



# **PENUNTUN PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI DASAR PRODI DIII TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS**



**STIKes MITRA KELUARGA  
2022**

Oleh:

Maulin Ingraini, M.Si

Noor Andryan Ilsan, Ph.D

## **KATA PENGANTAR**

Buku Penuntun praktikum Bakteriologi Dasar ini disusun dengan tujuan membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum Bakteriologi Dasar. 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 praktek. Praktikum Bakteriologi Dasar termasuk ke dalam mata kuliah Bakteriologi Dasar dengan total SKS 3, adapun persebarannya adalah 1 SKS teori dan 2 SKS Praktikum. Praktikum ini dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi STIKes Mitra Keluarga. Waktu yang dibutuhkan untuk 1 kali pertemuan praktikum adalah 2 SKS x 170 menit = 340 menit atau 5 jam 40 menit. Mata kuliah Bakteriologi Dasar membahas tentang sejarah dan perkembangan bakteri, karakteristik bakteri, teknik isolasi, inokulasi dan pewarnaan bakteri. Capaian Pembelajaran Mata Kuliah Bakteriologi Dasar adalah menguraikan prinsip dasar karakteristik bakteri, teknik isolasi, inokulasi dan pewarnaan bakteri

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 Dasar serta bagi mahasiswa yang memerlukannya. Segala kritik dan saran yang bersifat membangun tentang isi buku ini sangat dihargai demi perbaikan kualitas lebih lanjut.

Bekasi, Agustus 2022

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

## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>TATA TERTIB PRAKTIKUM.....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>v</b>
I.    Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Bakteriologi. ....	1
II.   Teknik Pemindahan Biakan Bakteri .....	5
III.  Isolasi bakteri.....	14
IV.  Preservasi Isolat Bakteri.....	17
V.   Pewarnaan Sederhana.....	21
VI.  Pewarnaan Gram .....	25
VII. Pewarnaan Endospora& Kapsul Bakteri .....	29
<b>UJIAN PRAKTIKUM 1</b>	
VIII. Motilitas Bakteri.....	35
IX.  Pengukuran sel bakteri .....	38
X.   Penghitungan jumlah bakteri.....	41
<b>UJIAN PRAKTIKUM 2</b>	
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>

## PRAKTIKUM I

### 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

Alat di laboratorium menjadi salah satu faktor yang penting untuk mendukung kegiatan praktikum, khususnya praktikum Bakteriologi Dasar. Mahasiswa akan terampil melakukan praktikum apabila mempunyai pengetahuan mengenai alat-alat yang digunakan selama praktikum. Mahasiswa tidak cukup hanya dengan mengetahui nama alat di laboratorium saja, tetapi harus memahami prinsip alat, cara penggunaan, fungsi alat serta cara memelihara alat. Pengetahuan mengenai alat laboratorium yang kurang akan mempengaruhi kelancaran dan keselamatan ketika praktikum.

Alat – alat yang digunakan pada praktikum Bakteriologi terbagi menjadi alat elektrik, alat gelas dan alat non gelas. Alat elektrik merupakan alat laboratorium yang pada penggunaannya membutuhkan listrik, seperti mikroskop, autoklaf, oven dan inkubator. Alat gelas merupakan alat-alat yang terbuat dari bahan gelas atau kaca. Alat gelas biasanya digunakan untuk menampung larutan, wadah untuk melihat isolat bakteri di bawah mikroskop dan wadah untuk menumbuhkan bakteri. Alat gelas yang digunakan pada laboratorium bakteriologi adalah cawan petri, tabung reaksi, gelas kimia, erlenmeyer, *object glass* dan pipet ukur. Sedangkan alat non gelas adalah alat yang materialnya terbuat dari selain gelas. Alat non gelas biasanya digunakan sebagai alat bantu untuk mengambil lauratr. Contoh alat non gelas yang umum digunakan adalah *bulb*, pinset dan jarum ose.

### C. Metode Kerja

#### 1. Alat

**Alat elektrik** : Mikroskop cahaya, autoklaf, inkubator, *Hot Plate and Stirrer*, *Colony counter*, *Biological Safety Cabinet* (BSC), Oven, Vortex. **Alat gelas dan keramik** : cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, labu erlenmeyer, *mortar and pestle*, *beaker glass*, pembakar spirtus, gelas ukur, *drugalsky*, *object glass*, *cover glass*. **Alat non gelas** : jarum inokulum / ose, pinset, *rubber bulb / filler*, rak tabung, bak pewarnaan, 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 alat-alat tersebut dan beri keterangan bagian-bagiannya.

### 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.	<i>Hot Plate</i>		
5.	<i>Colony counter</i>		
6.	Oven		
7.	<i>Biological Safety Cabinet</i> (BSC)		

8	Vortex		
---	--------	--	--

**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.	<i>Mortar &amp; pestle</i>		
7.	<i>Beaker glass</i>		
8.	Pembakar Spirtus		
9.	Gelas ukur		
10.	<i>Drugalsky</i>		
11.	<i>Object glass dan Cover glass</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.	Bak pewarnaan		
6.	pH meter universal		

**2. Pembahasan**

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

**E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan)

**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 II TEKNIK PEMINDAHAN BIAKAN BAKTERI

Tanggal Praktikum :

### A. 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.

### B. Dasar Teori

Bakteri dapat ditemukan dimanapun, di udara, sampel cairan tubuh manusia ataupun dipermukaan benda. Bakteri dapat dipindahkan dari suatu permukaan benda ke media pertumbuhan atau dari media ke media yang lain. Teknik pembiakan bakteri menjadi sangat penting dilakukan agar praktikan dapat menyiapkan dan memelihara biakan induk.

Alat yang digunakan pada praktikum bakteriologi dapat menjadi sumber keberadaan bakteri dan dapat mengkontaminasi media.

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**

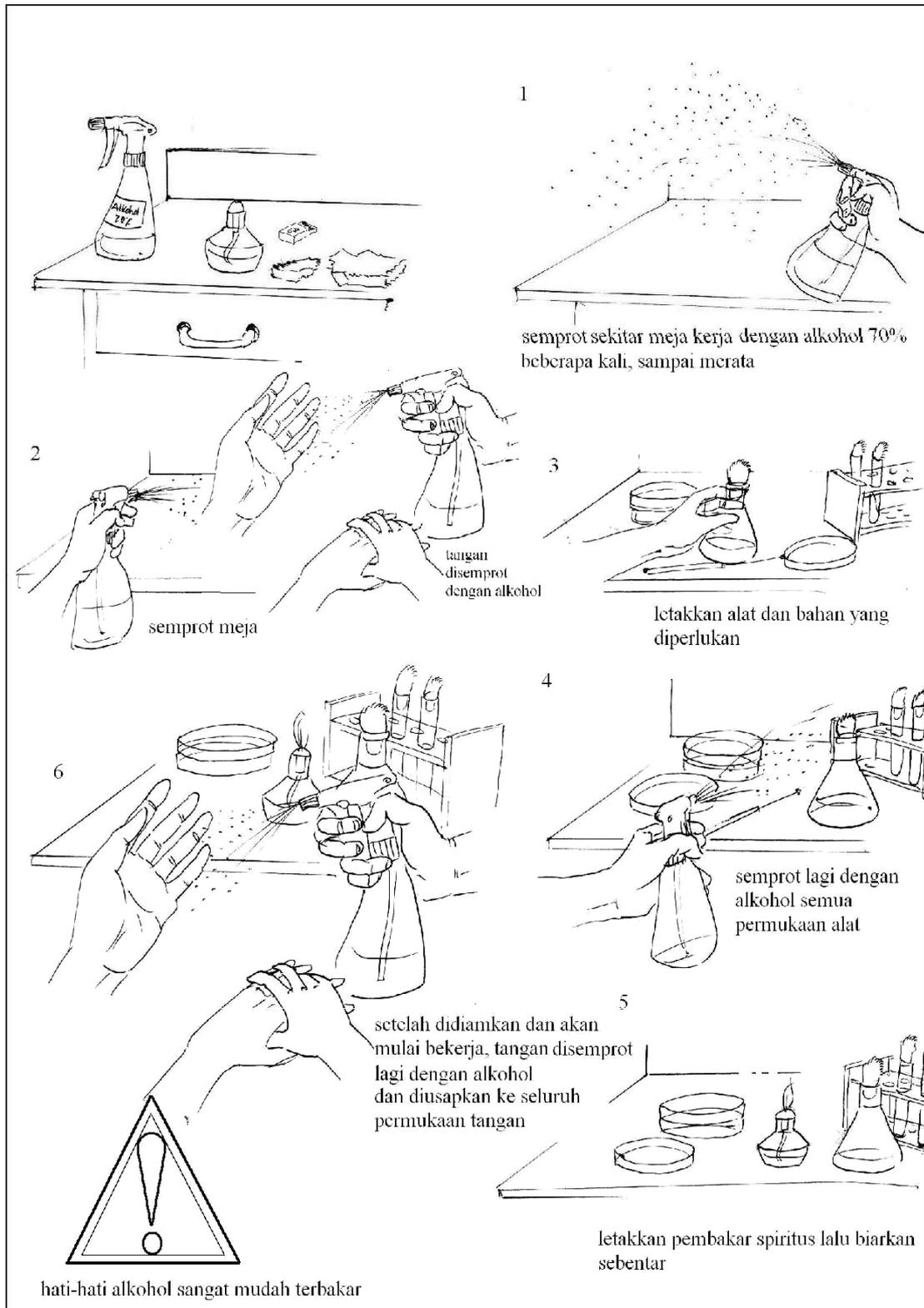
Alat yang digunakan pada praktikum ini adalah sprayer, jarum ose, botol spirtus, pipet ukur, cawan petri, filler / bulb, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung reaksi, korek api.

### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah akuades, kasa, kapas, alkohol 70%, media NA, spirtus, Isolat *Bacillus subtilis*, Isolat *Escherichia coli*.

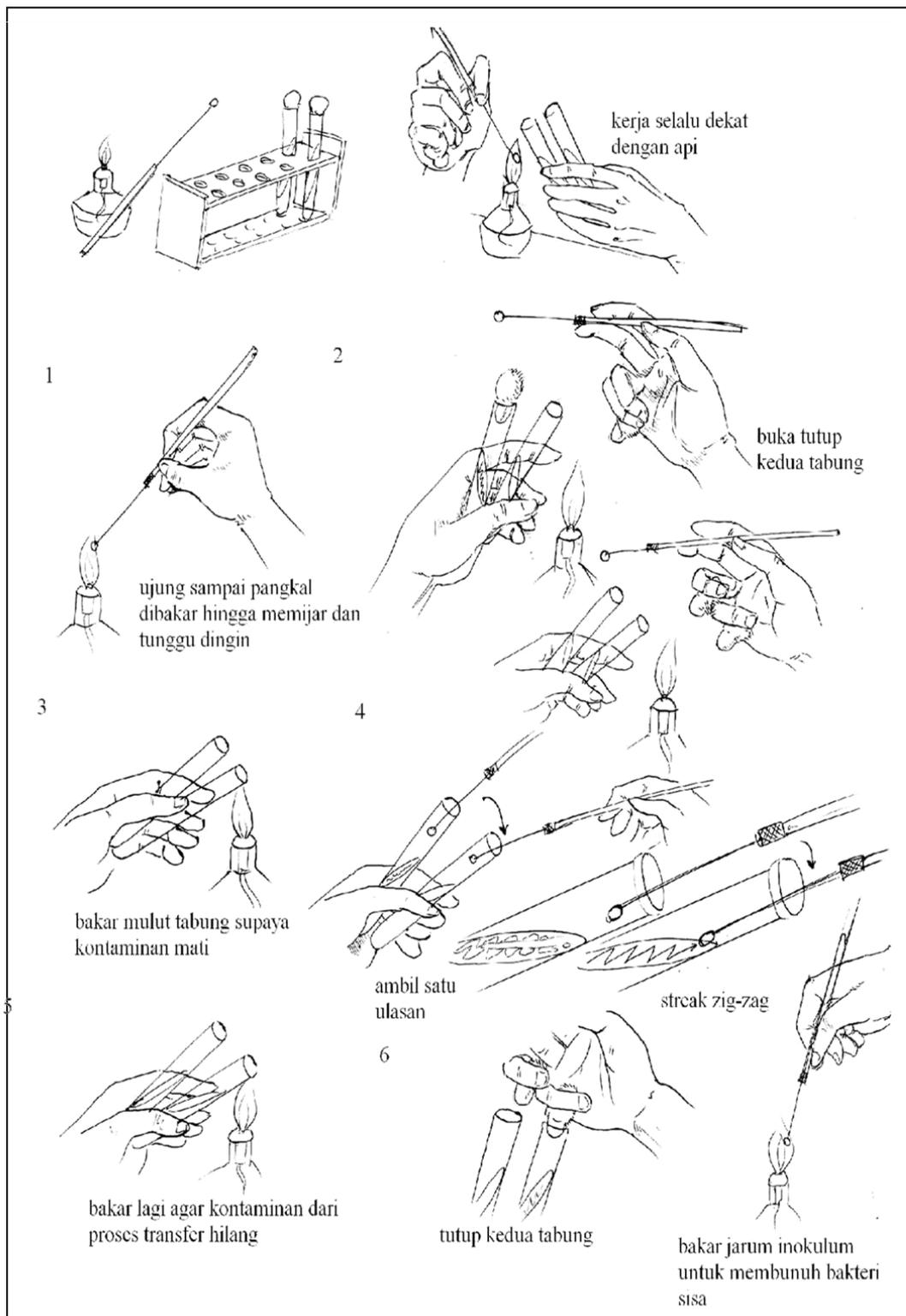
### 3. Prosedur Kerja

#### a. Desinfeksi Meja Kerja.



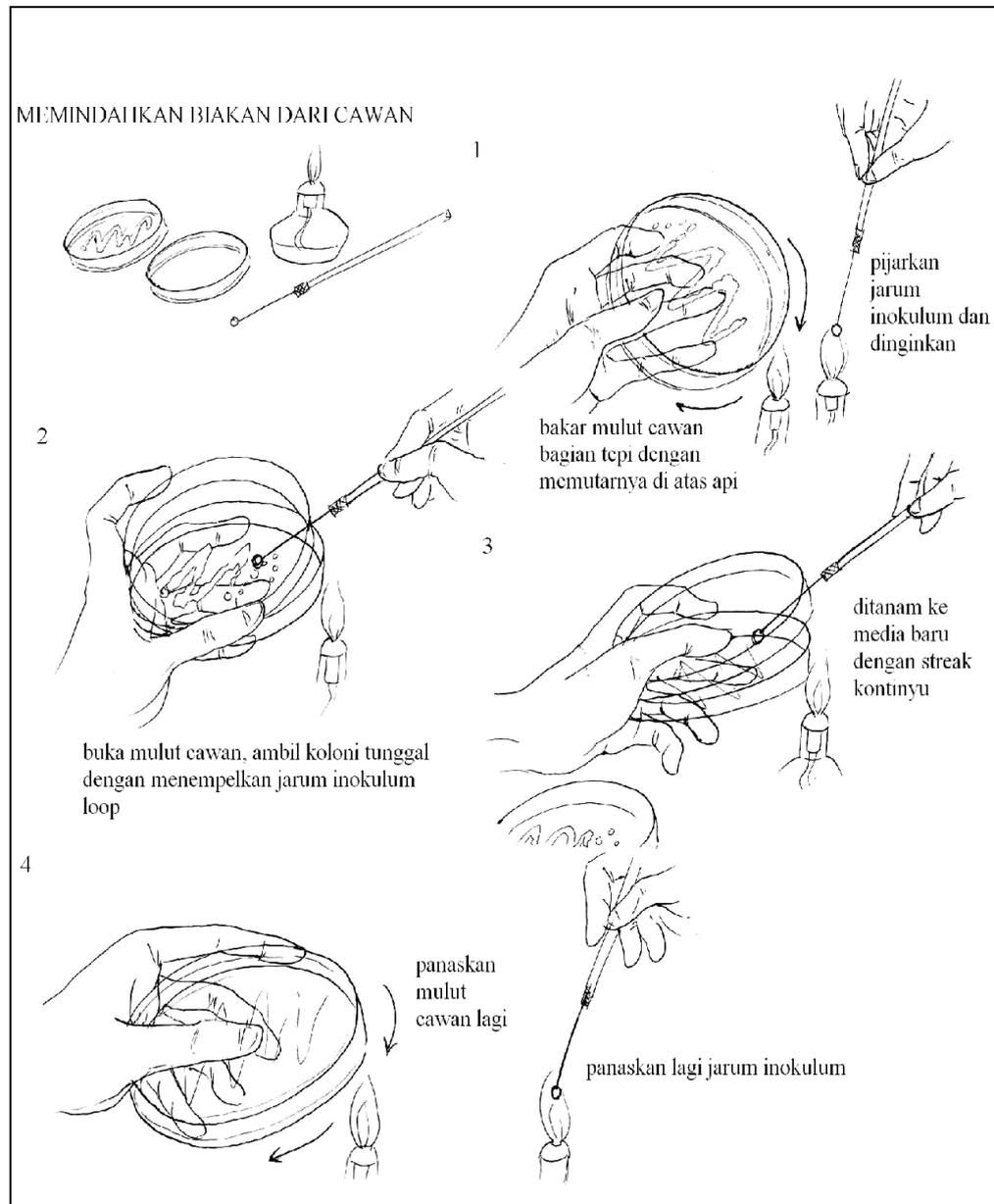
**Gambar 2.1. Prosedur desinfeksi meja kerja.**

**b. Memindahkan biakan secara aseptis.**



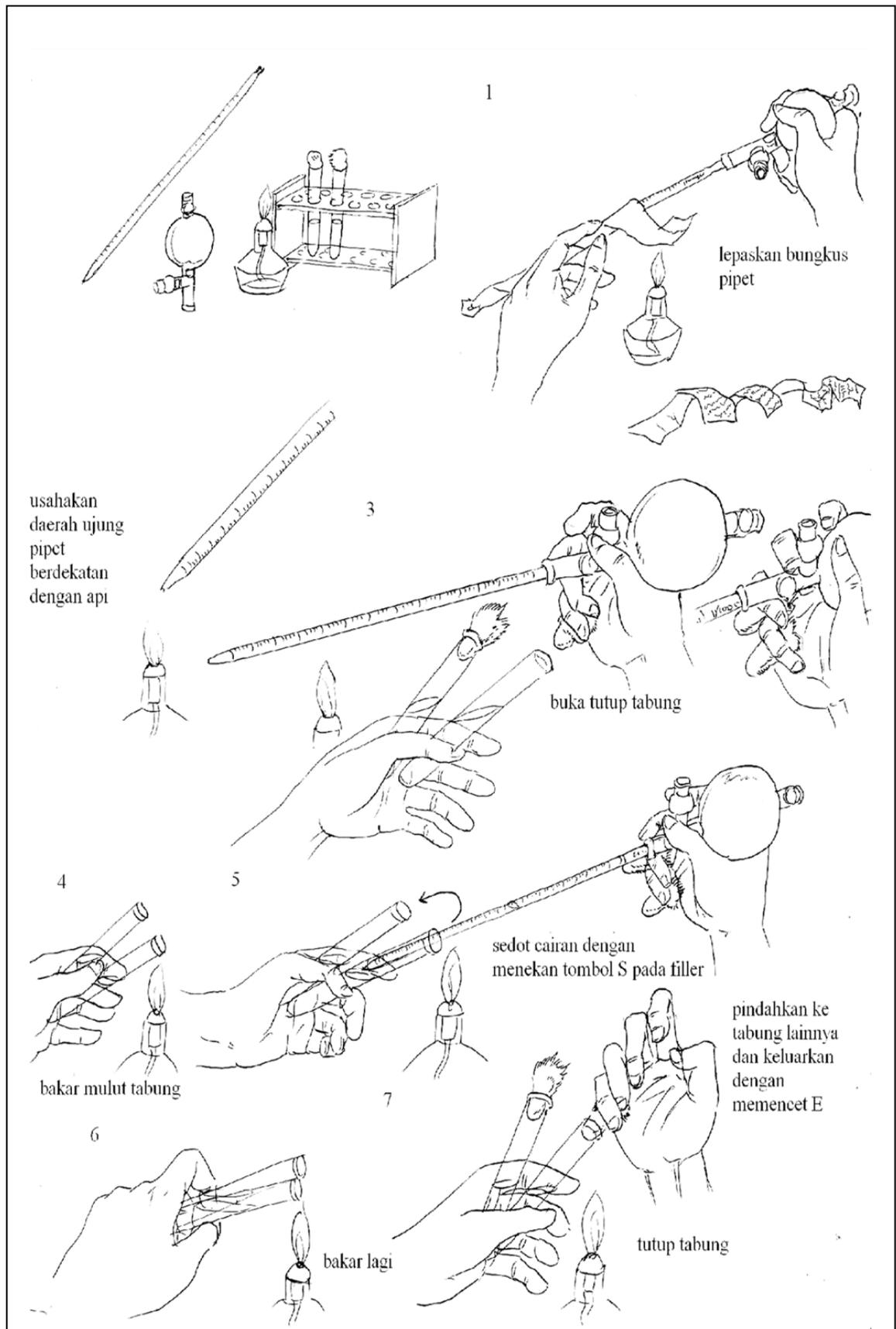
**Gambar 2.2. Prosedur pemindahan biakan bakteri secara aseptis.**

c. Memindahkan biakan dari cawan.

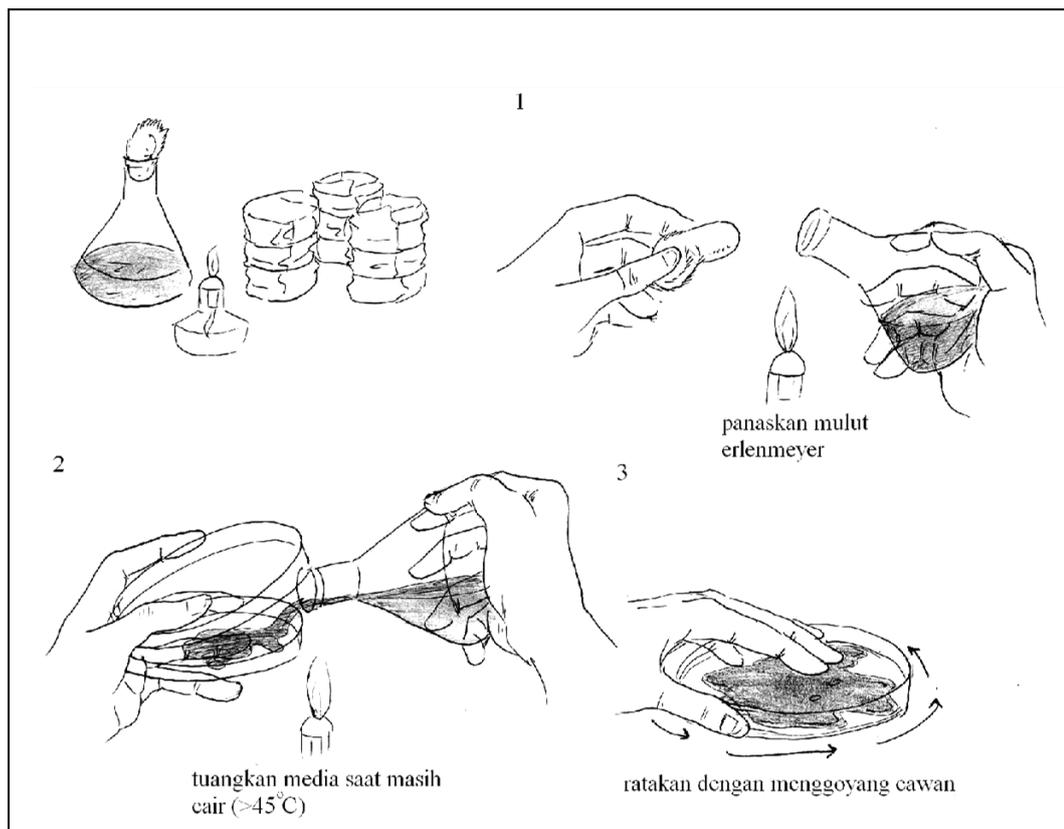


Gambar 2.3. Prosedur pemindahan biakan bakteri dari cawan.

d. Memindahkan cairan dengan pipet.



Gambar 2.4. Prosedur pemindahan cairan (suspensi) bakteri dengan pipet.

**e. Menuang Media.****Gambar 2.5. Prosedur penuangan media bakteri.**

**D. Hasil dan Pembahasan****1. Hasil**

(Gambar hasil pemindah biakan bakteri).

**2. Pembahasan**

(Penjelasan mengenai cara kerja aseptis, desinfeksi meja / ruang kerja, hal-hal yang dapat mengakibatkan kontaminasi).

**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 III

### ISOLASI BAKTERI

Tanggal Praktikum :

#### A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu melakukan isolasi bakteri dari kulit.
2. Mahasiswa mampu melakukan isolasi bakteri dari sampel makanan.

#### 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

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, *Mortar and pestle*, cawan petri, botol spirtus, pipet ukur, *filler/bulb*.

##### 2. Bahan

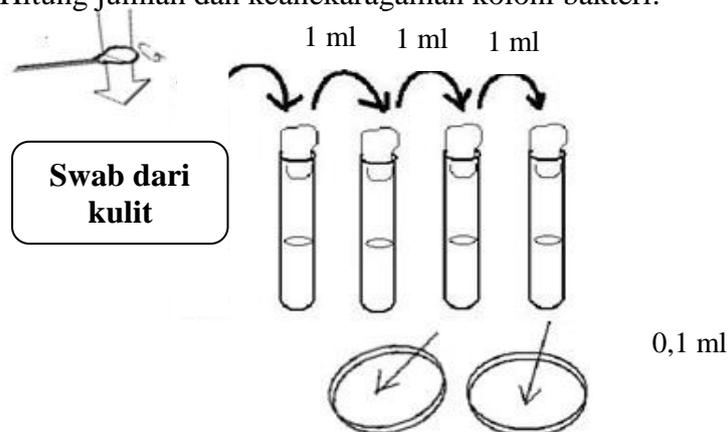
Bahan yang digunakan adalah akuades steril, sampel makanan, alkohol 70% , media NA, spirtus, *cotton bud* steril

##### 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*, tiriskan pada dinding tabung reaksi
- 2) *Cotton bud* diulas pada bagian kulit (agak lembab).

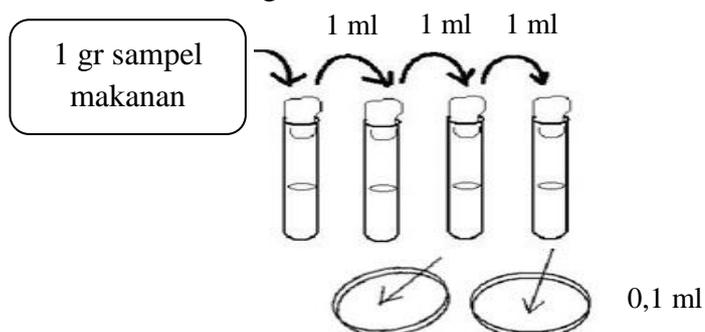
- 3) *Cotton bud* dimasukkan ke dalam tabung yang berisi akuades steril sebanyak 9 ml sebagai pengenceran  $10^{-1}$  secara aseptis.
- 4) 1 ml akuades steril pada tabung pengenceran  $10^{-1}$  dimasukkan ke tabung pengenceran  $10^{-2}$  yang berisi akuades steril 9 ml.
- 5) Lakukan hal yang sama sampai pengenceran bertingkat  $10^{-4}$ .
- 6) Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada medium NA.
- 7) Media diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 x 24 jam.
- 8) Hitung jumlah dan keanekaragaman koloni bakteri.



**Gambar 3.1. Prosedur isolasi bakteri dari sampel kulit.**

#### b. Isolasi bakteri dari sampel makanan

- 1) Sampel makanan ditimbang sebanyak 1 gram
- 2) Sampel makanan dihancurkan / dimaserasi
- 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 ditanam secara *spread plate* pada medium NA.
- 6) Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 x 24 jam.
- 7) Amati jumlah dan keanekaragaman koloni bakteri.



**Gambar 3.2. Prosedur isolasi bakteri dari sampel makanan.**

**D. Hasil dan Pembahasan****1. Hasil**

(Gambar hasil isolasi bakteri dari kulit dan dari makanan)

**2. Pembahasan**

(Penjelasan tentang hasil yang didapatkan. Jumlah koloni bakteri isolasi kulit dan makanan pada setiap pengenceran, faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi bakteri. Hasil dibandingkan dengan pustaka)

**E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat)

**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 IV

### PRESERVASI ISOLAT BAKTERI

Tanggal Praktikum :

#### A. Tujuan

1. Mahasiswa melakukan teknik preservasi isolat bakteri menggunakan akuades steril dan gliserol.
2. Mahasiswa melakukan uji viabilitas bakteri hasil preservasi menggunakan akuades steril dan 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 bioremediasi 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 oleh penguasaan 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).

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 penggunaannya 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

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, jarum ose, tabung mikro (*Eppendorf*), botol spirtus, pipet ukur, *filler / bulb*, cawan petri, batang L / *drugalsky*, botol *sprayer*

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, spirtus, gliserol, akuades, media NA

### 3. Prosedur Kerja

#### a. Preservasi dalam **akuades steril**.

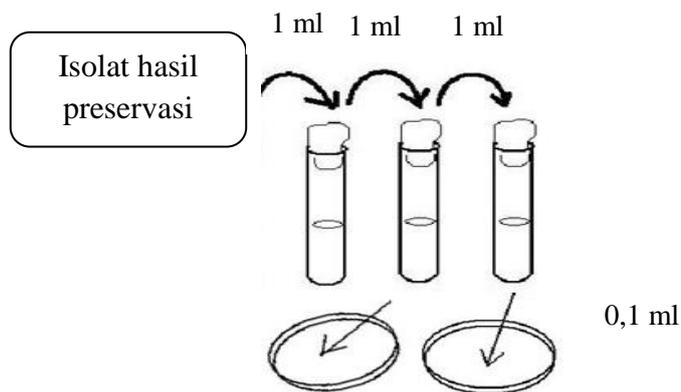
- 1) Akuades steril sebanyak 1-2 ml disiapkan dalam tabung bertutup ulir atau dalam tabung mikro (*eppendorf*).
- 2) Bakteri yang sudah berumur 24-48 jam dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi akuades steril sebanyak 1 ose atau 1 ml suspensi.
- 3) Tabung ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau suhu 10-15 °C.

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

- 1) Akuades steril 1-2 ml yang mengandung 15% gliserol dimasukkan ke dalam *eppendorf*.
- 2) Bakteri yang sudah berumur 24-48 jam dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* tersebut. *Eppendorf* ditutup rapat, larutan dihomogen dan disimpan pada suhu -15 °C – 4 °C.

#### c. Uji viabilitas bakteri hasil preservasi

- 1) Sampel isolat *Bacillus subtilis* / *Escherichia coli* dari hasil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung pengenceran  $10^{-1}$  secara aseptis.
- 2) Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai  $10^{-3}$ .
- 3) Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada medium NA.
- 4) Setelah selesai, inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
- 5) Amati viabilitas bakteri berdasarkan tumbuhnya koloni bakteri.
- 6) Uji viabilitas bakteri dilakukan rutin (minimal satu bulan) dan recovery dilakukan dengan cara menanamnya secara langsung pada media cair atau media agar.



Gambar 4.1. Pengujian viabilitas hasil preservasi

#### D. Hasil dan Pembahasan

##### 1. Hasil

(Gambar atau foto hasil preservasi isolat bakteri).

##### 2. Pembahasan

(Penjelasan hasil preservasi dan bandingkan dengan pustaka).

#### E. Kesimpulan

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

#### 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 V

### PEWARNAAN SEDERHANA

Tanggal Praktikum :

#### A. TUJUAN

1. Mahasiswa mampu melakukan pewarnaan sederhana (positif dan negatif).
2. 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 bakteri, 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 mengadsorpsi atau membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme. Zat warna mengadsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras mikroba dengan sekelilingnya dapat ditingkatkan. Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan struktur seperti spora, flagela, dan bahan inklusi yang 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 sederhana terdiri 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.

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

## C. Metode Kerja

### 1. Alat

Alat yang digunakan *object glass*, penjepit tabung reaksi, jarum ose, bak pewarnaan, botol spirtus, mikroskop, sprayer.

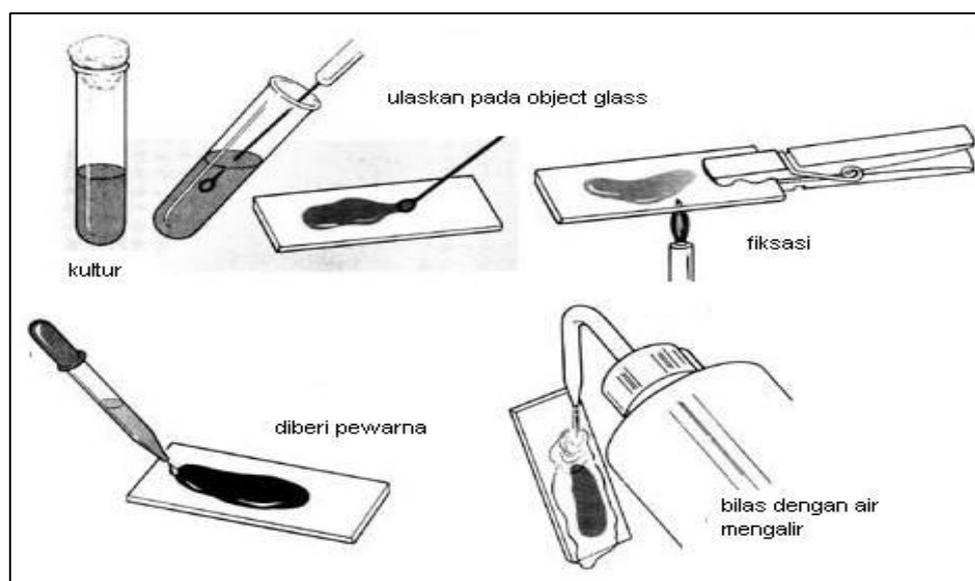
### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Isolat *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, Alkohol 70%, spirtus, akuades, eosin / nigrosin, *Methylen blue* / Safranin / *Crystal Violet*.

### 3. Prosedur Kerja

#### a. Pewarnaan sederhana (Positif)

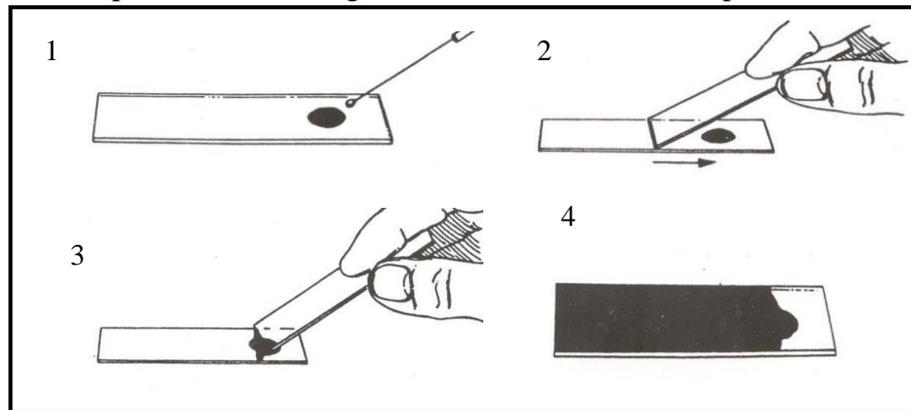
- 1) Bersihkan *object glass* dengan kapas.
- 2) Tulis kode atau nama bakteri pada sudut *object glass*.
- 3) Apabila menggunakan biakan cair, pindahkan setetes biakan dengan pipet tetes atau dapat juga dipindahkan dengan jarum inokulum. Jangan lupa biakan dikocok terlebih dahulu. Jika digunakan biakan padat, maka biakan dipindahkan dengan jarum inokulum, satu ulasan saja kemudian diberi akuades dan disebarkan supaya sel merata.
- 4) Fiksasi ulasan dengan melewati di atas api 2-3 kali.
- 5) Keringanginkan ulasan.
- 6) Ulasan ditetesi dengan pewarna (*Methylen blue* / Safranin / *Crystal Violet*) dan tunggu kurang lebih 30 detik.
- 7) Cuci dengan akuades kemudian keringkan dengan kertas *tissue*.
- 8) Amati sel bakteri menggunakan mikroskop (perbesaran 100 x 10).



Gambar 5.1. Prosedur pewarnaan sederhana (positif).

b. Pewarnaan negatif

- 1) Ambil dua object glass, teteskan eosin/nigrosin atau tinta cina di ujung kanan salah satu *object glass*.
- 2) Biarkan diambil lalu diulaskan atau diteteskan dalam tetesan eosin/nigrosin, homogenkan dengan ose.
- 3) Tempelkan sisi *object glass* yang lain kemudian gesekkan ke samping kiri.
- 4) Biarkan preparat mengering di udara, jangan difiksasi atau dipanaskan di atas api. Amati morfologi bakteri di bawah mikroskop.



**Gambar 5.2. Prosedur pewarnaan sederhana (negatif).**

**D. Hasil dan Pembahasan**

**1. Hasil**

(Gambar morfologi sel bakteri pada masing-masing pewarnaan).

**2. Pembahasan**

(Penjelasan hasil dari praktikum yang telah dilakukan dibandingkan dengan pustaka. Jelaskan sifat dari reagen pewarna).

**E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

**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 VI

### PEWARNAAN GRAM

Tanggal Praktikum :

#### A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu melakukan pewarnaan Gram pada isolat bakteri.
2. Mahasiswa mampu menentukan morfologi dan karakteristik bakteri yang diamati berdasarkan hasil 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 positif 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

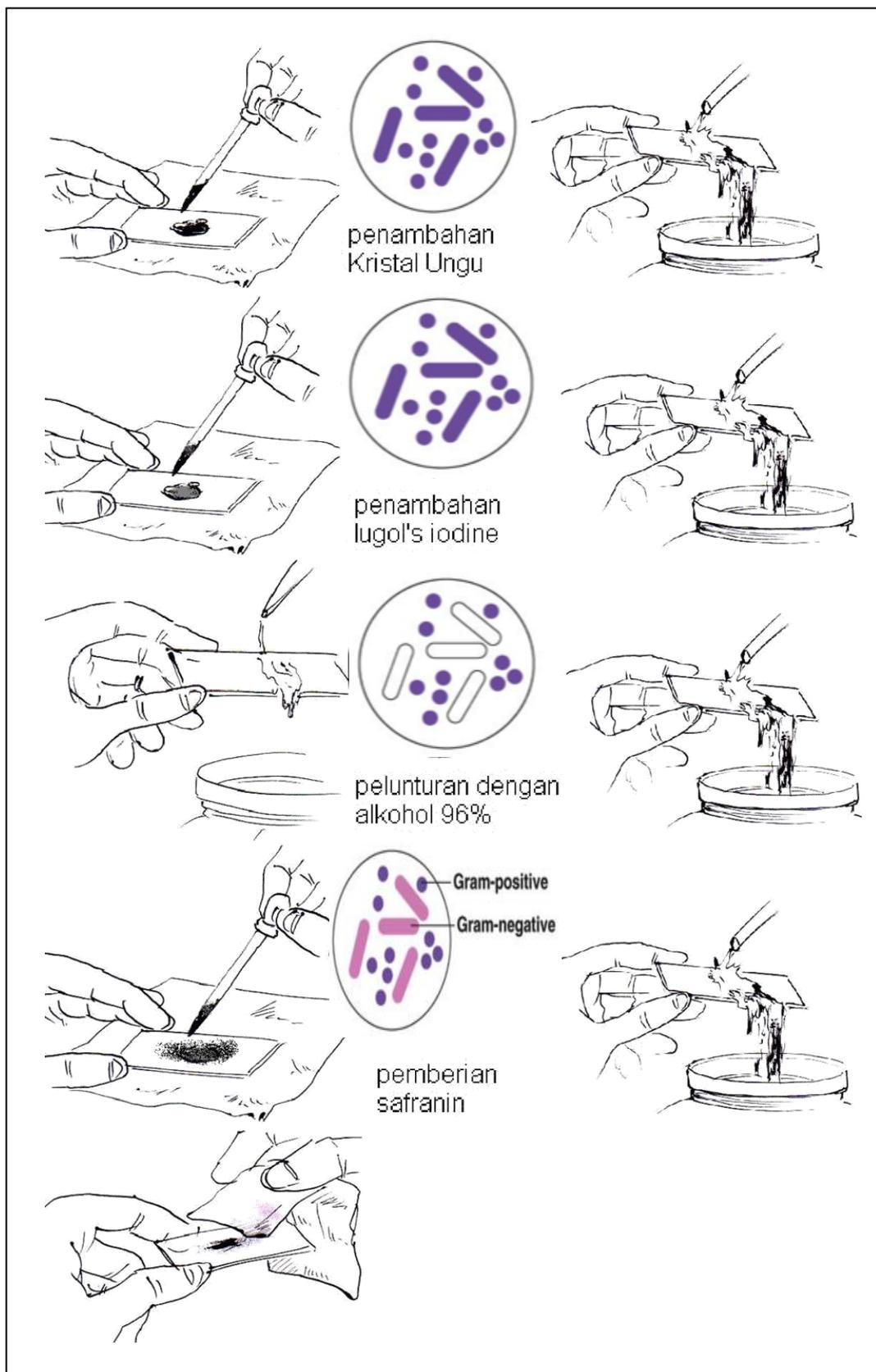
Alat yang digunakan adalah *object glass*, botol spirtus, sprayer, bak pewarnaan, jarum Ose.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Isolat *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, etanol 96%, akuades, kristal violet, safranin, spirtus, *Lugol's Iodine*.

#### 3. Prosedur Kerja Pewarnaan Gram

No	Prosedur Kerja	Dampak / Hasil
1.	Buat preparat ulas ( <i>smear</i> ) yang telah difiksasi dari bakteri gram positif missal <i>Bacillus subtilis</i> dan gram negatif missal <i>Escherichia coli</i> .	Sel bakteri tertempel pada permukaan kaca ( <i>object glass</i> ).
2.	Teteskan Kristal Violet sebagai pewarna utama pada kedua preparat, usahakan semua ulasan terwarnai dan tunggu selama $\pm 1$ menit.	Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri gram positif dan negative
3.	Cuci dengan akuades mengalir	
4.	Teteskan mordant ( <i>lugol's iodine</i> ) lalu tunggu $\pm 1$ menit.	Adanya <i>lugol's iodine</i> menyebabkan adanya ikatan CV dengan <i>iodine</i> yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada gram positif dapat terbentuk <i>CV-iodine</i> 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 ( <i>overdecolorize</i> ).	Penetasan etanol absolute menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks <i>CV-iodine</i> akan lepas dari permukaan sel gram negatif, sedangkan pada gram positif <i>CV-iodine</i> tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening.
7.	Cuci dengan akuades mengalir	
8.	Teteskan <i>counterstain</i> (safranin) dan tunggu selama $\pm 45$ detik.	Safranin akan mewarnai sel gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. <i>Counterstain</i> 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 6.1. Prosedur pewarnaan Gram.**

**D. Hasil dan Pembahasan****1. Hasil**

(Gambar hasil pewarnaan Gram).

**2. Pembahasan**

(Penjelasan hasil dari praktikum yang telah dilakukan. Penjelasan mengenai setiap reagen yang digunakan. Bandingkan hasil praktikum dengan pustaka).

**E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

**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 :

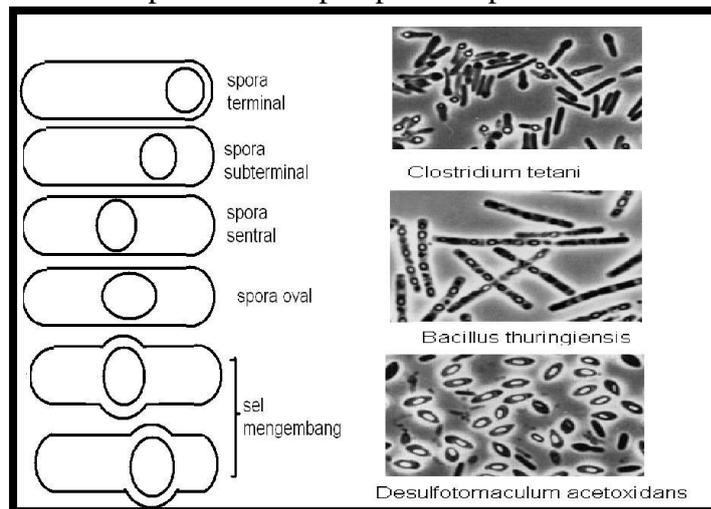
#### A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu melakukan prosedur pewarnaan endospora & kapsul bakteri.
2. Mahasiswa dapat menentukan tipe endospora bakteri *Bacillus subtilis*.
3. Mahasiswa dapat menentukan keberadaan kapsul pada bakteri *Bacillus subtilis*.
4. Mahasiswa dapat membandingkan metode pewarnaan kapsul Burry Gins dan Anthony.

#### 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 refraktif. 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 7.1. Tipe endospora bakteri.**

Beberapa jenis bakteri mengeluarkan bahan-bahan yang berlendir dan lengket pada permukaannya. 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 di alam bebas) atau perlindungan terhadap dehidrasi. Kemampuan menghasilkan kapsul merupakan sifat genetik, tetapi produksinya sangat dipengaruhi oleh komposisi medium tempat ditumbuhkannya sel-sel yang bersangkutan. Ukuran kapsul berbeda-beda menurut jenis bakterinya dan juga dapat berbeda di antara 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

Alat yang digunakan adalah *object glass*, mikroskop, sprayer, pipet tetes, jarum ose, bak pewarnaan, botol spirtus

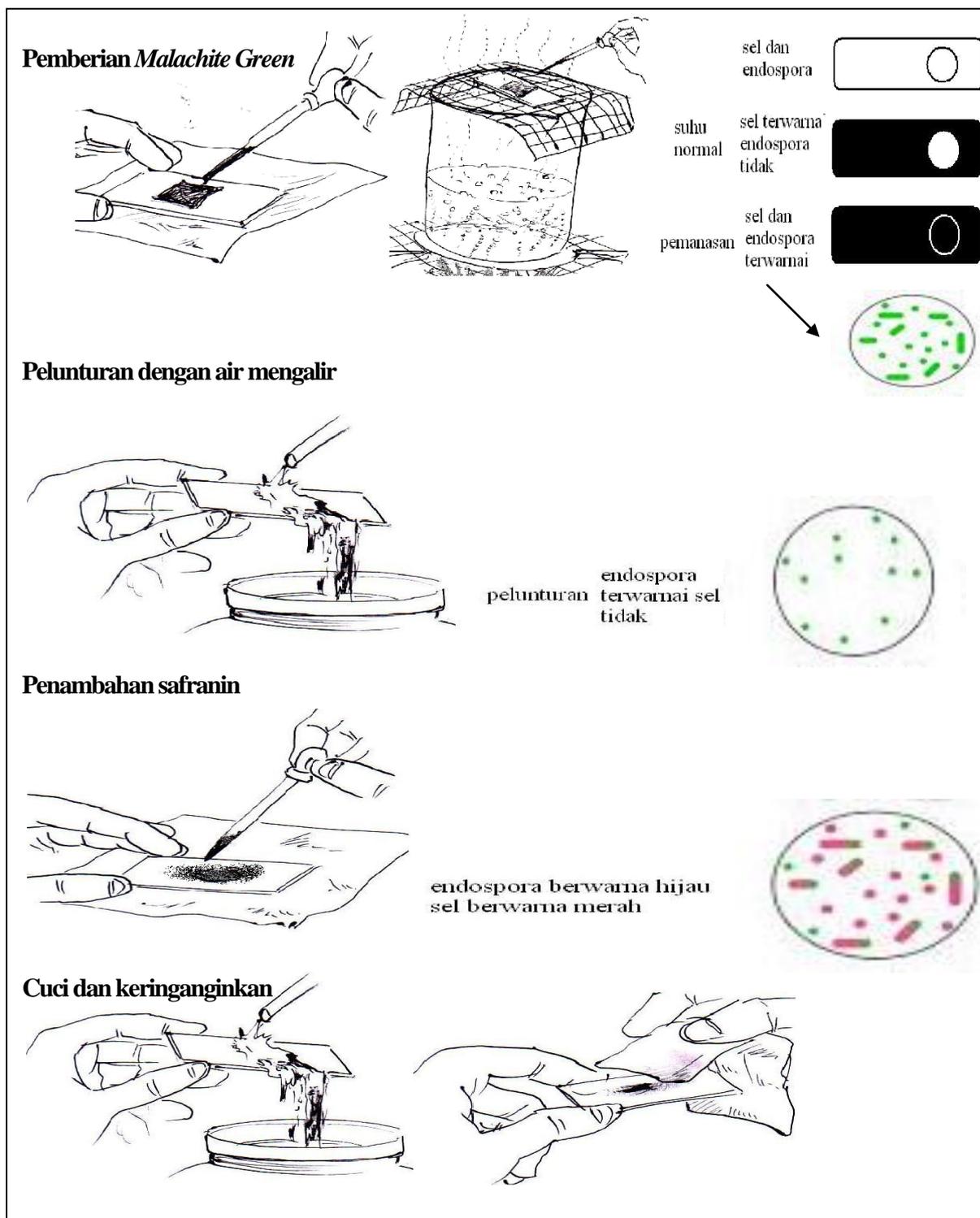
### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Isolat *Bacillus subtilis*, spirtus, alkohol 70%, *Copper sulfate*, akuades, *Carbol fuchsin*, *Malachite Green*, *tissue*, tinta cina / nigrosin, safranin.

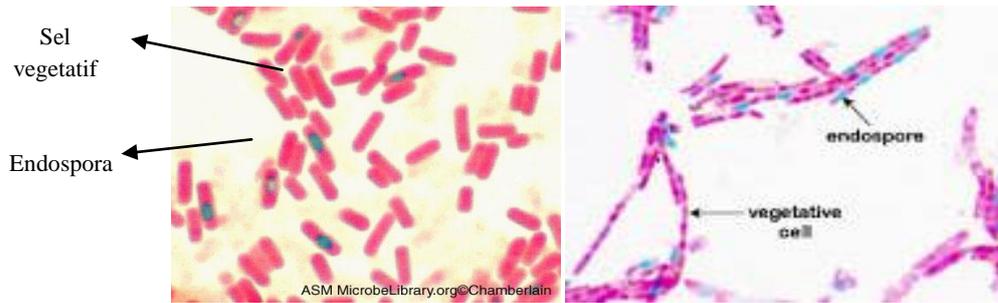
### 3. Prosedur Kerja

#### a. Pewarnaan Endospora

No.	Prosedur Kerja	Hasil
1.	Buat preparat ulas dari <i>Bacillus subtilis</i> lalu tutup dengan kertas merang.	Sel bakteri menempel pada permukaan <i>object glass</i> .
2.	Tetesi ulasan pada <i>object glass</i> dengan <i>Malachite green</i> di atas kertas merang. Letakkan di atas air yang mendidih. Biarkan 5 menit dan dijaga jangan sampai kering. Jika bagian pinggir mulai mengering, tambahkan lagi <i>Malachite green</i> .	<i>Malachite green</i> 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 <i>Malachite green</i> ke dinding endospora.
3.	Setelah dingin, bilas <i>object glass</i> dengan akuades mengalir.	Air digunakan sebagai agen dekolonisasi sel. Setelah perlakuan di atas <i>Malachite green</i> tidak melekat kuat dengan sel vegetatif. Pembilasan dengan akuades akan melunturkan <i>Malachite green</i> pada sel vegetatif.
4.	Tetesi dengan safranin sebagai <i>counter stain</i> , diamkan selama $\pm$ 45 detik.	Safranin akan mewarnai sel vegetatif menjadi merah, warna ini tidak mempengaruhi warna hijau endospora.
5.	Cuci kering anginkan.	



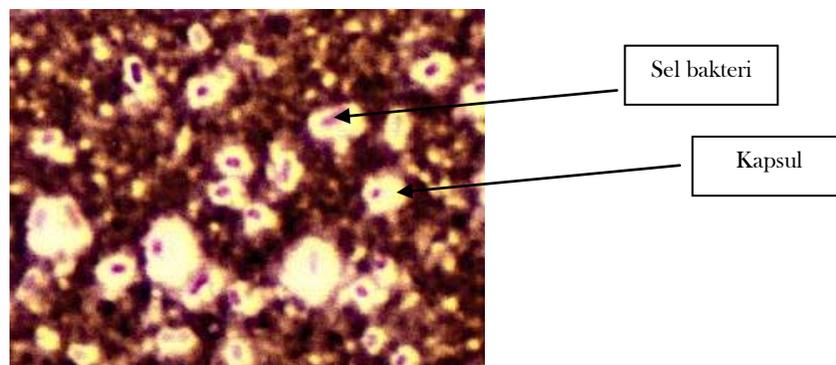
Gambar 7.2. Prosedur Pewarnaan Endospora.



**Gambar 7.3. Pewarnaan Endospora.**

**b. Pewarnaan Kapsul (Metode Burry Gins)**

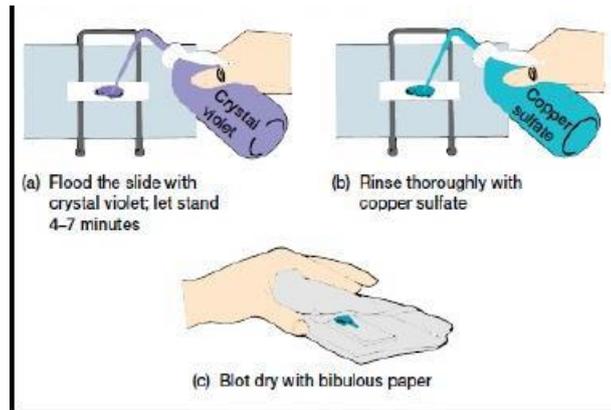
1. Tinta cina / nigrosin diteteskan sebanyak 1 di ujung kanan *object glass*
2. Bakteri diambil 1 ose, campurkan pada tinta cina tersebut, homogenkan
3. Tempelkan sisi *object glass* yang lain kemudian gesekkan ke samping kiri
4. Fiksasi agar bakteri melekat di *object glass*, biarkan sampai dingin
5. 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



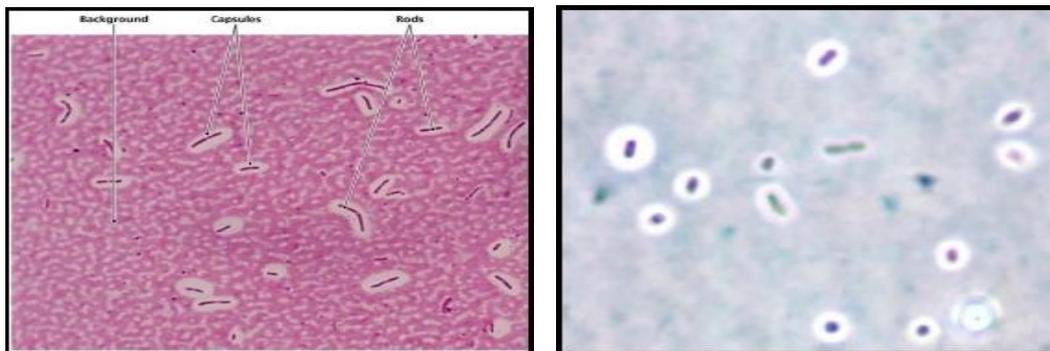
**Gambar 7.4. Pewarnaan Kapsul Metode Burry Gins**

**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 7.5. Metode Pewarnaan Kapsul Anthony**



**Gambar 7.6. Pewarnaan Kapsul Metode Anthony**

#### **D. Hasil dan Pembahasan**

##### **1. Hasil**

(Gambar hasil pewarnaan endospora dan kapsul bakteri).

##### **2. Pembahasan**

(Penjelasan hasil praktikum yang telah dilakukan dibandingkan dengan pustaka.

Penjelasan mengenai reagen dan metode yang digunakan).

#### **E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

#### **F. Daftar Pustaka**

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia).

#### **Disetujui oleh :**

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

## PRAKTIKUM VIII

### MOTILITAS BAKTERI

Tanggal Praktikum:

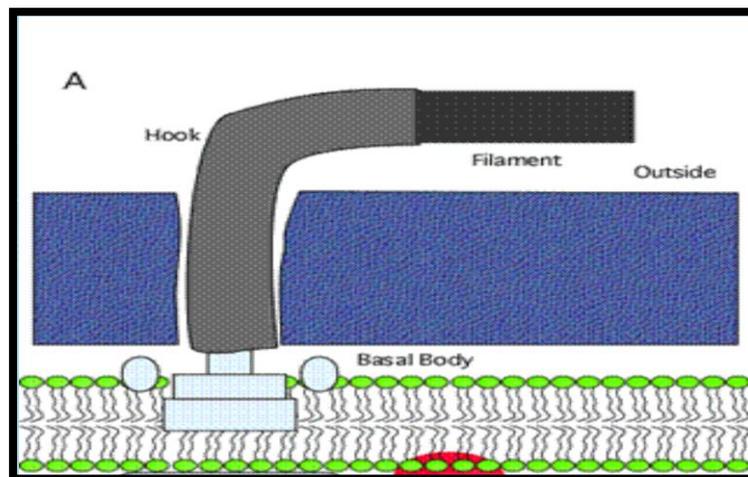
#### A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu melakukan pengamatan motilitas bakteri.
2. Mahasiswa mampu menentukan jenis motilitas pada 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).

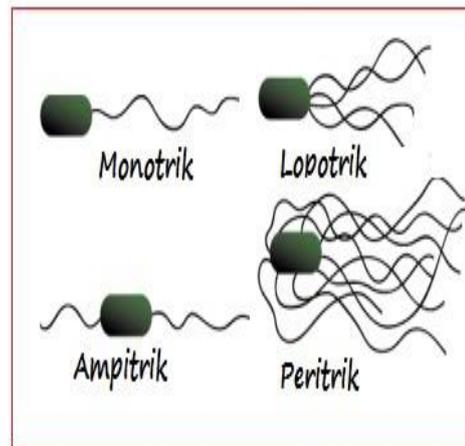


**Gambar 8.1. Struktur Flagela Bakteri.**

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 8.2. Jenis-jenis flagella berdasarkan jumlah & lokasi.**

### C. Metode Kerja

#### 1. Alat

Alat yang digunakan adalah *object glass*, *sprayer*, mikroskop, jarum ose, rak tabung, pembakar spirtus, *cover glass*, pipet tetes, inkubator, tabung reaksi.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel bakteri, alkohol 70%, spirtus, minyak imersi, media NA, aquades.

#### 3. Prosedur Kerja

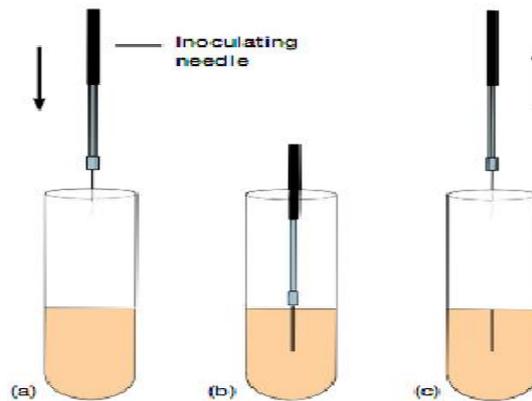
##### a. Pengamatan motilitas Secara langsung

- 1) Biakan bakteri cair ditetaskan ke *object glass*. Apabila menggunakan biakan padat maka ulas dengan jarum ose 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 lurus
- 2) Tanam biakan pada media NA tegak dengan cara tusuk (*Stab inoculation*) sampai  $\frac{3}{4}$  media.
- 3) Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  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



**Gambar 8.3. Pengamatan motilitas secara tidak langsung**

#### D. Hasil dan Pembahasan

##### 1. Hasil

(Gambar hasil pengamatan motilitas secara langsung dan tidak langsung).

##### 2. Pembahasan

(Penjelasan hasil praktikum yang telah dilakukan dibandingkan dengan pustaka. Penjelasan mengenai gerak aktif dan gerak Brown).

#### E. Kesimpulan

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

#### F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

**Disetujui oleh :**

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

## PRAKTIKUM IX

### PENGUKURAN SEL BAKTERI

Tanggal Praktikum:

#### A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan pengukuran sel bakteri.

#### B. Dasar Teori

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

1 skala mikrometer objectif = 0,01 mm / 10  $\mu\text{m}$ .

Kalibrasi dilakukan dengan menghimpitkan skala mikrometer objectif 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 tersebut berhimpitan kembali. Dari hasil tersebut dapat diketahui satu satuan panjang pada skala mikrometer okuler itu berdasarkan beberapa jumlah skala kecil mikrometer objectif yang berada di antara garis yang berhimpit tadi.

Rumus:

$$\begin{aligned}
 1 \text{ skala okuler} &= \text{OD (okuler division)} \times \frac{\text{Jarak yang diketahui antara 2 garis pada mikrometer objectif}}{\text{Jarak skala pada mikrometer okuler}} \\
 &= 0,01 \times \frac{\text{skala objectif}}{\text{skala okuler}} \text{ (mm)} \\
 &= 10 \times \frac{\text{skala objectif}}{\text{skala okuler}} \text{ (\mu m)}
 \end{aligned}$$

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

$$1 \text{ Skala Okuler} = 0,01 \times \frac{\text{skala objectif}}{\text{skala okuler}}$$

$$= 0,01 \times \frac{2}{13} = 0,00154 \text{ mm} = 1,54 \mu\text{m}$$

### C. Metode Kerja

#### 1. Alat

Alat yang digunakan adalah *object glass*, *sprayer*, mikroskop, jarum ose, rak tabung, pembakar spirtus, *cover glass*, pipet tetes steril, inkubator, tabung reaksi.

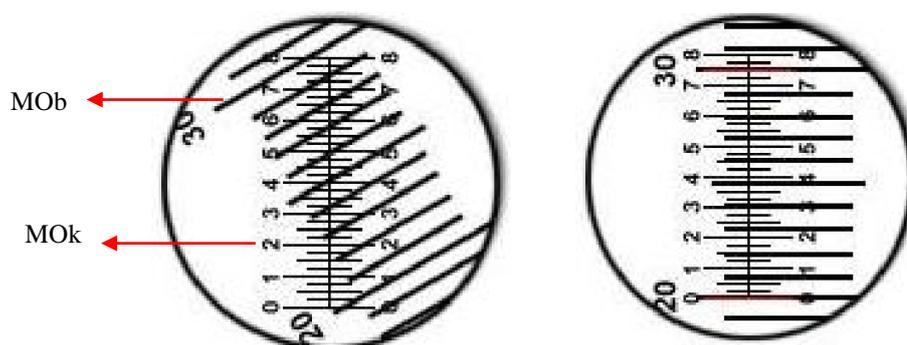
#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel bakteri, alkohol 70%, spirtus, media NA, aquades, minyak emersi

#### 3. Prosedur Kerja

##### a. Kalibrasi

- 1) Mikrometer objektif diletakkan pada meja benda mikroskop dan pasang mikrometer okuler pada tabung lensa okuler mikroskop.
- 2) Tentukan perbesaran yang digunakan, (misalnya 40 x 10) kemudian cari fokus skala mikrometer objektif.
- 3) Skala ke nol mikrometer objektif dihipitkan pada skala nol pada mikrometer 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 9.1. Kalibrasi mikrometer

##### b. Pengukuran sel bakteri

- 1) Mikrometer objektif dilepaskan dari meja benda mikroskop, kemudian ganti dengan preparat awetan bakteri yang akan diukur.

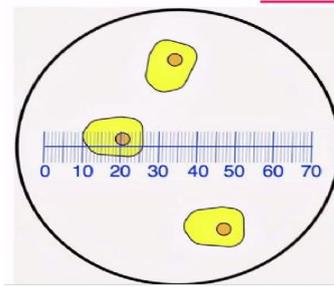
- 2) Cari fokus bayangan preparat tersebut dengan perbesaran yang sama dengan kalibrasi.
- 3) Tentukan sel bakteri yang akan diukur, geser meja preparat agar sel bakteri dapat dihimpitkan pada skala mikrometer okuler.
- 4) Panjang sel diukur menggunakan skala okuler, lakukan hal yang sama untuk mengukur lebar sel, tabung lensa okuler dapat diputar dan dicari posisi yang pas.
- 5) Hitung panjang dan lebar sel sebenarnya :

x skala okuler X hasil kalibrasi

y skala okuler X hasil kalibrasi

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

$2 \times 1,54 = 3,08 \mu\text{m}$



**Gambar 9.2. ilustrasi pengukuran sel menggunakan mikrometer**

#### D. Hasil dan Pembahasan

##### 1. Hasil

(Gambar dan perhitungan hasil kalibrasi dan pengukuran panjang dan lebar sel bakteri).

##### 2. Pembahasan

(Penjelasan dari hasil kalibrasi mikrometer dan pengukuran sel bakteri kemudian dibandingkan dengan pustaka).

#### E. Kesimpulan

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

#### F. Daftar Pustaka

(Tidak diperkenankan sumber dari blog dan wikipedia)

**Disetujui oleh :**

Tanda Tangan Dosen	Nilai	Tanda Tangan Mahasiswa

Catatan : Kelengkapan laporan sesuai yang di praktikumkan.

## PRAKTIKUM X

### PENGHITUNGAN JUMLAH BAKTERI

Tanggal Praktikum:

#### A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan penghitungan bakteri dengan metode Angka Lempeng Total (ALT), *haemocytometer* dan spektrofotometri.

#### 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*.

*Total Plate count* (TPC) atau Angka Lempeng Total (ALT) 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	= $50 \times 10^6$ 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
		= $5 \times 10^8$ CFU's/ml

Pour plate :	koloni = 50	= $50 \times 10^6$ CFU's/ 1 ml
	Fp = $1/10^{-6}$	= 50.000.000 CFU's/ 1 ml

$$\begin{aligned} \text{SP} = 0,1 \text{ ml} &= 500.000.000 \text{ CFU's} / 1 \text{ ml} \\ &= 5 \times 10^7 \text{ CFU's} / \text{ml} \end{aligned}$$

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.

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

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

$$\begin{aligned} N &= \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} \\ &= 537 / 0,022 \\ &= 24.409 \\ &= 24.000 \end{aligned}$$

### 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 digunakan 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

- Hasil yang dilaporkan menggunakan dua angka pertama sebagai pembulatan
- 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
- 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 kedua genap
- Hasil yang dilaporkan dapat berupa pangkat. Data yang dilaporkan harus terdiri dari dua angka.

Contoh:

Hasil perhitungan	ALT
11.700	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

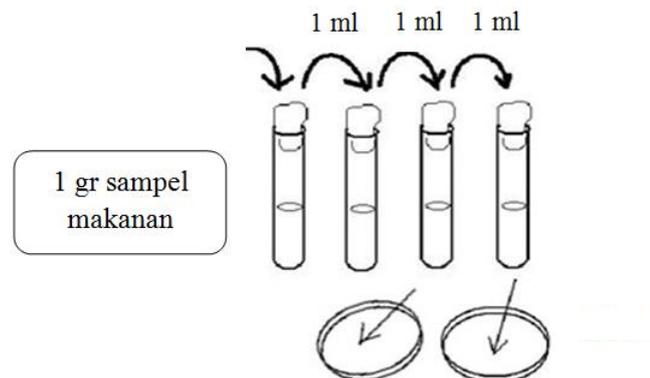
Alat yang digunakan adalah *object glass*, *sprayer*, mikroskop, jarum ose, rak tabung, pembakar spirtus, *cover glass*, pipet tetes, inkubator, tabung reaksi, pembakar spirtus, erlenmeyer, batang drugalski, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, spektrofotometer.

### 2. Bahan

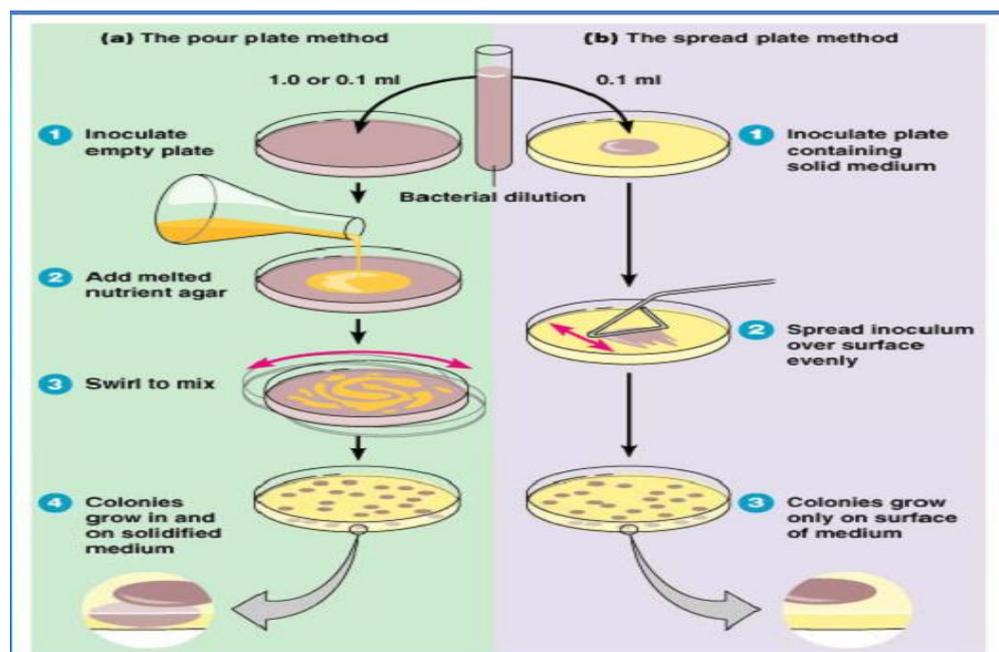
Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri cair usia 24 – 48 jam, sampel makanan, alkohol 70%, spirtus, media NA, NB, aquades, minyak emersi

### 3. Prosedur Kerja

#### a. Angka Lempeng Total (ALT)



Gambar 10.1. Pengenceran bakteri



Gambar 10.2. Prosedur metode (a) *pour plate* dan (b) *spread plate*.

1) *Spread plate*

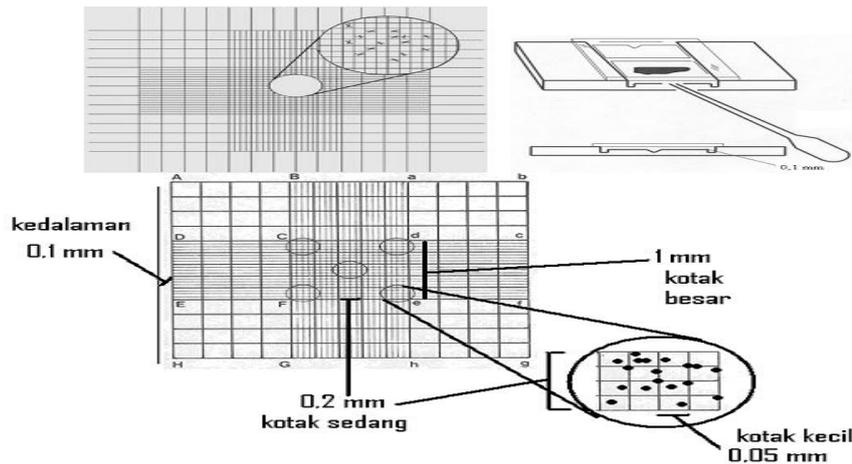
- a) Sampel sebanyak 1 gram dimasukkan ke tabung berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 3.
- b) 2 pengenceran terakhir ditanam sebanyak 0,1 ml ke media NA (*Nutrien Agar*) sebanyak dua kali tiap pengenceran (duplo).
- c) Ratakan dengan batang *drugalsky*
- d) Inkubasi pada suhu 37° C selama 1-2 x 24 jam.
- e) Setelah tumbuh, koloni dihitung dengan persyaratan yang telah diuraikan di atas.

2) *Pour plate*

- a) Sampel sebanyak 1 gram dimasukkan ke tabung berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 3.
- b) 2 pengenceran terakhir diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang masih kosong.
- c) Media NA yang masih cair (suhu  $\pm 45$  °C) ditambahkan ke dalam cawan petri, lakukan secara duplo.
- d) Ratakan dengan cara menggoyangkan cawan petri membentuk angka 8.
- e) Inkubasi pada suhu 37° C selama 1-2 x 24 jam.
- f) Setelah tumbuh, koloni dihitung dengan persyaratan yang telah diuraikan di atas.

**b. *Haemocytometer***

- 1) *Haemocytometer* dibersihkan dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tisu, dengan cara ditempelkan, JANGAN digosok.
- 2) *Cover glass* diletakkan di atas *haemocytometer*.
- 3) Suspensi bakteri dieteskan sebanyak 1 tetes ke parit kaca pada *haemocytometer*. Suspensi sel akan menyebar karena adanya daya kapilaritas.
- 4) Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
- 5) *Haemocytometer* diletakkan pada mikroskop, kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
- 6) Jumlah bakteri dihitung minimal sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.



**Gambar 10.3. Metode perhitungan menggunakan haemocytometer.**

- Luas kotak sedang :  
 $L = p \times l$   
 $= 0,2 \times 0,2 = 0,04 \text{ mm}^2$

- Volume kotak sedang :  
 $V = 0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$   
 $= 0,004 \text{ mm}^3$

(Karena  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ ), maka :  
 $V = 0,004 \text{ mm}^3$   
 $= 0,000004 \text{ cm}^3$   
 $= 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$

Sel/ml :

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

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

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

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

Kotak sedang :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5$$

kotak kecil :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{jumlah sel} \times 4 \times 10^6$$

### c. Spektrofotometri

#### 1) Pembuatan blanko

- 9 ml akuades steril ditambahkan dengan 1 ml media NB setril di dalam tabung reaksi.
- Larutan dipindahkan ke dalam kuvet dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan diatur pada panjang gelombang 600 nm.

#### 2) Penghitungan bakteri

- Bakteri yang berusia 24 jam pada media NB diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril.
- Larutan dipindahkan ke dalam kuvet dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.
- Konversi nilai OD yang didapatkan, dengan rumus baku:

$$\text{Nilai OD } 1 = 10^9 \text{ CFU's/ml}$$

**D. Hasil dan Pembahasan****1. Hasil**

(Gambar hasil dan perhitungan jumlah bakteri metode ALT, haemocytometer dan spektrofotometri).

**2. Pembahasan**

(Penjelasan dari hasil praktikum yang telah dilakukan, kelemahan dan kelebihan dari masing-masing metode sesuai pustaka).

**E. Kesimpulan**

(Kesimpulan berisi hasil secara singkat dan menjawab tujuan).

**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.

**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 AgroBio* 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 Molecular Biologu 3<sup>rd</sup> 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.