

MODUL
PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Disusun oleh :
RIZKI AMELIA NASUTION, M.Si

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUMATERA UTARA
MEDAN
2024

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil Alamin, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga buku modul praktikum mikrobiologi ini dapat diselesaikan sesuai waktu yang dijadwalkan. Buku modul praktikum mikrobiologi ini disusun dengan harapan dapat membantu para mahasiswa untuk lebih mudah mempelajari Mata kuliah mikrobiologi, dan sebagai pedoman dalam melaksanakan kegiatan praktikum mikrobiologi.

Topik-topik praktikum yang ada di dalam modul ini disusun dengan memperhatikan fasilitas yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Prodi Biologi Fakultas SAINS dan TEKNOLOGI UIN Sumatera Utara Medan.

Penulis membaca masih ada kekurangan dalam penyusunan modul ini. Segala macam kritikan dan saran yang membangun dari semua pihak akan dihargai dan diterima dengan lapang hati. Semoga modul ini dapat bermanfaat bagi penggunanya.

Medan, Maret 2024
Penulis,

Dosen Pengampu

VISI MISI PRODI BIOLOGI

A. VISI PRODI BIOLOGI

Unggul dalam bidang biologi khususnya biologi lingkungan dengan paradigma wahdatul ulum tahun 2030

B. MISI PRODI BIOLOGI

- 1. Melaksanakan pendidikan dan pengajaran dalam bidang biologi khususnya biologi lingkungan yang mutakhir dengan paradigma wahdatul ulum;*
- 2. Melaksanakan dan mengembangkan penelitian yang inovatif dalam bidang biologi khususnya biologi lingkungan dengan paradigma wahdatul ulum;*
- 3. Melaksanakan pengabdian kepada masyarakat sebagai implementasi bidang biologi khususnya biologi lingkungan dengan paradigma wahdatul ulum;*
- 4. Membangun jejaring kerjasama dalam pelaksanaan tridarma perguruan tinggi di bidang biologi khususnya biologi lingkungan.*

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Berpakaian rapi, bersepatu dan tidak diperkenankan memakai sandal kecuali dengan alasan yang dapat diterima.
2. Keluar masuk ruangan praktikum harus ijin.
3. Menjaga kebersihan ruang praktikum dengan tidak membuang sampah sembarangan.
4. Praktikan menyediakan sendiri alat tulis dan pensil untuk keperluan menggambar hasil pengamatan.
5. Sebelum praktikum hendaknya mahasiswa telah memahami dan menguasai acara praktikum yang akan dilaksanakan. Sebelum praktikum akan diadakan test.
6. Keterlambatan mengikuti praktikum hanya diberi toleransi selama 15 menit. Bila hadir di ruang praktikum setelah praktikum berlangsung lebih dari 15 menit, mahasiswa tidak diperkenankan mengikuti praktikum.
7. Bila tidak dapat mengikuti praktikum, mahasiswa diwajibkan membuat surat ijin atau ada keterangan dokter bila mahasiswa tidak dapat mengikuti praktikum karena sakit.
8. Mahasiswa diharapkan mengikuti secara penuh seluruh kegiatan praktikum, kehadiran termasuk dalam penilaian.
9. Satu minggu sebelum ujian praktikum dilaksanakan, praktikan harus sudah menyelesaikan seluruh acara praktikum.
10. Ujian praktikum berupa ujian preparat baik mikroskopis maupun makroskopis dan atau gambar atau ujian tertulis.

Tujuan Praktikum untuk:

1. Memahami hal-hal yang bersifat teori/konsep pada perkuliahan.
2. Melatih keterampilan mahasiswa dalam menggunakan mikroskop dan alat laboratorium lainnya.
3. Menambah wawasan dalam memahami konsep/fenomena biologis.

Cara praktikum:

1. Untuk setiap latihan tuliskan judul latihan, tujuan praktikum, nama bahan, gambarlah hasil pengamatan menggunakan pensil dan keterangan gambar menggunakan *ballpoint* atau tinta dan pada gambar diberi nomor sebagai petunjuk bagian yang akan dilaporkan
2. Sebelum menggambar hasil pengamatan tanyakan dulu kepada asisten apakah objek yang akan digambar telah benar.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR

VISI DAN MISI PRODI BIOLOGI

TATA TERTIB PRAKTIKUM

PRATIUM I STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA.....	6
PRATIUM II TEKNIK ISOLASI DAN BIAKAN MURNI	13
PRATIUM III PEWARNAAN GRAM	16
PRATIUM IV PENGUKURAN PERTUMBUHAN MIKROORGANISME.....	16
PRATIUM V PENETAPAN ANGKA LEMPENG TOTAL.....	23
PRATIUM VI UJI BIODIVERSITAS METABOLISME MIKROBA	27
PRATIUM VII UJI KEPEKAAN MIKROBA	31
PRATIUM VIII IDENTIFIKASI JAMUR	33
PRATIUM IX PENETAPAN ANGKA KAPANG KHAMIR	35
PRATIUM X UJI ANGKA PALING MUNGKIN (MPN) KOLIFORM.....	39
DAFTAR PUSTAKA	43

PRATIUM I

STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA

1. Teori Dasar:

A. STERILISASI

Dalam melakukan diagnosa mikrobiologi sterilisasi sangat diutamakan baik alat maupun medianya. Suatu alat dikatakan steril apabila alat atau bahan bebas dari mikroba baik bentuk vegetative maupun spora. Untuk itu sebagai pemula dalam mikrobiologi sangat perlu mengenal teknik sterilisasi, pembuatan media serta teknik penanaman.

Cara sterilisasi yang dipakai tergantung pada macamnya bahan dan sifat bahan yang disterilkan (ketahanan terhadap panas, bentuk yang disterilkan, padat, cair ataupun gas). Penyelidikan suatu spesies mikroorganisme selalu didasarkan atas sifat biakan murni dari spesies mikroorganisme tersebut. Oleh karena itu, untuk dapat memisahkan kegiatan mikroorganisme yang satu dengan yang lain atau untuk memelihara mikroorganisme secara biakan murni, perlu digunakan alat-alat dan medium yang steril (Muhiddin, 2007).

Metode sterilisasi antara lain sterilisasi fisik, kimia dan mekanik. Sterilisasi fisik dipakai bila selama sterilisasi dengan bahan kimia tidak akan berubah akibat temperatur tinggi atau tekanan tinggi. Cara membunuh mikroorganisme tersebut adalah dengan panas. Panas kering membunuh bakteri karena oksidasi komponen – komponen sel (Volk, 2005). Secara umum sterilisasi merupakan proses pemusnahan kehidupan khususnya mikrobial dalam suatu wadah ataupun peralatan laboratorium. Sterilisasi dalam mikrobiologi adalah suatu proses untuk mematikan semua mikroorganisme yang terdapat pada atau didalam suatu benda. Ada tiga cara utama yang umum dipakai dalam sterilisasi yaitu penggunaan panas, penggunaan bahan kimia, dan penyaringan (filtrasi). Apabila panas digunakan bersama-sama dengan uap air maka disebut sterilisasi basah, bila tanpa kelembapan maka disebut sterilisasi kering.

2. Tujuan Instruksioanal

Setelah mengikuti praktikum ini, mahasiswa program studi sarjana (S-1) Farmasi memiliki keterampilan untuk :

- a. Melakukan sterilisasi peralatan dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan mikrobiologi dengan metode yang tepat.
- b. Melakukan sterilisasi alat dan bahan didalam oven dan autoklaf.
- c. Melakukan teknik kerja aseptik.

3. Alat dan Bahan:

Labu Erlenmeyer, tabung reaksi, mat pipet, cawan petri, gelas ukur, gelas beaker, spatula, tali pengikat, kain kasa, pinset, jarum ose, batang penganduk, oven, dan autoklaf, air, aquadest dan deterjen.

4. Prosedur Kerja:

a. Sterilisasi dengan nyala api langsung

Alat-alat yang terbuat dari besi dan logam dibakar langsung diatas api hingga berwarna merah membara. Setelah itu tunggu hingga dingin dan alat tersebut siap digunakan. Alat-alat yang digunakan dengan pembakaran langsung diantaranya adalah kawat ose.

b. Sterilisasi dengan cara pembakaran sekejap

Alat-alat berupa kaca dilewatkan di atas api Bunsen, dengan tujuan agar bakteri yang ada disekitar alat tersebut tidak tumbuh dan berkembang pada saat alat-alat tersebut digunakan dalam proses pemindahan ataupun inokulasi. Alat-alat yang digunakan antara lain cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, dan ujung pipet ukur.

c. Sterilisasi dengan udara panas

Alat-alat dari kaca yang tebal disterilkan didalam oven dengan suhu mulai dari 170-200⁰C selama 1 jam. Bakteri dapat mati dalam suhu yang panas, oleh karena itu alat-alat yang terbuat dari kaca setelah dicuci, dikeringkan, dimasukkan kedalam oven, dipastikan bakteri yang ada pada alat tersebut sudah mati.

d. Sterilisasi menggunakan oven:

Oven pertama kali dihidupkan, kemudian oven di setel suhunya menjadi 170⁰C. Setelah itu biarkan suhu naik hingga sesuai setelan pada oven. Setelah suhu sudah sesuai dengan setelan pertama, maka alat-alat dari kaca yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam oven.

e. Sterilisasi dengan Uap Basah

Alat dan bahan yang tidak tahan terhadap panas, disterilkan di dalam autoklaf. Prinsip dari sterilisasi ini menggunakan uap air yang panas mampu membunuh bakteri yang ada di dalam alat ataupun bahan (media agar) tersebut. Alat-alat atau bahan yang ingin disterilkan dimasukkan dalam autoklaf yang berisi air, air di dalam autoklaf akan mendidih dan menghasilkan uap air. Sterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121⁰C.

Proses pemusnahan dari bakteri yang sudah selesai digunakan dapat juga menggunakan autoklaf sebagai alat untuk memusnahkan bakteri, dan proses pemusnahan

sama seperti pada proses sterilisasi.

Sterilisasi dengan Autoklaf

- Mengisi panci luar dengan air, kalau bisa dengan menggunakan aquadest untuk menghindari pengendapan Ca yang biasa terdapat pada air ledeng, sebanyak 1 liter untuk autoklaf kecil dan 1,5 liter untuk autoklaf yang besar.
- Alat dan bahan yang akan disterilkan, dimasukkan ke dalam panci dalam, susun alat dan bahan tersebut hingga mencapai permukaan panci.
- Atur posisi panci dengan memperhatikan alur tempat saluran uap yang terdapat dalam panci dalam, serta tanda panah yang terdapat pada tutup dan lingkaran permukaan panci luar.
- Tutup dengan erat (kencangkan pengunci tanpa menggunakan alat). Tutup katup pengeluaran uap yang terletak pada tutup autoklaf.
- Letakkan autoklaf di atas kompor gas atau tempat pembakar.
- Panaskan sampai air di dalam autoklaf mendidih dan uap mulai keluar dari katup pengeluaran uap.
- Biarkan hingga mencapai suhu 121⁰C atau tekanan 17,5 Psi. Pertahankan kondisi ini selama 1 jam dan tunggu hingga terdengar bunyi gas pada autoklaf, hitung selama 15 menit kemudian matikan kompor.
- Selama sterilisasi, pengaturan besar kecilnya sumber pembakaran dilakukan secara manual agar suhu tidak terlalu tinggi. Jika menggunakan autoklaf programmable maka dapat di setting waktunya untuk waktu yang diperlukan.
- Setelah proses sterilisasi, api di matikan dan tekanan di biarkan turun sehingga mencapai 0. Autoklaf tidak boleh di buka sebelum tekanan mencapai 0, karena cairan dalam tabung atau erlenmeyer dapat tumpah keluar di sebabkan penurunan suhu yang mendadak.
- Membuka tutup Autoklaf, kemudian mengambil erlenmeyer atau tabung dengan penjepit. Perhatikan bahwa peralatan dan cairan yang baru di keluarkan dari autoklaf bersuhu tinggi sehingga dapat menimbulkan luka bakar.

Sterilisasi dengan bahan kimia

Alat-alat ataupun bahan yang tidak tahan terhadap suhu tinggi, bisa disterilkan dengan cara direndam dalam bahan kimia seperti alkohol 70 %.

- Merendam benih (20 biji) perlakuan dalam alkohol, NaOCL selama 5 menit dan
- Mencuci dengan air steril sebanyak 2 kali, masing-masing perlakuan sebanyak dua kali. Meletakkan benih pada permukaan medium dan di inkubasi selama 2 hari pada temperatur 29°C. Mengamati adanya pertumbuhan mikroba dan mencatat hasil pengamatan pada tabel yang telah di sediakan, kemudian menghitung presentasinya dengan rumus: $A/B \times 100\%$.

5. Hasil Praktikum

- Dibuat dalam bentuk tabel berisi gambar alat untuk sterilisasi dan cara sterilisasi.
- Dibuat dalam bentuk skematik.

6. Tugas

1. Jelaskan pengertian steril,sterilisasi, dan sterilitas!
2. Jelaskan metode-metode sterilisasi dan sebutkan cara mensterilkan peralatan dan bahan yang digunakan dalam percobaan ini?
3. Jelaskan pengertian dan prinsip kerja aseptik!

A. PEMBUATAN MEDIA

1. Teori Dasar

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (nutrien) yang berguna untuk membiakkan mikroba. Dengan menggunakan bermacam-macam media dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis dan perhitungan sejumlah mikroba. Supaya mikroba dapat tumbuh baik dalam suatu media, maka medium tersebut harus memenuhi syarat-syarat, antara lain:

1. Harus mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroba,
2. Harus mempunyai tekanan osmosis,
3. Tegangan permukaan dan Ph yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang akan tumbuh,
4. Tidak mengandung zat-zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba,
5. Harus berada dalam keadaan steril sebelum digunakan, agar mikroba yang ditumbuhkan dapat tumbuh dengan baik (Sutedjo, 1991).

Medium ada yang alami dan ada yang merupakan buatan manusia, contoh medium buatan manusia adalah medium cair, medium kental (padat) dan medium setengah padat. Medium cair digunakan untuk menumbuhkan bakteri dan juga fermentasi. Medium padat digunakan untuk menumbuhkan mikrobia pada permukaan. (Dwidjoseputro, 1994). Larutan pengencer merupakan larutan yang digunakan untuk mengencerkan larutan dengan perbandingan pengenceran tertentu.

Caranya adalah dengan menempatkan pada tabung reaksi kemudian menentukan berapa perbandingan yang digunakan karena tiap perbandingan memiliki ketentuan sendiri-sendiri. Pengenceran dengan larutan pengencer diperlukan sehingga diperoleh pertumbuhan bakteri yang tidak konfluen hingga koloninya mudah untuk dihitung (Sandjaja, 1992).

- **Medium Nutrient Agar (NA)**

Medium *Nutrient Agar* (NA) masuk kedalam medium khusus karena dibuat sebagai tempat menumbuhkan mikroba yang sudah diketahui komposisi pembuatannya. NA di buat dengan komposisi agar – agar yang sudah dipadatkan sehingga NA juga bisa disebut dengan nutrient padat yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Fungsi agar – agar hanya sebagai pengental namun bukan zat makanan pada bakteri, agar dapat mudah menjadi padat pada suhu tertentu. Medium *Nutrient Agar* adalah salah satu medium padat yang memiliki komposisi yaitu agar – agar yang telah di panaskan dan mencair dengan suhu 95⁰C (Dwidjoseputro, 1994). Agar–agar adalah zat pengental dan bukan sebagai sumber makanan bagi bakteri. Agar–agar digunakan untuk membuat medium padat, agar larut dan menjadi padat pada suhu 45⁰C. NA lebih bersifat umum sehingga mikroba banyak tumbuh pada media ini (Amelia *et al*, 2005).

- **Medium Acidified Potato Dextrose Agar (APDA)**

Medium APDA adalah salah satu dari medium untuk proses menumbuhkan mikrobia. APDA merupakan medium yang berkomposisi kentang, dextrose, dan asam tartarat. APDA tidak bersifat umum seperti NA karena tidak semua mikrobia dapat tumbuh pada medium ini. Medium APDA termasuk ke dalam medium yang padat sehingga dapat membentuk koloni mikroba yang dapat dilihat dan dihitung, jika diinokulasikan di dalam medium APDA, bakteri anaerob akan tumbuh mengelompok pada dasar medium, bakteri yang anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar di seluruh medium, bakteri mikroaerofil akan tumbuh mengelompok sedikit di bawah permukaan medium, sedangkan bakteri aerob akan tumbuh pada permukaan medium (Dwidjoseputro, 1994). Medium ini digunakan untuk isolasi bakteri, hasilnya dinyatakan dalam jumlah koloni yang didapatkan nantinya. Medium ini sangat diperlukan untuk mempelajari ciri-ciri koloni, sifat-sifat biokimia, morfologi, reaksi pengecatan, reaksi imunologi dan ketentruman bakteri terhadap zat antibakteri. Pembuatan medium APDA dapat dilakukan dengan serangkaian cara mulai dari pembuatan PDA hingga pencampurannya dengan asam tartarat (Irianto, 2010).

2. Tujuan Intruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Farmasi memiliki keterampilan untuk :

- Membuat media pertumbuhan mikroorganisme sesuai dengan takaran yang dianjurkan dalam pembuatan media.
- Melakukan teknik kerja pembuatan media secara aseptik.

3. Alat dan Bahan

Labu Erlenmeyer, tabung reaksi, mat pipet, cawan petri, gelas ukur, gelas beaker, kapas, kain kasa, batang pengaduk, autokla. Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), dan

4. Prosedur Kerja

Prosedur pembuatan media pertumbuhan dilakukan sesuai dengan petunjuk pembuatan pada label kemasan produk. Medium NA dan PDA dibuat pada cawan petri dan tabung reaksi (media agar miring). Sedangkan media NB dibuat dalam tabung reaksi.

1. Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

- Menimbang 5 gram NA dan memasukan kedalam beaker glass.
- Mencampurkan 1000 ml ke dalam aquades kedalam beaker gelas.
- Mencairkan larutan NA ke dalam beker glass dalam rendaman air mendidih dan aduk terus menerus. Sebagai alternatif lain, dapat juga di masukan pengaduk magnetik (magnetik stirrer) ke dalam beaker glass dan panaskan di atas hot plate.
- Menuangkan sebanyak 200 ml NA kedalam botol scott ukuran 250 ml.
- Menutup dan beri label pada botol scott spidol.
- Diamati bentuk dan warnanya

2. *Nutrien Broth* (NB)

- Dipersiapkan alat dan bahan
- Dilarutkan 1,3 NB dalam 100 ml akuades di erlenmeyer
- Diaduk hingga homogen
- Disumbat mulut erlenmeyer deng kapas dan ditutup dengan aluminium foil
- Disterilkan dalam atoklaf
- Didinginkan
- Diamati bentuk dan warnanya

3. Pembuatan media potato dextrose agar (PDA) untuk cendawan

- Untuk Media konvensional: Menimbang 5 gram kentang, Mengupas dan mencuci bersih kentang. Memotong-motong kentang dengan bentuk dadu kecil. Merebus potongan atau hingga mendidih dan mengaduk secara terus menerus hingga homogen.

- Menyaring sari kentang dengan menggunakan kain muslin dan memasukan ke dalam beaker glass.
- Menimbang 20g dextrose, dan 20g agar
- Mencampurkan sari kentang dengan dextrose dan agar, dan menambahkan aquades hingga volume larutan mencapai 1000 ml.
- Menutup/menyumbat mulut erlenmeyer dengan kapas. Membungkus rapat mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan cling wrap. Memberi label pada erlenmeyer dengan spidol. Setelah itu buat sumbatan kapas untuk menutup erlenmeyer lalu lakukan sterilisasi di dalam autoklaf untuk memperoleh media steril bebas dari mikroba. Diamati bentuk dan warnanya

5. Hasil praktikum : Dibuat dalam bentuk skematik dan amati perubahan warna dari media yang sudah disterilkan.

6. Tugas

1. Jelaskan pengertian dan fungsi media pertumbuhan?
2. Jelaskan cara pembuatan media nutrient agar, nutrient broth dan PDA ?
3. Syarat – syarat apa sajakah yang harus dipenuhi agar suatu medium dapat digunakan?
4. Mengapa dikatakan medium umum, selektif, diferensial, alami, semi sintesis dan medium sintesis ?

PRATIKUM II

TEKNIK ISOLASI DAN BIAKAN MURNI

A. TEKNIK ISOLASI MIKROORGANISME

1. Teori dasar

Mikroorganisme terdapat di mana saja (omnipresent). Sebagian Besar mikroorganisme di Lingkungan tidak berbahaya, tetapi dalam kegiatan mikrobiologi di laboratorium harus dilaksanakan secara hati-hati agar media yang sudah disterilkan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme tersebut.

Isolasi mikroorganisme adalah memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya di media buatan sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni.

2. Tujuan Instruksional

- a. Untuk Mengetahui Teknik Mengisolasi Mikroorganisme
- b. Untuk mengkarakterisasi M.O. yang diisolasi dari Lingkungan

3. Alat dan Bahan

Alat: Cawan petri, Tabung Reaksi dan Bunsen

Bahan: Media NA, PDA, dan Sumber Isolat yang ditentukan

4. Prosedur Kerja

Disiapkan media NA dan PDA yang telah disterilkan. Ditimbang ke dalam cawan petri steril secara aseptis. Diratakan dengan membentuk angka delapan. Dibiarkan hingga memadat. Dimasukkan sumber isolat ke dalam petri yang telah berisi media. Diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator. Kemudian diamati mikroorganisme yang tumbuh dan tentukan karakteristik koloninya berdasarkan tipe koloni, bentuk koloni, elevasi koloni, dan warna koloni. Setelah itu ditentukan satu koloni mikroorganisme untuk dimurnikan dalam kegiatan selanjutnya.

B. TEKNIK BIAKAN MURNI

1. Teori Dasar

Dalam teknik biakan murni tidak saja diperlukan bagaimana memperoleh suatu biakan yang murni, tetapi juga bagaimana memelihara serta mencegah pencemaran dari luar. Inokulasi dimaksudkan untuk menumbuhkan, meremajakan mikroba dan mendapatkan populasi mikroba yang murni. Inokulasi adalah pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi.

Media untuk membiakkan bakteri haruslah steril sebelum digunakan. Pencemaran terutama berasal dari udara yang mengandung banyak mikroorganisme. Pemindehan biakan mikroba yang dibiakkan harus sangat hati-hati dan mematuhi prosedur laboratorium agar tidak terjadi kontaminasi. Oleh karena itu, diperlukan teknik-teknik dalam pemindehan mikroorganisme yang disebut dengan teknik inokulasi biakan.

Isolasi bakteri merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan sehingga diperoleh kultur atau biakan murni. Ada beberapa cara umum yang dapat dilakukan dengan cara goresan (steak plate), cara taburan atau tuang (pour plate), serta mikromanipulator (the micromanipulator methods) (lim,2001). Secara alami, bakteri di alam ditemukan dalam populasi campuran. Hanya dalam keadaan tertentu saja populasi ini ditemukan dalam keadaan tertentu saja populasi ini ditemukan dalam keadaan murni. Untuk dapat mempelajari sifat biakan, morfologi, dan sifat faalinya, maka organisme yang akan diteliti harus dapat dipisahkan. Ini berarti bahwa harus ada biakan murni yang hanya mengandung satu jenis bakteri saja. Untuk memperoleh biakan murni dapat dilakukan pengenceran dengan menggunakan bahan cair atau padat. Pada mulanya digunakan gelatin sebagai bahan pematat. Teknik untuk memperoleh biakan murni ada 3 cara, yaitu: teknik penggoresan agar, teknik agar tuang, teknik agar sebar.

Teknik inokulasi merupakan suatu pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Dengan demikian akan diperoleh biakan mikroorganisme yang dapat digunakan untuk pembelajaran mikrobiologi. Pada praktikum ini akan dilakukan teknik inokulasi biakan mikroorganisme pada medium steril untuk mempelajari mikrobiologi dengan satu kultur murni saja.

Identifikasi biakan mikroorganisme seringkali memerlukan pemindehan ke biakan segar tanpa terjadi pencemaran. Pemindehan mikroorganisme ini dilakukan dengan teknik aseptik untuk mempertahankan kemurnian biakan selama pemindehan berulang kali. Mikroorganisme dapat ditumbuhkan dalam biakan cair atau padat. Kekeruhan dalam kaldu menunjukkan terjadinya pertumbuhan mikroorganisme. Bila mikroorganisme menumpuk pada dasar tabung maka akan membentuk sedimen, sedangkan pada permukaan kaldu pertumbuhannya terlihat sebagai pelikel.

Selain dalam media cair, mikroorganisme juga memperlihatkan pertumbuhan dengan ciri tertentu dalam biakan padat seperti agar miring atau lempengan agar. Agar

miring lazimnya digunakan untuk menyimpan biakan murni sedangkan agar lempengan lazimnya digunakan untuk memurnikan mikroorganisme.

Media untuk membiakkan bakteri haruslah steril sebelum digunakan. Pencemaran terutama berasal dari udara yang mengandung banyak mikroorganisme. Pemindahan biakan mikroba yang dibiakkan harus sangat hati-hati dan mematuhi prosedur laboratorium agar tidak terjadi kontaminasi. Pada praktikum ini akan dilakukan teknik inokulasi biakan mikroorganisme pada medium steril untuk mempelajari mikrobiologi dengan satu kultur murni saja. Diharapkan dengan percobaan ini, mahasiswa mampu mengisolasi dan menginokulasi bakteri dari lingkungannya di alam.

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

- a. Melakukan inokulasi mikroorganisme pada media pertumbuhan padat dan cair;
- b. Memindahkan biakan mikroorganisme dari satu media pertumbuhan ke media pertumbuhan lain;
- c. Melakukan teknik kerja aseptik.

3. Alat dan Bahan

Alat: Cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer, pinset, jarum ose, pipet, kapas, aluminium foil, kain kasa, dan kertas perkamen.

Bahan: Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), Potato Dextrose Agar (PDA), biakan murni bakteri dan jamur.

4. Prosedur Kerja

Satu sengkeli inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masing-masing dipindahkan secara aseptik ke dalam media cair, agar miring, agar tegak, dan media padat cawan petri. Inokulasi dalam cawan petri dilakukan dengan metode gores (*streak*), metode tuang, dan metode sebar (*spread*).

5. Tugas

1. Jelaskan perbedaan inokulasi dan isolasi bakteri!
2. Jelaskan metode-metode inokulasi!
3. Mengapa bakteri diinokulasi pada agar miring dan agar tegak!
4. Jelaskan karakteristik pertumbuhan bakteri dalam media padat !
5. Jelaskan karakteristik pertumbuhan bakteri dalam media cair !

PRATIKUM III

PEWARNAAN GRAM

1. Teori Dasar

Pada umumnya bakteri bersifat tembus cahaya, hal ini disebabkan karena banyak bakteri yang tidak mempunyai zat warna (Waluyo, 2007) . Salah satu cara untuk mengamati bentuk sel bakteri sehingga mudah untuk diidentifikasi ialah dengan metode pengecatan atau pewarnaan. Hal tersebut juga berfungsi untuk mengetahui sifat fisiologisnya yaitu mengetahui reaksi dinding sel bakteri melalui serangkaian pengecatan.

Pewarnaan atau pengecatan terhadap mikroba banyak dilakukan baik secara langsung (bersama bahan yang ada) ataupun secara tidak langsung (melalui biakan murni).

Tujuan dari pewarnaan tersebut ialah untuk :

1. Mempermudah melihat bentuk jasad, baik bakteri, ragi, ataupun fungi.
2. Memperjelas ukuran dan bentuk jasad.
3. Melihat struktur luar dan kalau memungkinkan juga struktur dalam jasad.
4. Melihat reaksi jasad terhadap pewarna yang diberikan sehingga sifat-sifat fisik dan kimia yang ada akan dapat diketahui (Suriawiria, 1999).

Ada tiga macam prosedur pewarnaan, yaitu pewarnaan sederhana (simple stain), pewarnaan diferensial (differential strain), dan pewarnaan khusus (special strain) (Pratiwi, 2008). Pada pewarnaan sederhana hanya digunakan satu macam zat warna untuk meningkatkan kontras antara mikroorganisme dan sekelilingnya. Prosedur Pewarnaan sederhana mudah dan cepat, sehingga pewarnaan ini sering digunakan untuk melihat bentuk ukuran dan penataan pada mikroorganisme bakteri pada bakteri dikenal bentuk yang bulat (coccus), batang (basil), dan spiral (Lay, 1994).

Pewarnaan bakteri yang menggunakan lebih dari satu zat warna seperti pewarnaan gram dan pewarnaan tahan asam. Pewarnaan gram adalah salah satu teknik pewarnaan diferensial yang paling penting dan paling luas digunakan untuk bakteri. Bakteri yang diwarnai dengan metode gram ini dibagi menjadi dua kelompok, salah satu diantaranya bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Pelczar & Chan, 1986).

Pewarnaan bakteri bertujuan untuk memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, untuk melihat struktur luar dan struktur dalam

bakteri seperti dinding sel dan vakuola, menghasilkan sifat-sifat fisik dan kimia yang khas daripada bakteri dengan zat warna, serta meningkatkan kontras mikroorganisme dengan sekitarnya. Teknik pewarnaan warna pada bakteri dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu pengecatan sederhana, pengecatan diferensial dan pengecatan struktural. Pemberian warna pada bakteri atau jasad- jasad renik lain dengan menggunakan larutan tunggal suatu pewarna pada lapisan tipis, atau olesan, yang sudah difiksasi, dinamakan pewarnaan sederhana. Prosedur pewarnaan yang menampilkan perbedaan di antara sel-sel mikroba atau bagian- bagian sel mikroba disebut teknik pewarnaan diferensial (Pelczar & Chan, 2007). Teknik pewarnaan warna pada bakteri dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu pengecatan sederhana, pengecatan diferensial dan pengecatan struktural. Pemberian warna pada bakteri atau jasad- jasad renik lain dengan menggunakan larutan tunggal suatu pewarna pada lapisan tipis, atau olesan, yang sudah difiksasi, dinamakan pewarnaan sederhana. Prosedur pewarnaan yang menampilkan perbedaan di antara sel-sel mikroba atau bagian-bagian sel mikroba disebut teknik pewarnaan diferensial (Pelczar & Chan, 2007).

Bakteri yang diwarnai dengan teknik pewarnaan Gram terbagi dua golongan, yaitu: Gram positif, bila warna zat pewarna pertama (karbol gentian violet) tetap bertahan, dengan demikian warna sel bakteri tampak ungu tua; dan Gram negatif, bila warna zat pewarna pertama tidak bertahan (luntur) kemudian tercat oleh zat pewarna tandingannya, misal: air fuchsin, safranin, dan oleh zat pewarna tandingan lainnya. (Razali, 1987)

Penyebab terjadinya dua golongan bakteri yaitu Gram positif dan Gram negatif ialah setelah diberi zat pewarna fenomenanya ini, berhubungan dengan struktur dan komposisi dinding sel. Perbedaan ketebalan antara kedua golongan itu dapat merupakan hal yang penting; dinding sel bakteri Gram negatif pada umumnya lebih tipis dari yang dimiliki bakteri Gram positif. Presentasi kandungan lipid bakteri Gram negatif lebih tinggi daripada Gram positif. Kenyataannya dalam eksperimen pengecatan menunjukkan bahwa perlakuan dengan alkohol mengesktrak lipid, yang menyebabkan porositas atau permeabilitas dinding sel meningkat. Dengan demikian, kompleks karbol gentian violet dan lugol dapat disari keluar dan bakteri Gram negatif terwarnakan. Keterangan lain yang hampir sama juga mendasarkan pada perbedaan permeabilitas antara kedua golongan bakteri itu, yaitu pada bakteri Gram negatif kandungan peptidoglikan jauh lebih sedikit sehingga kerapatan jalinannya jauh lebih sedikit daripada bakteri Gram positif. Pori-pori dalam peptidoglikan bakteri Gram negatif tetap masih cukup besar untuk dapat disari keluar kompleks karbol gentian violet dan lugol. Selanjutnya, bila sel-sel Gram positif diperlakukan dengan lisozim untuk menyingkirkan dinding selnya, sisa strukturnya yang disebut protoplas atau sel tanpa dinding akan tercatat juga oleh kompleks karbol gentian violet dan lugol.

Tetapi, sel ini mudah dihapuskan oleh alkohol. Kenyataan ini menunjukkan bahwa struktur dinding sel bakteri Gram positif itu yang menjadi tempat tertahannya zat pewarna pertama yaitu karbol gentian violet. (Razali, 1987).

Zat warna adalah senyawa kimia berupa garam-garam yang salah satu ionnya berwarna. Garam terdiri dari ion bermuatan positif dan ion bermuatan negatif. Senyawa-senyawa kimia ini berguna untuk membedakan bakteri-bakteri karena reaksinya dengan sel bakteri akan memberikan warna berbeda. Dengan demikian warna sel bakteri tampak ungu tua; dan Gram negatif, bila warna zat pewarna pertama tidak bertahan (luntur) kemudian tercat oleh zat pewarna tandingannya, misal: air fuchsin, safranin, dan oleh zat pewarna tandingan lainnya. (Razali, 1987). Perbedaan inilah yang digunakan sebagai dasar pewarnaan bakteri. Sel-sel warna dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu asam dan basa. Jika warna terletak pada muatan positif dari zat warna, maka disebut zat warna basa. Jika warna terdapat pada ion negatif, maka disebut zat warna asam. Contoh zat warna basa adalah methylen blue, safranin, netral red, dan lain-lain. Sedangkan anionnya pada umumnya adalah Cl^- , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , COOHCOO^- . Zat warna asam umumnya mempunyai sifat dapat bersenyawa lebih cepat dengan bagian sitoplasma sel sedangkan zat warna basa mudah bereaksi dengan bagian-bagian inti sel. Pewarnaan bakteri dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti : fiksasi, peluntur warna, substrat, intensifikasi pewarnaan dan penggunaan zat warna penutup (Sutedjo, 1991).

Prinsip dasar dari pewarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna. Terdapat tiga macam metode pewarnaan yaitu pewarnaan sederhana, pewarnaan diferensial dan pewarnaan gram. Pewarnaan sederhana menggunakan pewarna tunggal, pewarnaan diferensial memakai serangkaian larutan pewarna atau reagen. Pewarnaan gram merupakan metode pewarnaan yang paling umum digunakan untuk mewarnai sel bakteri (Umsl, 2008).

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

1. Melakukan pewarnaan Gram;
2. Mengidentifikasi morfologi bakteri Gram positif dan Gram negatif;
3. Membedakan bakteri Gram Positif dan Gram negatif.
4. Mengelompokkan bakteri gram positif atau bakteri gram negatif serta menentukan

morfologinya.

3. Alat dan Bahan

Gelas objek, kawat ose, Bunsen, botol air suling, pinset, Pipet tetes, botol semprot, Cover Glass, Object Glass, Kapas dan Mikroskop. Biakan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, alkohol, gentian violet, lugol, safranin, air suling, dan minyak imersi.

4. Prosedur Kerja

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Jarum ose dan mulut tabung dibakar terlebih dahulu agar steril.
2. Cuci gelas objek dengan alkohol 70 % lalu difiksasi.
3. Fiksasi objek glass pada lampu spiritus yang telah dibersihkan dengan alkohol 70 % dan diberi aquades. Letakkan satu tetes air suling pada gelas objek.
4. Suspensikan satu ose biakan koloni bakteri, ratakan dan fiksasi diatas nyala api tetapi jangan terlalu lama diatas nyala api tetapi jangan terlalu lama.
5. Tambahkan satu tetes gentian violet selama 2 menit. Lalu dibilas dengan air mengalir (aquadest). Tambahkan satu tetes larutan lugol, ratakan diamkan selama 1-2 menit dan fiksasi.
6. Cuci gelas objek dengan alkohol 70 % sampai tetesan terakhir tidak berwarna, keringkan.
7. Tambahkan satu tetes safranin,biarkan 15-30 detik, cuci larutan safranin dengan air suling steril,keringkan.Tetesi dengan minyak imersi (imersi oil)
8. Lihat pada mikroskop dengan pembesaran 100 kali, amati warna dan bentuk dari bakteri.warna ungu/violet menunjukkan bakteri Gram positif, dan warna merah jambu (pink) menunjukkan bakteri Gram negatif. Buat hasil dan data dalam tabel.

5. Tugas

1. Mengapa bakteri positif dan Gram negatif memberikan warna yang berbeda?Jelaskan!
2. Apa tujuan fiksasi dan jelaskan cara melakukannya ?
3. Jelaskan fungsi penambahan reagensia pada percobaan ini !
4. Bagaimana cara membuat larutan alkohol 70 %!
5. Jelaskan tentang metode pencatan Ziehl-Nielsen!

PRAKTIKUM IV
PENGUKURAN PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

1. Teori Dasar

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain. Biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Ciri khas reproduksi bakteri ialah pembelahan biner melintang atau satu sel membelah diri, menghasilkan dua sel. Jadi bila dimulai dengan satu bakteri tunggal, maka populasi pertumbuhan secara geometrik;

$$1=2=2^1=2^2=2^3=2^4=2^5 \dots\dots 2^n$$

Berdasarkan satu pola pertumbuhan geometri dari satu sel induk dan menganggap bahwa tidak ada sel anaknya yang mati, jumlah sel N setelah n generasi atau pembelahan, dapat di hitung berdasarkan rumus berikut:

$$N=2^n$$

Pada sistem alami, kita akan menjumpai populasi daripada sel tunggal. Jika kita menyatakan populasi awal N_i , kita dapat menghitung populasi akhir N_t sebagai:

$$N_t=(2^n)N_i$$

Jika kita menggunakan log pada kedua sisi persamaan tersebut yaitu:

$$\text{Log } N_t=n \text{ Log } 2 + \text{Log } N_i$$

Dimana N adalah Jumlah generasi atau pembelahan yang terjadi di dalam waktu t atau

$$N = \frac{t \text{ (waktu pertumbuhan)}}{g \text{ (waktu generasi)}}$$

$$t/g = \frac{\log N_t - \log N_i}{\log 2} \quad \text{atau} \quad g = t \frac{\log 2}{\log N_t - \log N_i}$$

waktu generasi adalah waktu yang diperlukan satu sel untuk membelah diri dari satu sel menjadi 2 sel.

Faktor-faktor yang mempengaruhi waktu generasi adalah:

1. Tipe organisme
2. Fase pertumbuhan
3. Kondisi lingkungan
4. Nutrisi

Metode yang dipakai pada praktikum adalah:

1. Metode aerasi
2. Metode non aerasi
3. Metode cawan tuang

2. Tujuan Instruksional

1. Untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan
2. Untuk mengetahui metode penghitungan bakteri
3. Untuk mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi bakteri
4. Untuk mengetahui kurva pertumbuhan bakteri *B.subtilis*
5. Untuk mengetahui waktu generasi yang diperoleh pada percobaan

3. Alat dan bahan

Erlenmeyer, beaker glass, pipet serologi 1 ml, pipet, cawan petri, tabung reaksi, bunsen, vortex, inkubator, suspensi *B.subtilis* inkubasi 18 jam, media Glukosa Yeast Pepton Agat (GYPA), Glikose Yeast Pepton Broth (GYPB), NA, Alkohol 70%, spiritus, dan desinfektan.

4. Prosedur kerja

Pembuatan suspensi *Saccaromyces cerevisiae*

1 gr *S.cerevisiae* ditambahkan 10 ml aquadest steril, lalu ditambahkan 2 ml GYPB lalu diinkubasi selama 18 jam. Setelah itu dilakukan pengenceran 10^{-6} .

1. Metode Aerasi

Diambil 1 ml dari pengenceran 10^{-6} , dimasukkan ke dalam media GYPB. Dishaker sesuai waktu yang telah ditentukan (t_1, t_2, t_3). Diambil 1 ml dari GYPB dan dimasukkan ke dalam media GYPA. Dihomogenkan, dituangkan ke dalam petri dan diinkubasi selama 24-48 jam lalu diamati.

2. Metode Non Aerasi

Diambil 1 ml dari pengenceran 10^{-6} , dimasukkan ke dalam media GYPB. Didiamkan sesuai waktu telah ditentukan (t_1, t_2, t_3). Diambil 1 ml dari GYPB dan dimasukkan ke dalam media GYPA. Dihomogenkan, dituangkan ke dalam petri dan diinkubasi selama 24-48 jam lalu diamati.

3. Spektrofotometri

Diambil 1 ose bakteri dari kultur murni, dimasukkan ke dalam 10 ml aquadest steril, lalu dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Disediakan blanko (akuades

steril) sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam cuvet. Kemudian dipilih panjang gelombang yang diinginkan. Dibaca nilai absorbansi blangko dan dilanjutkan dengan suspensi bakteri.

5. Tugas

1. Apa perbedaan aerasi dan non aerasi?
2. Sebutkan fase-fase pertumbuhan pada bakteri!
3. Apa faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan?

PRATIKUM V

PENETAPAN ANGKA LEMPENG TOTAL BAKTERI

1. Teori Dasar

Uji angka lempeng total merupakan metode yang umum digunakan untuk menghitung adanya bakteri yang terdapat dalam sediaan yang diperiksa. Uji angka lempeng total dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu teknik cawan tuang (*pour plate*) dan teknik sebaran (*spread plate*). Pada prinsipnya dilakukan pengenceran terhadap sediaan yang diperiksa kemudian dilakukan penanaman pada media lempeng agar. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lempeng agar dihitung setelah inkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai. Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30-300. Angka lempeng total dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengencer.

Metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan Angka Lempeng Total (ALT). Uji Angka Lempeng Total (ALT) dan lebih tepatnya ALT aerob mesofil atau anaerob mesofil menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/gram atau koloni/100ml. Cara yang digunakan antara lain dengan cara tuang, cara tetes, dan cara sebar (BPOM, 2008).

Prinsip pengujian Angka Lempeng Total menurut Metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pada pengujian Angka Lempeng Total digunakan PDF (Pepton Dilution Fluid) sebagai pengencer sampel dan menggunakan PCA (Plate Count Agar) sebagai media padatnya.

Metode yang digunakan untuk menentukan jumlah mikroba dalam bahan pangan antara lain dengan metode permukaan. Agar steril terlebih dahulu dituangkan kedalam cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, kemudian sebanyak 0,1 ml contoh yang telah diencerkan di pipet pada permukaan agar tersebut. Sebuah batang gelas melengkung (hockey stick) dicelupkan kedalam alkohol 70% dan dipijarkan sehingga alkohol habis terbakar. Setelah dingin batang gelas melengkung tersebut digunakan untuk meratakan contoh diatas medium agar dengan cara memutarakan cawan petri diatas meja. Selanjutnya inkubasi dan perhitungan koloni dilakukan seperti pada metode penuangan, tetapi harus diingat bahwa jumlah contoh yang ditumbuhkan adalah 0,1 ml dan harus dimasukkan dalam

perhitungan “Total Count” (Thayib dan Amar, 1989).

Metode hitungan cawan didasarkan pada anggapan bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni. Jadi jumlah koloni yang muncul pada cawan merupakan suatu indeks bagi jumlah organisme yang dapat hidup yang terkandung dalam sampel. Dan mencawakan hasil pengenceran tersebut. Setelah inkubasi, jumlah koloni masing-masing cawan diamati. Untuk memenuhi persyaratan statistik, cawan yang dipilih untuk penghitungan koloni ialah yang mengandung antara 30 sampai 300 koloni. Karena jumlah mikroorganismenya dalam sampel tidak diketahui sebelumnya, maka untuk memperoleh sekurang-kurangnya satu cawan yang mengandung koloni dalam jumlah yang memenuhi syarat tersebut maka harus dilakukan sederatan pengenceran dan pencawanan.

Jumlah organisme yang terdapat dalam sampel asal ditentukan dengan mengalikan jumlah koloni yang terbentuk dengan faktor pengenceran pada cawan yang bersangkutan.

Cara ini yang paling umum digunakan untuk perhitungan jumlah mikrobia. Dasarnya ialah membuat suatu seri pengenceran bahan dengan kelipatan 10 dari masing-masing pengenceran diambil 1 cc dan dibuat taburan dalam petridish (pour plate) dengan medium agar yang macam caranya tergantung pada macamnya mikrobia. Setelah diinkubasikan dihitung jumlah koloni tiap petridish dapat ditentukan jumlah bakteri tiap cc atau gram contoh, yaitu dengan mengalikan jumlah koloni dengan kebalikan pengencerannya, misalnya untuk pengenceran 1:10.000 terdapat 45 koloni bakteri maka tiap cc atau gram bahan mengandung 450.000 bakteri. Untuk membantu menghitung jumlah koloni dalam petridish dapat digunakan colony counter yang biasanya dilengkapi electronic register.

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

- a. Melakukan pengujian angka lempeng total bakteri.
- b. Menghitung jumlah koloni bakteri.

3. Alat dan Bahan

Cawan petri, mat pipet, erlenmeyer, gelas ukur, jarum ose, pipet mikro, neraca analitik, tabung reaksi, stomaker, spreader dan colony counter. Media *Plate Count Agar (PCA)*, *Peptone Dilution Fluid (PDF)*, air suling, biakan jamur.

4. Prosedur Kerja

Ambil 10 ml cuplikan dari masing-masing biakan jamur. Pindahkan secara aseptik kedalam kantong stomaker steril dan tambahkan 90 ml PDF. Homogenkan dengan stomaker selama 30 detik sehingga terbentuk suspensi dengan pengenceran 10^{-1} . Dari suspensi tersebut, encerkan secara bertingkat dalam tabung telah diisi dengan 9 ml PDF, homogenkan hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-6} . Tuang 0,1 ml suspensi ke dalam 15-20 ml media PCA (suhu $45 \pm 1^\circ\text{C}$) pada cawan petri. Putar cawan petri sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata. Buat uji blanko untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Setelah media memadat, inkubasi seluruh cawan pada suhu $35-37^\circ\text{C}$ selm 24-48 Jam dengan posisi dibalik. Amati dan hitung jumlah koloni yang tumbuh.

1. Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni anantara 30-300. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung, lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai angka lempeng total dalam tiap ml contoh.
2. Bila salah satu dari cawan petri menunjukkan jumlah koloni ≤ 30 atau ≥ 300 , hitung jumlah rata-rata koloni, kemudian dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai angka lempeng total dalam tiap ml contoh.
3. Jika terdapat cawan-cawan dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah koloni 30-300, maka hitung jumlah koloni dari masing- masing tingkat pengenceran kemudian dikalikan dengan faktor pengencerannya. Apabila hasil perhitungan pada tingkat yang lebih tinggi diperoleh jumlah koloni rata-rata lebih besar dari dua kali jumlah koloni rata-rata pada pengenceran dibawahnya, maka angka lempeng total dihitung dari tingkat pengenceran yang lebih rendah (misal pada pengenceran 10^{-2} jumlah koloni rata-rata 140, pada pengenceran 10^{-3} jumlah koloni rata-rata 32, maka dipilih jumlah koloni 140×10^2).
4. Bila hasil perhitungan pada tingkat pengenceran lebih tinggi diperoleh jumlah koloni rata-rata kurang dari 2 kali jumlah koloni rata-rata pada pengenceran di bawahnya, maka angka lempeng total dihitung dari rata-rata jumlah koloni kedua tingkat pengenceran tersebut. misal pada pengenceran 10^{-2} jumlah koloni rata-rata 293, pada pengenceran 10^{-3} jumlah koloni rata-rata 41, maka angka lempeng total adalah : $41 \times 10^2 = 4100$ Bila tidak ada satu pun koloni tumbuh dan cawan. Maka angka lempeng total dinyatakan sebagai $<$ dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.
5. Jika seluruh cawan menunjukkan jumlah koloni lebih dari 300, dipilih cawan dari tingkat pengenceran tertinggi kemudian dibagi menjadi beberapa sektor (2, 4 atau 8)

dan dihitung jumlah koloni dari satu sektor. Angka lempeng total adalah jumlah koloni dikalikan dengan jumlah sektor, kemudian dihitung rata-rata dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.

6. Jika jumlah koloni rata-rata dari 1/8 bagian cawan lebih besar dari 200, maka angka lempeng total dinyatakan lebih besar dari 200×8 dikalikan faktor pengenceran.
7. Perhitungan dan pencatatan hasil angka lempeng total hanya ditulis dalam dua angka. Angka berikutnya ke bawah bila kurang dari lima dan dibulatkan ke atas bila lebih dari lima. Sebagai contoh 523×10^3 dibulatkan menjadi 52×10^4 , sedangkan $83,6 \times 10^3$ dibulatkan menjadi 84×10^3 . Jika dijumpai koloni “spreader” meliputi seperempat sampai setengah bagian cawan, maka dihitung koloni yang tumbuh di luar daerah “spreader”. Jika 75% dari seluruh cawan mempunyai koloni “spreader” dengan keadaan seperti di atas, maka dicatat sebagai “Spr”. Untuk keadaan ini harus dicari penyebabnya dan diperbaiki cara kerjanya (pengujian ulang).
8. Jika dijumpai koloni “spreader” tipe rantai, maka tiap satu deret koloni yang terpisah dihitung sebagai satu koloni, dan bila dalam kelompok “spreader” terdiri dari beberapa rantai, maka tiap rantai dihitung sebagai satu koloni.

5. Tugas

1. Jelaskan pengertian angka lempeng total!
2. Mengapa cawan petril diletakkan pada posisi terbalik saat diinkubasi!
3. Mengapa dipilih lempeng dengan jumlah koloni 30-300?
4. Jelaskan apa yang dimaksud dengan koloni “spreader” !
5. Jelaskan faktor-faktor penyebab terbentuknya koloni “spreader” !

PRATIUM VI

UJI BIOKIMIA METABOLISME BAKTERI

1. Teori Dasar

Metabolisme merupakan keseluruhan proses yang terjadi di dalam makhluk hidup yang membutuhkan dan memanfaatkan energi bebas untuk melaksanakan berbagai macam fungsi. Jalur metabolisme merupakan serangkaian reaksi enzimatik yang berurutan yang menghasilkan produk tertentu.

Serangkaian reaksi yang terdapat dalam metabolisme dikelompokkan menjadi dua, yaitu katabolisme dan anabolisme. Katabolisme (reaksi penguraian) adalah reaksi kimia dimana senyawa-senyawa metabolit kompleks diuraikan menjadi produk yang lebih sederhana dengan membebaskan energi. Dimana energi yang dibebaskan selama ini tersimpan dalam bentuk ATP. Sedangkan anabolisme (reaksi pembentukan) adalah reaksi biokimia yang membentuk molekul-molekul sederhana menjadi lebih kompleks, misalnya pembentukan protein dari asam amino.

Uji biokimia didasarkan pada berbagai hasil metabolisme yang disebabkan oleh daya kerja enzim. Berdasarkan tempat kerjanya, enzim terbagi menjadi dua kelompok yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim yaitu enzim yang bekerja di dalam sel. Sistem endoenzim selain bersifat anabolik juga bersifat katabolik. Sedangkan eksoenzim yaitu enzim yang disekresikan keluar sel dan berdifusi ke dalam media. Enzim ini bersifat hidrolitik yang berarti bahwa eksoenzim menguraikan molekul kompleks menjadi sederhana. Dimana molekul yang lebih kecil ini akan memasuki sel dan digunakan untuk kepentingan sel.

Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dalam interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan adanya penambahan reagen kimia. Selain itu juga dapat dilihat dari kemampuannya dalam menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi.

2. Tujuan Instruksional

1. Untuk mengetahui aktivitas metabolisme bakteri yang digunakan
2. Untuk mengetahui media apa saja yang dipakai dalam uji biokimia
3. Untuk mengetahui tujuan dari masing-masing uji yang dilakukan

3. Alat dan Bahan

Rak tabung, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose lurus, jarum ose bengkok, lampu bunsen, pipet tetes, handsprayer dan objek glass. Biakan bakteri, media agar pati, media gelatin, media SCA, media Karbohidrat (sukrosa, glukosa, dan laktosa), media SIM

agar, reagen H₂O₂ 3%, wipol, antis, dan alkohol 70%.

4. Prosedur Kerja

a. Hidrolisi pati

Cairkan media pati steril, kemudian tuangkan ke dalam petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Lalu bagi menjadi dua kuadran. Diambil bakteri dengan menggunakan jarum ose bengkok, lalu goreskan biakan pada masing-masing kuadran. Inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu ruang 37°C di inkubator bakteri. Teteskan iodine pada permukaan koloni bakteri. Uji positif apabila ada zona bening pada koloni.

b. Hidrolisis gelatin

Ambil media gelati semi padat dalam tabung reaksi. Tusuk secara lurus dengan menggunakan jarum ose lurus yang berisi inokulum bakteri (biakan cair) pada bagian tengah media. Inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu ruang 37°C. Masukkan ke dalam pendingin selama 10 menit. Uji positif jika media cair setelah dimasukkan ke dalam pendingin.

c. Uji sitrat

Ambil media SCA (*Simon Citrat Agar*). Lalu goreskan inokulum bakteri pada media dengan menggunakan jarum ose bengkok. Inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu ruang 37°C. Amati perubahan warna pada media. Uji positif terjadi jika terdapat perubahan warna pada media yang semula berwarna hijau menjadi bisru.

d. Uji TSIA

Siapkan media miring (*Slant-Butt*) TSIA. Gores permukaan media dengan ose bengkok yang berisikan inokulum, kemudian tusuk bagian tengah media secara lurus dengan menggunakan ose lurus. Inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu ruang 37°C. Amati perubahan warna, keretakan media dan adanya endapan hitam

e. Uji motilitas

Siapkan media SIM dalam tabung reaksi. Inokulasikan bakteri dengan menggunakan ose lurus pada media dengan cara menusukkannya secara lurus hingga setengah media pada tabung reaksi. Inokulasikan selama 24-48 jam dengan suhu ruang 37°C. Amati tepe bentuk pergerakan bakteri.

f. Uji katalase

Siapkan gelas objek yang bersih. Inokulasikan satu lup biakan bakteri pada

permukaan glas objek. Tambahkan 2-3 tetes H_2O_2 3%, pada permukaan slide. Uji positif apabila terlihat pembentukan gelembung (yang terbentuk dari penguraian H_2O_2).

5. Tugas

1. Apa tujuan dilakukan uji biokimia pada bakteri?
2. Sebutkan jenis-jenis media yang digunakan untuk uji biokimia pada bakteri dan apa gunanya?
3. Sebutkan tipe-tipe alat gerak pada bakteri!

PRAKTIKUM VII

UJI KEPEKAAN MIKROBA

1. Teori Dasar

Antibiotik maupun jenis-jenis antimikroba lainnya telah umum dikenal dikalangan masyarakat. Penggunaan dari antibiotik dan antimikroba ini pun telah meningkat, seiring dengan bermunculannya berbagai jenis infeksi yang kemungkinan ditimbulkan oleh jenis bakteri baru ataupun virus baru. Kenyataannya adalah bahwa penggunaannya dikalangan awam seringkali disalah artikan atau disalah gunakan, dalam artian seringkali dalam menangani suatu jenis infeksi yang tidak tepat, yang berupa pemakaian antibiotik dengan dosis dan lama terapi atau penggunaan yang tidak tepat, karena kurangnya pemahaman mengenai antibiotik ini sendiri. Hal ini yang kemudian hari merupakan penyebab utama dari timbulnya resistensi dari obat-obat antibiotik maupun antimikroba terhadap jenis bakteri tertentu. Obat-obat antimikroba efektif dalam pengobatan infeksi karena kemampuan obat tersebut membunuh mikroorganisme yang menginvasi penjamu tanpa merusak sel.

Dalam percobaan ini akan dilakukan uji sensitifitas atau kepekaan mikroba, yang merupakan suatu teknik untuk menetapkan sensitifitas suatu antibiotika dengan mengukur efek senyawa tersebut pada pertumbuhan suatu mikroorganisme serta berhubungan dengan waktu inkubasi untuk melihat antibiotik mana yang kerjanya lebih cepat menghambat atau membunuh mikroba lain. Alasan penggunaan beberapa macam antibiotik yaitu untuk melihat antibiotik mana yang kerjanya lebih cepat menghambat atau membunuh mikroba, antibiotik mana yang telah resisten dan antibiotik mana yang betul-betul cocok untuk suatu jenis mikroba. Penggunaan atau pemberian antibiotik sebenarnya tidak membuat kondisi tubuh semakin baik, justru merusak sistem kekebalan tubuh karena imunitas bisa menurun akibat pemakaiannya. Alhasil, beberapa waktu kemudian akan mudah jatuh sakit kembali.

Antibiotik hanya melawan infeksi bakteri dan tidak bekerja melawan infeksi virus, gondok dan bronkhitis. Antibiotik yang diperlukan untuk mengobati infeksi virus malah bisa membahayakan tubuh. Hal ini karena setiap kali dosis antibiotik diambil virus tidak terpengaruh, malah sebaliknya, terjadi peningkatan kekebalan bakteri terhadap antibiotik. Bakteri yang kebal dengan antibiotik tidak dapat dibunuh

dengan obat tersebut pada dosis yang sama. Inilah sebabnya mengapa setiap orang harus mengikuti petunjuk yang diberikan oleh dokter sebelum mengambil antibiotik.

Pada percobaan ini dilakukan uji pada beberapa antibiotik terhadap bakteri *E. coli* dan *Enterobacter* untuk mengetahui besar sensitif, resistensi, intermediet dan zona hambat dari setiap antibiotik.

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa akan memiliki keterampilan untuk:

- a. Melakukan pengujian kepekaan mikroba terhadap antibiotik menggunakan metode Kirby- Bauer.
- b. Menentukan zona hambat antibiotik terhadap pertumbuhan mikroba.
- c. Menginterpretasi kepekaan mikroba terhadap antibiotik.
- d. Mengetahui tingkat sensitivitas, intermediet dan resistensi antibiotik terhadap bakteri *Enterobacter* dan *E. coli*.

3. Alat dan Bahan

Cawan petri, pencadangan logam/gelas, pinset, labu tentukur, pipet volumetric, pipet mikro, Bunsen, *Ose loop*, Rak tabung, Tabung reaksi, Inkubator, Tabel disk, Pinset, Penggaris. Antibiotik uji dan baku (kloramfenikol dan tetrasiklin), nutrient agar, air suling, natrium klorida 0,9% asam klorida 0,1 N, mikroba uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*).

4. Prosedur Kerja

Penyiapan Larutan Kloramfenikol

Timbang sediaan uji setara dengan 1 g kloramfenikol, larutkan dalam air suling dan cukupkan hingga 100 ml (konsentrasi 10 µg/ml). Ambil aseptik 2,5 ml larutan tersebut dan encerkan dengan air suling hingga 10 ml untuk memperoleh konsentrasi 2,5 µg/ml.

Penyiapan Larutan Tetrasiklin

Timbang sediaan uji setara dengan 1g tetrasiklin, larutkan dalam asam klorida 0,1 N dan cukupkan hingga 100ml (konsentrasi 10 µg/ml). Ambil aseptik 2,4 ml larutan tersebut dan encerkan dengan air suling hingga 10 ml untuk memperoleh konsentrasi 2,4 µg/ml.

Penyiapan Inokulum *E. coli* dan *S. aureus*

Ambil sengkeli koloni *E. coli* dan *S. aureus* dari biakan agar yang telah diinkubasi selama 24 jam. Pindahkan ke dalam tabung berisi larutan NaCl 0,9% kocok hingga terdispersi secara merata. Encerkan secara bertahap hingga diperoleh inokulum yang menghasilkan transmitan 25% pada panjang gelombang 580 nm.

Pengujian Kepekaan Antibiotik

Siapkan 2 cawan petri steril. Campurkan 0,1 ml inokulum bakteri dengan 15 ml medium agar dalam masing-masing cawan petri, homogenkan, kemudian biarkan sampai media memadat. Tanam 4 cincin pencadangan logam/gelas pada masing-masing cawan. Kemudian masukkan larutan baku kloramfenikol pada cawan petri, salah satu cincin pencadangan diisi dengan larutan blanko. Inkubasi pada suhu 36 – 37⁰C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi, ukur diameter zona hambat disekitar cincin pencadangan menggunakan jangka sorong. Prosedur yang sama dilakukan terhadap tetrasiklin.

5. Tugas

1. Apakah sama daya hambat antimikroba terhadap semua spesies mikroba?
2. Bagaimana kita menentukan bahwa suatu mikroba resisten terhadap zat anti mikroba?
3. Jelaskan prinsip pengujian kepekaan mikroba terhadap antibiotik dengan metode Kirby- Bauer!
4. Jelaskan mengapa inokulum harus diatur agar menghasilkan transmittan 25% pada panjang gelombang 580 nm!
5. Jelaskan pengertian mikroba susceptible, intermediet, dan resisten terhadap antibiotik!
6. Jelaskan metode-metode uji kepekaan mikroba lainnya!
7. Jelaskan aplikasi uji kepekaan mikroba di bidang farmasi klinis!

PRATIUM VIII

IDENTIFIKASI JAMUR

1. Teori Dasar

Jamur sangat erat hubungannya dengan kehidupan manusia. Sedemikian eratnya sehingga manusia tak terlepas dari jamur. Jenis-jenis fungi-fungian ini bisa hidup dan tumbuh di mana saja, baik di udara, tanah, air, pakaian, bahkan di tubuh manusia sendiri. Jamur bisa menyebabkan penyakit yang cukup parah bagi manusia. Penyakit tersebut antara lain mikosis yang menyerang langsung pada kulit, mikotoksitosis akibat mengonsumsi toksin dari jamur yang ada dalam produk makanan dan misetismus yang disebabkan oleh konsumsi jamur beracun.

Sel jamur terdiri dari dua bentuk yaitu bentuk hifa (pseudo hypha) merupakan banyak bentuk negatif dan bentuk spora yang merupakan bagian jamur untuk bertahan hidup di mana kondisi di sekitarnya sangat buruk untuk berkembang biak. Hifa ada yang berseptum dan ada yang tidak berseptum bergantung dengan spesies daripada jamur. Kumpulan daripada hifa disebut miselium. Sampai saat ini dikenal kurang lebih 200.000 spesies jamur, tetapi hanya 50 spesies yang patogen pada manusia yaitu 20 spesies menyerang kulit. 12 spesies menyerang subkutan, 18 spesies menyerang alat bantu atau sistemik.

Jamur pada manusia hidup pada lapisan tanduk. Jamur kemudian melepaskan toksin yang bisa menimbulkan peradangan dan intansi merah dan gatal. Infeksinya bisa berupa bercak-bercak berwarna putih, merah dan hitam di kulit dengan bentuk simetris. Ada pula infeksi yang berbentuk lapisan-lapisan sisik pada kulit. Tergantung pada jenis jamur yang menyerang.

Jamur adalah sekelompok organisme yang digabungkan dalam toksin Kingdom Fungi berdasarkan system Whittaker. Kingdom fungi mempunyai ciri khas yaitu bersifat heterotroph yang mengabsorpsi nutrient dan memiliki kitin pada dinding selnya. Jamur dapat bersifat saprotrop dengan mendapatkan nutrisi dari organisme lain yang mati, bersifat parasit dengan mendapatkan / nutrisi dengan menghisap dari organisme hidup, atau dengan bersimbiosis dengan cara mutualisme bersama satu organisme. Produksi kitin, sejenis polisakarida adalah synapomorphy (sifat yang serupa) antara fungi, choanoflagellata, dan hewan. Adapun jamur dibagi menjadi empat divisi yaitu : Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, dan Deuteromycota (jamur imperfektal).

Pada umumnya jamur bersel banyak, tetapi ada pula yang bersel satu. Berdasarkan

sifat ini pula, maka ukuran jamur sangat bervariasi dari sangat kecil / mikroskopik sampai berukuran cukup besar / makroskopik.

2. Tujuan Intruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

1. Melakukan pemeriksaan jamur;
2. Mengidentifikasi morfologi jamur ;

3. Alat dan Bahan

Gelas objek, jarum ose, bunsen, botol air uling, pinset, dan mikroskop. Biakan jamur, alkohol, air suling, dan minyak imersi.

4. Prosedur Kerja

1. Inokulasi jamur pada media agar, kemudian inkubasi selama 24 jam.
2. Setelah inkubasi, amati secara visual.
3. Untuk pengamatan di bawah mikroskop, cuci gelas objek dengan alkohol lalu fiksasi.
4. Tambahkan satu tetes air suling pada gelas objek lalu suspensikan satu ose biakan jamur, homogenkan, ratakan dan keringkan dengan fiksasi.
5. Cuci gelas objek dengan alkohol 70 % lalu keringkan.
6. Tetesi minyak imersi (immersion oil). Amati pada mikroskop dengan perbesaran 100x
7. Amati warna dan bentuk jamur.

5. Tugas

1. Jelaskan morfologi jamur!
2. Mengapa pengamatan dilakukan secara visual dan mikroskopik!
3. Mengapa pada pemeriksaan jamur tidak menggunakan pereaksi pengecatan Gram
4. Jelaskan metode-metode lain yang digunakan dalam pemeriksaan jamur!
5. Jelaskan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan jamur!

PRATIUM IX

PENETAPAN ANGKA KAPANG KAMIR

1. Teori Dasar

Banyak virus, bakteri, dan jamur menyerang makanan yang masih mentah seperti sayur-sayuran, buah-buahan, susu, daging dan banyak juga menyerang makanan yang sudah dimasak seperti nasi, roti, kue-kue, lauk-pauk dan sebagainya. Kapang adalah mikroorganisme yang termasuk dalam anggota Kingdom Fungi yang membentuk hifa. Kapang bukan merupakan kelompok taksonomi yang resmi, sehingga anggota-anggota dari kapang tersebar ke dalam filum Glomeromycota, Ascomycota, dan Basidiomycota.

Kapang (Inggris: mold) merupakan anggota regnum Fungi ("Kerajaan" Jamur) yang biasanya tumbuh pada permukaan makanan yang sudah basi atau terlalu lama tidak diolah. Sebagian besar kapang merupakan anggota dari kelas Ascomycetes. Kapang bereproduksi dengan menggunakan spora. Spora kapang terdiri dari dua jenis, yaitu spora seksual dan spora aseksual. Spora aseksual dihasilkan lebih cepat dan dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan spora seksual. Spora aseksual memiliki ukuran yang kecil (diameter 1-10 μm) dan ringan, sehingga penyebarannya umumnya secara pasif menggunakan aliran udara. Apabila spora tersebut terhirup oleh manusia dalam jumlah tertentu akan mengakibatkan gangguan kesehatan.

Kapang adalah mikroba yang memiliki lebih dari satu sel berupa benang benang halus yang disebut hifa, kumpulan hifa disebut miselium, dan berkembang biak dengan spora. Khamir adalah mikroba bersel tunggal berbentuk bulat lonjong dan memperbanyak diri dengan cara membentuk tunas (askospora), tetapi tidak membentuk miselium.

Kapang merupakan multiseluler yang bersifat aktif karena merupakan organisme saprofit dan mampu memecah bahan – bahan organik kompleks menjadi bahan yang lebih sederhana. Di bawah mikroskop dapat dilihat bahwa kapang terdiri dari benang yang disebut hifa, kumpulan hifa ini dikenal sebagai miselium.

Analisis kuantitatif mikroorganisme pada suatu sediaan farmasi makanan-minuman dan kosmetik penting dilakukan untuk mengetahui mutu sediaan dan bahan farmasi, makanan, minuman, dan kosmetika (Djide, 2006). Dalam analisis kuantitatif tersebut ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk menghitung atau mengukur jumlah mikroorganisme didalam suatu bahan atau sediaan farmasi, makanan, minuman, dan kosmetika dapat dibedakan sebagai berikut (Radji, 2010) :

1. Angka lempeng total (ALT)

2. Metode filtrasi
3. Angka kapang kamir (AKK)
4. Pemeriksaan bakteri patogen

Angka kapang/khamir menunjukkan adanya cemaran kapang/khamir dalam sediaan yang diperiksa. Setiap sediaan mensyaratkan batas angka kapang/khamir tertentu yang masih dianggap aman. Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni 40-50 buah. Angka kapang/khamir dinyatakan sebagai jumlah koloni kapang/khamir hasil perhitungan dikalikan faktor pengenceran.

Perhitungan angka kapang-khamir bertujuan untuk menentukan jumlah koloni kapang dan khamir yang terdapat didalam suatu sampel. Pada prinsipnya, pengujian ini menggunakan metode yang hampir sama dengan penentuan ALT, hanya berbeda pada media perbenihan yang digunakan. Pada penentuan AKK, digunakan media *sabouraud dextrose agara* (SDA) atau *potato dextrose agar* (PDA) (Radji, 2010).

Jumlah kapang dan khamir di dalam contoh makanan dapat dihitung dengan metode hitung cawan menggunakan medium Potato Dextrose Agar (PDA). Jika didalam contoh diduga mengandung juga bakteri dalam jumlah tinggi, maka pertumbuhan bakteri dapat dihambat dengan menambahkan asam tartarat 10% sterilkan ke dalam PDA setelah sterilisasi. Jumlah yang ditambahkan biasanya adalah 1 mL asam tartarat 10% ke dalam setiap 100 mL PDA steril.

Cara penentuan. Pada pemeriksaan AKK, volume sampel yang dipipet kedalam media SDA/PDA pada setiap pengenceran adalah 0,5 mL. Media pbenihan SDA/PDA dituang terlebih dahulu, kemudian sebanyak 0,5 mL sampel dipipetkan diatas permukaan media, lalu digoyang perlahan sambil diputar sampai merata. Pemeriksaan dilakukan duplo dan disertakan blangko media SDA/PDA (Radji, 2010).

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

- a. Melakukan pengujian angka lempeng total jamur
- b. Menghitung jumlah koloni jamur.

3. Alat dan Bahan

Cawan petri, mat pipet, erlenmeyer, gelas ukur, jarum ose, pipet mikro, neraca analitik, tabung reaksi, stomaker, spreader dan colony counter. Potato Dextrosa Agar (PDA), Plate Count Agar PCA, air suling, jamur.

4. Prosedur Kerja

1. Ambil 10 ml cuplikan dari masing-masing biakan jamur.
2. Pindahkan secara aseptik kedalam kantong stomaker steril dan tambahkan 90 ml PDA.
3. Homogenkan dengan stomaker selama 30 detik sehingga terbentuk suspensi dengan pengenceran 10^{-1} .
4. Dari suspensi tersebut, encerkan secara bertingkat dalam tabung telah diisi dengan 9 ml PDA, homogenkan hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-6} . Tuang 0,1 ml suspensi ke dalam 15-20 ml media PCA (suhu $45 \pm 1^\circ\text{C}$) pada cawan petri.
5. Putar cawan petri sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata. Buat uji blanko untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer.
6. Setelah media memadat, inkubasi seluruh cawan pada suhu $35-37^\circ\text{C}$ selm 24-48 Jam dengan posisi dibalik. Amati dan hitung jumlah koloni yang tumbuh.

Interpretasi

Cara menganalisis hasil pengujian untuk nilai Angka Kapang/Khamir sesuai dengan ketentuan PPOMN (2006) yaitu : cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung jumlah koloni dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang/Khamir dalam tiap gram atau mililiter sampel.

Beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut :

- a. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- b. Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (Misal: pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 30 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada pengenceran 10^{-2} yaitu 60 koloni).
- c. Bila pada pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni kurang dari dua kali jumlah koloni pengenceran dibawahnya, maka diambil angka rata-rata dari jumlah koloni kedua pengenceran tersebut. Hasil dinyatakan sebagai Angka Kapang dan Khamir dalam tiap gram, sampel (Misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 10 koloni, maka Angka Kapang Khamir adalah: $6+10 \times 10^3 = 8 \times 10^3$)

- d. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang/Khamir perkiraan.
- e. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang/Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah ($<1 \times$ faktor pengenceran terendah).

5. Tugas :

1. Mengapa menggunakan media PDA dalam menguji atau pemeriksaan kapang/jamur?
2. Jelaskan mengapa pH PDA perlu diturunkan untuk memeriksa kapang/jamur?
3. Apakah kapang dan jamur sama atau berbeda? jelaskan!

PRATIKUM X

UJI ANGKA PALING MUNGKIN (MPN) KOLIFORM

1. Teori Dasar

Pemeriksaan bakteri patogen bertujuan untuk menentukan apakah suatu produk mengandung bakteri patogen yang tidak diperbolehkan terdapat dalam suatu sediaan farmasi, makanan dan minuman (Radji dan Biomed, 2013). Mikroorganisme yang dimanfaatkan sebagai indikator pencemaran bahan pangan adalah kelompok bakteri yang keberadaannya di makanan diatas batasan jumlah tertentu. Misalnya *Escherichia coli*, koliform dan fecal *Streptococcus* digunakan sebagai indikator penanganan pangan secara tidak higienis, termasuk keberadaan patogen tertentu. Mikroorganisme indikator ini sering digunakan sebagai indikator kualitas mikrobiologi pada pangan dan air (Hasrudin dan Rifnatul, 2014).

Uji MPN (Most Probable Number) Coliform yang umumnya digunakan untuk menghitung jumlah bakteri khususnya untuk mendeteksi adanya bakteri coliform yang merupakan kontaminan. Ciri-ciri utamanya yaitu bakteri gram negatif, batang pendek, tidak membentuk spora, memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas yang dideteksi dalam waktu 24 jam inkubasi pada suhu 37°C (Sunardi, 2014).

Prinsip utama metode ini adalah mengencerkan sampel sampai tingkat tertentu sehingga dihilangkan kisaran jumlah mikroorganisme yang diuji dalam nilai MPN/satuan volume atau massa sampel. Semakin banyak seri tabung maka semakin tinggi akurasi tetapi juga akan mempertinggi biaya analisa (Nova dkk, 2013). Media MPN menggunakan media cair didalam tabung reaksi dimana perhitungannya dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif yaitu yang ditumbuhi oleh bakteri setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan terbentuknya gas di dalam tabung Durham yang diletakkan pada posisi terbalik (Novianti, 2015).

2. Tujuan Instruksional

Setelah mengikuti percobaan ini, mahasiswa Program Studi Sarjana (S-1) Biologi memiliki keterampilan untuk :

- a. Melakukan pengujian angka paling mungkin (MPN).
- b. Menghitung angka paling mungkin koliform.
- c. Menginterpretasi angka paling mungkin koliform.

3. Alat dan Bahan

Stomaker, pipet ukur mulut lebar, tabung reaksi dilengkapi tabung Durham. *Pepton Dilution Fluid* (PDF), *MacConkey Broth* (MCB), *Brilliant Green Lactose Bile 2 % Broth* (BGLB), sumber air bersih, air minum, dan minuman sari buah.

4. Prosedur Kerja

Timbang 25 ml cuplikan sampel dan pindah secara aseptik ke dalam kantong stomaker plastik steril. Tambahkan 225 ml *Pepton Dilution Fluid* (PDF) dan kocok hingga diperoleh suspensi homogen dengan pengenceran 10^{-1} . Buat pengenceran bertingkat dalam tabung reaksi berisi 9 ml PDF hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} .

➤ Uji Presumtif

Siapkan 3 tabung reaksi berisi 9 ml MCB yang dilengkapi tabung Durham untuk setiap pengenceran. Ke dalam tiap tabung dari masing-masing seri masukkan 1 ml suspensi pengenceran. Inkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah Inkubasi, catat dan amati ada tidaknya gas dalam tabung Durham pada tiap tabung reaksi. Kemudian lanjutkan inkubasi hingga 48 jam dan catat tabung – tabung yang menghasilkan gas.

➤ Uji Konfirmasi

Pindahkan 1 sengkeli biakan dari tabung yang menunjukkan uji presumtif positif ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml BGLB yang telah dilengkapi dengan tabung Durham. Inkubasi seluruh tabung pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Amati ada tidaknya gas pada tabung Durham.

Interpretasi

Catat jumlah tabung yang menghasilkan gas dari uji konfirmasi dan rujuk ke Tabel MPN. Angka yang diperoleh pada tabel MPN menyatakan jumlah bakteri koliform dalam tiap gram atau tiap ml contoh yang diuji.

Tabel MPN (cara 3 Tabung)

Indeks MPN dan batas kepercayaan 95 % bila digunakan 3 tabung

Jumlah	Tabung	Positif	MPN per	Batas	95%
			g/ml	Kepercayaan	
1:10	1:100	1:1000		Terendah	Tertinggi
0	0	0	<3	--	--
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
Jumlah	Tabung	Positif	MPN per	Batas	95%
			g/ml	Kepercayaan	
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120

3	0	1	39	7	130
----------	----------	----------	-----------	----------	------------

3	0	2	64	15	380
3	0	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	1	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	2	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	>2400	--	---

Catatan :

Bila seri pengenceran yang digunakan melebihi dari yang tertera pada Tabel MPN, maka hasil yang diperoleh dari Tabel dikalikan faktor 10,100,1000, dan seterusnya. Misal: Bila yang dipilih adalah dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} , maka hasilnya dikalikan dengan 10. Bila yang dipilih adalah pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} , maka hasil; dikalikan dengan 100.

5. Tugas

1. Jelaskan prinsip penentuan angka kemungkinan terdekat (MPN) !
2. Jelaskan cara penyiapan sampel pada penetapan angka kemungkinan terdekat (MPN)!
3. Jelaskan aplikasi angka kemungkinan terdekat (MPN) di bidang farmasi !
4. Jelaskan perbedaan angka lempeng total dengan angka kemungkinan terdekat (MPN)!
5. Jelaskan faktor-faktor yang menyebabkan hasil percobaan pada angka kemungkinan terdekat (MPN) menunjukkan positif palsu !

DAFTAR PUSTAKA

- Holt JC, Bergey DH. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Baltimore: Williams & Wilkins.
- Jawetz M; Adelberg's. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. edisi 23. Alih Bahasa: Huriwati Hartanto dkk. Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran ECG. Cetakan I, 2008.
- Madigan. M. T et al. *Biology of Microorganism*. 10th ed. New York; Southern Illinois University Carbondale, 2003.
- Martinko JM, Madigan MT. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall. 2005.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. UI-Press, 1986
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid 2 UI-Press., 1986
- Schlegel, H.G. dan K. Schmidh. *Mikrobiologi Umum*, GadjahMada University press., 1994.
- Tortora GJ. Funke BR, Case CL. *Microbiology: an Introduction*. 7th ed. Addison Wesley Longman, Inc. California, 2001.
- Waluyo, L. *Mikrobiologi Umum*. UMM Press, 2004