

PANDUAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Disusun Oleh:
Reza Anindita, M.Si.

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN MITRA KELUARGA
BEKASI
2020**

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	1
I. Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Bakteriologi	2
II. Sterilisasi.....	5
III. Media dan Cara Pembuatan Media	9
IV. Teknik Pemindahan Biakan Bakteri.....	14
V. Teknik Isolasi dan Penanaman Mikroba	21
VI. Pengamatan Bakteri secara Mikroskopis.....	31
VII. Pengamatan Fungi secara Mikroskopis	40
VIII. UJIAN PRAKTIKUM 1 (Materi I-V)	
IX. Uji Cemar Mikroba : Angka Lempeng Total	43
X. REVIEW Materi VI, VII & IX	
XI. UJIAN PRAKTIKUM 2 (Materi VI-IX)	
XII. Uji Potensi Senyawa Antimikroba.....	54
XIII. Uji Kepekaan Antibiotik : Penentuan MIC dengan Metode Dilusi Cair	58
XIV. Interpretasi hasil MIC/KHM dan KBM/MBC dengan Metode dilusi Cair.....	58
XV. Review Materi XII-XIV	
XVI. UJIAN PRAKTIKUM 3 (Materi XII-XIV)	
DAFTAR PUSTAKA	63

PRAKTIKUM I

PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu mengenal dan mengetahui fungsi dari masing-masing alat yang digunakan di dalam laboratorium mikrobiologi.
- 1.2. Mahasiswa mampu menggunakan dan mengoperasikan alat-alat yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi .

II. Tinjauan Pustaka

Mikrobiologi adalah cabang ilmu biologi yang mempelajari organisme hidup berukuran mikroskopis. Adapun organisme yang biasa dipelajari dalam mikrobiologi terdiri dari lima kelompok ; bakteri, protozoa, virus, algae dan cendawan mikroskopis. Dalam mikrobiologi kita mempelajari jasad renik atau mikroba baik yang bermanfaat maupun merugikan bagi kehidupan manusia, namun untuk mempelajari masalah mikrobiologi dasar diperlukan alat-alat yang mendukung kehidupan mikroorganisme yang ingin kita amati.

Pentingnya alat dalam mempelajari mikrobiologi ditunjukkan dengan penemuan mikroskop untuk pertama kali oleh Antony Van Leeuwenhoek (1632-1732). Dwidjoseputro (2005) menyatakan Van Leeuwenhoek merupakan orang yang pertama kali mengetahui adanya dunia mikroorganisme, sekaligus menunjukkan kepada kita mengenai pentingnya fungsi alat, yaitu mikroskop. Adanya mikroskop dapat terlihat bentuk makhluk-makhluk kecil yang sebelumnya tidak terlihat sama sekali oleh mata manusia.

Mikroskop merupakan salah satu contoh pentingnya alat dalam mempelajari mikrobiologi, oleh sebab itu pengetahuan mengenai alat laboratorium merupakan salah satu faktor yang penting untuk mendukung kegiatan praktikum mikrobiologi dasar. Artinya mahasiswa akan terampil dalam praktikum mikrobiologi apabila sejak awal sudah dibekali pengetahuan mengenai alat-alat praktikum seperti nama alat, fungsi dan cara menggunakannya. Dengan demikian , kurangnya pengetahuan alat akan berdampak bagi keberhasilan praktikum mikrobiologi.

Adapun alat – alat yang biasa digunakan pada praktikum mikrobiologi terdiri dari 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.

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

a. 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..

3.2. Cara Kerja

1. Persiapkan slat – alat yang terdapat di laboratorium mikrobiologi
2. Perhatikan presentasi dan demonstrasi alat yang dilakukan oleh pembimbing/dosen.
3. Perhatikan dan catat fungsi dari alat-alat yang dipresentasikan.
4. Gambar atau foto alat-alat tersebut.

IV. Hasil dan Pembahasan

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

a. Alat-alat elektrik

No.	Nama Alat	Gambar	Bagian dan fungsi
1.	Mikroskop cahaya		
2.	Autoklaf elektrik		
3.	Inkubator		
4.	<i>Hot Plate</i>		
5.	<i>Colony counter</i>		
6.	Oven		
7.	<i>Biological Safety Cabinet</i> (BSC)		

b. Alat-alat gelas dan keramik

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

c. Alat-alat non gelas

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

V. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

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 II

STERILISASI

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan prosedur sterilisasi menggunakan *autoclave* sesuai petunjuk yang telah ditetapkan.
- 1.2. Mahasiswa mampu melakukan prosedur sterilisasi menggunakan oven sesuai petunjuk yang telah ditetapkan.
- 1.3. Mahasiswa mampu melakukan kerja aseptik sebelum melakukan kerja mikrobiologi

II. Tinjauan Pustaka

Sterilisasi adalah proses membebaskan bahan dan alat dari semua bentuk organisme hidup. Steril atau terbebas dari semua bentuk organisme hidup merupakan syarat utama yang harus dipenuhi sebelum melakukan praktikum mikrobiologi. Waluyo (2008) menyatakan bahan atau peralatan yang dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Steril artinya tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang mengganggu kehidupan dan proses yang dikerjakan.

Gabriel (1996) menyatakan, sebelum melakukan praktikum mikrobiologi maka alat yang ingin digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi yang dimaksud adalah proses membunuh segala bentuk kehidupan mikroorganisme yang ada dalam sampel praktikum, alat-alat atau lingkungan dalam laboratorium. Dalam bidang bakteriologi, kata sterilisasi sering dipakai untuk menggambarkan prosedur utama yang diambil dengan tujuan meniadakan atau membunuh semua bentuk kehidupan mikroorganisme.

Terkait dengan praktikum mikrobiologi dasar, sterilisasi medium dan alat-alat laboratorium dapat dilakukan berdasarkan jenis alat dan prosedur kerja yang digunakan.

Sterilisasi berdasarkan jenis alat yang digunakan dikelompokkan menjadi dua yaitu :

1. sterilisasi basah

Sterilisasi basah dilakukan dengan *autoclave*. Bahan-bahan yang disterilisasi dengan *autoclave* adalah bahan-bahan yang mengandung air seperti media, aquades dan larutan lainnya.

2. Sterilisasi kering.

Sterilisasi kering dilakukan dengan oven. Alat-alat yang disterilisasi dengan oven misalnya tabung reaksi, cawan petri dll.

Adapun sterilisasi berdasarkan prosedur kerja dibedakan atas :

1. Sterilisasi fisik

Sterilisasi secara fisik adalah sterilisasi yang dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran, contohnya adalah pemanasan (pembakaran) secara langsung seperti pemanasan jarum ose atau pinset dan pemanasan kering dengan menggunakan oven.

2. Sterilisasi kimiawi

Sterilisasi kimiawi dilakukan dengan cara menyemprot atau membilas alat dengan desinfektan dan antiseptik.

3. Sterilisasi Mekanik

Sterilisasi mekanik adalah sterilisasi menggunakan saringan berpori sangat kecil

antara 0.22 mikron sampai 0.45 mikron sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Cara ini biasanya dilakukan untuk sterilisasi bahan yang tidak tahan atau peka terhadap panas seperti antibiotik ataupun senyawa enzim.

Pemilihan cara sterilisasi yang akan dipakai tergantung dari beberapa hal misalnya macam bahan dan alat yang disterilkan, ketahanan terhadap panas, dan bentuk bahan yang disterilkan (padat, cair, atau berbentuk gas) (Waluyo, 2008).

Praktikum ini dilaksanakan agar pratikan dapat mengetahui cara-cara sterilisasi, jenis- jenis peralatan-peralatan yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi dan mengetahui penggolongan media atau macam-macam media.

Urutan tinjauan pustaka meliputi :

1. *Konsep atau pengertian sterilisasi*
2. *Macam strilisasi*
3. *Sterilisasi fisik*
 - *Panas*
 - *Penyaringan*
 - *Radiasi*
 - *Pengeringan*
4. *Sterilisasi kimia*

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Autoklaf	1	Alkohol 70 %
2	Api Bunsen/ Lampu Spiritus	2	Kertas Koran (untuk membungkus alat-alat gelas)
3	Sengkelit/ Ose Bulat		
4	Sengkelit/ Ose lurus/ jarum		
5	Oven		
6	Alat-alat gelas : tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, beaker glass, dan lain-lain		
7	Botol semprot (tempat alkohol 70% untuk membersihkan permukaan meja, dll)		

3.2. Cara Kerja :

a. Sterilisasi menggunakan autoklaf

- 1) Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.

- 2) Masukkan alat dan bahan yang akan disterilisasi. Jika mensterilisasi botol bertutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
- 3) Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
- 4) Nyalakan autoklaf, diatur *timer* dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C.
- 5) Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15 menit dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
- 6) Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *pressure gauge* menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

b. Sterilisasi menggunakan lampu bunsen

1. Nyalakan pembakar bunsen dengan cara membuka tutupnya.
2. Sterilkan jarum ose dengan membakar ujung jarum yang terbuat dari logam pada api bunsen.
3. Peganglah jarum dengan posisi agak tegak di atas api ($\pm 45^\circ$), bakar jarum hingga berpijar dan pijaran tersebut merambat hingga pangkal bagian logam jarum.
4. Bila sudah selesai, tunggu beberapa detik hingga suhu ose kembali normal atau sentuhkan ujung ose pada permukaan media hingga terdengar bunyi "ches".

c. Sterilisasi Kering menggunakan oven

1. Alat kaca seperti cawan petri dan tabung reaksi dicuci bersih kemudian dikeringkan
2. Alat kaca tersebut dibungkus dengan kertas minyak/koran
3. Alat kaca yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam oven kemudian diatur suhu 180 °C selama 2 jam atau pada suhu 210 °C selama 30 menit
4. Tekan tombol power
5. Setelah 2 jam atau 30 menit (tergantung suhu yang digunakan), turunkan suhu dan matikan tombol power.
6. Setelah suhu turun, alat yang telah disterilkan tersebut diambil dan dikeluarkan dari dalam oven lalu diletakkan di tempat yang bersih.

d. Kerja Aseptis

1. Sebelum mulai kerja tangan disemprot dengan alkohol 70%
2. Lingkungan kerja (meja kerja) disemprot dengan alkohol
3. Alat dan bahan yang sudah disterilkan seperti tabung/cawan/*Erlenmeyer* sebaiknya bagian mulut (bagian yang memungkinkan kontaminasi masuk) dibakar/dilewatkan api terlebih dahulu.
4. Alat seperti pinset, batang L, spider, dan lain-lain dapat disemprot alkohol terlebih dahulu lalu dibakar.

5. Jarum ose yang sudah dipijarkan harus ditunggu dingin terlebih dahulu atau dapat ditempelkan pada tutup cawan bagian dalam untuk mempercepat transfer panas yang terjadi.
6. Jika bekerja di ruang *safety cabinet* tidak perlu memakai pembakar bunsen tapi jika diluar *safety cabinet* maka semakin banyak sumber api maka semakin terjamin kondisi aseptisnya.

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

No	Nama Alat	Metode Sterilisasi	Suhu dan Waktu

4.2. Pembahasan

(Penjelasan mengenai hasil yang telah diperoleh dari kegiatan praktikum sterilisasi).

V. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

PRAKTIKUM III

MEDIA DAN CARA PEMBUATAN MEDIA

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu menerapkan cara pembuatan media padat untuk pengujian mikrobiologi
- 1.2. Mahasiswa mampu menerapkan cara pembuatan media cair untuk pengujian mikrobiologi.

II. Tinjauan Pustaka

Secara pengertian media adalah susunan bahan yang mengandung nutrisi, baik bahan alami seperti tauge, kentang, daging, telur, wortel dan sebagainya) ataupun bahan buatan (berbentuk senyawa kimia, organik ataupun anorganik) yang digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba. Hidayat (2006) menyatakan mikroorganisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel, sehingga dengan media pertumbuhan dapat ditumbuhkan mikroorganisme sebagai kultur murni.

Dalam praktikum mikrobiologi, penggunaan media sangat vital, bukan hanya menumbuhkan mikroorganisme tetapi juga untuk keperluan isolasi dan diidentifikasi. Media juga digunakan untuk membawa mikroorganisme dari tempat lain ke laboratorium sehingga mikroorganisme tetap hidup sampai di laboratorium. Media yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroba terdiri dari beberapa komponen senyawa kimia, sehingga dalam pembuatannya harus memenuhi beberapa kaidah kimia (Gabriel, 1996).

Berdasarkan bentuknya media pertumbuhan mikroorganisme dikelompokkan menjadi :

1. Media Cair

Media cair digunakan untuk perbanyak mikroorganisme sebelum disebarkan ke media padat. Media ini tidak cocok untuk tujuan isolasi mikroorganisme dan tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni mikroorganisme. Contoh media cair adalah *Nutrient broth* (NB); *Pepton dilution fluid* (PDF); *Lactose Broth* (LB); *Mac Conkey Broth* (MCB).

2. Media padat

Media padat mengandung komposisi agar sebesar 15 %.Media padat digunakan untuk mempelajari koloni mikroorganismenya, isolasi mikroorganismenya dan memperoleh biakan murni. Contoh media padat *Nutrient Agar (NA)*; *Potato Dextrose Agar (PDA)*; *Plate Count Agar (PCA)*, dan lain-lain.

Beberapa syarat yang harus dipenuhi sebagai media biakan yaitu:

- a. Mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganismenya yang berkembang,
- b. Memiliki kelembaban optimum bagi pertumbuhan mikroorganismenya,
- c. Mengandung oksigen (kultur bakteri aerob) dan pH sesuai serta
- d. Harus bebas dari mikroba lain dan steril.

Pada praktikum ini kita melakukan pembuatan media dasar untuk bakteri. Media yang dimaksud adalah media NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*). Praktikum ini dilaksanakan agar pratikan dapat mengetahui dan melakukan praktik pembuatan media secara baik dan benar.

- *Urutan tinjauan pustaka*
- *Pengertian medium pertumbuhan bakteri*

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Cawan petri	1	Media Nutrient Agar (NA)
2	Tabung reaksi	2	Media Nutrient Broth (NB)
3	Batang pengaduk	3	Aquadest
4	Pipet volume		
5	Erlenmeyer		
6	Penangas/ elemen pemanas		

3.2. Cara kerja

a. Pembuatan Media NA

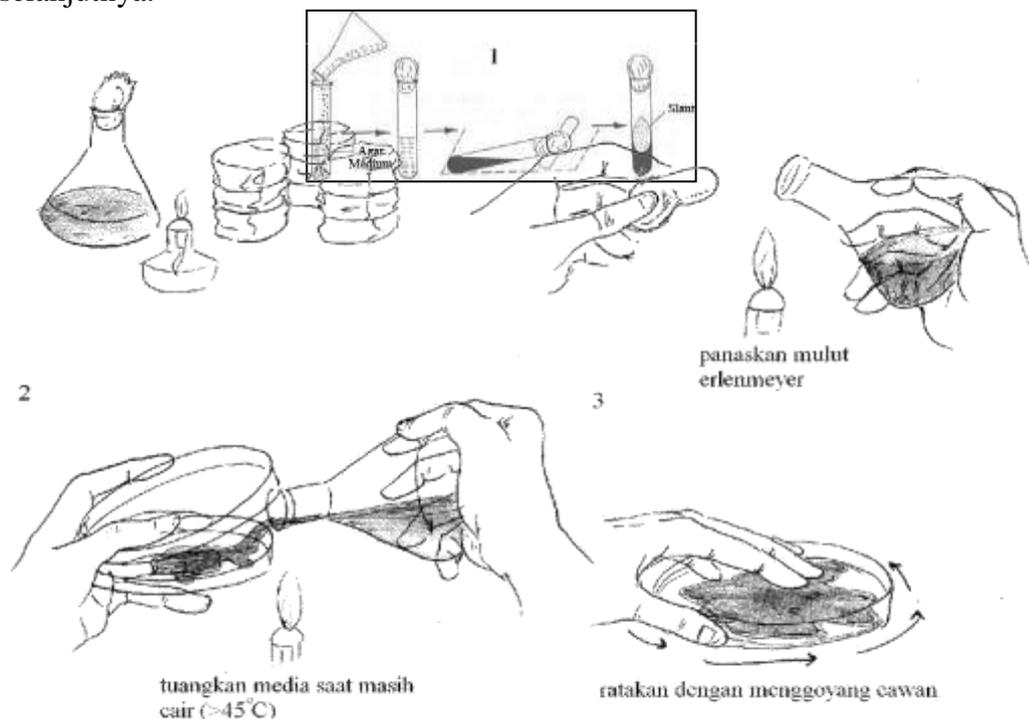
1. Timbang media NA sesuai prosedur di kemasan.
2. Buat suspensi agar dengan menimbang 28,0 gram NA lalu tambahkan 1000 mL aquadest, aduk hingga tercampur menggunakan batang pengaduk.

3. Panaskan campuran (NA + aquadest) dengan hati-hati menggunakan penangas/ elemen pemanas sampai media tercampur homogen dan terlarut sempurna (ditunjukkan dengan warna yang kuning jernih).
Perhatian : pada saat pemanasan jangan sampai terbentuk buih berlebihan sampai meluap!
4. sterilisasi campuran tsb menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm, 121°C selama 15 menit.
5. Dinginkan hingga suhu menjadi 45-50°C (hangat-hangat kuku/ dapat dipegang telapak tangan).
6. Suspensi media NA dapat dituangkan @10ml ke tabung reaksi :
 - Agar tegak → diletakkan tegak pada rak tabung dan biarkan memadat;
 - Agar miring → diletakkan miring dan biarkan memadat
 - Tutup tabung reaksi dengan kapas atau penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat !).
 - Agar datar → tuangkan ke cawan petri @ 15 ml.
 - Buat agar tegak, agar miring dan agar datar masing-masing sebanyak rangkap 3.
 - Lakukan pengerjaan (f) secara aseptik/ dekat dengan lampu spiritus/ api bunsen.
7. Sisa media cair NA yang tersisa di Erlenmeyer disimpan di oven beberapa saat dan akan digunakan pada percobaan ke IV dan V.

b. Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB) :

1. Buat suspensi agar dengan menimbang 13,0 gram NB lalu tambahkan 1000 mL aquadest, aduk hingga tercampur menggunakan bantuan batang pengaduk.
2. Panaskan campuran (NB + aquadest) dengan hati-hati menggunakan penangas/ elemen pemanas sampai media tercampur homogen dan terlarut sempurna (ditunjukkan dengan warna yang kuning jernih).
Perhatian : pada saat pemanasan jangan sampai terbentuk buih berlebihan sampai meluap!
3. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm, 121°C selama 15 menit.

4. dinginkan hingga suhu menjadi 45-50°C (hangat-hangat kuku/ dapat dipegang telapak tangan).
 5. Lalu suspensi media NB dapat dituangkan ke tabung @10ml ke tabung reaksi :
 - Agar tegak → diletakkan tegak pada rak tabung dan biarkan memadat;
 - Tutup tabung reaksi dengan kapas atau penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat !).
 - Agar datar → tuangkan ke cawan petri @ 15 ml.
 - Lakukan pengerjaan (5) secara aseptik/ dekat dengan lampu spiritus/ api bunsen.
 6. Sisa media cair NB yang tersisa di Erlenmeyer disimpan di oven beberapa saat dan akan digunakan pada percobaan ke IV dan V
- (*Catatan* : Buatlah 300 ml media NA (timbang 8,4 gram) dan 300 ml media NB (timbang 3,9 gram) untuk setiap kelompok kecil praktikum). Penimbangan media dilakukan secara teliti dan cepat, kemudian serbuk media dimasukkan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer.
- Seluruh media NA dan NB (**Percobaan 1**) ini akan digunakan untuk percobaan selanjutnya.



Gambar 2.1 Agar Miring Media NA dan NB

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1 Hasil

No	Media	Pengamatan hari ke	Keadaan	
			Kontaminasi (+)	Tidak terkontaminasi (-)
		1		
		2		
		3		
		1		
		2		
		3		

4.2. Pembahasan

V. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

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 IV

TEKNIK PEMINDAHAN BIAKAN BAKTERI

I. Tujuan

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

II. Tinjauan Pustaka

2.1. Teknik pembuatan subbiakan

Teknik pembuatan subbiakan dapat diartikan memindahkan mikroorganisme dari satu media ke media lain. Teknik ini merupakan teknik dasar yang sangat penting dan digunakan secara rutin dalam menyiapkan dan memelihara biakan induk serta pada prosedur pengujian mikrobiologi. Dalam prosedur tersebut perlu dilakukan secara aseptis atau terbebas dari kontaminan.

Mikroorganisme selalu ada di udara, permukaan perlengkapan, meja kerja dan peralatan laboratorium. Untuk mencegah tercemarnya biakan murni, perlu diadakan teknik aseptik pada waktu memindahkan mikroba. Dalam praktikum kali ini akan dipelajari cara-cara memindahkan biakan murni dengan cara aseptik.

2.2. (*Teknik/prosedur Pemindahan Mikroorganisme secara Aseptik*)

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

a. Alat

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

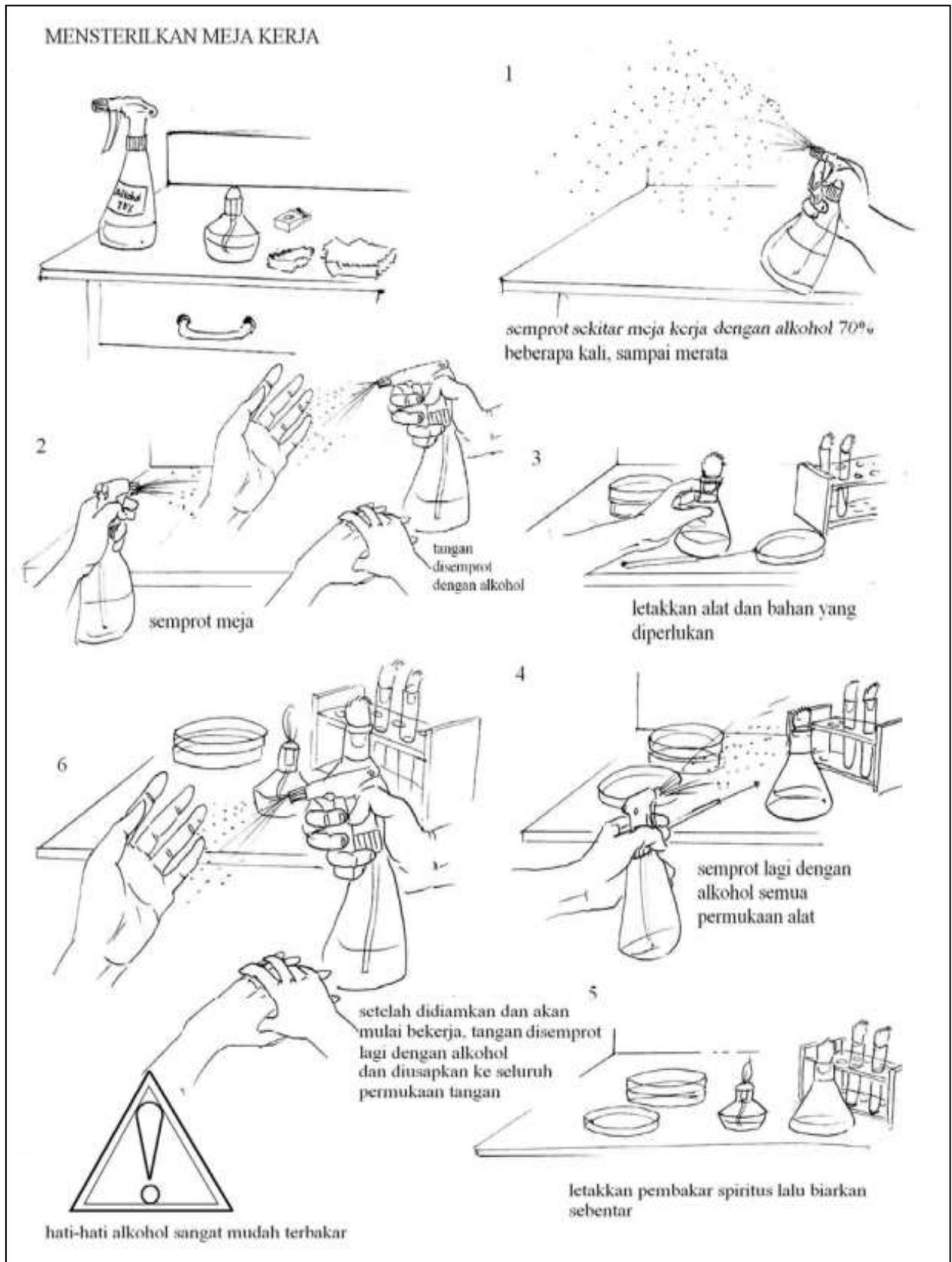
b. Bahan

- | | |
|---------------|--|
| - Akuades | - Kasa |
| - Alkohol 70% | - Media NA dan NB (hasil Percobaan III) |

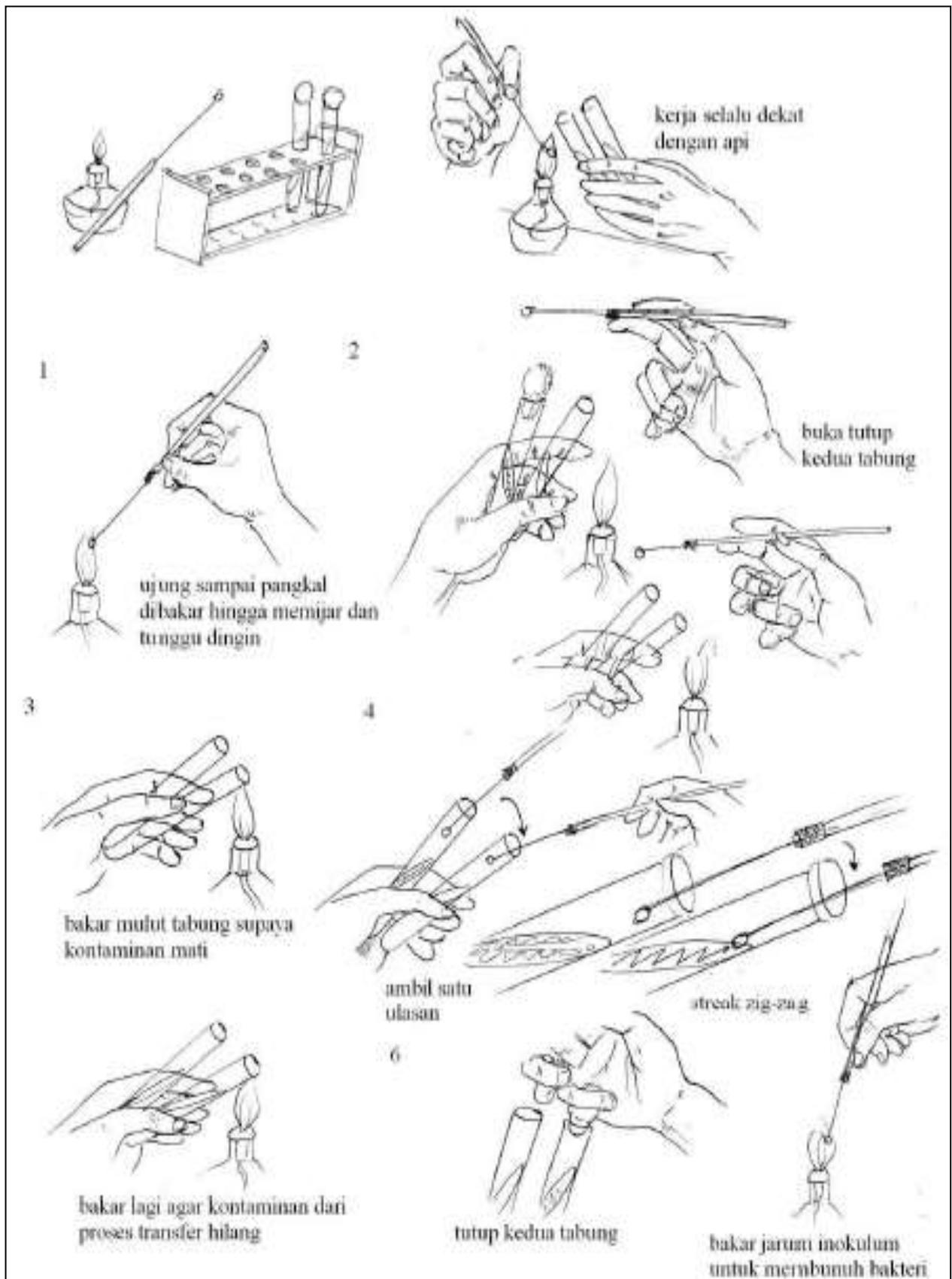
- Spirtus
- Isolat/kultur murni *Bacillus subtilis*
- Kapas
- Isolat/kultur murni *Escherichia coli*

3.2. Cara Kerja

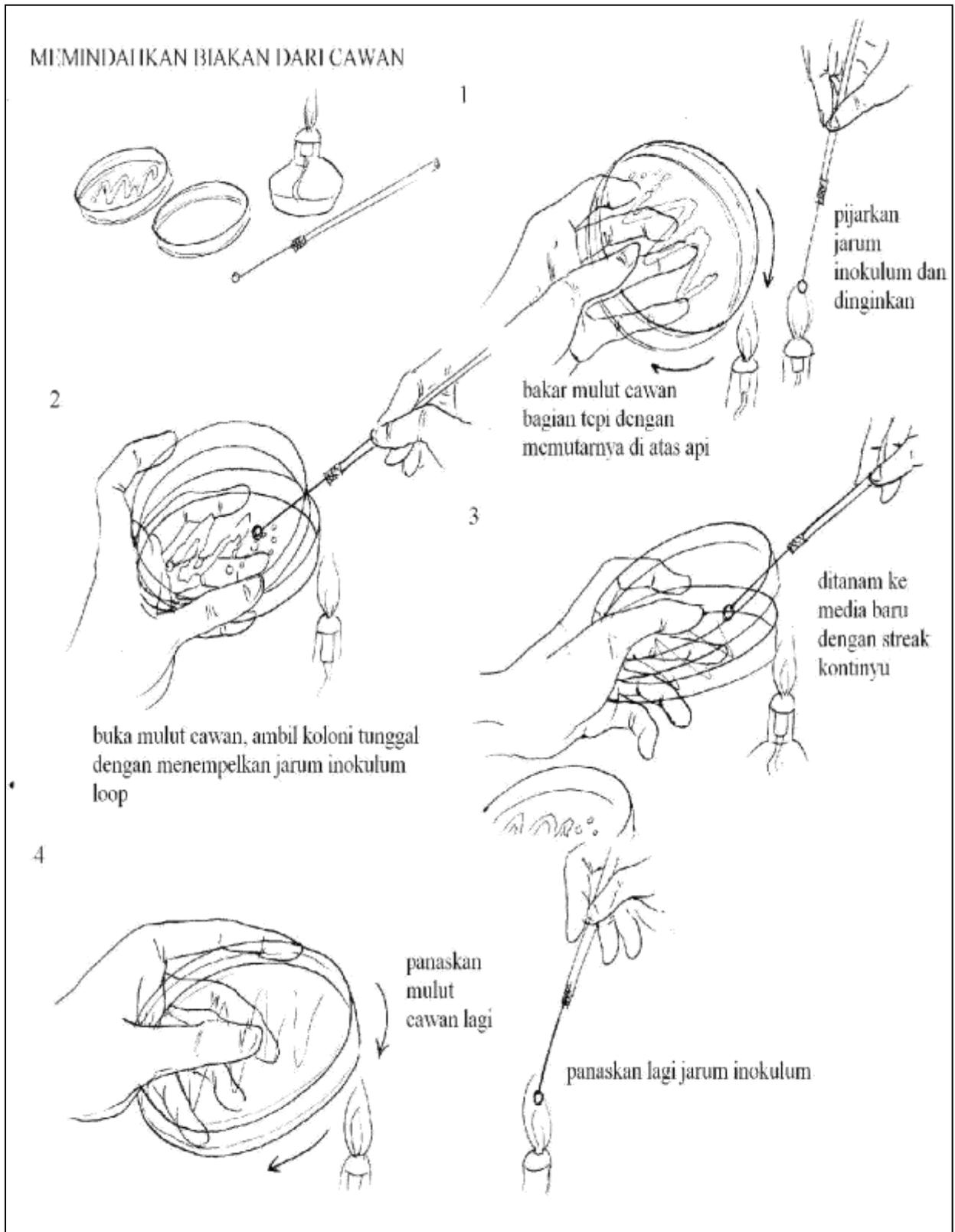
a. Sterilisasi Meja Kerja



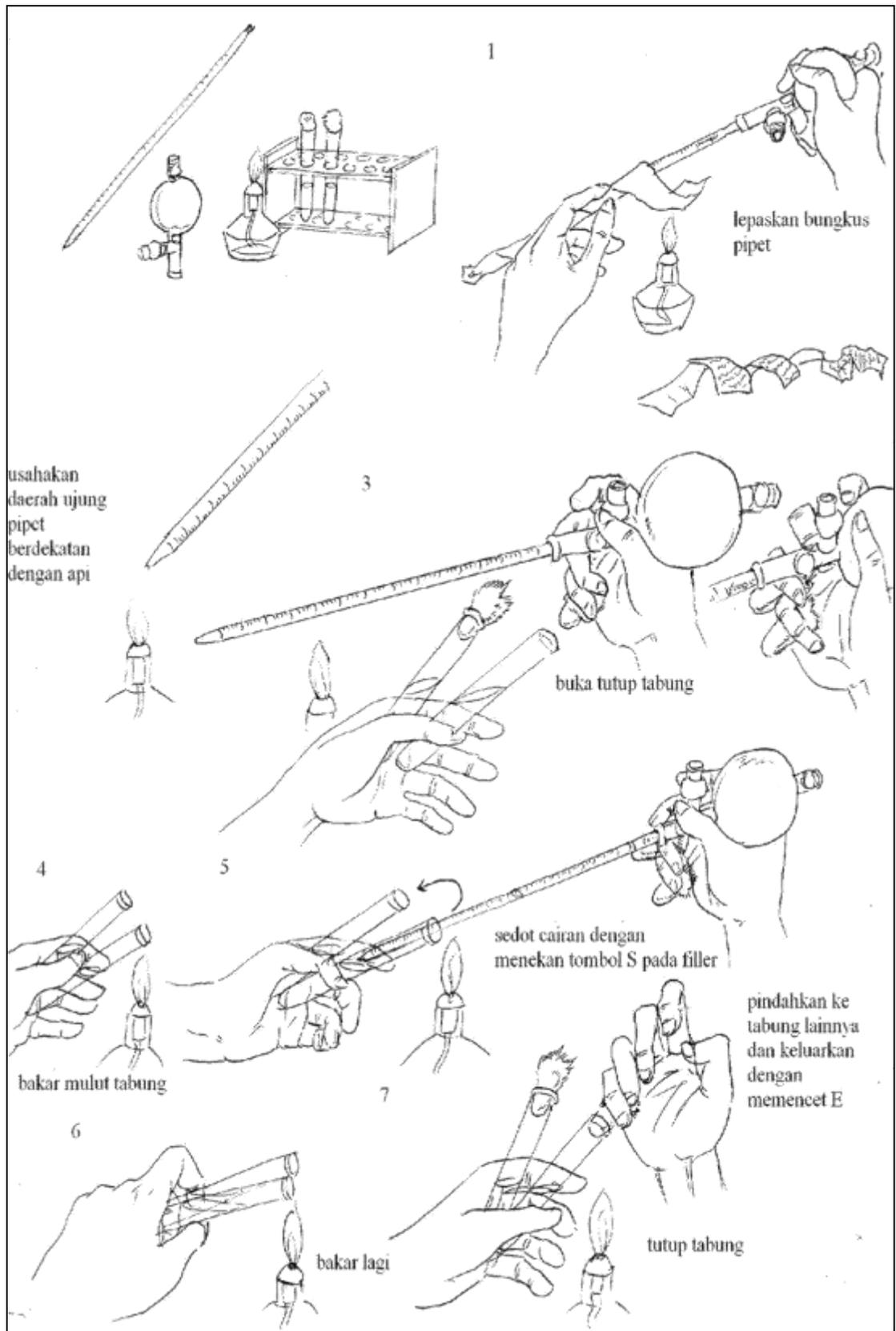
b. Pemindahan Biakan secara Aseptis



c. Pemindahan Biakan dari Cawan



d. Pemandahan cairan dengan pipet



IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

Amatilah pertumbuhan semua biakan, yang ditandai dengan kekeruhan pada biakan kaldu dan munculnya pertumbuhan bakteri pada permukaan agar miring dan di sepanjang garis inokulasi pada tabung agar tegak

Catatlah hasil pengamatan anda pada tabel berikut ini :

Keterangan	Kaldu nutrien	Agar miring nutrien	Agar tegak nutrien
Pertumbuhan (+) atau (-)			
Pigmentasi (+) atau (-)			
Gambarlah sebaran pertumbuhan			

4.2. Pembahasan

- Pentingnya/alasan membakar alat inokulasi sebelum dan setelah tiap inokulasi
- Pentingnya/alasan memegang tutup/kapas tabung uji di tangan
- Pentingnya/alasan membakar alat inokulasi sebelum dan setelah tiap inokulasi
- Pentingnya/alasan memegang tutup/kapas tabung uji di tangan
- Pentingnya/alasan mendinginkan alat inokulasi sebelum mengambil inokulum
- Pentingnya/alasan membakar leher tabungsegera setelah membuka penutup tabung dan sebelum menutup tabung kembali
- Tujuan prosedur pembuatan subbiakan
- Pentingnya/alasan jarum inokulasi yang lurus digunakan untuk menginokulasi tabung agar tegak
- Pentingnya/alasan memegang tutup/kapas tabung uji di tangan
- Analisis mengenai gambar sebaran pertumbuhan dan pigmentasi, apakah terkontaminasi atau tidak (tunjukkan dengan alasan yang kuat)

V. Kesimpulan

(Hasil kesimpulan merupakan penjelasan akhir secara terperinci)

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 V TEKNIK ISOLASI ATAU PENANAMAN MIKROBA

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan penanaman (isolasi) mikroba dengan teknik *pour plate*, *spread plate* dan *streak plate*.
- 1.2. Mahasiswa mampu menentukan karakteristik biakan mikroorganisme sebagai alat bantu dalam mengidentifikasi dan mengklasifikasi organisme ke dalam kelompok taksonomi

II. Tinjauan Pustaka

Pada teknik isolasi atau penanaman mikroba perlu diperhatikan kebutuhan nutrisi untuk mikroba tersebut sehingga dapat tumbuh dengan baik. Isolasi mikroba adalah memisahkan mikroba dari alam dan menanamnya dalam media baru sebagai biakan murni. Teknik untuk menanam mikroba adalah sebagai berikut :

1. *Spread plate method* (metode cawan tebar/sebar)

Teknik *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba dengan cara dipulas atau disebar pada permukaan media agar padat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba, karena konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikroba yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung.

2. *Streak plate method* (metode cawan gores)

Teknik ini dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan media agar padat. Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah sebagai biakan murni. Prinsip dasar cara ini adalah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut.

3. *Pour plate method* (metode cara tabur)

Teknik ini dilakukan menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50 °C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba dan

menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Menyatakan prinsip dasar cara ini adalah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50 °C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut

2.3. Karakteristik biakan mikroorganisme

Ketika ditumbuhkan dalam berbagai media, mikroorganisme akan menunjukkan perbedaan tampilan makroskopik pertumbuhannya. Perbedaan-perbedaan tersebut yang disebut karakteristik biakan, digunakan sebagai dasar untuk memisahkan mikroorganisme –mikroorganisme ke dalam kelompok taksonomi. Mikroorganisme ditentukan dengan membiakkan organisme tersebut pada agar miring, cawan gores, cawan tuang dan cawan sebar. Pola-pola pertumbuhan mikroorganismenya pada media pertumbuhan akan diuraikan sebagai berikut :

a. Media agar miring

Media agar miring memiliki satu garis lurus inokulasi pada permukaan dan dievaluasi sebagai berikut :

1. Kelimpahan pertumbuhan : jumlah pertumbuhan dikategorikan dalam bentuk tidak ada, sedikit , sedang dan banyak
2. Pigmentasi : mikroorganisme kromogenik dapat menghasilkan pigmen-pigmen intraseluler yang bertanggung jawab atas pewarnaan organisme seperti yang tampak pada koloni permukaan. Organisme-organisme lain menghasilkan pigmen-pigmen ekstraseluler yang larut, yang diekskresikan ke dalam media dan yang juga menghasilkan warna. Akan tetapi, sebagian besar mikroorganisme merupakan nonkromogenik dan akan terlihat berwarna putih hingga abu abu.
3. Karakteristik optik : karakteristik optik dapat dievaluasi berdasarkan jumlah cahaya yang ditransmisikan melewati pertumbuhan. Karakteristik tersebut dideskripsikan sebagai buram (tidak ada transmisi cahaya) dan transparan
4. Bentuk : tampilan goresan satu garis pertumbuhan pada permukaan agar miring, dikatakan :
 - a. Filiformis : seperti benang dan berkesinambungan dengan tepian halus
 - b. Ekinulatus : seperti benang dan berkesinambungan dengan tepian halus
 - c. Bermanik : nonkonfluen hingga semikonfluen
 - d. Menyebar : tersebar dan tipis

- e. Arboresen : seperti pohon
- f. Rizoid : seperti akar.

b. Media agar datar

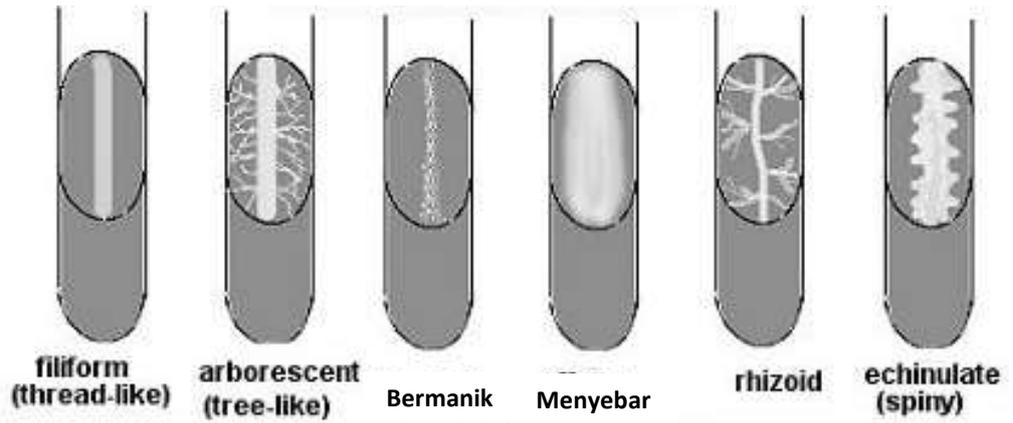
Media agar datar memperlihatkan koloni-koloni yang terpisah dengan baik dan dievaluasi dengan cara berikut ini :

1. Ukuran : titik, kecil, sedang atau besar
2. Pigmentasi : warna koloni
3. Bentuk :
 - a. Sirkuler : batas tepi yang tidak terputus
 - b. Takberaturan : batas tepi yang berlekuk
 - c. Rizoid : menyebar dan seperti akar
4. Tepian, tampilan batas bagian luar koloni digambarkan sbb:
 - a. Mulus : rata dan jelas
 - b. Lobatus : lekuk dan mencolok
 - c. Bergelombang : lekukan bergelombang
 - d. Bergerigi
 - e. Filamentus : menyebar seperti benang
5. Elevasi, derajat kenaikan pertumbuhan koloni pada permukaan agar digambarkan sbb :
 - a. Datar : peningkatan tidak terlihat
 - b. Naik : sedikit menaik
 - c. Cembung : peningkatan berbentuk kubah
 - d. Umbonatus : menaik dengan bagian tengah yang cembung

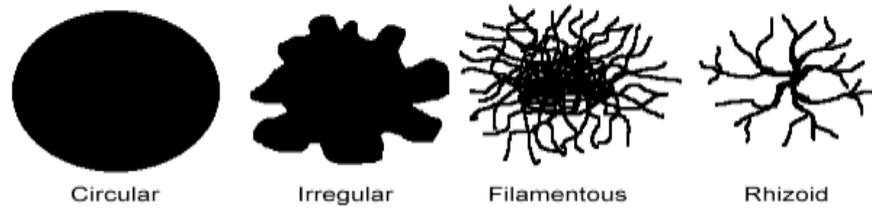
c. Media nutrien cair

Biakan ini dievaluasi berdasarkan sebaran dan tampilan pertumbuhan sebagai berikut :

1. **Kekeruhan halus yang merata** : pertumbuhan menyeluruh yang terdispersi secara halus
2. **Flokulen** : agregat-agregat berupa kepingan-kepingan yang terdispersi menyeluruh
3. **Pelikel** : seperti bantalan-bantalan yang tebal pada permukaan
4. **Endapan** : pertumbuhan yang berkumpul di bagian dasar biakan, dapat berupa granul, kepingan atau flokulan



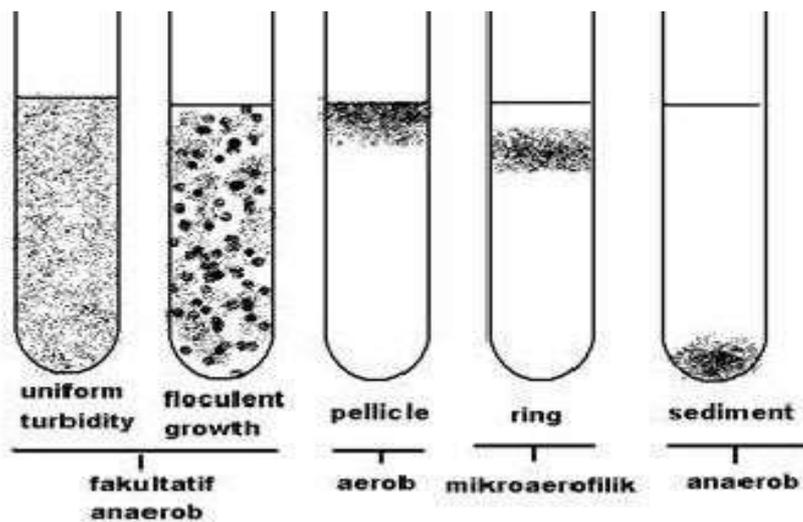
Form



Elevation



Margin



3.1. Metode Kerja

a. Alat dan Bahan

1. Metode Cawan Tuang (*Pour Plate Method*)

- a) Jarum ose
- b) Lampu Bunsen
- c) Media NA dan NB dalam Cawan Petri
- d) Kultur Murni

2. Metode Cawan Sebar (*Spread Plate Method*)

- a) Spreader/batang bengkok/batang Drigalsky
- b) Pipet volume
- c) lampu bunsen
- d) Media NA dalam cawan petri
- e) Kultur murni bakteri
- f) Larutan pengencer (BPW atau NaCl fisiologis 0,9%)

3. Metode Cawan Gores (*Streak Plate Method*)

- a) Media NA dalam cawan petri
- b) Kultur murni bakteri
- c) Jarum ose
- d) Lampu bunsen

b. Cara Kerja

1. Metode Cawan Tuang (*Pour Plate Method*)

- a) Dinginkan media NA dalam tabung reaksi sampai suhu $\pm 45- 50$ °C (cirinya : terasa hangat di kulit/tidak 'kemranyas').
- b) Buka tutup tabung yang mengandung kultur murni bakteri, dan bakar leher botol.
- c) Pindahkan 1 ml kultur murni bakteri ke dalam tabung reaksi yang mengandung NA secara aseptis.
- d) Bakar leher tabung di atas bunsen, dan tuangkan media NA yang telah mengandung kultur murni bakteri ke dalam cawan petri.
- e) Goyangkan perlahan-lahan untuk mencampur kultur bakteri dengan media NA sampai homogen. Penggoyangan petri jangan terlalu kuat. Pada saat penuangan media, cawan petri diletakkan 20 cm dari sumber api (zona steril) (lihat Gambar 2).

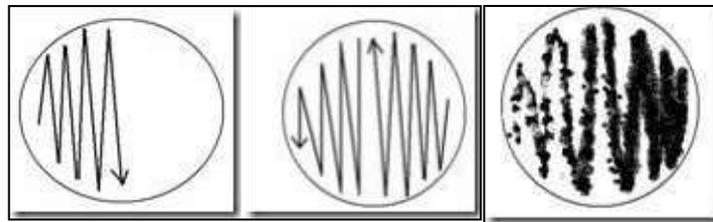
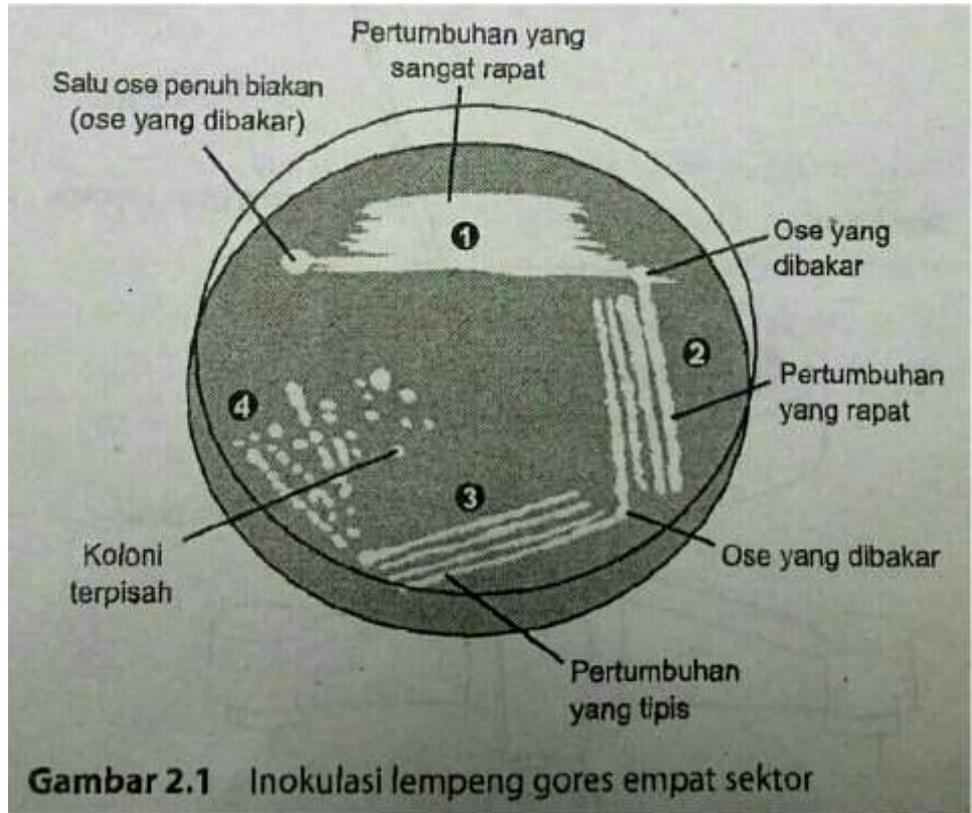
- f) Setelah agar memadat diinkubasi terbalik pada suhu kamar (37 °C) selama 24 jam. Inkubasi terbalik dilakukan setelah agar memadat.
- g) Amati pertumbuhannya.

2. Metode Cawan Sebar (*Spread Plate Method*).

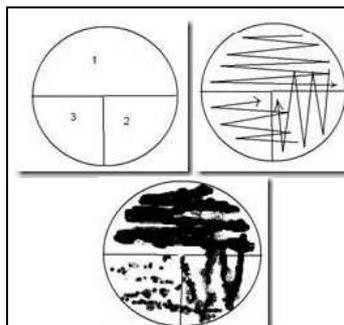
- a) Buatlah pengenceran 10^{-1} - 10^{-6} dari kultur murni bakteri dengan larutan pengencer.
- b) Ambil tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri, buka dan bakar leher tabung.
- c) Pindahkan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media NA dalam cawan petri.
- d) Bakar *spreader* yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol, biarkan dingin.
- e) Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan *spreader* secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar 1).
- f) Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.

3. Metode Cawan Gores (*Streak Plate Method*)

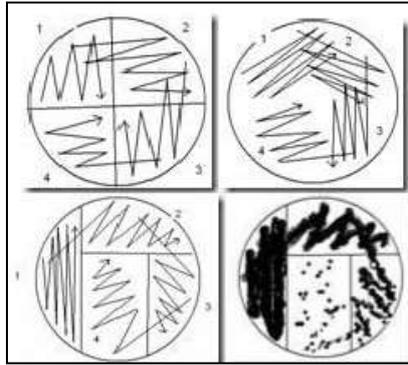
- a) Tuang media Na cair ke dalam cawan petri secara aseptis, lalu biarkan memadat
- b) Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri.
- c) Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada
- d) permukaan media agar dimulai pada satu ujung. *Perhatikan teknik penggoresan!* (lihat Gambar 3, 4, 5, 6). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar.
- e) Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
- f) Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar (37 °C) selama 24 jam
- g) Amati pertumbuhannya.



Gambar 2.2 *Streak Plate Method* secara Goresan Sinambung



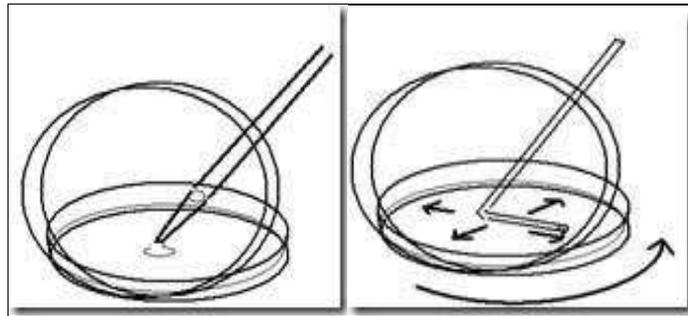
Gambar 2.3. *Streak Plate Method* secara Goresan T



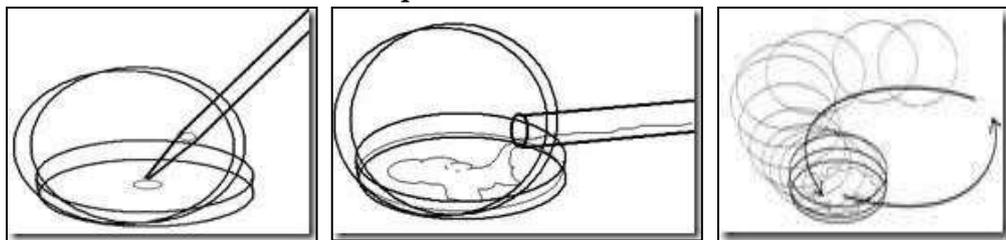
Gambar 2.4 Streak Plate Method dengan lebih banyak Sektor



Gambar 2.5 Contoh Hasil Isolasi Streak Plate Method



Gambar Spread Plate Method



Gambar Pour Plate Method

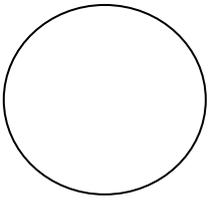
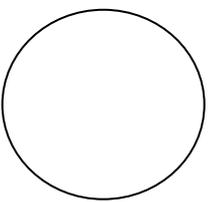
IV. Hasil dan Pembahasan

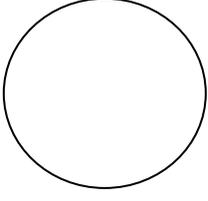
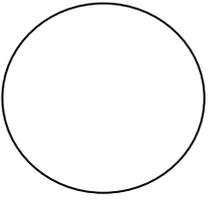
4.1. Hasil

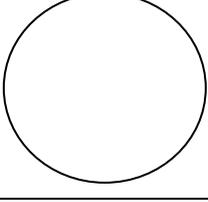
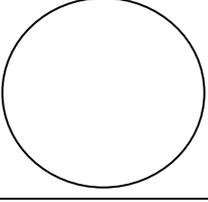
Amatilah seluruh biakan pada agar lempeng untuk mengidentifikasi sebaran koloni. Catat hasil pengamatan anda pada tabel berikut ini

- Buatlah gambar sebaran koloni yang terlihat pada masing-masing biakan agar lempeng
- Pilih dua koloni terpisah yang memiliki penampakan berbeda pada masing masing agar lempeng. Deskripsikan masing masing koloni, meliputi :
 - Bentuk : bulat, tidak beraturan atau tersebar
 - Elevasi : datar, agak menaik atau sangat menaik
 - Pigmentasi

8. Ukuran : titik, kecil, sedang atau besar

	Teknik cawan sebar	
	Bakteri.....	Bakteri.....
Gambar koloni-koloni yang tampak pada masing-masing agar lempeng		
Deskripsi koloni : Bentuk Elevasi Pigmentasi Ukuran		

	Teknik cawan gores	
	Bakteri.....	Bakteri.....
Gambar koloni-koloni yang tampak pada masing-masing agar lempeng		
Deskripsi koloni : Bentuk Elevasi Pigmentasi Ukuran		

	Teknik cawan tuang	
	Bakteri.....	Bakteri.....
Gambar koloni-koloni yang tampak pada masing-masing agar lempeng		
Deskripsi koloni : Bentuk Elevasi Pigmentasi Ukuran		

4.2.Pembahasan

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM VI PENGAMATAN BAKTERI SECARA MIKROSKOPIS

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan prosedur preparat ulas
- 1.2. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan prosedur pewarnaan sederhana
- 1.3. Mahasiswa mampu mengetahui bentuk sel bakteri dari masing-masing pewarnaan.
- 1.4. Mahasiswa mampu memahami Prosedur pewarnaan gram pada isolat bakteri.
- 1.5. Mahasiswa mampu memahami morfologi sel bakteri berdasarkan pewarnaan gram.
- 1.6. Mahasiswa mampu mengetahui karakteristik bakteri berdasarkan pewarnaan gram.
- 1.7. Mahasiswa mampu mengkalibrasi micrometer okuler
- 1.8. Mahasiswa mampu melakukan prosedur percobaan pengukuran mikroorganisme

II. Tinjauan Pustaka

Apusan bakteri harus disiapkan sebelum melakukan teknik pewarnaan. Beberapa aturan untuk melakukan penyiapan apusan bakteri adalah :

1. Penyiapan kaca objek /*object glass*

Kaca objek yang bersih penting untuk menyiapkan apusan mikroba. Lemak atau minyak dari jari tangan yang menempel di kaca objek harus dibersihkan menggunakan sabun dan air yang diikuti dengan pembilasan dengan alkohol 95 % dan air. Setelah dibersihkan keringkan kaca objek dan letakkan di atas lap laboratorium hingga siap digunakan.

Catatan : Ingat untuk selalu memegang kaca objek yang bersih pada tepinya

2. Penandaan Kaca Objek

Penting untuk memberikan penandaan kaca objek yang tepat. Inisial organisme dapat ditulis baik pada pinggir kaca objek dengan menggunakan pensil penanda alat gelas maupun pada permukaan tempat apusan akan dibuat. Berhati-hatilah supaya tanda tersebut tidak mengalami kontak dengan pereaksi-pereaksi pewarnaan.

3. Penyiapan Apusan

Penting untuk tidak membuat apusan yang terlalu tebal atau padat. Apusan yang terlalu tebal/padat terjadi jika biakan yang digunakan pada penyiapan apusan terlalu banyak sehingga sejumlah besar sel menumpuk pada kaca objek. Jenis persiapan ini mengurangi jumlah cahaya yang dapat melewati kaca objek dan menyulitkan untuk

melihat morfologi sel tunggal. Catatan : *apusan hanya membutuhkan sejumlah kecil biakan bakteri*. Apusan yang baik adalah apabila dikeringkan tampak sebagai suatu lapisan atau selaput tipis yang berwarna keputihan, cukup jernih untuk membuat buku ajar anda tetap dapat terbaca.

Adapun apusan yang dibuat dari biakan kaldu atau biakan dari media padat memerlukan berbagai teknik :

a. Biakan Kaldu

Suspensikan kembali biakan dengan mengetukkan tabung menggunakan jari anda. bergantung pada ukuran ose. Satu atau dua ose penuh harus diletakkan di bagian tengah kaca objek dengan menggunakan ose inokulasi yang steril, kemudian disebarakan secara merata kira kira sampai seluas uang koin. Simpan apusan tersebut di atas meja laboratorium dan biarkan mengering terkena udara.

b. Biakan dari media padat

Organisme-organisme yang dibiakkan dalam media padat menghasilkan pertumbuhan permukaan yang padat dan tebal serta tidak boleh dipindahkan langsung ke kaca objek. Biakan-biakan tersebut harus diencerkan dengan menempatkan satu atau dua ose penuh air di bagian tengah kaca objek tempat sel itu akan diemulsifikasi. Pemindahan sel-sel memerlukan penggunaan ose atau jarum yang disentuhkan ke biakan untuk mencegah perpindahan terlalu banyak sel. Suspensi dibuat dengan menyebarkan sel dengan gerakan melingkar dalam tetesan air menggunakan ose atau jarum. Hal ini akan membantu menghindari penumpukan sel. Apusan yang dihasilkan harus mengisi area kira kira seluas uang logam dan harus membentuk suatu lapisan berwarna keputihan homogen yang tembus pandang atau semi transparan. Dalam hal ini apusan harus dibiarkan benar-benar kering. *Catatan : jangan meniup kaca objek atau menggoyang-goyangkannya di udara*

4. Fiksasi Panas

Kecuali yang telah menempel di kaca objek, apusan bakteri akan terbilas selama prosedur pewarnaan. Hal ini dapat dicegah dengan fiksasi panas. Selama proses tersebut, protein-protein bakteri dikoagulasidan direkatkan pada permukaan kaca objek. Fiksasi panas dilakukan dengan cara melewatkan apusan yang dikeringkan di udara tersebut dengan cepat dua sampai tiga kali di atas nyala api pembakar bunsen.

2.1. Pewarnaan bakteri

Melihat dan mengamati bakteri dalam keadaan hidup sangat sulit, karena selain bakteri itu tidak berwarna juga transparan dan sangat kecil. Untuk mengatasi hal tersebut maka dikembangkan suatu teknik pewarnaan sel bakteri sehingga sel dapat terlihat lebih jelas dan mudah diamati. Oleh karena itu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama.

Adapun Fungsi pewarnaan antara lain :

1. memberi warna pada sel atau bagian-bagiannya sehingga memberi kontras dan tampak lebih jelas
2. untuk menunjukkan bagian-bagian struktur sel
3. membedakan mikroba satu dengan yang lain
4. menentukan pH dan potensial oksidasi reduksi ekstraseluler dan intraseluler.

Pengecatan bakteri umumnya menggunakan lebih dari satu tingkat pengecatan. Hasil pengecatan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti : fiksasi, substrat, dekolorisator dan sebagainya. Dalam pembuatan pulasan bakteri yang siap diwarnai, perlu dilakukan fiksasi terlebih dahulu yang bertujuan antara lain

1. mencegah mengkerutnya globula-globula protein sel,
2. merubah afnitas cat,
3. mencegah terjadinya otolisis sel,
4. dapat membunuh mikroba secara cepat dengan tidak menyebabkan perubahan perubahan bentuk atau strukturnya,
5. melekatkan bakteri di atas gelas benda dan
6. membuat sel-sel lebih kuat/keras.

Cara fiksasi yang paling banyak digunakan dalam pengecatan bakteri adalah dengan membuat lapisan suspensi/pulasan bakteri di atas gelas benda, kemudian dikeringanginkan dan dilalukan beberapa kali di atas nyala lampu spiritus.

2.2. Pengukuran mikroorganisme secara mikroskopis.

Penentuan ukuran mikroba dilakukan dengan menetapkan terlebih dahulu diameter medan mikroskopik menggunakan alat optic berupa micrometer okuler dan micrometer objektif. Micrometer okuler yang terletak di atas suatu papan bunda di dalam bagian eyepiece merupakan cakram kaca dengan skala skala yang tertera pada permukaannya. Jarak antar skala-skala tersebut akan bervariasi bergantung dengan pada perbesaran lensa objektif yang digunakan, yang menentukan ukuran medan. Jarak tersebut ditentukan

dengan menggunakan micrometer, suatu objek gelas khusus dengan skala yang tertera, yaitu berjarak 0,01 mm atau 10 mikrometer (μm).

Prosedur kalibrasi untuk micrometer okuler dilakukan dengan menumpang-tindihkan skala-skala pada kedua micrometer. Hal ini dilakukan dengan memutar lensa okuler. Penentuan kemudian dilakukan berdasarkan jumlah skala okuler per jarak yang diketahui pada micrometer. Akhirnya, factor kalibrasi untuk satu skala okuler dihitung sebagai berikut :

$$1 \text{ skala okuler (O.D = Okuler Division)} = \frac{\text{Jarak yang diketahui antara 2 garis pada mik. Objektif}}{\text{Jarak skala pada mikrometer okuler}}$$

Contoh : jika 13 skala okuler setara dengan 2 skala micrometer meja ($2 \times 0,01 \text{ mm} =$ jarak yang diketahui 0,02 mm)

$$1 \text{ skala okuler} = 0,02 \text{ mm} / 13 = 0,00154 \text{ mm atau } 1,54 \mu\text{m}$$

Apabila mikrometer okuler telah dikalibrasi, ukuran mikroorganisme dapat dengan mudah ditentukan.

Contoh :

Jika suatu organisme menempati lima skala pada micrometer okuler :

Panjang organisme =

jumlah skala okuler yang ditempati x faktor kalibrasi untuk satu skala okuler

$$5 \times 1,54 \mu\text{m} = 7,70 \mu\text{m}$$

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

a. Pengamatan Bakteri secara mikroskopis

No.	Alat	No.	Bahan
1	Mikroskop cahaya	1	Kultur biakan <i>Escherichia coli</i>
2	Pipet	2	Kultur biakan <i>Staphylococcus aureus</i>
3	Kertas saring	3	Aquadest
4	Pinset	4	NaOH
5	Object glass dan Cover glass	5	Metilen Blue
6	Cawan petri	6	Gentian Violet
7	Jarum Ose	7	Karbol Fuchsin
8	Api bunsen/ lampu spiritus	8	Alkohol
9	Kertas lensa	9	Lugol
		10	Xylol
		11	Minyak imersi

3.2. Cara Kerja

a. Pengamatan Bakteri secara mikroskopis

1. Teknik Dasar Preparat Ulas

- a) Labellah gelas benda yang kering dan bersih
- b) Sterilkan jarum ose
- c) Siapkan kultur bakteri (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*)(praktikum ke II/ Pertemuan ke- 2 & 3) berusia 24 - 48 jam. Buat kultur tersebut 2 hari sebelum praktikum ke IV.
- d) Ambil kultur secukupnya, yaitu :
 - Jika kultur dalam bentuk cair, ambil 1 ose penuh, letakan di tengah gelas benda, ratakan ± 1 cm
 - Jika kultur dalam bentuk padat, ambil satu bagian kecil kultur, letakan di tengah gelas benda yang sebelumnya telah diberi aquades steril
- e) Biarkan mengering
- f) Fiksasi di atas lampu bunsen.
- g) Preparat siap diwarnai

2. Teknik Pewarnaan Sederhana

- a) Buat Preparat Ulas lalu Fiksasi di atas lampu bunsen
- b) Teteskan dengan zat warna (*metilen blue*)
- c) Diamkan selama 1 menit
- d) Bilas dengan air mengalir
- e) Keringanginkan (jangan dilap / dihapus)
- f) Amati dengan perbesaran 100 x menggunakan minyak emersi
- g) Gambar bentuk sel bakteri yang anda amati

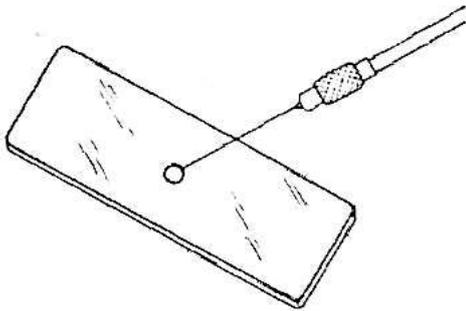
3. Teknik Pewarnaan Gram

- a) Buat Preparat Ulas lalu Fiksasi
- b) Teteskan Crystal Violet 1 menit
- c) Bilas dengan air, keringanginkan
- d) Diberi iodin/lugol (mordan) 1-2 tetes dan diamkan 1 menit
- e) Dibilas dengan alkohol selama 30 detik
- f) Bilas dengan aquadest
- g) Diberi 1 tetes safranin/karbol fuchsin, diamkan 1 menit, bilas dengan aquades dan keringanginkan
- h) Amati dengan perbesaran 100 x menggunakan minyak emersi

4. Pengukuran mikroorganisme secara mikroskopis

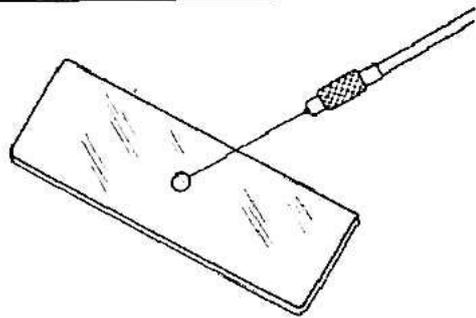
1. Dengan bimbingan dosen/laboran lakukan kalibrasi micrometer
2. Untuk menentukan ukuran bakteri pada preparat jadi dengan mikroskop, lakukan hal-hal berikut ini :
 - a. Hitung jumlah skala okuler yang ditempati 3 bakteri. Catat data di kolom pengamatan
 - b. Tentukan dan catat rata rata dari ketiga pengukuran tersebut
 - c. Tentukan ukuran bakteri dengan mengalikan nilai rata-rata dengan faktor kalibrasi yang telah anda hitung, catat nilai tersebut

Dari media cair

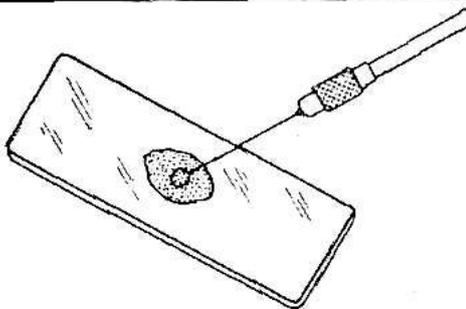


(a) Tempatkan satu atau dua ose penuh suspensi sel pada kaca objek bersih.

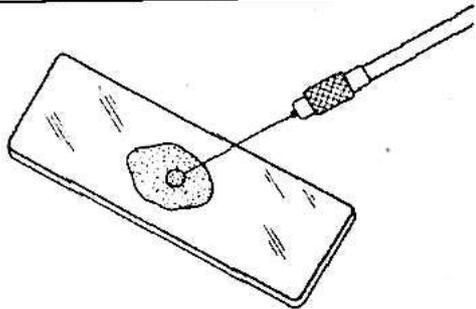
Dari media padat



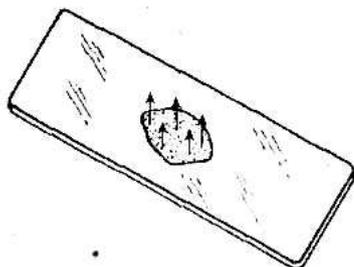
(a) Ambil satu tetes air dengan menggunakan ose dan tempatkan tetesan tersebut pada bagian tengah kaca objek.



(b) Dengan gerakan ose memutar, sebarkan suspensi dengan area yang kecil kira-kira seluas uang logam.

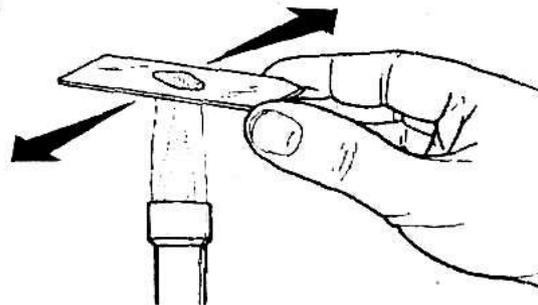


(b) Pindahkan sejumlah kecil inokulum bakteri dari biakan agar miring ke dalam tetesan air. Sebarkan keduanya dengan area yang kecil kira-kira seluas uang logam.



(c) Biarkan apusan mengering di udara.

Fiksasi



(d) Sambil memegang kaca objek pada satu ujung, lewatkan apusan secara cepat di atas nyala api Pembakar Bunsen dua hingga tiga kali.

Gambar Teknik penyiapan apusan bakteri

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

1. Penyiapan apusan bakteri

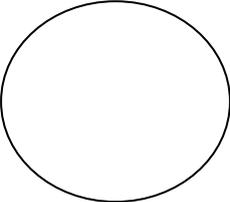
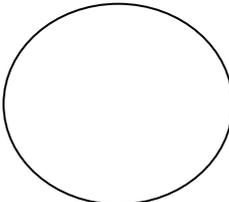
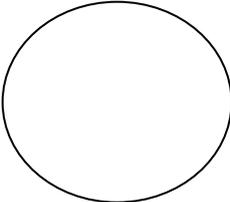
- a. Periksa selaput berwarna keputihan yang bersatu atau buram pada setiap kaca objek
- b. Pilih preparat yang menurut anda paling baik dan tanyakan pada instruktur anda untuk mengomentari pilihan anda. Ingat : bahwa apusan yang baik harus cukup jernih untuk membuat buku acuan anda tetap terbaca melalui apusan. Indikasikan berdasarkan nomor kaca objek untuk konsistensi apusan dari biakan kaldu dan biakan padat yang menurut anda paling baik.

- 1) **Biakan kaldu**.....
- 2) **Biakan padat**
- 3) **Ose**.....
- 4) **Jarum**.....

2. Pewarnaan Sederhana

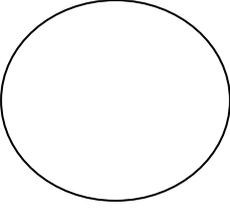
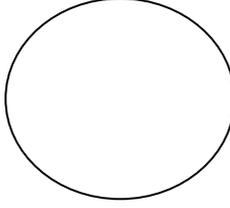
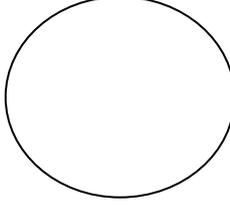
Pada halaman kosong yang disediakan :

- a. Gambarlah medan representatif untuk masing-masing organisme
- b. Jelaskan morfologi organisme meliputi bentuk (basillus, kokus, spiral) dan susunannya (berantai, berkelompok dan berpasangan)

	Metilen blue	Kristal violet	Karbol fuksin
Gambar medan representatif			
Organisme Morfologi sel : Bentuk Susunan Warna sel			

3. Pewarnaan Gram

- a. Buatlah gambar medan mikroskopik representatif
- b. Jelaskan sel-sel tersebut berdasarkan morfologi dan susunannya
- c. Jelaskan warna sel-sel yang telah diwarnai
- d. Klasifikasikan organisme-organisme tersebut berdasarkan reaksi gramnya : gram positif atau negatif

	Bakteri.....	Bakteri.....	Bakteri.....
Gambar medan representatif			
Morfologi sel : Bentuk Susunan Warna sel Reaksi gram			

4.2. Pembahasan

1. Penyiapan Apusan Bakteri

- mengapa apusan yang tebal dan padat kurang bagus untuk pemeriksaan mikroskopis
- mengapa pengeringan apusan di udara penting ? mengapa apusan tersebut tidak boleh dipanaskan di atas nyala api kecil pembakar Bunsen untuk mempercepat proses pengeringannya ?
- mengapa anda harus berhati-hati agar tidak memanaskan apusan secara berlebihan selama proses fiksasi panas
- menurut anda, mengapa adanya lemak atau kotoran pada kaca objek gelas akan menghasilkan preparat apusan yang tidak baik ? berikan dua atau tiga alasan

2. Teknik Pewarnaan Sederhana

Mengapa pewarna-pewarna basa lebih efektif untuk pewarnaan bakteri daripada pewarna-pewarna asam

3. Teknik Pewarnaan Gram

- Tuliskan tujuan masing-masing pereaksi
- Tahap apa yang paling krusial dalam melakukan prosedur pewarnaan gram

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM VII PENGAMATAN FUNGI SECARA MIKROSKOPIS

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu menyiapkan alat dan bahan untuk pemeriksaan jamur di laboratorium dengan baik dan benar.
- 1.2. Mahasiswa mampu memahami teknik pewarnaan preparat jamur.
- 1.3. Mahasiswa mampu mengetahui bagian-bagian jamur yang dilihat menggunakan mikroskop.

II. Tinjauan Pustaka

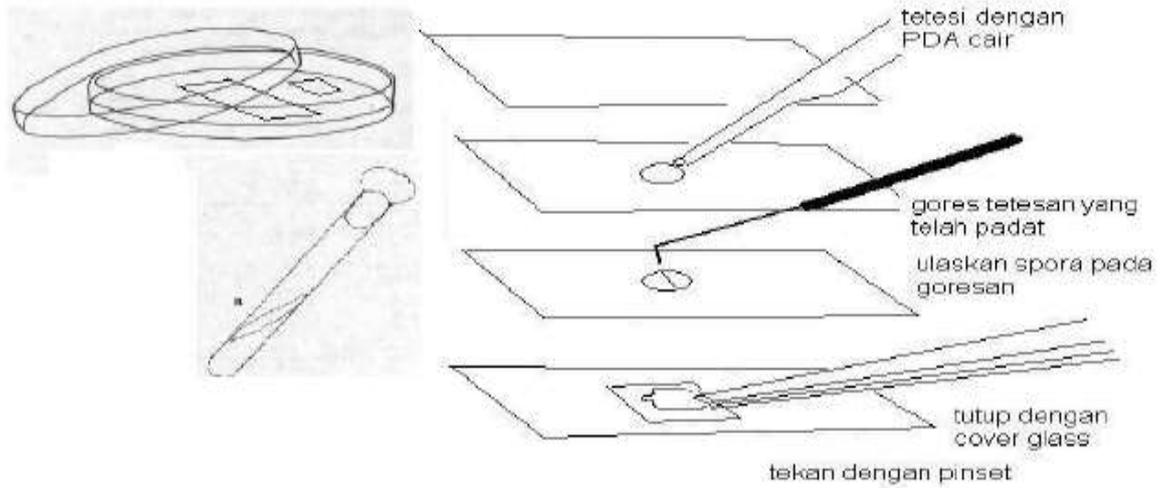
III. Metode Kerja

4.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Cawan petri	1	Roti berjamur
2	Cover glass	2	Media PDA
3	Jarum ose	3	Alkohol 70%
4	Api Bunsen/ Lampu Spiritus		
5	Gelas objek		
6	Pinset		
7	Beaker gelas		
8	Inkubator		
9	Cutter / silet		
10	Kertas label/ Spidol permanent		
11	Mikroskop		

4.2. Cara Kerja

- a. Buat Media PDA
- b. Sterilkan cawan petri yang berisi kapas yang di atasnya terdapat *object glass* dan *cover glass*.
- c. Siapkan media PDA dan dijaga supaya tetap cair.
- d. Teteskan media PDA pada *object glass* secara aseptis lalu tunggu memadat (teteskan jangan terlalu banyak).
- e. Belah media yang memadat dengan jarum inokulum yang berujung L.
- f. Ulaskan spora jamur yang akan diamati pada belahan tersebut.
- g. Tutup dengan *cover glass* tepat di atas media dan tekan hingga merata.
- h. Inkubasi selama 2x24 jam.
- i. Amati pertumbuhan miselium dan spora pada *object glass* dengan perbesaran sedang



IV. Hasil dan Pembahasan

1.1. Hasil

No	Gambar	Keterangan

1.2. Pembahasan

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan .

RAKTIKUM IX

UJI CEMARAN MIKROBA : ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT)

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan pengujian angka lempeng total (ALT) pada bakteri
- 1.2. Mahasiswa mampu menginterpretasi hasil pengujian Angka Lempeng Total (ALT) pada bakteri

II. Tinjauan Pustaka

Angka Lempeng Total (ALT) adalah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam kultur yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C (SNI, 1992). Uji ALT (Angka Lempeng Total) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total (ALT) dalam tiap gram sampel bahan (Anonim, 1992; Anonim, 2000).

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

a. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

No.	Alat	No.	Bahan
1	Pipet volume/ukur	1	Media <i>Plate Count Agar</i> (PCA)
2	<i>Colony Counter</i> (alat hitung koloni)	2	<i>Buffered Pepton Water</i> (BPW)
3	Cawan petri	3	Sampel uji (jamu <i>sachet</i>)
4	Erlenmeyer		
5	Tabung Reaksi		

3.2. Cara Kerja

a. Penyiapan Sampel Uji

Kemasan jamu yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis didekat nyala api spiritus.

b. Persiapan dan Homogenasi Sampel

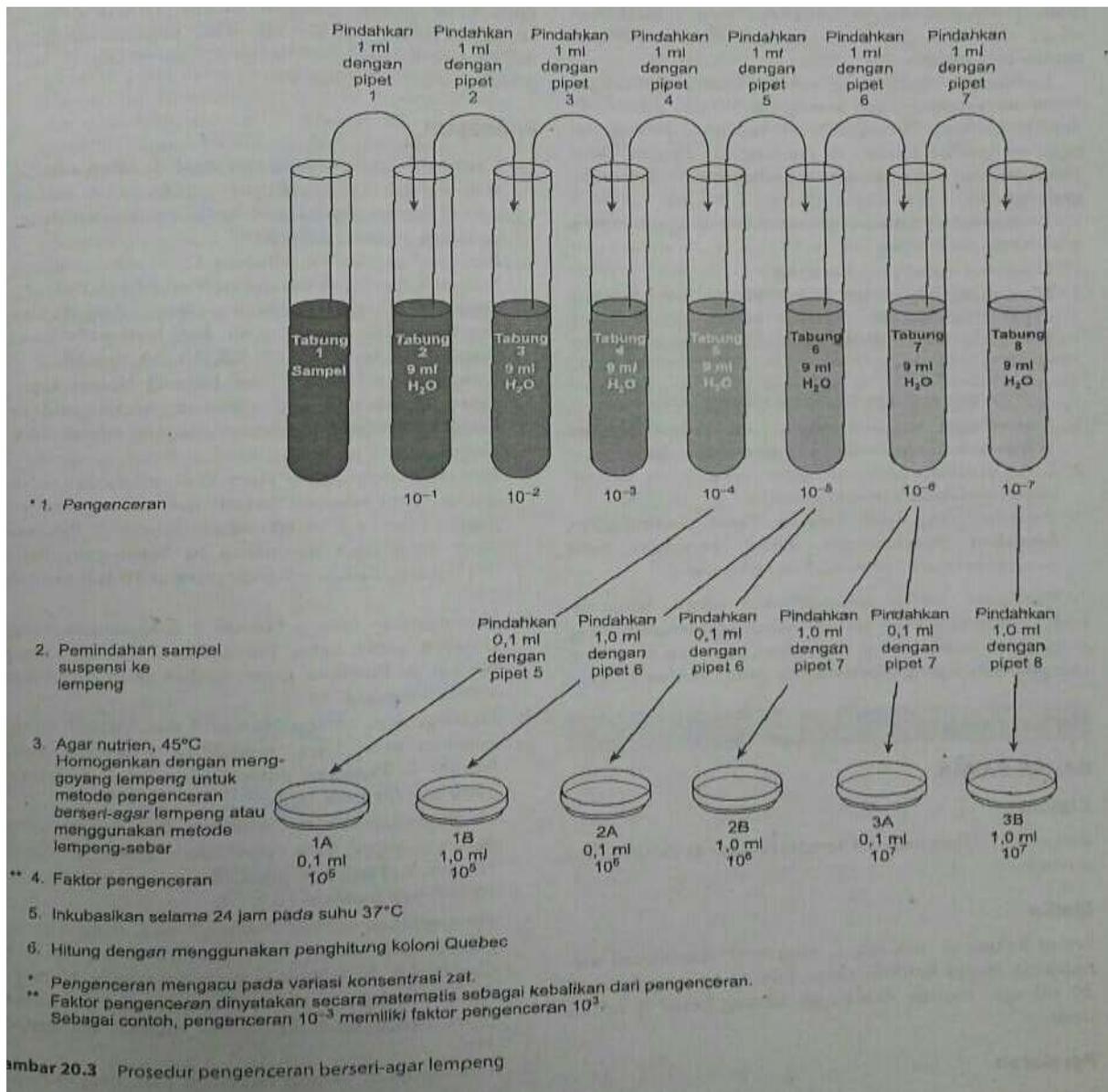
Secara aseptis diambil sebanyak 10 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan 90 ml BPW dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-1}

c. Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*)

Hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan

d. Hitung Angka Lempeng Total (ALT)

1. Sediakan 6 tabung reaksi, masing masing berisi 9 ml aquades steril dan beri label 10^{-1} sampai 10^{-6}
2. Buat pengenceran dari sampel yang akan diperiksa dari 10^{-1} sampai 10^{-6} dengan cara :
 - Masukkan 1 ml sampel ke dalam pengenceran 10^{-1} (tabung reaksi pertama) lalu kocok hingga homogeny
 - Pipet 1 ml dari tabung 1 masukkan ke dalam tabung 2, lalu kocok hingga homogeny
 - Pipet 1 ml dari tabung ke 2 lalu masukkan ke dalam tabung 3, kemudian kocok hingga homogen dan seterusnya sampai tabung ke 6
 - Sediakan 2 cawan petri steril, letakkan berurutan, dan beri label 10^{-5} dan 10^{-6}
 - Ambil larutan dari tabung 5 & 6 sebanyak 1 ml secara aseptis, lalu masukkan ke dalam cawan 5 & 6
 - Siapkan media PCA cair (40-45 °C) sebanyak 2 tabung masing masing 9 ml
 - Masukkan media tersebut ke dalam cawan 5 & 6 secara aseptis
 - Homogenkan dengan cara memutar angka 8, biarkan dingin dan mengeras
3. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 35 °C selama 24-48 jam
4. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung *colony counter*.
5. Perhitungan Angka Lempeng total dalam 1 ml contoh dengan mengkalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.
6. Interpretasikan hasil percobaan yang telah Anda lakukan dan simpulkan apakah sampel jamu yang telah Anda analisis mengandung jumlah mikroba melebihi batas yang ditetapkan atau tidak! Jelaskan! (berdasarkan Peraturan Pemerintah/ Keputusan Kepala Badan POM RI tentang persyaratan cemaran mikroba pada makanan).



IV. Hasil dan Pembahasan

1.1. Hasil

1. Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung adalah :
 - a. Satu koloni dihitung 1 koloni
 - b. Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni
 - c. Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni
 - d. Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni
 - e. Koloni yang lebih besar dari setengah cawan tidak dihitung
 - f. Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni

Rumus standar penghitungan koloni adalah :

$$\text{Jumlah koloni} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

2. Cara penghitungannya adalah sebagai berikut :

Hitung cawan yang mengandung jumlah 10-150 koloni dan catat pengenceran yang digunakan.

$$N = \frac{\sum c}{\{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)\} \times d}$$

Dengan :

N : Jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g.

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

n_1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang di hitung

n_2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang di hitung

d : Pengenceran pertama yang di hitung.

CONTOH :

Pengenceran :	1:100	1:1000
Jumlah Koloni:	132 dan 144	23 dan 18

$$\begin{aligned} N &= \frac{\sum c}{\{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)\} \times d} \\ &= \frac{(132+144+23+18)}{\{(1 \times 2) + (0,1 \times 2)\} \times 10^2} \\ &= \frac{317}{0,022} \\ &= 14.409 \\ &= 14.000 \text{ koloni/gr} \end{aligned}$$

Hitung cawan yang mengandung jumlah koloni lebih dari 150 koloni dan catat pengenceran yang digunakan. Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 150 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 150 laporkan sebagai perkiraan kapang dan khamir

CONTOH:

Pengenceran	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	TBUD	170
Perkiraan ragi dan kapang koloni per ml atau per g	170.000	

2. Hitung cawan yang mengandung jumlah koloni kurang dari 10 koloni atau cawan tanpa koloni dan catat pengenceran yang digunakan. Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 10, catat koloni yang ada, nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 10 dan kalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT kapang dan khamir.

CONTOH:

Pengenceran	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	8 dan 0	2 dan 0

Perkiraan ALT ragi dan kapang koloni per ml atau per g Lebih kecil dari 1.400

Pelaporan

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hail pembulatan.
- Bulatkan angka menjadi 2 angka yang sesuai, bila angka ketiga 6 atau di atasnya seperti 7,8,9, maka angka ketiga menjadi 0 (nol) dan angka kedua naik 1 angka, misalnya 456 menjadi 460 ($4,6 \times 10^2$)
- Bila angka ketiga 4 atau dibawahnya seperti 1,2,3 maka angka ketiga menjadi 0 (nol) sedangkan angka kedua tetap. Misalnya 454 menjadi 450 ($4,5 \times 10^2$)
- Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua itu genap.

CONTOH :

Hasil Perhitungan	ALT
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

3. Catat hasil pengamatan dan jumlah bakteri yang dihitung per ml sampel pada tabel
4. Karena cawan pengencer dilakukan secara berulang satu sama lain, tentukan rata rata jumlah bakteri yang dilakukan duplo tersebut per ml sampel dan catatlah pada tabel

Cawan	Faktor pengenceran	ml pengenceran	Pengenceran akhir pada cawan	Jumlah koloni	Jumlah bakteri per ml sampel (CFU/ml)	Jumlah rata-rata per ml sampel (CFU/ml)

1.2. Pembahasan

- a. Kelemahan dan kelebihan penghitungan jumlah bakteri yang sudah dilakukan
- b. Bedakan antara pengenceran dan factor pengenceran

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM X

UJI CEMARAN MIKROBA : ANGKA KAPANG KHAMIR (AKK)

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan pengujian Angka kapang Khamir (AKK)
- 1.2. Mahasiswa mampu menginterpretasi hasil pengujian Angka Kapang Khamir (AKK)

II. Tinjauan Pustaka

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25 °C dan dinyatakan dalam satuan koloni /mL (Soekarto, 2008). Uji AKK (Angka Kapang Khamir) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan kapang dan khamir setelah sampel diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25oC. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya (Anonim, 1992; Anonim, 2002).

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Pipet Volume	1	Media <i>Potato Dextrrose Agar</i> (PDA)
2	<i>Colony counter</i> (alat hitung koloni)	2	Larutan pengencer <i>Pepton Dilution Fluid</i> (PDF)
3	Cawan Petri	3	Sampel uji (jamu gendong)
4	Tabung Reaksi	4	Aquadest steril.
		5	Kloramfenikol 100mg/ liter media Pembuatan larutan kloramfenikol : 1 gram kloramfenikol dalam 100 ml aquadest steril.

3.2. Cara Kerja

e. Penyiapan Sampel Uji

Kemasan jamu yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis didekat nyala api spiritus.

f. Persiapan dan Homogenasi Sampel

Secara aseptis diambil sebanyak 10 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan 90 ml *Pepton Dilution Fluid* (PDF) dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-1}

g. Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan

h. Uji sterilitas media

Dilakukan dengan menuangkan media PDA dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PDA dan 1 ml pengencer (PDF) lalu dibiarkan memadat.

i. Hitung Angka Kapang Khamir (AKK)

1. Sediakan 6 tabung reaksi, masing masing berisi 9 ml aquades steril dan beri label 10^{-1} sampai 10^{-6}
2. Buat pengenceran dari sampel yang akan diperiksa dari 10^{-1} sampai 10^{-6} dengan cara :
 - Masukkan 1 ml sampel ke dalam pengenceran 10^{-1} (tabung reaksi pertama) lalu kocok hingga homogen
 - Pipet 1 ml dari tabung 1 masukkan ke dalam tabung 2, lalu kocok hingga homogen
 - Pipet 1 ml dari tabung ke 2 lalu masukkan ke dalam tabung 3, kemudian kocok hingga homogen dan seterusnya sampai tabung ke 6
 - Sediakan 2 cawan petri steril, letakkan berurutan, dan beri label 10^{-5} dan 10^{-6}
 - Ambil larutan dari tabung 5 & 6 sebanyak 1 ml secara aseptis, lalu masukkan ke dalam cawan 5 & 6
 - Siapkan media PDA cair (40-45 °C) sebanyak 2 tabung masing masing 9 ml
 - Masukkan media tersebut ke dalam cawan 5 & 6 secara aseptis
 - Homogenkan dengan cara memutar angka 8, biarkan dingin dan mengeras
3. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 35 °C selama 5 hari
4. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung *colony counter*.
5. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-5, tetapi koloni kapang dan khamir dihitung setelah 5 hari.

6. Perhitungan Angka Kapang Khamir dalam 1 ml dengan mengkalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.
7. Interpretasikan hasil percobaan yang telah Anda lakukan dan simpulkan apakah sampel jamu yang telah Anda analisis mengandung jumlah mikroba melebihi batas yang ditetapkan atau tidak! Jelaskan! (berdasarkan Peraturan Pemerintah/ Keputusan Kepala Badan POM RI tentang persyaratan cemaran mikroba pada makanan)

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

4.2. Pembahasan

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PRAKTIKUM XII
UJI POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBA :
METODE *DIFUSI PAPER DISK*

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan uji Potensi Senyawa Antimikroba dengan metode *difusi paper disk*.
- 1.2. Mahasiswa mampu menginterpretasi hasil uji potensi senyawa antimikroba dengan metode *difusi paper disk*.

II. Tinjauan Pustaka

Senyawa-senyawa kemoterapi yang ada memiliki spectrum aktivitas antimikroba yang beragam. Beberapa memiliki spectrum aktivitas yang terbatas, yaitu hanya efektif terhadap satu kelompok mikroorganisme. Sensitivitas sejumlah besar mikroorganisme patogen terhadap antibiotic telah diketahui, tetapi terkadang perlu dilakukan pengujian beberapa senyawa untuk menentukan pilihan terapi yang tepat. Suatu prosedur difusi agar menggunakan cakram kertas terstandar, dikenal dengan metode Kirby-Bauer, sering digunakan untuk menentukan sensitivitas mikroorganisme yang diisolasi dari proses infeksi terhadap obat. Metode ini memungkinkan penentuan efikasi suatu obat secara cepat dengan mengukur diameter zona hambat yang dihasilkan dari difusi senyawa obat ke dalam media agar di sekitar cakram. Pada prosedur ini cakram cakram kertas berukuran seragam dijenuhkan dengan antibiotic-antibiotik berkonsentrasi tertentu dan diletakkan di atas permukaan lempeng agar yang telah ditanami mikroorganisme uji.

Media yang biasa dipilih adalah agar Mueller-Hinton dengan pH 7,2-7,4 yang dituang ke dalam cawan petri dengan kedalaman seragam (5mm) dan dibiarkan memadat dalam lemari pendingin. Sensitivitas suatu mikroorganisme terhadap suatu obat ditentukan berdasarkan ukuran daerah jernih, yang tergantung pada variabel-variabel seperti :

1. Kemampuan dan kecepatan difusi antibiotic ke dalam media, serta interaksi antibiotik dengan mikroorganisme uji
2. Jumlah mikroorganisme yang diinokulasi
3. Kecepatan pertumbuhan mikroorganisme
4. Derajat sensitivitas mikroorganisme terhadap antibiotik

Pengukuran diameter zona hambat dinyatakan dalam millimeter dan ukuran ini dibandingkan dengan ukuran yang tercantum dalam tabel standar CLSI yang dinyatakan resisten, intermediet dan sensitif terhadap antibiotik.

III. Metode Kerja

3.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Cawan petri steril	1	Suspensi bakteri uji dalam medium NB umur 24 jam
2	Jarum ose dan <i>Spreader</i>	2	<i>Nutrient Agar (NA) atau Muller Hilton Agar</i>
3	Api Bunsen/ lampu spirtus	3	Bebagai larutan uji antibiotika dengan konsentrasi tertentu
4	Inkubator, <i>Vortex</i>	5	Deret larutan standard Mc Farland
5	Jangka sorong/ penggaris	6	Aquades steril
6	Pinset	7	Alcohol 70 %
7	Tabung reaksi Besar, tabung reaksi kecil dan Rak tabung	8	Kapas usap steril
8	Pipet Volume, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer	9	<i>Paper Disk antibiotik</i>

3.2. Cara kerja:

a. Preparasi Senyawa Uji Antibiotika

Preparasi senyawa uji antibiotika dilakukan sesuai petunjuk dalam kemasan, kemudian buatlah berbagai variasi konsentrasi senyawa uji antibiotika. Pada praktikum ini dibuat 4 variasi konsentrasi senyawa uji yaitu konsentrasi 25mg/ml; 12,5mg/ml; 6,25mg/ml dan 3,125mg/ml (*Perhatikan cara pembuatan konsentrasi senyawa uji!*)

b. Preparasi Mikroorganisme Uji

1. Siapkan kultur murni bakteri uji
2. Siapkan deret larutan standard Mac Farland
3. Buat sebanyak 2 tabung @ 10 ml suspensi bakteri Uji menggunakan media BPW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroorganisme 6×10^8 CFU/ml).

c. Kontrol negatif (tanpa sediaan uji antibiotika dan suspensi bakteri uji)

1. Siapkan 20 ml media NA
2. Tuang secara aseptis ke dalam cawan petri steril

3. Biarkan memadat
 4. Beli label pada dasar petri (kontrol negatif)
- d. Pembuatan kontrol positif (dengan suspensi bakteri uji tapi tanpa sediaan uji antibiotika)**
1. Ambil 0,2 ml suspensi bakteri uji
 2. Inokulasi ke dalam cawan petri berisi media NA secara *spread plate*
 3. Biarkan memadat
 4. Beli label pada dasar petri (kontrol positif)
- e. Uji antibiotik metode cawan cakram kertas (*Difusi Paper Disk Plate*)**
1. Siapkan 4 cawan petri steril
 2. Tuangkan 20 ml NA cair bersuhu 40-45 °C ke dalam masing masing cawan petri lalu biarkan memadat
 3. Ulaskan suspensi bakteri uji ke seluruh permukaan cawan petri tersebut. Lalu biarkan selama 1 jam
 4. Letakkan cakram antibiotik pada permukaan agar dengan jarak sedemikian rupa agar tidak terjadi penumpukan zona inhibisi
 5. Inkubasi cawan petri pada suhu 37 °C selama 48-72 jam
 6. Ukur zona inhibisi dengan penggaris / jangka sorong

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

a. Prosedur Uji Sensitivitas Antibiotik Kirby-Bauer

- Amati ada tidaknya daerah hambat di sekeliling masing-masing cakram pada seluruh biakan cawan
- Dengan menggunakan penggaris millimeter, ukur dengan seksama setiap zona hambat dan bulatkan ke millimeter, kemudian catat hasil yang anda peroleh pada tabel
- Bandingkan hasil yang anda peroleh dengan tabel dan tentukan sensitivitas setiap mikroorganisme uji terhadap senyawa kemoterapi dengan menuliskan resisten (R), Intermediet (I) atau Sensitif (S)
- Untuk setiap senyawa antibiotik/kemoterapi, tentukan :
 - a. Apakah spektrum aktivitas senyawa uji adalah spektrum luas atau sempit
 - b. Apakah senyawa uji efektif terhadap jenis organisme gram positif, gram negative atau tahan asam.

Senyawa antibiotik	Bakteri.....		Bakteri.....	
	Diameter zona hambat	sensitivitas	Diameter zona hambat	Sensitivitas
Penisilin				
Streptomisin				
Tetrasiklin				
Kloramfenikol				
Gentamisin				
Vankomisin				

Senyawa antibiotik	Spektrum aktivitas	Jenis mikroorganisme

b. Efek Sinergis Kombinasi Obat/antibiotic

Amati seluruh biakan cawan agar untuk menentukan pola zona hambat yang ditunjukkan. Zona hambat yang terpisah menunjukkan efek aditif sedangkan zona hambat yang menyatu menunjukkan efek sinergis. Catatlah hasil pengamatan anda pada tabel di bawah ini :

Biakan	Pola zona hambat	Efek sinergis/aditif
<i>E.colli</i> Obat.....dan obat..... Obat.....dan obat.....		
<i>S. aureus</i> Obat.....dan obat..... Obat.....dan obat.....		

4.2. Pembahasan

Hasil percobaan anda menunjukkan bahwa antibiotik-antibiotik yang anda gunakan memiliki spektrum aktivitas yang luas terhadap sel-sel prokariotik. Mengapa antibiotik-antibiotik ini tidak memiliki aktivitas terhadap sel-sel eukariotik seperti fungi.

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

PERTEMUAN XIII
UJI KEPEKAAN ANTIBIOTIK :
PENENTUAN MIC / KHM
DENGAN METODE DILUSI CAIR

I. Tujuan

- 1.1. Mahasiswa mampu melakukan penentuan MIC/KHM dan MBC/KBM dengan metode dilusi cair
- 1.2. Mahasiswa mampu menginterpretasi hasil uji MIC/KHM dan MBC/KBM dengan metode dilusi cair

II. Tinjauan Pustaka

Kadar Hambat Minimal (KHM) suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Kadar Bunuh Minimal suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang dapat membunuh pertumbuhan mikroba tertentu. KHM dan KBM dapat ditentukan dengan prosedur tabung dilusi. Prosedur ini digunakan untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif dalam mengontrol infeksi pada pasien (Radji, 2004).

Metode dilusi disebut metode pengenceran. Metode ini dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada praktikum ini terlebih dahulu akan dilakukan metode dilusi cair. Metode dilusi cair digunakan untuk menentukan *minimum inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) dan *minimum bacterial concentration* (MBC) atau kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada agen medium cair yang ditambahkan dengan agen mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut dilanjutkan dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

KHM adalah konsentrasi terendah suatu senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji. Data kuantitatif dari praktikum ini dapat digunakan oleh praktisi klinis untuk menentukan regimen antimikroba yang

efektif untuk pengobatan infeksi bakteri pada tubuh inang. Data ini sangat penting ketika toksisitas antibiotik diketahui dapat menyebabkan efek merugikan yang besar pada tubuh inang.

Penisilin adalah suatu antibiotic poten yang diproduksi oleh kapang *Penicillium notatum*. Aktivitas penisilin berkaitan dengan cincin β -laktam yang terdapat dalam struktur molekul antibiotic tersebut. Penelitian mengungkapkan bahwa beberapa organisme secara genetis mampu membuat β -laktanase (penisilinase), suatu enzim yang memutuskan sebuah ikatan pada bagian cincin β -laktam pada suatu molekul. Ketika kesatuan cincin dirusak, aktivitas penghambatan dari antibiotic ini akan hilang.

Pada praktikum ini KHM penisilin akan ditentukan terhadap galur *S. aureus* yang sensitif terhadap penisilin. Prosedur akan dilakukan dengan larutan penisilin berkonsentrasi tertentu, yang disiapkan dengan metode dua set pengenceran berseri dalam media kaldu yang diperkaya. Tabung yang berisi pengenceran antibiotic kemudian diinokulasikan dengan organisme uji yang berkonsentrasi terstandar. Tabel menyajikan protocol pengenceran antibiotic berseri dalam media kaldu.

Setelah diinkubasi, pembacaan serapan dengan spektrofotometri akan digunakan untuk menentukan ada atau tidaknya pertumbuhan dalam biakan. Biakan yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada konsentrasi penisilin terendah menunjukkan konsentrasi hambat minimum antibiotik tersebut terhadap mikroorganisme uji.

Tabel 45.1		Teknik Pengenceran Antibiotik Berseri dalam Media Kaldu								
	NOMOR TABUNG									
Penambahan (ml) pada:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Media	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Penisilin	2	2	Pengenceran berseri (lihat protokol)							0
Biakan uji	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volume total	4	4	4	4	4	4	4	4	4*	4
Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)	50	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0
Kontrol	(-)									(+)

*Setelah dibuang 2 ml

Metode Kerja

2.1. Alat dan Bahan

No.	Alat	No.	Bahan
1	Mortir/Stamper/Lumpang	1	Suspensi bakteri
2	Tabung reaksi besar dan kecil	2	Senyawa uji berupa antibiotik(misalnya penisilin)
3	Rak Tabung reaksi	3	<i>Nutrient broth</i> (NB)
4	Pipet volume ukuran 1 ml	4	Pelarut sedian uji
5	Pipet volume ukuran 5 ml	5	Aquadest steril
6	Pipet Pasteur	6	Swab Steril
6	Labu Ukur 100 mL		
8	Api Bunsen/ Lampu Spiritus		
9	Inkubator		
10	Spektrofotometer		
11	<i>Colony counter</i>		
12	Cawan petri		

2.2. Cara kerja :

a. Penentuan MIC/KHM dengan Metode Dilusi Cair

1. Siapkan 1-10 tabung reaksi kosong steril yang dilabeli secara berurutan 1, 2, 3, 4, 5, 6,7,8,9,10
2. Dengan pipet 10 ml steril, tambahkan masing-masing 2 ml media NB ke dalam tabung berlabel 2 sampai 10. *Catatan : buang pipet bekas ke dalam beker berisi disinfektan.*
3. Dengan pipet 2 ml steril, tambahkan 2 ml larutan penisilin ke dalam tabung 1 dan 2. *Catatan : homogenkan isi tabung dengan baik.*
4. Dengan menggunakan pipet steril 2 ml, pindahkan 2 ml dari tabung 2 ke tabung 3. Homogenkan dan pindahkan 2 ml dari tabung 3 ke tabung 4. Lanjutkan prosedur ini sampai tabung 9. Buang 2 ml dari tabung 9 ke dalam beker. Tabung 10 tidak mengandung antibiotik dan berfungsi sebagai kontrol positif. Buang pipet. *Catatan : jangan lupa menghomogenkan isi setiap tabung dengan baik setiap pemindahan*
5. Selanjutnya dengan menggunakan pipet 2 ml steril, tambahkan masing-masing 2 ml isolat (subkultur) bakteri *S. aureus/e.colli* (pengenceran 1 : 1000) ke dalam seluruh tabung
6. Inkubasi semua tabung pada suhu 37 °C selama 24 jam
7. Amati MIC dengan metode berikut ini :

a) Metode Turbidimetri, caranya :

Setelah media tabung perlakuan diinkubasi selama 1x24 jam, semua tabung tersebut dilihat kekeruhannya secara visual. Apabila kekeruhan masing-masing tabung masih setara atau lebih keruh dari tabung K (+) yang berisi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* /*E.colli* sesuai standar kekeruhan McFarland 1 berarti bakteri masih dapat tumbuh, tetapi ketika larutan dalam tabung terlihat mulai lebih jernih daripada tabung K(+) berarti pertumbuhan bakteri mulai terhambat. Hal inilah yang menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM).

b) Metode spektrofotometri

Pengamatan kekeruhan menggunakan alat *spektrofotometer* yang lebih akurat dalam menentukan kekeruhan yang berfungsi untuk mengukur panjang gelombang serta nilai absorbansi kekeruhan yang ada pada setiap tabung perlakuan.

c. Penentuan MBC/KBM secara streak plate

Penentuan MBC / KBM dilakukan dengan cara :

1. Hasil inkubasi dari penentuan MIC dilanjutkan dengan uji rekulturasi untuk mengetahui **konsentrasi bunuh minimum** (KBM) dari *antibiotic* (penisilin) pada cawan petri
2. Hasil rekulturasi kemudian diinkubasi kembali selama 1x24 jam
3. Amati : apabila masih ditemukan koloni bakteri *S.aureus* maka penisilin tersebut tidak dapat membunuh bakteri tetapi apabila tidak ditemukan koloni bakteri maka penisilin tersebut dapat membunuh bakteri.
4. Pertumbuhan bakteri pada cawan petri ditandai dengan adanya koloni pada media NA
5. Hitung koloni bakteri secara manual menggunakan *Colony counter*

IV. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil

a. Penentuan KHM

- Ikuti instruksi menggunakan spktrofotometer untuk menentukan pembacaan serapan tabung 2 sampai 10 pada Set I dan II. Gunakan tabung-tabung nomor 1, kontrol negative , sebagai blanko untuk mengatur spektrofotometer
- Catat hasil pembacaan serapan yang anda peroleh pada tabel di bawah ini :

Nomor	Tabung Reaksi								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Konsentrasi penisilin (µg/ml)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0,78	0,39	0
Set I									
Set II									

Keterangan :

Set I : konsentrasi hambat minimal.....

Set II : konsentrasi hambat minimal.....

b. Penentuan KBM

Catat hasil rekulturasi dari tabung MIC yang telah diinkubasi selama 24 jam, lalu isi jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada tabel berikut ini :

Nomor	Tabung Reaksi								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Konsentrasi penisilin (µg/ml)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0,78	0,39	0
Set I									
Set II									

4.2. Pembahasan

- Apakah kemampuan beberapa mikroorganisme menghasilkan β -laktamase sudah ada sebelum mikroorganisme tersebut terpajan antibiotik penisilin ? jelaskan ?
- Dapatkah hasil uji KHM digunakan untuk menentukan apakah suatu antibiotik bersifat bakterisida atau bakteriostatik ?
- Tujuan KBM dan bahas jumlah koloni dari KBM serta tentukan nilai KBM nya

V. Kesimpulan

Daftar Pustaka

Disetujui oleh :

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai dengan yang di praktikumkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Jawetz et al. 2017. Mikrobiologi Kedokteran : Edisi 25. EGC : Bandung
- Pratiwi, S.T. 2016. Mikrobiologi Farmasi. Erlangga : Jakarta
- Misnadiarly dan Djajaningrat, H. 2014. Mikrobiologi Untuk Klinik dan Laboratorium. Rineka Cipta : Jakarta
- Retnaningrum, E. Darmasiwi, S., Siregar, A.R. 2018. Bahan Ajar Mikrobiologi. GadjahMada University Press.
- Cappucino, J.G and Sherman, N. 2017. *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. EGC : Bandung
- Pollack, A. *et al.* 2017. *Praktik Laboratorium Mikrobiologi*. EGC : Bandung