cara menjauhi sumber racun. Flagella terdiri dari tiga bagian yaitu filament, hook (sudut) dan *Basal body* (badan besar).



Gambar 16. Struktur Flagela Bakteri.

Berdasarkan jumlah dan lokasi penempatan flagella terdiri dari empat, diantaranya:

1. Monotrik: flagel tunggal pada salah satu ujung, contoh: *Vibrio* sp., *Pseudomonas* Sp.
2. Lopotrik: terdapat 1 atau lebih flagel disalah satu ujung, contoh:*Bartonella bacilliformis*.
3. Ampitrik: terdapat 1 atau lebih flagel di kedua ujung, contoh: *Spirillum serpens*.
4. Peritrik: flagel terbesar diseluruh badan bakteri, contoh:*Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Eschericia coli*.



Gambar 17.Jenis-jenis flagella berdasarkan jumlah & lokasi.

C. Metode Kerja

1. Alat

- *Objek glass*
- Mikroskop
- Rak tabung
- *Cover glass*
- *Incubator*
- Sprayer
- Jarum ose
- Pembakarspirtus
- Pipet tetes steril
- Tabung reaksi

2. Bahan

- Sampel bakteri
- Spirtus
- Media NA
- Alkohol 70%
- Minyakimersi
- Aquades

3. Prosedur Kerja

a) Pengamatan motilitas Secara langsung

1) Teteskan biakan bakteri ke *object glass*,jika digunakan biakan padat maka ulas dengan jarum inokulum lalu ditambah akuades satu tetes, ratakan.
2) Tutup dengan cover glass
3) Amati di bawah mikroskop

b) Pengamatan secara tidak langsung

1) Ambil isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose
2) Tanam biakan pada media NA tegak dengan cara tusuk (*Stab inoculation*) sedalam ± 5 mm.
3) Inkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama 1x 24 jam
4) Bakteri yang motil ditandai dengan pertumbuhan yang tersebar ke seluruh permukaan agar, sedangkan bakteri yang tidak motil hanya tumbuh pada daerah tusukan saja

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

(gambarhasil pengamatan motilitas secara langsung dan tidak langsung).

2. Pembahasan

(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMIX
PENGUKURAN SEL BAKTERI

Tanggal Praktikum:

A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan pengukuran sel bakteri.

B. Dasar Teori

Ukuran bakteri berkisar antara 0,5 – 5 µm, maka pengukuran bakteri dengan menggunakan mikrometer. Terdapat 2 jenis mikrometer, yaitu mikrometer okuler dan mikrometer objektif. Mikrometer okuler dipasang pada lensa okuler pada mikroskop, sedangkan mikrometer objektif berbentuk slide yang ditempatkan pada meja preparat mikroskop. Jarak antara garis skala pada mikrometer okuler bergantung pada perbesaran lensa objektif yang digunakan. Jarak ini dapat ditentukan dengan mengkalibrasi antara mikrometer okuler dan objektif. Mikrometer objektif memiliki skala yang telah diketahui dan menjadi tolak ukur untuk menentukan ukuran skala mikrometer okuler.

1 skala mikrometer objektif = 0,01 mm / 10 µm.

Kalibrasi dilakukan dengan menghimpitkan skala mikrometer objektif dan okuler pada perbesaran yang diinginkan. Skala ke nol (garis pertama) pada kedua mikrometer dihimpitkan menjadi satu garis, kemudian dilihat lagi pada skala ke berapa kedua jenis mikrometer tersebutberhimpitan kembali. Dari hasil tersebutdapat diketahui satu satuan panjang pada skala mikrometer okuler itu berdasarkanbeberapa jumlah skala kecil mikrometer objektif yang berada di antara garis yangberhimpit tadi.

Rumus:

$$1 \text{ skala okuler} = \text{OD (okuler division)} \times \frac{\text{Jarak yang diketahui antara 2 garis pada mikrometer objektif}}{\text{Jarak skala pada mikrometer okuler}}$$

$$= 0{,}01 \times \frac{\text{skala objektif}}{\text{skala okuler}} \text{ (mm)}$$

$$= 10 \times \frac{\text{skala objektif}}{\text{skala okuler}} \text{ (µm)}$$

Misal : Jika skala ke 0 mikrometer okuler berhimpit dengan skala ke 0 mikrometer objektif lalu skala ke 13 mikrometer okuler berhimpit dengan skala ke 2 mikrometer objektif maka beberapa 1 skala okuler.

$$1 \text{ Skala Okuler} = 0{,}01 \text{ x } \frac{\text{skala objektif}}{\text{skala okuler}}$$

$$= 0{,}01 \text{ x } \frac{2}{13} = 0{,}00154 \text{ mm} = 1{,}54 \text{ µm}$$

C. Metode Kerja

1. Alat

- *Objek glass*
- Mikroskop
- Rak tabung
- *Cover glass*
- *Incubator*
- Pembakar spritus
- *Sprayer*
- Jarum ose
- Pembakar spirtus
- Pipet tetes steril
- Tabung reaksi

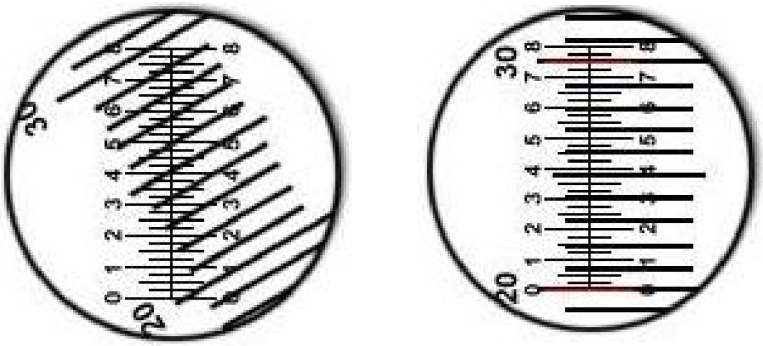
2. Bahan

- Sampel bakteri
- Spirtus
- Media NA
- Minyak emersi
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Aquades

3. Prosedur Kerja

a. Kalibrasi

1) Letakkan mikrometer objektif pada meja benda dan pasang mikrometer okulerpada tabung lensa okuler.
2) Tentukan perbesaran yang digunakan, (misalnya 40 x 10) kemudian cari gambarperbesaran dari skala mikrometer objektif.
3) Setelah fokus didapat, kemudian selanjutnya himpitkan skala ke nol mikrometer objektif dan okuler.
4) Cari dengan teliti skala ke berapa antara mikrometer objektif dan okuler yang berhimpit lagi.
5) Hitung besarnya skala okuler dengan rumus di atas.



Gambar 18. Kalibrasi mikrometer

b. Pengukuran sel bakteri

1) Lepaskan mikrometer objektif dari meja benda.
2) Ganti dengan preparat ulas yang telah disiapkan
3) Cari fokus dari preparat tersebut dengan perbesaran yang sama.
4) Hitung berapa panjang sel dengan menghitung skala mikrometer okuler.
5) Jika diperlukan hitung lebar sel dengan cara yang sama. Tabung lensa okuler dapat diputar dan dicari posisi yang pas.
6) Hitung panjang dan lebar sel sebenarnya :

   x skala okuler X hasil kalibrasi

   y skala okuler X hasil kalibrasi

   misal : 5 x 1,54 = 7,7 µm

   2 x 1,54 = 3,08 µm

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

(Gambar dan perhitungan hasil pengamatan pengukuran bakteri)

2. Pembahasan

(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan)

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMX

PENGHITUNGAN JUMLAH BAKTERI

Tanggal Praktikum:

A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan penghitungan bakteri dengan cara *plate count, Most Probable Number* (MPN) dan *haemocytometer*.

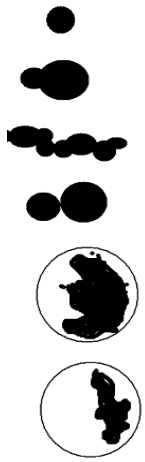
B. Dasar Teori

Penghitungan jumlah bakteri terbagi menjadi dua cara, yaitu penghitungan secara tidak langsung dan langsung. Penghitungan secara tidak langsung dilakukan dengan metode *plate count* dan *Most Probable Number* (MPN). Sedangkan penghitungan secara langsung dengan menggunakan *haemocytometer*.

Plate count adalah penghitungan koloni bakteri yang tumbuh di media agar lempeng, koloni yang terbentuk berasal dari suspensi yang telah dilakukan pengenceran bertingkat pada suatu sampel. Satuan bakteri yang terhitung adalah *Colony Forming Units* (CFU's) per ml.

Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung adalah sebagai berikut :

- Satu koloni dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni.
- Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni.
- Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah luas cawan) tidak dihitung.
- Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni.



Cara menghitung sel relatif / CFU's per ml

CFU's / ml = jumlah koloni x faktor pengenceran

Misal : Penanaman dilakukan dari tabung pengenceran 10^{-6} dengan metode *Spread Plate* dan *Pour Plate*.

Spread plate :	koloni = 50	= 50 x 10^6 CFU's / 0,1 ml
	Fp = $1/10^{-6}$	= 50.000.000 CFU's / 0,1 ml
	SP = 0,1 ml	= 500.000.000 CFU's / 0,1 ml
		= 5 x 10^8 CFU's / ml

Pour plate :	koloni = 50	= 50 x 10^6 CFU's / 1 ml
	Fp = 1/10^{-6}	= 50.000.000 CFU's / 1 ml
	SP = 0,1 ml	= 500.000.000 CFU's / 1 ml
		= 5 x 10^7 CFU's / ml

Catat pengenceran yang digunakan dan hitung total jumlah koloni, dengan menggunakan Perhitungan Angka Lempeng Total menurut SNI 01-2332.3-2006.

1. Cawan yang mengandung 25 – 250 koloni.

$$N = \frac{\sum C}{[(1xn_1)+(0{,}1xn_2)]x(d)}$$

Dengan: N = Jumlah koloni (koloni/ml atau koloni/g)

$\sum C$ = Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung

n_1= Jumlah cawan pada cawan pertama yang dihitung

n_2= Jumlah cawan pada cawan kedua yang dihitung

d = Pengenceran pertama yang dihitung

Contoh:

Pengenceran	:	1:100	1:1000
Jumlah koloni	:	232 dan 244	33 dan 28

$$N = \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1x2) + (0{,}1x2)] \times 10^{-2}}$$

= 537 / 0,022

= 24.409

= 24.000

2. Cawan yang mengandung lebih dari 250 koloni

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 koloni pada seluruh pengenceran, maka laporan hasilnya adalah Terlalu Banyak Untuk Dihitung (TBUD) atau *Too Numerous To Count*(TNTC). Tetapi apabila salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250, laporkan sebagai perkiraan ALT.

Contoh:

Pengenceran	:	1:100	1:1000
Jumlah koloni	:	TBUD	640

Perkiraan ALT koloni/ml atau koloni/g adalah 640.000

3. Cawan yang mengandung kurang dari 25 koloni atau cawan tanpa koloni

Apabila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 25, maka catat koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 25 dan dikalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang dgunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

Contoh:

Pengenceran	:	1: 100	1: 1000
Jumlah koloni	:	18 dan 0	2 dan 0

Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g : lebih kecil dari 2.500

4. Pelaporan

a. Hasil yang dilaporkan menggunakan dua angka pertama sebagai pembulatan
b. Bulatkan ke atas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 dan gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya
c. Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga 5, bulatkan ke atas bila angka kedua ganjil dan bulatkan ke bawah bila angka ke dua genap
d. Hasil yang dilaporkan dapat berupa pangkat. Data yang dilaporkan harus terdiri dari dua angka.

Contoh:

Hasil perhitungan	ALT
12.700	13.000 atau $1,3 \times 10^4$
12.400	12.000 atau $1,2 \times 10^4$
15.500	16.000 atau $1,6 \times 10^4$
14.500	14.000 atau $1,4 \times 10^4$

C. Metode Kerja

1. Alat

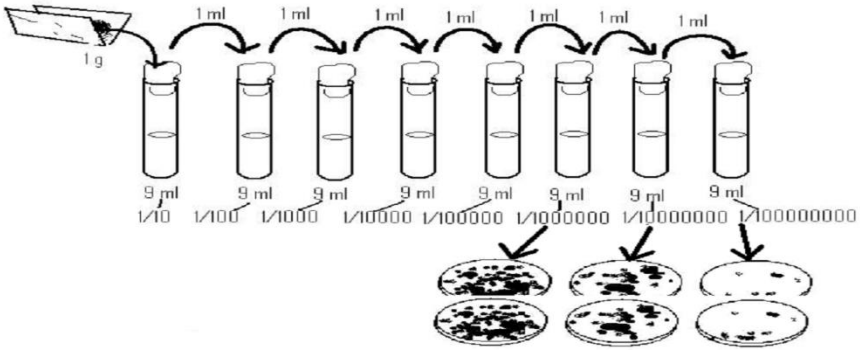
- *Objek glass*
- Mikroskop
- Rak tabung
- *Cover glass*
- *Incubator*
- Pembakar spritus
- Batang drygalski
- Tabung durham
- *Sprayer*
- Jarum ose
- Pembakar spirtus
- Pipet tetes steril
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml

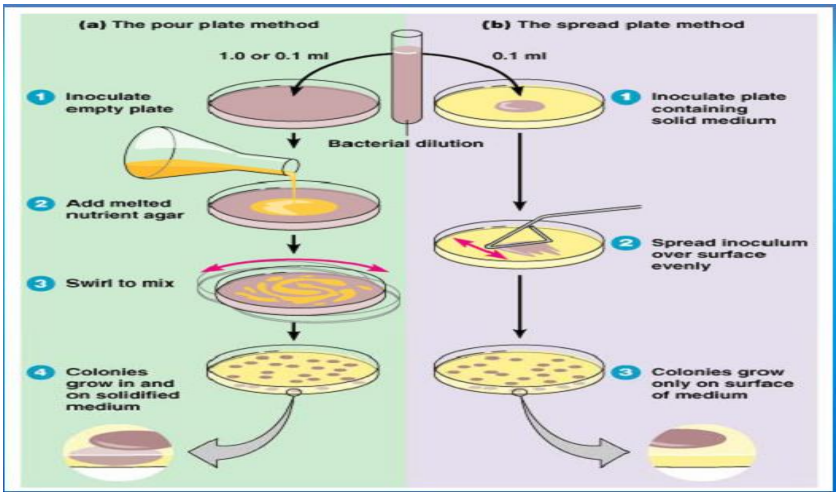
2. Bahan

- Sampel bakteri
- Spirtus
- Media NA, LBSS, LBDS
- Minyak emersi
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Aquades

3. Prosedur Kerja

a. *Plate count*





Gambar 19. Prosedur metode (a) pour plate dan (b) spread plate.

1) Spread plate
   - Sampel dimasukkan ke tabung berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat.
   - 3 pengenceran terakhir diplating (ditanam) sebanyak 0,1 ml ke media NA (*Nutrien Agar*) sebanyak dua kali tiap pengenceran (duplo).
   - Ratakan dengan batang drygalski
   - Inkubasi pada suhu 30º C selama 1-2 x 24 jam.
   - Setelah tumbuh, koloni dihitung dengan persyaratan yang telah diuraikan di atas.
2) Pour plate
   - Sampel dimasukkan ke tabung berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat.
   - 3 pengenceran terakhir diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang masih kosong.
   - Ditambahkan NA yang masih cari, lakukan secara duplo untuk masing – masing pengenceran.
   - Ratakan dengan cara menggoyangkan cawan petri membentuk angka 8.
   - Inkubasi pada suhu 30º C selama 1-2 x 24 jam.
   - Setelah tumbuh, koloni dihitung dengan persyaratan yang telah diuraikan di atas.

b. *Most Probable number* (MPN)

1) Pembuatan Media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*) dan LBDS (*Lactose Broth Double Strength*)

   Komposisi:

   LBSS :Beef extract 3 g, Peptone 5 g, lactose 5 g, Bromthymol blue 0,2%

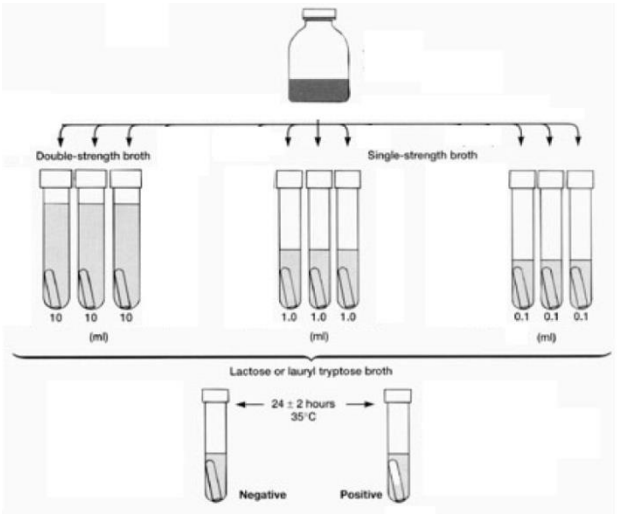
   LBDS :Beef extract 3 g, Peptone 5 g, lactose 10 g, Bromthymol blue 0,2%

   a) LBSS
      - Timbang media Lactose Broth sebanyak 11,25 gram
      - Masukkan ke dalam gelas kimia
      - Tambahkan dengan akuades sebanyak 1.000 ml
      - Tambahkan Bromthymol blue (0,2%)
      - Homogenkan

   b) LBDS
      - Timbang media Lactose Broth sebanyak 22,5 gram
      - Masukkan ke dalam gelas kimia
      - Tambahkan dengan akuades sebanyak 1.000 ml
      - Tambahkan Bromthymol blue (0,2%)
      - Homogenkan

2) Pengujian

   a) 3 tabung berisi LBDS (9 ml tiap tabung) dan 6 tabung berisi LBSS (9 ml tiap tabung) disiapkan lengkap dengan tabung durham.
   b) Diatur kesembilan tabung menjadi 3 seri.
   c) Botol yang berisi air sampel dikocok.
   d) Suspensi air sample dipindahkan sebanyak 10 ml ke masing-masing tabung seri pertama (3 tabung LBDS), secara aseptis.
   e) Suspensi air sample dipindahkan sebanyak 1 ml ke masing-masing tabung seri kedua (3 tabung LBSS), secara aseptis.
   f) Suspensi air sample dipindahkan sebanyak 0,1 ml ke masing-masing tabung seri ketiga (3 tabung LBSS), secara aseptis.
   g) Semua tabung diinkubasi pada suhu 37º C selama 48 jam.
   h) Tabung positif dihitung dan dicocokkan dengan tabel MPN

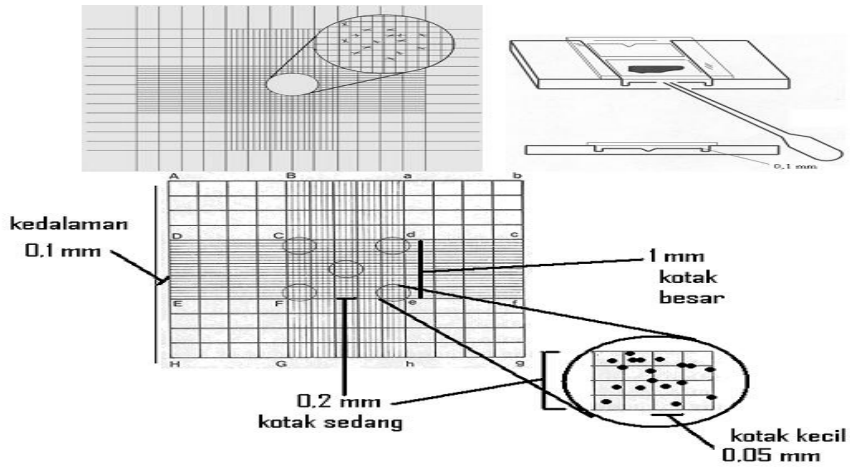


Gambar 20.Skematis rangkaian seri metode MPN.

Tabel 1.Tabel *Most Probable Number* (MPN).

nomor tabung yang positif			indeks MPN	95% batas kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml	per 100 ml	terendah	tertinggi
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

c. *Haemocytometer*



Gambar 21.Metode perhituungan menggunakan *haemocytometer*.

1) Bersihkan *haemocytometer* dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tisu.
2) Letakkan cover glass di atas *haemocytometer*.
3) Teteskan ± 50 µl suspensi bakteri (kira-kira 1 tetes) ke parit kaca pada *haemocytometer*. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
4) Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
5) Letakkan haemocytometer pada mikroskop, kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
6) Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rataan dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

- Luas kotak sedang :
  L = p x l
  = 0,2 x 0,2 = 0,04 mm^2

- Volume kotak sedang :
  V = 0,04 mm^2 x 0,1 mm
  = 0,004 mm^3

(Karena 1 ml = 1 cm^2), maka :
V = 0,004 mm^3
= 0,000004 cm^3
= 4 x 10^{-6} ml

Sel/ml :

Jumlah sel/ml = $\frac{\text{jml sel}}{4 \text{ x } 10{-}6 \text{ ml}}$

$= \frac{\text{jml sel}}{4} \text{ x } 10^6$

$= \text{jml sel x } \frac{1}{4} \text{ x } 10^6$

$= \text{jm sel x } 2{,}5 \text{ x } 10^5$

Kotak sedang : Jumlah sel/ml = jumlah sel x 2,5 x 10^5
kotak kecil : Jumlah sel/ml = jumlah sel x 4 x 10^6

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

(Gambar hasil dan perhitungan jumlah bakteri secafra Palte count, MPN dan *haemocytometer*).

2. Pembahasan

(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUMXI
PENGUJIANVIABILITAS BAKTERI HASIL PRESERVASI

Tanggal Praktikum:

A. Tujuan

- Mahasiswa mengetahui viabilitas bakteri hasil preservasi akuades steril.
- Mahasiswa mengetahui viabilitas bakteri hasil preservasi gliserol konsentrasi rendah.

B. Dasar Teori

Tujuan koleksi dan preservasi meliputi tujuan jangka pendek dan jangka panjang.Preservasi jangka pendek dilakukan untuk keperluan rutin penelitian yang disesuaikan dengan kegiatan program atau proyek tertentu.Preservasi jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba, sehingga apabila suatu saat diperlukan, dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia.Dalam kaitannya dengan pemanfaatan koleksi mikroba, tujuan koleksi dan preservasi mikroba dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu untuk keperluan (1) pribadi atau lembaga nonkomersial dan (2) lembaga dan swasta komersial.

Keberhasilan pembuatan koleksi plasma nutfah mikroba tergantung pada tiga faktor, yaitu (1) penguasaan teknologi, (2) ketersediaan fasilitas preservasi, dan (3) ketersediaan tenaga terampil, tekun, dan rutin.Penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba memerlukan penelitian yang rumit, jangka waktu lama, dan pemantauan, serta dana yang besar. Hal ini berkaitan dengan tujuan utama preservasi, yaitu (1) mereduksi atau mengurangi laju metabolisme dari mikroorganisme hingga sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan (2) memelihara sebaik mungkin biakan, sehingga diperoleh angka perolehan (*recovery*) dan kehidupan (survival) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri yang minimum. Namun demikian, saat ini berbagai teknik preservasi untuk berbagai mikroba telah tersedia dalam berbagai buku acuan, sehingga penggunanya tinggal mengadopsi teknologi tersebut sesuai dengan kebutuhannya.

Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan memindahkan secara berkala jangka pendek misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru.Teknik ini memerlukan waktu dan tenaga yang banyak.Beberapa teknik penyimpanan sederhana yang efektif untuk penyimpanan isolat jangka pendek atau menengah, dan biasanya tidak sesuai untuk penyimpanan jangka panjang. Di antara teknik tersebut ialah penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porselin, lempengan gelatin, dan P_2O_5 dalam keadaan vakum. Walaupun tidak digunakan secara luas, teknik tersebut hanya memerlukan peralatan yang sederhana dan mudah diperoleh, sehingga dapat bermanfaat bagi lembaga yang belum memiliki peralatan canggih (Skerman, 1973).

C. Metode Kerja

1. Alat

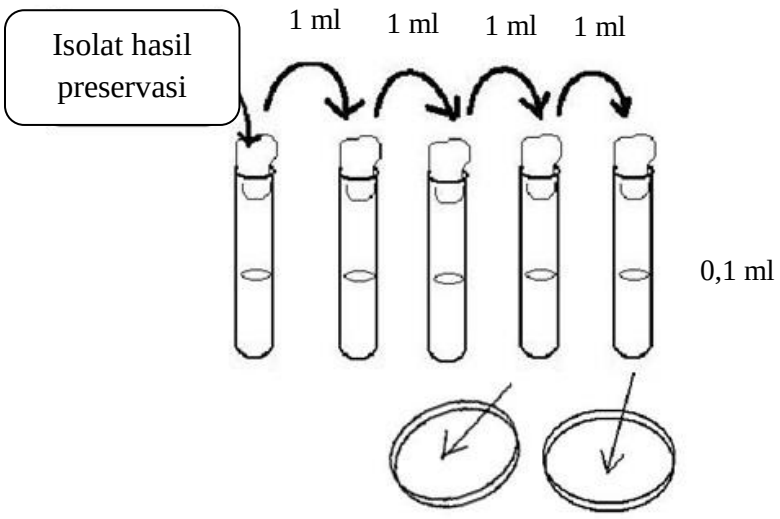
- Tabung reaksi
- Pipet ukur
- *Filler*
- Sprayer
- Batang L / *Drugalsky*
- Botol spirtus
- Cawan petri

2. Bahan

- Isolat *Bacillus subtilis* hasil preservasi
- Isolat *Escherichia coli* hasil preservasi
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Akuades
- Media NA

3. Prosedur Kerja

a. Sampel isolat*Bacillus subtilis* / *Escherichia coli* sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis.
b. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-4}.
c. Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditananm secara *spread plate* pada medium NA.
d. Setelah selesai, inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 1 x 24 jam.
e. Amati viabilitas bakteri berdasarkan tumbuhnya koloni bakteri.



Gambar 22.Prosedur isolasi bakteri hasil preservasi.

D. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

(Gambar hasil pengujian viabilitas bakteri).

2. Pembahasan

(Penjelasan dari praktikum yang telah dilakukan).

E. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci).

F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda TanganMahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 2008. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.

Badjoeri, M. 2010. *Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma nutfah*.Warta limnologi. Vol.45: 6-9.

Capuccino, J.G. and N. Sherman. 2013. *Manual Laboratorium Mikrobiologi Edisi 8*. EGC: Jakarta.

Chairlan, M. & E. Lestari. 2013. *Pedoman Teknik Dasar Untuk Laboratorium Kesehatan.* EGC: Jakarta.

Machmud, M. 2001. *Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba*. Buletin Agro*Bio* 4(1): 24-32.

Entjang, I. 2003. *Mikrobiologi Dan Parasitologi Untuk Akademi Perawat dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. Citra Aditia Bakti: Bandung.

Singleton dan Sainsbury. 2006. *Dictionary of Microbiology and Moleculer Biologu 3rd Edition*. John Wiley and Sons Inc. Sussex, England.

SNI 01-2332.3-2006. 2006. *Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada Produk Perikanan*. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta. Hal.2-4.