



MODUL BAHAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DAN PARASITOLOGI



**SEMESTER GENAP (II)
PRODI D3 FARMASI
POLITEKNIK KESEHATAN
KEMENKES GORONTALO**



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan segala nikmat kepada kami sehingga penyusun modul praktikum ini dapat diselesaikan sebagai mana mestinya. Modul praktikum ini dimaksudkan sebagai bahan penuntun praktikum yang akan mendukung kelancaran proses pembelajaran dalam laboratorium pada mata kuliah “MIKROBIOLOGI DAN PARASITOLOGI” pada program studi D3 – Farmasi Poltekkes Kemenkes Gorontalo.

Materi-materi yang disajikan dalam modul ini diharapkan dapat memberikan pemahaman mendalam mengenai “Mikrobiologi dan Parasitologi” bagi pengembangan ilmu. Sebagai sebuah karya keilmiaan, kami berharap semoga modul ini menjadi sesuatu yang bermanfaat bagi siapa saja yang membaca dan mempelajarinya. Sebagai sebuah karya pula maka kami menyadari bahwa sudah pasti terdapat kekurangan ataupun kejanggalan di berbagai tempat dalam modul ini. Oleh sebab itu, demi kesempurnaannya di masa mendatang, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat kami harapkan.

Gorontalo, Februari 2021

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

	Hal
Lembar Pengesahan.....	i
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Tata Tertib Laboratorium	v
Modul Praktikum I & II Pengenalan Alat Praktikum dan Teknik Sterilisasi	1
A. Dasar Teori	1
B. Tujuan Praktikum.....	1
C. Petunjuk Umum	1
D. Peralatan Praktikum	2
E. Prosedur Kerja	2
F. Hasil Pengamatan.....	15
Modul Praktikum III Pembuatan Media.....	16
A. Dasar Teori	16
B. Tujuan Praktikum.....	20
C. Petunjuk Umum	20
D. Alat dan Bahan.....	20
E. Prosedur Kerja	21
F. Hasil Pengamatan.....	21
Modul Praktikum IV Isolasi Mikroorganisme.....	23
A. Dasar Teori	23
B. Tujuan Praktikum.....	24
C. Petunjuk Umum	25
D. Alat dan Bahan.....	25
E. Prosedur Kerja	25
F. Hasil Pengamatan.....	26
Modul Praktikum V Inokulasi Mikroorganisme	27
A. Dasar Teori	27
B. Tujuan Praktikum.....	29
C. Petunjuk Umum	29
D. Alat dan Bahan.....	29
E. Prosedur Kerja	30
F. Hasil Pengamatan.....	31
Modul Praktikum VI Pewarnaan Gram.....	32
A. Dasar Teori	32
B. Tujuan Praktikum.....	32
C. Petunjuk Umum	33
D. Alat dan Bahan.....	33

E. Prosedur Kerja	33
F. Hasil Pengamatan.....	34
Modul Praktikum VII Pemeriksaan Jamur	35
A. Dasar Teori	35
B. Tujuan Praktikum.....	36
C. Petunjuk Umum	36
D. Alat dan Bahan.....	36
E. Prosedur Kerja	37
F. Hasil Pengamatan.....	37
Modul Praktikum VIII Pengaruh Lingkungan Terhadap Pertumbuhan	
Mikroorganisme	38
A. Dasar Teori	38
B. Tujuan Praktikum.....	38
C. Petunjuk Umum	39
D. Alat dan Bahan.....	39
E. Prosedur Kerja	39
F. Hasil Pengamatan.....	40
Modul Praktikum IX Angka Lempeng Total Bakteri.....	41
A. Dasar Teori	42
B. Tujuan Praktikum.....	42
C. Petunjuk Umum	42
D. Alat dan Bahan.....	42
E. Prosedur Kerja	42
F. Hasil Pengamatan.....	43
Modul Praktikum X Uji <i>Most Probable Number</i> (MPN) Coliform.....	45
A. Dasar Teori	45
B. Tujuan Praktikum.....	46
C. Petunjuk Umum	46
D. Alat dan Bahan.....	46
E. Prosedur Kerja	47
F. Hasil Pengamatan.....	48
Modul Praktikum XI Uji Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotika	51
A. Dasar Teori	51
B. Tujuan Praktikum.....	51
C. Petunjuk Umum	52
D. Alat dan Bahan.....	52
E. Prosedur Kerja	52
F. Hasil Pengamatan.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54

TATA TERTIB LABORATORIUM

- 1) Mahasiswa memasuki ruang Laboratorium **HARUS** tertib dan sesuai dengan jadwal mata pelajaran.
- 2) Mahasiswa **HARUS** memakai APD (Jas lab, masker, sarung tangan, penutup kepala dan sepatu) selama berada di dalam laboratorium.
- 3) Mahasiswa **DILARANG** masuk ke ruang Laboratorium tanpa seizin dosen maupun instruktur
- 4) Mahasiswa **DILARANG** membawa makanan/ minuman ke ruang Laboratorium, kecuali untuk praktikum.
- 5) Selama praktikum berlangsung, mahasiswa **HARUS** menjaga kebersihan ruang laboratorium.
- 6) Mahasiswa melakukan praktikum **HARUS** sesuai dengan petunjuk pada lembar kerja atau petunjuk langsung dari dosen maupun instruktur
- 7) Bertanyalah pada dosen maupun instruktur apabila kurang paham tentang praktikum yang akan dilaksanakan.
- 8) Mahasiswa **HARUS** menggunakan bahan sesuai dengan petunjuk dan berpedoman pada keselamatan kerja di Laboratorium
- 10) Mahasiswa **DILARANG** bermain-main selama praktikum berlangsung.
- 11) Jika dalam praktikum mahasiswa merusakkan/ memecahkan alat, maka yang bersangkutan **HARUS** menggantinya.
- 12) Jika dalam praktikum terjadi kecelakaan (kena pecahan kaca, terbakar, tertusuk, tertelan bahan kimia) harap segera melapor kepada dosen maupun instruktur
- 13) Setelah menyelesaikan pratikum, semua peralatan **HARUS** dibersihkan dan disimpan kembali ke dalam ruang penyimpanan alat.
- 14) Mahasiswa dipersilahkan meninggalkan ruang Laboratorium setelah melaporkan hasil praktikum
- 15) Sebelum meninggalkan ruang Laboratorium, meja praktikum **HARUS** dalam keadaan bersih, kursi diletakkan dibagian belakang, kran air dan gas ditutup rapat, kontak listrik dicabut serta AC dimatikan.

MODUL PRAKTIKUM I

PENGENALAN ALAT PRAKTIKUM DAN TEKNIK STERILISASI

A. DASAR TEORI

Laboratorium mikrobiologi adalah salah satu laboratorium yang wajib ada pada program diploma 3 farmasi karena laboratorium ini sangat menunjang pembuatan produk-produk atau sediaan farmasi. Berbagai sediaan obat dan makanan serta minuman yang akan dipasarkan untuk publik memiliki syarat tertentu terhadap cemaran mikroba, bahkan obat-obat steril harus bebas dari cemaran mikroba dan bahan-bahan lain yang mengancam keselamatan penggunaannya.

Selama melakukan kegiatan dalam laboratorium, praktikan harus tetap menjaga keamanan dan keselamatan diri, oleh karena itu tahap pengenalan alat dan proses sterilisasi menjadi amat penting diketahui dan dipahami oleh para mahasiswa yang akan bekerja di dalamnya. Selain penggunaan alat pelindung diri (APD) di laboratorium, mahasiswa juga perlu mengenal dan paham cara menggunakan alat-alat yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi. Beberapa alat laboratorium tersebut meliputi alat-alat yang besar seperti mikroskop, autoklaf, inkubator, oven, lemari pendingin dan colony counter. Alat-alat lain adalah alat-alat kecil seperti mikropipet, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, tabung durham, kawat ose/sengkelit, pinset, timbangan dan lain-lain.

Untuk melakukan proses sterilisasi juga diperlukan pengetahuan yang cukup tentang alat dan proses-proses sterilisasi yang akan digunakan atau dipilih. Proses sterilisasi biasanya menggunakan alat-alat dan persyaratan tertentu yang harus dipelajari secara spesifik, apalagi untuk bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan sediaan farmasi. Oleh karena itu modul persiapan praktikum ini juga memiliki peran yang penting untuk melakukan tahap- tahap praktikum mikrobiologi berikutnya.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mengetahui alat-alat yang akan digunakan dalam praktikum mikrobiologi dan dapat menggunakannya secara benar
2. Memahami macam-macam teknik sterilisasi

C. PETUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum.
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja.
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur.

D. PERALATAN PRAKTIKUM

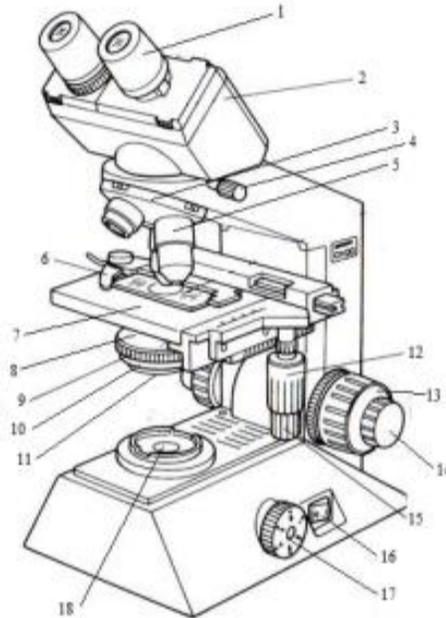
Alat-alat laboratorium yang umum digunakan dalam praktikum mikrobiologi antara lain :

- | | | |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| 1. Mikroskop | 7. Hotplate Stirrer | 13. Tabung Reaksi |
| 2. Autoklav | 8. Mikropipet | 14. Gelas Ukur |
| 3. Oven | 9. Cawan Petri | 15. Tabung Durham |
| 4. Inkubator | 10. Labu Erlenmeyer | 16. Kawat Ose |
| 5. Colony Counter | 11. Pipet Tetes | 17. Pinset |
| 6. Lemari Pendingin | 12. Pipet Ukur | |

E. PROSEDUR KERJA

1. Pengawas praktikum mendemonstrasikan cara penggunaan alat yang benar sambil menjelaskan fungsi beberapa instrument berikut :
 - a) Mikroskop: digunakan untuk mengamati mikroorganisme yang sangat kecil ukurannya. Bagian-bagian dari mikroskop cahaya adalah:
 - 1) Lensa Okuler, berfungsi untuk berfungsi untuk memperbesar bayangan objek, gambar yang ditangkap oleh lensa objektif
 - 2) Tabung mikroskop/Tubus, berfungsi untuk mengatur fokus
 - 3) Revolver, berfungsi untuk memilih lensa obyektif yang akan digunakan
 - 4) Pengunci Tabung tubus, berfungsi untuk megunci posisi tabung dan lensa okuler
 - 5) Lensa Objektif, berfungsi untuk menentukan bayangan objektif serta memperbesar benda.
 - 6) Penjepit Preparat, berfungsi untuk menjepit preparat yang akan diamati agar tidak bergeser.
 - 7) Meja preparat, berfungsi untuk meletakkan preparat yang akan diamati.
 - 8) Kondensor, berfungsi untuk memfokuskan/mengumpulkan cahaya ke benda yang sedang diamati
 - 9) Pemutar Kondensor, berfungsi mengatur kondensor naik atau turun
 - 10) Pemutar Kondensor, berfungsi mengatur kondensor naik atau turun
 - 11) Diafragma, berfungsi untuk mengatur cahaya yang akan masuk ke mikroskop
 - 12) Pengatur penjepit preparat, mengatur penjepit preparat ke kiri atau kanan
 - 13) Makrometer sekrup, berfungsi untuk mencari fokus bayangan objek secara cepat
 - 14) Mikrometer sekrup, berfungsi untuk memfokuskan bayangan objek secara lambat
 - 15) Pengatur penjepit preparat, berfungsi mengatur penjepit preparat kedepan atau kebelakang

- 16) Sakelar Lampu/tombol on atau off, berfungsi memutuskan aliran listrik atau menghubungkan aliran listrik ke mikroskop
- 17) Pengatur Intensitas Cahaya, berfungsi mengatur lampu redup atau nyala terang
- 18) Lampu, sumber cahaya pada mikroskop



Cara menggunakan mikroskop yang baik dan benar adalah sebagai berikut :

1) Meletakkan mikroskop pada permukaan bersih dan datar

Sebelum meletakkan mikroskop, kita harus membersihkan terlebih dahulu permukaan dari debu atau cairan yang berpotensi merusak mikroskop. Mikroskop juga harus diletakkan di dekat kontak listrik.

Cara membawa mikroskop yaitu dengan memegang pegangan mikroskop dan bagian bawah mikroskop, jangan hanya memegang bagian pegangan mikroskopnya saja. Setelah itu, letakkan mikroskop pada meja dan colokkan mikroskop ke sumber listrik.

2) Memutar lensa objektif sampai pembesaran terendah berada di atas meja mikroskop

Untuk memulai menggunakan mikroskop, pembesaran paling rendah berfungsi baik karena memungkinkan kita untuk melihat area paling luas dari sampel. Pembesaran biasanya ditulis pada samping lensa objektif dalam bentuk nomor dan huruf 'x', contohnya 4x. Semakin rendah nomornya, maka semakin rendah pembesarannya. Lebih mudah untuk fokus pada bagian yang spesifik dengan lensa objektif ini. Jika kita ingin mengganti lensa objektif, kita harus memperhatikan meja mikroskopnya. Karena lensa objektif dengan pembesaran tinggi mempunyai ukuran lebih panjang dan bisa merusak sampel jika kita tidak memperhatikannya.

3) Mempersiapkan slide mikroskop

i. Mencuci tangan sebelum memulai

Tangan kita mengandung minyak yang berpotensi masuk ke dalam sampel kita. Minyak ini bisa merusak sampel kita atau bahkan mikroskop. Menggunakan sarung tangan bisa menjadi alternatif yang baik. Selain itu, kita harus menjaga tangan dan area kerja kita dari debu dan partikel kontaminasi sebisa mungkin.

ii. Menggunakan Kaca Preparat

Kaca preparat adalah sebuah kaca yang digunakan sebagai tempat meletakkan sampel untuk diteliti. Sampel diletakkan di atas kaca preparat, kemudian ditutup menggunakan kaca tipis. Berikan sedikit tetesan air pada kaca preparat agar bagian kaca tipis bisa melekat stabil pada kaca preparat.

iii. Meletakkan Kaca Preparat pada Meja Mikroskop

Cara mengambil kaca preparat adalah dengan memegang bagian ujungnya, agar tidak ada sidik jari yang tertempel pada bagian kaca yang hendak diamati. Sidik jari dan minyak dari tangan bisa mengkontaminasi kaca preparat. Jika kaca preparat kotor, bersihkan menggunakan lap bersih, seperti sapu tangan

iv. Mengunci Kaca Preparat

Ada dua klip (biasanya terbuat dari logam atau plastik) pada meja mikroskop yang berfungsi untuk mengunci kaca preparat agar stabil dan kita bisa fokus pada mikroskop

v. Menyalakan Mikroskop

Switche untuk menyalakan mikroskop biasanya terletak di samping mikroskop. Jika mikroskop sudah menyala, bagian tengah dari kaca preparat akan muncul sinar bulat kecil. Jika tidak ada sinar muncul, coba untuk mengatur diafragma. Jika diafragma tertutup, tidak akan ada sinar yang muncul

4) Mengatur focus mikroskop

i. Mengatur focus pada lensa objektif

Di dalam mikroskop mungkin ada 2 atau tiga lensa objektif berbeda yang bisa diganti untuk memperbesar objek. Kita harus mulai mengamati sampel dengan menggunakan lensa objektif 4x dan meningkatkan pembesaran hingga fokus. Biasanya, lensa objektif 4x (kadang 3,5x) adalah pembesaran terendah pada kebanyakan mikroskop. Lensa objektif yang rendah memberikan penglihatan yang luas, dan memungkinkan kita untuk perlahan memfokuskan objek, teknik ini disebut *scanning objective*. Jika kita memulai

pengamatan menggunakan lensa objektif tinggi, kita mungkin tidak akan melihat objek secara penuh dan akan kesulitan mencari objek yang ingin kita amati. Biasanya, lensa objektif mempunyai pembesaran 10x atau 40x. Lensa mata mempunyai pembesaran 10x, dan jika dikalikan dengan pembesaran lensa objektif, pembesaran 4x misalnya, maka kita akan mempunyai total pembesaran 40x. Lensa objektif 10x akan memberikan pembesaran 100x, dan lensa objektif 40x, 400x pembesaran

ii. Mengatur Fokus pada Kaca Preparat Menggunakan Pengatur Fokus dan Diapragma

Mulai mengatur fokus menggunakan pengatur fokus kasar dan kemudian ubah tingkat cahayanya. Putar pengatur fokus kasar secara perlahan sambil mengamati sampel lewat lensa mata, lakukan hal ini sampai gambar bisa fokus. Gunakan pengatur fokus halus untuk lebih memfokuskan gambar.

- b) Autoklaf adalah alat yang digunakan untuk sterilisasi alat, bahan, atau media tertentu dengan menggunakan uap panas bertekanan. Alat ini menggunakan uap air panas bertekanan kira 2 atm (=15 Psi) dengan lama sterilisasi umumnya 15 menit.



Cara penggunaan autoklaf:

- 1) Isi air sampai batas yang ditentukan
- 2) Masukkan alat/bahan yang akan disterilisasi ke dalam keranjang khusus
- 3) Tutup autoklaf dan kencangkan klep pengaman
- 4) Nyalakan autoklaf
- 5) Atur suhu dan waktu sterilisasi
- 6) Tunggu sampai selesai proses sterilisasi
- 7) Buka katup pengaman agar uap keluar, setelah tekanan turun, buka

autoklaf dan keluarkan alat/bahan yang telah steril.

- c) Oven, bagian dari alat yang digunakan untuk sterilisasi dengan metode panas kering. Suhu sterilisasi dengan oven kira-kira 160°C selama 60 menit. Sterilisasi dengan oven digunakan untuk alat, bahan atau media yang tahan terhadap pemanasan tinggi.



Cara menggunakan oven sebagai berikut :

- 1) Hubungkan dengan sumber listrik.
 - 2) Masukkan alat/objek yang akan dikeringkan, atur dengan rapi lalu tutup pintu dengan rapat.
 - 3) Hidupkan alat dengan menekan tombol ON, lampu indikator akan menyala (merah dan kuning).
 - 4) Atur temperatur suhu dan waktu yang diinginkan
 - 5) Bila waktu yang diatur telah selesai, pengatur waktu secara otomatis kembali ke nol.
 - 6) Biarkan alat/objek dingin, lalu keluarkan bahan dan alat yang disterilkan/dikeringkan.
- d) Inkubator merupakan alat yang digunakan untuk menginkubasi mikroba pada suhu tertentu. Inkubator digunakan untuk menumbuhkan bakteri, jamur, dan menyimpan biakan murni pada suhu rendah. Inkubator memiliki sekat kaca antara bagian dalam inkubator dan pintu yang fungsinya untuk melihat biakan mikroba tanpa membuka sekat dalam, sehingga kondisi dalam inkubator tetap terjaga.



Cara menggunakan inkubator adalah sebagai berikut :

- 1) Untuk mengoperasikan **incubator**, colokkan kabel inkubator pada sumber daya listrik
 - 2) Siapkan sampel yang akan diinkubasi kemudian letakkan pada rak dalam ruang inkubator kemudian tutup pintu incubator
 - 3) Jika persiapan sampel telah selesai, tekan tombol POWER pada posisi ON, maka alat akan langsung menyala ditandai dengan display menyala
 - 4) Siapkan sampel yang akan diinkubasi kemudian letakkan pada rak dalam ruang **incubator** kemudian tutup pintu inkubator
 - 5) Set TIMER dengan memutar tombol TIMER sesuai waktu yang diinginkan
 - 6) Bila inkubasi telah selesai, matikan alat dengan menekan kembali tombol POWER pada posisi OFF
 - 7) Lepaskan colokan pada sumber daya listrik
- e) Colony counter adalah alat yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri.



Cara menggunakan alat colony counter adalah sebagai berikut :

- 1) Hubungkan Kabel Power ke sumber listrik.
- 2) Tekan tombol di sebelah kiri belakang sampai lampu colony counter menyala dan stabil.
- 3) Letakkan cawan petri dengan posisi terbalik.
- 4) Tekan tombol set agar angka pada display menunjukkan angka 0.
- 5) Hitung jumlah colony mikroba dengan menekan koloni yang terlihat.
- 6) Jumlah yang tertera pada display menunjukkan jumlah koloni yang telah di hitung.

- f) Lemari pendingin adalah alat yang digunakan untuk menyimpan media atau bahan/spesimen agar isi dan mutu tidak berubah.



Cara menggunakan lemari pendingin adalah sebagai berikut :

- 1) Hubungkan alat dengan arus listrik
 - 2) Atur suhu lemari pendingin sesuai kebutuhan
 - 3) Jangan melakukan penyimpanan bahan jika suhu lemari belum stabil
- g) Magnetik Stirrer, digunakan untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan.



Cara menggunakan alat magnetic stirrer adalah sebagai berikut :

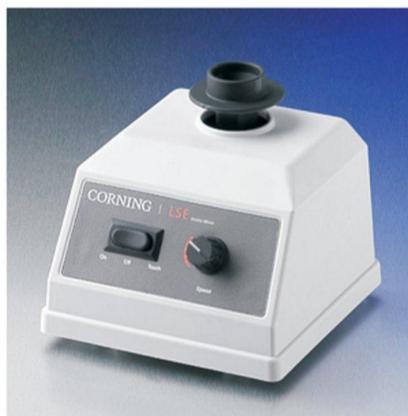
- 1) Tombol logam untuk menghidupkan alat.
- 2) Ambil stirer (batang magnet) dan masukkan pada larutan (di tempatkan dalam erlenmeyer/ beaker glass) yang akan di homogenkan.
- 3) Letakkan tepat di bagian tengah papan besi dengan hati-hati.
- 4) Ubah tombol di sebelah kanan untuk mengatur kecepatan
- 5) Ubah tombol di sebelah kiri untuk mengatur suhu.
- 6) Waktu penggunaan di sesuaikan dengan kebutuhan.
- 7) Setelah selesai, tombol kecepatan dan suhu di-0 kan kemudian matikan alat.
- 8) Ambil batang magnet dari larutan yang telah homogen, cuci dan letakkan kembali di atas papan besi.

- h) Timbangan analitik, digunakan untuk menimbang bahan yang akan digunakan dalam praktikum dengan tingkat ketelitian yang tinggi.



Cara menggunakan alat timbangan analitik adalah sebagai berikut :

- 1) Sambungkan alat dengan arus listrik
 - 2) Siapkan bahan padat yang akan ditimbang teliti
 - 3) Nyalakan alat dengan menekan tombol power
 - 4) Buka perlahan salah satu sisi kaca timbangan dan letakkan wadah untuk menimbang, dapat berupa cawan arloji ukuran kecil atau kertas timbang
 - 5) Reset timbangan dengan menekan tombol tare, maka digit timbangan akan kembali ke 0
 - 6) Timbang secara perlahan bahan sesuai kebutuhan
 - 7) Setelah menimbang matikan alat dan bersihkan dari debu ataupun sisa bahan
- i) Vortex, digunakan untuk mengaduk senyawa kimia yang ada dalam tabung reaksi atau wadah.



Cara menggunakan alat vortex adalah sebagai berikut :

- 1) Tabung reaksi diletakkan pada lubang tempat tabung.
- 2) Menekan tombol power hingga tempat meletakkan tabung bergerak. Dengan adanya tegangan yang diberikan, maka tabung reaksi yang berisi larutan akan tercampur rata.

- j) Mikropipet, digunakan untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μl .



Cara menggunakan alat mikropipet adalah sebagai berikut :

- 1) Sebelum digunakan *Thumb Knob* sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
 - 2) Masukkan Tip bersih ke dalam *Nozzle* / ujung mikropipet.
 - 3) Tekan *Thumb Knob* sampai hambatan pertama / *first stop*, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
 - 4) Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
 - 5) Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari *Thumb Knob* maka cairan akan masuk ke tip.
 - 6) Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
 - 7) Tekan *Thumb Knob* sampai hambatan kedua / *second stop* atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
 - 8) Jika ingin melepas tip putar *Thumb Knob* searah jarum jam dan ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.
- k) Tip/Ujung mikropipet, digunakan sebagai bagian dari mikropipet untuk memindahkan larutan dalam jumlah kecil



Cara menggunakan tip mikropipet adalah sebagai berikut :

- 1) Masukkan Tip bersih ke dalam Nozzle / ujung mikropipet.
 - 2) Tekan Thumb Knob sampai hambatan pertama / first stop, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
 - 3) Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
 - 4) Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari Thumb Knob maka cairan akan masuk ke tip.
 - 5) Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
 - 6) Tekan Thumb Knob sampai hambatan kedua / second stop atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip. Jika ingin melepas tip putar Thumb Knob searah jarum jam dan ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.
- l) Pinset, digunakan untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotic.



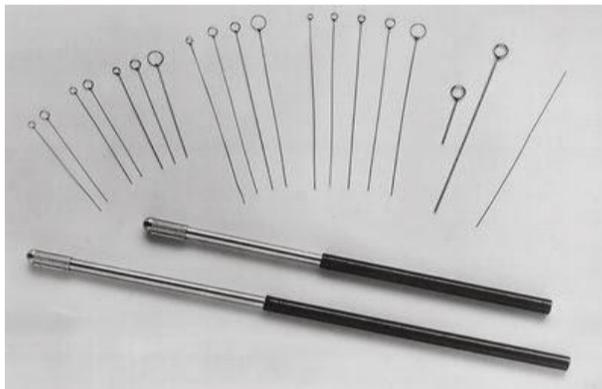
Cara menggunakan pinset adalah sebagai berikut :

- 1) Jepit benda yang akan diambil pada ujung pinset
 - 2) Tekan bagian tengah pinset agar genggaman pinset lebih kuat
- m) Bunsen, digunakan untuk memanaskan medium, mensterilkan jarum inokulasi dan alat-alat yang terbuat dari platina dan nikrom seperti jarum platina dan ose



Cara menggunakan Bunsen adalah sebagai berikut :

- 1) Isi wadah dengan spirtus hingga $\frac{3}{4}$ ukuran wadah
 - 2) Jangan mengisi penuh wadah spirtus untuk menghindari letupan
 - 3) Nyalakan Bunsen dan matikan nyala api setelah digunakan dengan cara langsung menutup sumbu, jangan mematikan nyala Bunsen dengan cara meniup nyala api
- n) Kawat ose/loop/sengkelit adalah alat yang digunakan untuk menanam bakteri dengan cara digores



Cara menggunakan alat kawat ose adalah sebagai berikut :

- 1) Lakukan sterilisasi dengan nyala api sebelum menggunakan kawat ose
 - 2) Biarkan beberapa saat sampai kawat mendingin
 - 3) Jarum Ose disentuhkan pada bagian mikrobia kemudian menggosokkan pada kaca preparat untuk diamati.
- o) Cawan Petri, digunakan sebagai ebagai wadah penyimpanan dan pembuatan kultur media.



Cara menggunakan cawan petri adalah sebagai berikut :

- 1) Sterilkan cawan sebelum digunakan
 - 2) Tuang media kedalam cawan sebanyak + $\frac{1}{4}$ volume cawan dan biarkan media mengeras
- p) Tabung reaksi, digunakan untuk mereaksikan dua atau lebih larutan/ bahan kimia. Wadah pengembangan mikroba, misalnya dalam pengujian jumlah bakteri.



Cara menggunakan tabung reaksi adalah sebagai berikut :

- 1) Sterilisasikan alat yang akan digunakan untuk melakukan percobaan.
 - 2) Masukkan tabung reaksi yang telah disterilkan pada rak tabung reaksi.
 - 3) Masukkan bahan yang akan direaksikan pada tabung reaksi.
 - 4) Jika tabung digunakan sebagai wadah media pembiakan, isi tabung dengan media sebanyak $\frac{1}{2}$ ukuran tabung, dan letakkan tabung dengan posisi miring.
- q) Tabung durham, alat ini berukuran kecil, ditempatkan pada tabung reaksi yang telah berisi cairan pertumbuhan mikroorganisme dan zat indikator yang dapat menandai terjadinya perubahan warna karena adanya perubahan derajat keasaman dan gas yang dihasilkan.



Cara menggunakan tabung durham yaitu dengan menempatkan Tabung durham pada tabung reaksi dengan posisi terbaik. Tabung durham sebagai alat bantu indikator adanya fermentasi. Jika tabung durham terdapat gelembung menandakan adanya fermentasi. Alat ini biasa dipakai pada pengujian mikroba dengan metode MPN(Most Probable Number).

2. Instruktur memberikan pengantar mengenai sterilisasi dan menjelaskan teknik-teknik sterilisasi.
 - a) Teknik Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu cara untuk membebaskan alat ataupun bahan dari segala bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Dalam praktikum mikrobiologi sterilisasi dapat dilakukan secara fisik dan kimia, pemilihan cara

sterilisasi tergantung pada jenis bahan yang akan disterilkan ataupun bentuk bahan/sediaan yang akan disterilkan.

b) Jenis Teknik Sterilisasi

1) Sterilisasi Pemijaran

Cara ini terutama digunakan untuk sterilisasi kawat ose yang terbuat dari platina ataupun nikrome, dilakukan dengan membakar ose sampai pijar dua sampai tiga kali

2) Sterilisasi Udara Kering (Oven)

Oven umumnya digunakan untuk sterilisasi alat-alat gelas seperti erlemeyer, baker glass, petri dish, dan alat gelas lainnya. Temperatur yang digunakan 150 – 170^o C selama minimal 1 jam tergantung jumlah alat yang disterilkan.

3) Sterilisasi Uap Bertekanan

Autoklaf merupakan tehnik sterilisasi yang paling efisien, karena adanya uap panas akan memperbesar penetrasi uap air ke dalam sel mikroba dan distribusi panas lebih merata sehingga terjadi koagulasi protein yang mempercepat kematian mikroba. Umumnya digunakan untuk sterilisasi media mikrobiologi, kapas, kertas maupun alat gelas tertentu.

4) Sterilisasi Dengan Penyaringan

Mekanisme penyaringan berdasarkan perbedaan ukuran partikel , penyaring dibuat memiliki pori yang sangat kecil sehingga cukup untuk menahan bakteri, saringan akan tercemar bakteri sedangkan cairan yang melewatinya bebas bakteri—steril

Bahan-bahan yang tidak tahan pemanasan seperti serum, darah, toksin, maupun sediaan farmasi yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan menggunakan penyaring bakteri seperti:

- Berkefeld filter : penyaring bakteri dari tanah diatomae
- Chamberlain Filter : penyaring bakteri dari porselein
- Seitz filter : penyaring bakteri dari asbes
- Fritted glass filter : penyaring bakteri dari gelas

3. Setelah semua peralatan telah dijelaskan, praktikan mencatat hasil pengamatan pada lembar kerja

F. HASIL PENGAMATAN

PENGENALAN ALAT					
NO.	GAMBAR	NAMA ALAT	FUNGSI	CARA MENGGUNAKAN	CARA STERILISASI

MODUL PRAKTIKUM III PEMBUATAN MEDIA

A. DASAR TEORI

Media adalah campuran nutrisi atau zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan. Media selain untuk menumbuhkan mikroba juga dibutuhkan untuk isolasi & inokulasi mikroba serta untuk uji fisiologi dan biokimia mikroba. Media yang baik untuk pertumbuhan mikroba adalah yang sesuai dengan lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut, yaitu : susunan makanannya dimana media harus mengandung air untuk menjaga kelembaban dan untuk pertukaran zat atau metabolisme, juga mengandung sumber karbon, mineral, vitamin dan gas, tekanan osmosis yaitu harus isotonic, derajat keasaman/pH umumnya netral tapi ada juga yang alkali, temperatur harus sesuai dan steril.

Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu: sumber energi misalnya gula, sumber nitrogen, juga ion inorganik esensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin. Media pertumbuhan mengandung unsur makro yang dibutuhkan mikroba seperti karbon (C), Hidrogen (H), oksigen (O), Nitrogen (N), dan Fosfor (P). selain itu media juga mengandung unsur mikro seperti besi (Fe), dan Magnesium (Mg). media juga dapat mengandung bahan tambahan lain seperti indikator phenol red. Sifat media pembenihan yang ideal adalah mampu memberikan pertumbuhan yang baik jika ditanami kuman, mendorong pertumbuhan cepat, murah, mudah dibuat kembali, dan mampu memperlihatkan sifat khas mikroba yang diinginkan.

Berdasarkan bentuknya media dibedakan menjadi:

1. Media Cair : Digunakan untuk pembenihan diperkaya sebelum disebarkan media padat, tidak cocok untuk isolasi mikroba dan tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni kuman. Contoh media cair *Nutrient broth* (NB); *Pepton dilution fluid* (PDF); *Lactose Broth* (LB); *Mac Conkey Broth* (MCB), dan lain-lain. Pepton merupakan protein yang diperoleh dari peruraian enzim hidrolitik seperti pepsin, tripsin, papain. Pepton mengandung Nitrogen dan bersifat sebagai larutan penyangga, beberapa kuman dapat tumbuh dalam larutan pepton 4%
2. Media Semi Padat : Adalah media dengan konsentrasi agar sebesar 0,5%. Media semi padat biasanya digunakan untuk uji mortalitas (pergerakan) mikroorganisme dan kemampuan fermentasi.
3. Media Padat : Mengandung komposisi agar sebesar 15 %. Media padat digunakan untuk mempelajari koloni kuman, untuk isolasi dan untuk memperoleh biakan murni. Contoh media padat *Nutrient Agar* (NA); *Potato Dextrose Agar* (PDA); *Plate Count Agar* (PCA), dan lain-lain.

Berdasarkan tujuan penggunaannya media dibedakan menjadi :

1. Media isolasi : Media yang mengandung unsur esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba.
2. Media diperkaya : Merupakan media yang mengandung bahan dasar untuk pertumbuhan mikroba dan zat-zat tertentu yang ditambahkan seperti serum, kuning telur, dan lain-lain.
3. Media Selektif : Media cair yang ditambahkan zat tertentu untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu dan diberikan penghambat untuk mikroba yang tidak diinginkan. Contoh media yang ditambahkan ampisilin untuk menghambat mikroba lainnya.

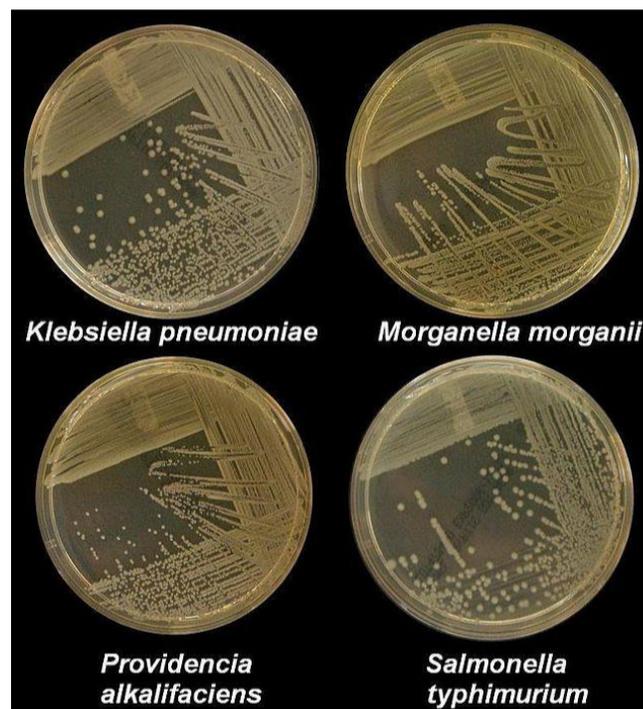
Beberapa jenis media dan fungsinya dijabarkan dalam table berikut.

Jenis	Nama	Fungsi
Cair	Kaldu Nutrisi (Nutrient Broth)	Media pengayaan dan pembiakan
	Kaldu darah	Media pembiakan dan melihat sifat hemolysis
	Air Pepton (Pepton Dilution Fluid/PDF)	Media pengayaan
	Kaldu empedu	Media pembiakan bakteri enterik
	Gula pepton (kaldu gula) dengan gula yang digunakan glukosa atau laktosa	Media untuk melihat fermentasi gula
Semi padat	0,5% agar	Untuk melihat gerak bakteri
Padat	Agar nutrisi (Nutrient Agar)	Untuk mempelajari koloni bakteri
	Agar Darah	Untuk melihat koloni bakteri dan sifat hemolysis
	Agar endo	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan peragi laktosa
	EMBA-eosin Methylene Blue Agar	Media pembiakan bakteri enterik, dapat digunakan untuk membedakan bakteri peragi laktosa dan bukan peragi laktosa
	SS Agar – Salmonella Shigella Agar	Media pembiakan Salmonella dan Shigella
	TCBS – Thiosulphate Citrate Bile	Media Pemiakan Vibrio
	Agar darah telurit	Media pembiakan <i>Corynebacterium diptheriae</i>
Agar miring	Lowenstein-Jensen	Media pembiakan <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
	TSIA – Triple Sugar Iron Agar	Media untuk melihat kemampuan bakteri dalam meragi gula dan membentuk H ₂ S
	Nutrient Agar	Untuk peremajaan koloni murni

Berikut adalah penjelasan umum mengenai media yang akan dibuat pada praktikum kali ini.

1. Media Nutrient Agar

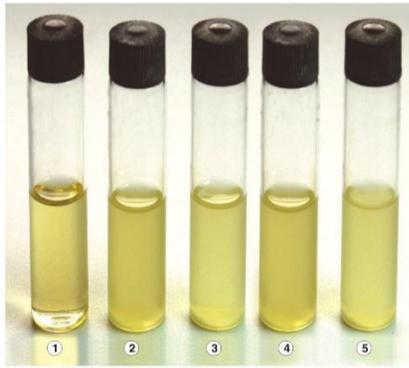
Nutrien agar adalah medium umum yang digunakan untuk pertumbuhan mayoritas dari mikroorganisme yang tidak selektif, dalam artian mikroorganisme heterotrof. Media ini merupakan media sederhana yang dibuat dari ekstrak beef, pepton, dan agar. NA merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji biasa dari air, produk pangan, untuk pertumbuhan sampel pada uji bakteri, dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni. Untuk komposisi nutrisi agar adalah ekstrak beef 10 g, pepton 10 g, NaCl 5 g, air desitilat 1.000 ml dan 15 g agar/L. Agar dilarutkan dengan komposisi lain dan disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit, kemudian siapkan wadah sesuai yang dibutuhkan.



2. Media Nutrient Broth

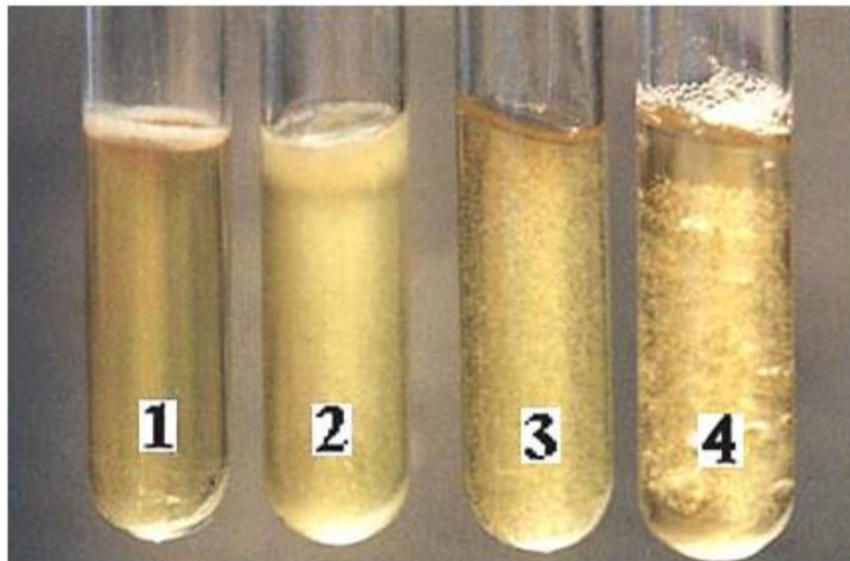
NB (Nutrient Broth) merupakan medium cair yang digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri. Tiap liter NB mengandung pepton 5 gram dan ekstrak beef 1,5 gram, sodium chlorida 5 gram dan yeast ekstrak 1,5 gram. NB tidak menggunakan agar karena NB merupakan medium cair. Proses pembuatannya lebih sederhana karena tidak memerlukan pemansan.

Nutrient Broth tersusun atas dua bahan dasar, yaitu beef extract dan pepton. Perbedaan konsentrasi antara Nutrient Agar dan Nutrient Broth yaitu Nutrient Agar berbentuk padat sedangkan Nutrient Broth berbentuk cair. Susunan kimia kedua media tersebut sama-sama sintetik.



Nutrient Broth No. 2 (M1362)

1. Control
2. Escherichia coli ATCC 25922
3. Enterobacter aerogenes ATCC 13048
4. Klebsiella pneumoniae ATCC 13883
5. Salmonella Typhimurium ATCC 14028



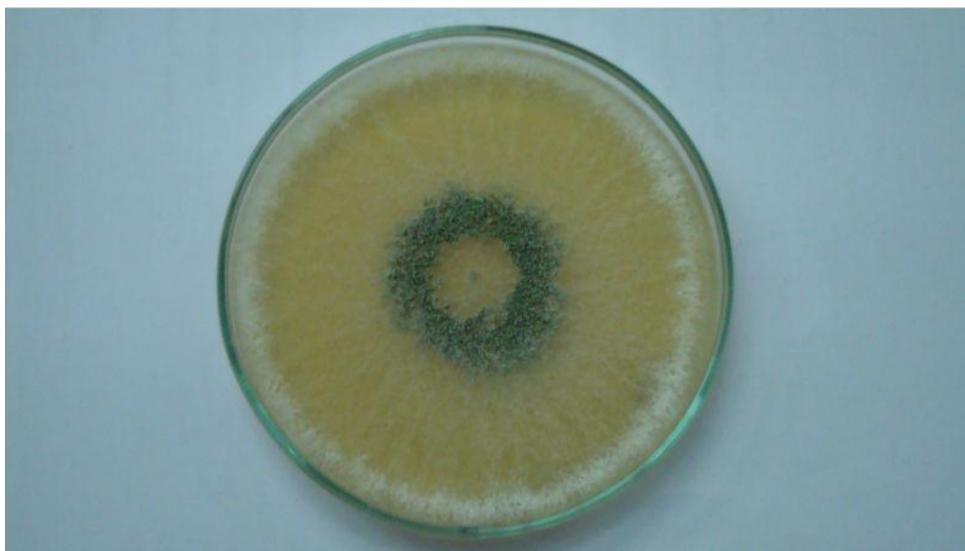
3. Potato Dextrose Agar

Potato Dextrose Agar merupakan medium umum pertumbuhan yang digunakan dalam mikrobiologi, yang terbuat dari kentang (*Potato infusion*) dan dekstrosa. Agar dekstrosa kentang adalah medium yang paling banyak digunakan untuk menumbuhkan fungi dan bakteri. Kentang (*Potato infusion*) dapat dibuat dengan merebus 200 gram kentang dalam 1 liter air suling (akuades) selama 30 menit, kemudian saring larutan kaldu yang dihasilkan dengan kain katun tipis. Lalu, menambahkan air suling hingga total volume suspensi mencapai 1 liter. Kemudian, masukkan 20 gram dekstrosa dan 20 gram agar-agar bubuk. Selanjutnya, medium disterilkan dengan autoklaf pada 15 psi selama 15 menit.

Dalam mikrobiologi media PDA (Potato Dextrose Agar) digunakan untuk menumbuhkan atau mengidentifikasi yeast dan kapang. PDA dapat juga digunakan untuk enumerasi yeast dan kapang dalam suatu sampel atau produk makanan. PDA mengandung sumber karbohidrat dalam jumlah cukup yaitu terdiri dari 20% ekstrak kentang dan 2% glukosa sehingga baik untuk pertumbuhan kapang dan khamir tetapi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri.



Aspergillus flavus on PDA agar *Penicillium chrysogenum* on PDA



B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Untuk mengetahui teknik pembuatan media yang baik dan benar

C. PETUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum.
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

a) Autoklaf	g) Erlenmeyer
b) Petridish	h) Kawat kasa
c) Gelas ukur	i) Kompur
d) Neraca analitik digital	j) Batang pengaduk
e) Spatula	k) Alumunium foil
f) Kertas saring	l) Kapas steril

- m) Kertas dan kantung plastik
- n) Kertas Label, Alat tulis
- o) Lampu Spiritus

2. Bahan

- a) Nutrient Agar
- b) PDA
- c) NB
- d) Aquadest
- e) Desinfektan

E. PROSEDUR KERJA

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menimbang dengan teliti bahan untuk pembuatan media. **PERHATIKAN...!!!**, bahan yang akan ditimbang harus mengacu pada aturan yang tertera pada kemasan media. Umumnya aturan pembuatan media yang tertera pada kemasan adalah aturan untuk membuat media sejumlah 1000 mL, sehingga memerlukan perhitungan untuk membuat media dengan volume kecil
3. Memindahkan bahan yang telah ditimbang ke dalam Erlenmeyer ukuran sedang
4. Melarutkan bahan dengan sejumlah aquadest. Umumnya aturan pembuatan media yang tertera pada kemasan adalah aturan untuk membuat media sejumlah 1000 mL
5. Menghomogenkan larutan media hingga tercampur sempurna dengan bantuan pemanasan dan pengadukan. Proses pemanasan tidak boleh sampai mendidih.
6. Menutup mulut eelenmeyer dengan sumbat gabus atau kapas yang dibungkus dengan aluminium foil
7. Melakukan proses sterilisasi media dengan teknik uap panas bertekanan (121⁰C selama 15 menit pada tekanan 1 atm)
8. Mengeluarkan media yang telah steril dari autoklaf

F. HASIL PENGAMATAN

a) Uraian Media

No	Nama Media	Komposisi	Kegunaan Media

b) Data Penggunaan Bahan

No	Nama Media	Pelarutan Sesuai Kemasan	Volume Yang Dibuat (mL)	Bahan Yang Harus Ditimbang (Gram)	Skema Pembuatan Media

MODUL PRAKTIKUM IV ISOLASI MIKROORGANISME

A. DASAR TEORI

Pada umumnya kita dapat menjumpai mikrobia pada setiap tempat baik dalam tanah, udara, air bahkan pada hampir semua yang ada terdapat mikrobia. Tentu saja dalam mempelajari mikroorganisme mahasiswa harus mengerti dan memahami bagaimana mengisolasi dan memisahkan mikrobia tersebut agar didapat biakan murni sesuai dengan yang dikehendaki sehingga dapat dipelajari morfologi, biologi ataupun karakteristik mikrobia tersebut.

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan isolasi mikroorganisme sehingga biakan murni terbebas dari kontaminan. Kontaminan adalah organisme yang tidak diinginkan ada bersama biakan murni. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam isolasi mikroorganisme tersebut misalnya prosedur teknik aseptik, jenis medium yang digunakan, teknik isolasi, teknik pemilihan sumber biakan (koloni), dan penyimpanan pasca isolasi mikroorganisme (Harley & Prescott, 2002; Madigan dkk., 2011).

Sementara itu, jenis medium yang cocok digunakan untuk memperoleh biakan murni adalah medium padat, khususnya medium padat dalam cawan petri. Medium padat dapat menghentikan pergerakan sel-sel, kemudian mengizinkan sel-sel mikroba untuk tumbuh dan membentuk massa yang tampak sebagai sebuah entitas tersendiri yang disebut koloni (Madigan dkk, 2011). Koloni merepresentasikan perbanyakan dari sebuah organisme tunggal (Cappucino & Sherman, 2002).

Sebelum dapat melakukan isolasi maka yang harus dilakukan terlebih dahulu adalah pengambilan sampel atau contoh. Sampel yang diambil dapat berupa tanah, air, bagian tanaman ataupun manusia dan lain-lain. Teknik isolasi untuk memperoleh biakan murni ada beberapa cara tergantung substratnya. Isolasi mikroba dari substrat cair dapat menggunakan cara sebar (*spread method*) dan cara tuang (*pour-plate method*). Isolasi mikroba dari substrat padat dapat menggunakan cara tabur (*spread method*) dan cara suspensi. Hal yang perlu diperhatikan pula adalah dalam memilih sumber biakan, seperti memilih koloni yang representatif untuk diambil menjadi biakan murni. Koloni yang berada di bagian tengah dari sampel biasanya kurang terkontaminasi dibandingkan koloni yang berada di bagian pinggir. Selain itu, koloni yang dipilih adalah yang benar-benar telah terpisah dengan koloni lain. Setelah melakukan isolasi, diperlukan upaya untuk menjaga agar biakan tersebut tetap baik, misalnya dengan disimpan di pendingin atau alat pengering (Harley & Prescott, 2002).

1. *Spread Plate Method*

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar, agar diperoleh kultur murni. Prosedur kerjanya adalah suspensi cairan diambil sebanyak 0,1 ml dengan mikropipet kemudian teteskan di atas permukaan agar

yang telah memadat. Trigalski kemudian dibakar diatas bunsen dan didinginkan beberapa detik. Kemudian suspensi diratakan dengan menggosokannya pada permukaan agar , penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

2. *Pour Plate Method*

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat dan dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri dan dihomogenkan lalu dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebabkan sel-sel bakteri tidak hanya terdapat pada permukaan agar saja tapi juga di dalam atau dasar agar sehingga bisa diketahui sel yang dapat tumbuh dipermukaan agar yang kaya O₂ dan di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung O₂. Prosedur kerjanya adalah petridish, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair disiapkan. Kemudian 1 ml suspensi bakteri ditetaskan secara aseptis ke dalam cawan kosong. Lalu medium yang masih cair dituang ke dalam petridish lalu petridish di putar membentuk angka 8 agar suspensi bakteri dan media homogen, kemudian diinkubasi.

3. *Streakplate Method*

Metode ini digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.

a) Goresan Sinambung

Prosedur kerjanya adalah inokulum loop (ose) disentuhkan pada koloni bakteri dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar. Lalu petridish diputar 180° dan dilanjutkan goresan sampai habis. Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru.

b) Goresan T

Prosedur kerjanya adalah petridish dibagi menjadi 3 bagian menggunakan spidol dan daerah tersebut diinokulasi dengan streak zig-zag. Ose dipanaskan dan didinginkan, lalu distreak zig-zag pada daerah berikutnya.

c) Goresan Kuadran

Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganisma. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Melakukan inokulasi mikroba secara aseptis
2. Melakukan inokulasi mikroba dengan teknik *Spread Plate* dan *Pour Plate*

C. PETUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum.
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a) Kawat Ose
 - b) Lampu Bunsen
 - c) Beaker Glass
 - d) Korek Api
 - e) Inkubator
 - f) Tabung reaksi steril
 - g) Pipet volume dan pipet ukur steril
2. Bahan
 - a) Media NA
 - b) Media PDA
 - c) Sampel Tempe
 - d) Sampel Roti
 - e) Sampel tanah
 - f) Sampel tanaman eceng gondok
 - g) Sampel bawang putih
 - h) Sampel rumput teki

E. PROSEDUR KERJA

1. Menyiapkan Suspensi Sampel
 - a) Gerus substrat menggunakan peralatan yang steril
 - b) Timbang sebanyak 1 gram substrat yang telah dihaluskan
 - c) Campur 1 gram substrat dengan 100 mL Aquadest steril (10^{-1})
 - d) Siapkan 2 tabung reaksi steril, masing-masing tabung diisi dengan 9 ml aquadest steril
 - e) Pipet 1 ml suspensi 10^{-1} dan masukkan ke dalam tabung 2 untuk membuat pengenceran 10^{-2}
 - f) Pipet 1 ml suspensi 10^{-2} dan masukkan ke dalam tabung 3 untuk membuat pengenceran 10^{-3}
2. Menyiapkan Sampel Dari Jaringan Tumbuhan
 - a) Siapkan jaringan tanaman yang akan dijadikan sampel dengan memotong kecil jaringan tersebut ($\pm 1 \times 2$ mm) menggunakan scalpel steril.

- b) Pindahkan jaringan kedalam wadah yang bersih, kering dan steril serta bertutup
3. Isolasi Mikroba Teknik *Spread Plate*
- Ambil suspensi sampel 10^{-3} secara aseptis sebanyak 0,1 ml
 - Tuang suspensi sampel tepat di bagian tengah media yang telah mengeras dalam petridish
 - Sebarkan suspensi di atas permukaan media secara merata menggunakan ose steril
 - Inkubasi media pada suhu 37°C selama 1x24 jam
 - Khusus untuk sampel jaringan tanaman, sebarkan secara merata jaringan tanaman di atas media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam
4. Isolasi Mikroba Teknik *Pour Plate*
- Ambil suspensi sampel secara aseptis sebanyak 1 ml dan tuang tepat di tengah petridish steril
 - Ambil ± 25 ml media hangat dan tuangkan media hangat ($45-50^{\circ}\text{C}$) kedalam petridish yang telah berisi suspensi sampel
 - Lakukan pengerjaan tersebut secara cepat untuk menghindari pengerasan media
 - Inkubasi media pada suhu 37°C selama 1x24 jam

F. HASIL PEGAMATAN

No	Sampel	Media NA		Media PDA	
		Warna koloni	Bentuk koloni	Warna koloni	Bentuk koloni
1					
2					
3					
4					
5					
6					

MODUL PRAKTIKUM V INOKULASI MIKROORGANISME

A. DASAR TEORI

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. Pemindahan biakan mikroba yang dibiakkan harus sangat hati-hati dan mematuhi prosedur laboratorium agar tidak terjadi kontaminasi. Oleh karena itu, diperlukan teknik-teknik dalam pembiakan mikroorganisme yang disebut dengan teknik inokulasi biakan.

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.

Teknik pembiakan dilakukan berdasarkan tujuan melakukan pembiakan mikroorganisme. Umumnya tiga situasi dapat ditemukan yaitu:

1. Memperbanyak atau menumbuhkan spesies tertentu.
2. Menentukan jumlah dan tipe organism yang ada pada sampel.
3. Mengisolasi organism tertentu dari sumber alami.

Identifikasi biakan mikroorganisme seringkali memerlukan pemindahan ke biakan segar tanpa terjadi pencemaran. Pemindahan mikroorganisme ini dilakukan dengan teknik aseptik untuk mempertahankan kemurnian biakan selama pemindahan 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.

Pertumbuhan mikroorganisme dalam kaldu seringkali menggambarkan aktivitas metabolismenya. Mikroba aerob obligat berkembang biak pada lapisan permukaan karena pada bagian ini kandungan oksigen tinggi. 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.

Ada beberapa metode yang digunakan untuk menginokulasi mikroorganisme yaitu:

1. Metode Gores

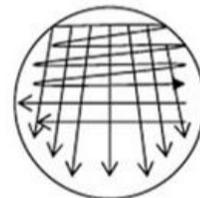
Teknik ini lebih menguntungkan jika ditinjau dari sudut ekonomi dan waktu, tetapi memerlukan ketrampilan-ketrampilan yang diperoleh dengan latihan. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Inokulum digoreskan di permukaan media agar nutrisi dalam cawan petri dengan jarum pindah (lup inokulasi). Di antara garis-garis goresan akan terdapat sel-sel yang cukup terpisah sehingga dapat tumbuh menjadi koloni

Cara penggarisan dilakukan pada medium pembiakan padat bentuk lempeng. Bila dilakukan dengan baik teknik inilah yang paling praktis. Dalam pengerjaannya terkadang berbeda pada masing-masing laboratorium tapi tujuannya sama yaitu untuk membuat goresan sebanyak mungkin pada lempeng medium pembiakan.

a. Goresan T



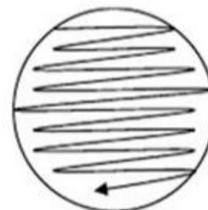
c. Goresan Radian



b. Goresan Kuadran

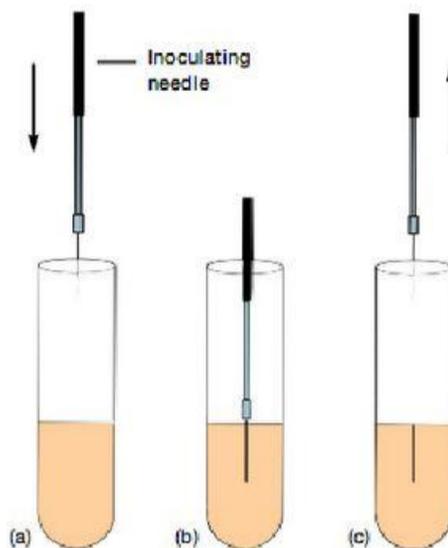


d. Goresan Sinambung



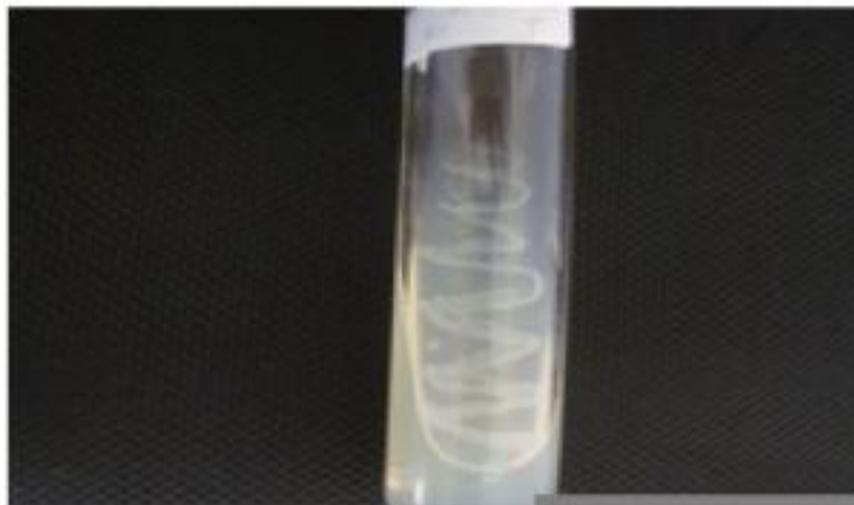
2. Metode Tusuk

Metode Tusuk yaitu metode yang digunakan untuk medium tegak, yang dilakukan dengan cara menusukkan ujung jarum yang didalamnya terdapat inokulum dan dimasukkan ke dalam media



3. Inokulasi Pada Agar Miring

Teknik atau metode inokulasi ini merupakan teknik inokulasi bakteri dengan cara menggoreskan loop yang telah dilumuri mikroorganisme pada permukaan suatu agar miring. Media yang masih cair disimpan dalam posisi miring untuk menghasilkan media dengan posisi miring.



B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mampu memindahkan dan meremajakan mikroorganisme dengan menggunakan teknik serta media yang tepat

C. PETUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum.
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a) Kawat Ose
 - b) Lampu Bunsen

- c) Korek Api
2. Bahan
- a) Agar miring NA
 - b) Agar tegak NA
 - c) NA lempeng
 - d) Biakan mikroorganisme yang sudah dibuat pada praktikum sebelumnya

E. PROSEDUR KERJA

1. Metode Gores
- a) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
 - b) Bakar kawat ose, biarkan dingin.
 - c) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri
 - d) Goreskan kawat ose pada permukaan lempeng nutrien agar secara kontinyu sampai setenga permukaan agar, putar cawan petri dan oles kembali pada permukaan agar yang kosong.
 - e) Bakar kembali kawat ose
 - f) Inkubasikan
2. Biakan Pada Agar miring
- a) Siapkan media agar miring
 - b) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
 - c) Bakar kawat ose, biarkan dingin.
 - d) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri
 - e) Goreskan kawat ose pada permukaan agar miring secara zigzag.
 - f) Bakar kembali kawat ose
 - g) Inkubasikan
3. Biakan Pada Agar Tegak
- a) Siapkan media agar tegak
 - b) Siapkan biakan yang akan ditanam kembali.
 - c) Bakar kawat lurus, biarkan dingin.
 - d) Sentuhkan ujung kawat pada koloni dan putar 360°
 - e) Tusukkan kawat pada permukaan agar tegak hingga keseluruhan kawat masuk kedalam media.
 - f) Bakar kembali kawat
 - g) Inkubasikan

MODUL PRAKTIKUM VI PEWARNAAN GRAM

A. DASAR TEORI

Bentuk bakteri beraneka macam yaitu basil (tongkat/batang), coccus, spirillum. Bakteri bentuk basil pembagiannya yaitu basil tunggal, diplobasil, dan tripobasil. Bakteri bentuk kokus dibagi menjadi monokokus, diplokokus, dan stafilokokus. Untuk bakteri bentuk spirillum hanya dibagi dua yaitu setengah melengkung dan melengkung (Dwidjoseputro, 1998).

Melihat dan mengamati bakteri dalam keadaan hidup sangat sulit, karena selain bakteri itu tidak berwarna juga transparan dan sangat kecil. Untuk mengatasi hal tersebut maka dikembangkan suatu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama dalam penelitian-penelitian mikrobiologi (Dwidjoseputro, 1998).

Pewarnaan Gram merupakan suatu pewarnaan differensial, yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi untuk membantu diagnosis infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur yang berbentuk ragi. Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri (Kemenkes, 2016).

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. Penggolongan tersebut berdasarkan kemampuannya dalam mempertahankan *primary stain* yaitu zat warna crystal violet. Bakteri yang mampu mempertahankan *primary stain* disebut Gram positif, sedangkan bakteri Gram negatif adalah bakteri yang melepaskan warna tersebut dan mengikat zat warna kedua (*counterre stain*) yaitu Safranin (Kemenkes, 2016).

Untuk melakukan pewarnaan, bakteri dibuat pulasan lebih dahulu di atas kaca objek. Sebelum dilakukan pewarnaan dibuat ulasan bakteri di atas kaca objek. Pada pembuatan pulasan perlu diperhatikan ketebalan dari bakteri yang dipulas, tidak terlalu padat atau tipis agar tidak mengganggu pengamatan dan diperoleh hasil yang baik. Kemudian pulasan bakteri difiksasi. Fiksasi dilakukan dengan cara melewatkan preparat diatas api atau merendamnya dengan metanol. Fiksasi bertujuan melekatkan bakteri pada glass objek dan mematikan bakteri. Setelah fiksasi dilakukan maka teknik pewarnaan dapat segera dilanjutkan (Kemenkes, 2017).

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Memahami prinsip kerja pewarnaan gram pada bakteri dan mampu menentukan jenis bakteri gram positif maupun negatif

2. Menjelaskan perbedaan bakteri gram positif dan negative

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

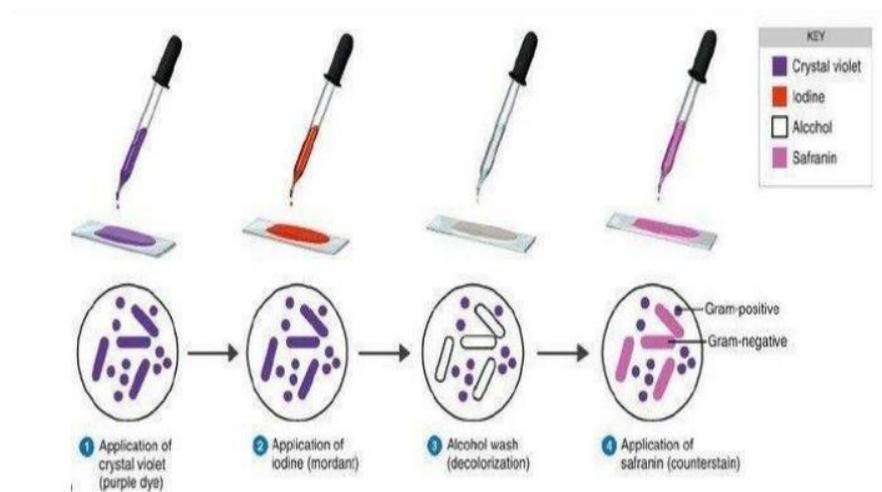
1. Alat

a. Mikroskop	e. Bunsen
b. Kaca objek	f. Beaker glass
c. Cover glass	g. Kertas saring
d. Jarum ose	h. Pinset
2. Bahan

a. Biakan kuman	f. Iodium
b. Spritus	g. Alkohol 96%
c. Karbol kristal ungu	h. Minyak Imersi
d. Fuchsin	i. Kalium Iodida
e. Safranin	

E. PROSEDUR KERJA

- a. Pembuatan Larutan Iodium
 1. Timbang Iodine sebanyak 12.69 gram + KI 18 gram, masukkan dalam gelas beker 250 ml.
 2. Tambah aquadest 150 ml. Aduk hingga larut sempurna. Jika masih susah larut bisa ditambahkan KI lagi.
 3. Setelah larut sempurna, masukkan larutan iodine ke dalam labu takar 1000 ml, tambahkan aquadest sampai tanda batas. Gojog hingga homogen.
 4. Segera pindahkan ke dalam botol reagen gelap dan beri label.
- b. Pewarnaan Gram
 1. Ambil satu sengkeli biakan kuman, letakkan pada kaca objek, suspensi dengan air kemudian difiksasi
 2. Tambahkan pewarna I kristal ungu biarkan selama lima menit, cuci dengan air
 3. Tambahkan cairan iodium biarkan 45 – 60 detik cuci dengan air
 4. Bilas dengan alkohol 95 % sampai warna ungu tidak mengalir, cuci dengan air
 5. Tambahkan pewarna safranin, diamkan 1-2 menit. Cuci dengan air, keringkan
 6. Tambahkan minyak imersi, tutup dengan cover glass, periksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x dan 100 x objektif



F. HASIL PENGAMATAN

No.	Pengamatan	Keterangan
1.		- Perbesaran : - Warna : - Bentuk :
2.		- Perbesaran : - Warna : - Bentuk :
3.		- Perbesaran : - Warna : - Bentuk :

MODUL PRAKTIKUM VII PEMERIKSAAN JAMUR

A. DASAR TEORI

Jamur adalah organisme bersel tunggal atau bersel banyak yang dinding selnya mengandung kitin, bersifat eukariotik, dan tidak berklorofil. Jamur multiseluler terbentuk dari rangkaian sel yang membentuk benang hifa bersekat ataupun tidak bersekat yang akan saling sambung menyambung membentuk miselium (Kawuri *et al.*, 2016).

Secara umum, jamur dibagi menjadi tiga kelas yaitu divisi Zygomycota merupakan jamur dengan hifa bersekat, divisi Ascomycota merupakan jamur dengan hifa tidak bersekat dan askuspora terdiri dari 8 spora, serta divisi Basidiomycota yang umumnya berukuran makroskopis, memiliki tudung (basidiokarp) dan tubuh buah (Hastono, 2003).

Menurut Syamsuri (2007), jamur hidup secara heterotrof yaitu secara saprofit, parasit atau simbiosis pada makhluk hidup lain atau pada inang tertentu untuk memperoleh nutrisi. Pada keadaan tertentu, sifat jamur dapat berubah menjadi patogen dan menyebabkan penyakit. Hal tersebut menyebabkan harusnya manusia berhati-hati dalam menjaga kesehatan termasuk juga memilih makanan yang sehat dan terhindar dari jamur. Berbagai jenis makanan yang sudah ditumbuhi jamur umumnya akan busuk dan namun tidak basah (berlendir). Apabila jamur dibiarkan berkembang biak, maka jamur akan membentuk koloni yang dapat dilihat secara makroskopik serta merusak *host* atau inangnya. menurut Tournas *et al.* (2001) jamur dapat menyebabkan berbagai tingkat dekomposisi bahan makanan.

Ada beberapa faktor penunjang atau syarat pertumbuhan jamur yaitu :

a. Air dan Kelembapan

Semua jenis jamur memerlukan kelembapan relatif cukup tinggi untuk menunjang pertumbuhannya, yaitu 95-99%. Di alam, biasanya jamur muncul pada saat setelah musim hujan atau setelah hujan selesai. Pada kondisi seperti itu, kandungan air di udara cukup tinggi. Demikian pula kandungan air sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan miselia jamur. Apabila kandungan air terlalu sedikit maka perumbuhan jamur akan terganggu. Sebaiknya bila terlalu banyak maka akan terjadi pembusukan substrat yang ditandai dengan berkembangnya kontaminan dan matinya miselia.

b. Kebutuhan nutrisi

Jamur dalam hidupnya juga memerlukan nutrisi untuk tumbuh yang diserap dari substrat. Semua senyawa karbon dapat digunakan oleh jamur, antara lain monosakarida, polisakarida, asam organik alkohol, selulosa, dan lignin. Sumber karbon yang paling mudah diserap adalah glukosa. Senyawa nitrogen diperlukan untuk proses sintesis protein, purin, pirimidin dan khitin. Sumber nitrogen yang diperlukan dalam bentuk

nitrat, amonium, dan nitrogen organik. Kebutuhan mineral diantaranya sulfur dalam bentuk garam sulfat diperlukan untuk sintesis metionin, vitamin, dan biotin. Unsur logam, seperti besi, tembaga, dan mangan diperlukan dalam jumlah sangat kecil.

c. Suhu

Suhu merupakan faktor penting yang berpengaruh terhadap penyebaran jamur di bumi. Berdasarkan kisaran suhu, jamur dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu jamur psikrofil (jamur yang hidup pada rentang suhu 0-17C), jamur mesofil (jamur yang hidup pada kisaran suhu 15-40C), dan jamur termofil (jamur yang dapat hidup pada kisaran suhu 35-50C).

d. Keasaman

Pengaruh kisaran pH pada pertumbuhan jamur tergantung pada beberapa faktor, antara lain ketersediaan anion logam, permeabilitas dinding sel yang berhubungan dengan pertukaran anion, serta produksi gas karbondioksida dan amoniak. Setiap jenis jamur memerlukan pH berbeda untuk setiap tahapan kehidupannya. Jika pH substrat (tempat tumbuh) lebih asam atau basa maka enzim pencernaan yang dihasilkan oleh sel jamur tidak aktif dapat mengurangi materi substrat.

e. Cahaya

Kebanyakan jamur kecuali *Agaricus* memerlukan cahaya untuk awal pertumbuhan badan buah. Pada jamur *Flammulina velutipes*, pembentukan badan buah memerlukan cahaya efektif dengan panjang gelombang 435-470 nm, namun kebanyakan jamur masih belum diketahui.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Untuk mengidentifikasi jenis jamur yang tumbuh pada berbagai jenis sampel makanan yang diujikan.
2. Untuk mengetahui karakteristik morfologi khusus dari jamur yang ditemukan

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a. Mikroskop
 - b. Pipet tetes
 - c. Kaca objek (*Object glass*)
 - d. Kaca penutup (*Deck glass*)
 - e. Jarum preparat (*Ose needle*)

2. Bahan
 - a. Aquadest
 - b. Minyak Imersi
 - c. Media NA
 - d. Media PDA
 - e. Media NB
 - f. Sampel jagung busuk (atau sampel kalian nanti)
 - g. *Tissue*

E. PROSEDUR KERJA

1. Disiapkan sample jamur dari jagung busuk (*atau sampel kalian nanti*)
2. Disiapkan media PDA yang telah dibuat
3. Dituangkan media ke dalam cawan petri hingga memadat
4. Dipanaskan Jarum ose, diambil suspensi dari jagung busuk.
5. Diinokulasikan dengan metode digoreskan pada ke empat sisi pinggiran agar (mengikuti bentuk agar)
6. Diambil cover glass dengan pinset yang telah disterilkan dengan lampu Bunsen, dicelupkan ke dalam larutan alcohol 70 % kemudian difiksasi diatas lampu Bunsen.
7. Diletakkan cover glass diatas media PDA yang telah diinokulasikan suspensi jamur.
8. Diamati karakteristik dan koloni yang terbentuk (struktur morfologi, warna, bentuk) dengan menggunakan mikroskop.

F. HASIL PENGAMATAN

No.	Sampel	Gambar		Keterangan
		Hasil	Literatur	
1.				
2.				

MODUL PRAKTIKUM VIII PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

A. DASAR TEORI

Pertumbuhan mikroba sangat dipengaruhi oleh lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan pengaruh lain. Selain dipengaruhi oleh faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme juga dipengaruhi faktor dari dalam bakteri itu sendiri. Untuk pertumbuhannya mikroorganisme membutuhkan kondisi yang ideal sehingga mikroba dapat tumbuh secara optimal. Perubahan lingkungan akan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, bahkan dapat mengubah morfologi dan fisiologi dari mikroba tersebut. Mikroorganisme dapat beradaptasi dengan baik di lingkungan yang berbeda. Mikroorganisme dapat berkembang dengan sangat pesat, bahkan pertumbuhan mikroorganisme yang sangat besar dapat menjadi suatu wabah penyakit atau menyebabkan kerusakan pada bahan makanan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme diantaranya adalah:

1. Suhu

Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh optimal pada suhu tubuh manusia, tetapi ada sebagian bakteri yang dapat tumbuh pada kondisi cukup ekstrim, misalnya pada suhu panas atau dingin.

2. pH

pH optimal untuk pertumbuhan bakteri adalah sekitar pH netral yaitu 6,5 – 7,4. Pada umumnya bakteri tidak akan tumbuh pada pH terlalu asam atau basa. Sehingga ketahanan terhadap pH ini yang dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan bahan makanan, misalnya dengan teknik fermentasi, dimana makanan dibuat fermentasi.

3. Oksigen

Oksigen merupakan unsur yang sangat penting untuk pertumbuhan mikroba aerob.

4. Tekanan osmotik

Tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan air keluar dari dalam sel bakteri, akibatnya bakteri dapat mati atau terhambat pertumbuhannya. Teknik ini dapat digunakan untuk mengawetkan makanan dengan cara penambahan garam sehingga tekanan osmotik cairan akan naik.

5. Unsur kimia

Untuk pertumbuhannya bakteri membutuhkan unsur-unsur kimia seperti C, H, N, S, dan P. selain itu juga membutuhkan unsur mikro seperti, Zn, Fe, dan Cu.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Melakukan pembuktian pengaruh pemanasan terhadap pertumbuhan kuman

2. Melakukan pembuktian pengaruh proses sterilisasi dan desinfeksi terhadap pertumbuhan kuman

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Biakan kuman
2. Lempeng NA
3. Kapas usap steril
4. Kaldu NB
5. Desinfektan
6. Uang logam
7. Cotton swab steril

E. PROSEDUR KERJA

- a. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman
 1. Ambil satu sengkeli biakan kuman masukkan dalam nutrient broth
 2. Celupkan kapas usap ke dalam suspensi kuman dan oleskan pada permukaan agar secara merata
 3. Sisa suspensi kuman dididihkan. setelah mendidih ulangi langkah 2 pada lempeng agar yang lain
 4. Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam
 5. Bandingkan yang terjadi pada dua cawan petri tersebut.
- b. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman menggunakan uang logam
 1. Ambil satu buah uang logam tempelkan pada permukaan lempeng agar
 2. Ambil satu buah uang logam yang lain, bakar hingga memijar dan tempelkan pada permukaan lempeng agar lain
 3. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
 4. Amati yang terjadi
- c. Melihat pengaruh desinfektan terhadap pertumbuhan kuman
 1. Kapas usap steril dibasahi oleh NB dan diusapkan pada telapak tangan, kemudian diusapkan pada lempeng agar
 2. Cuci tangan dengan sabun, ulangi langkah 1 pada lempeng agar lain
 3. Cuci tangan dengan desinfektan, ulangi langkah 1 pada lempeng agar lain
 4. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
 5. Amati yang terjadi

F. HASIL PENGAMATAN

- a. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman

	Suspensi Kuman	Suspensi Kuman yang Dididihkan
Pengamatan		

- b. Melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kuman menggunakan uang logam

	Uang Logam yang Tidak Dipijar	Uang Logam yang Dipijar
Pengamatan		

- c. Melihat pengaruh desinfektan terhadap pertumbuhan kuman

	Tangan yang Tidak Dicuci	Tangan yang Dicuci/Didesinfektan
Pengamatan		

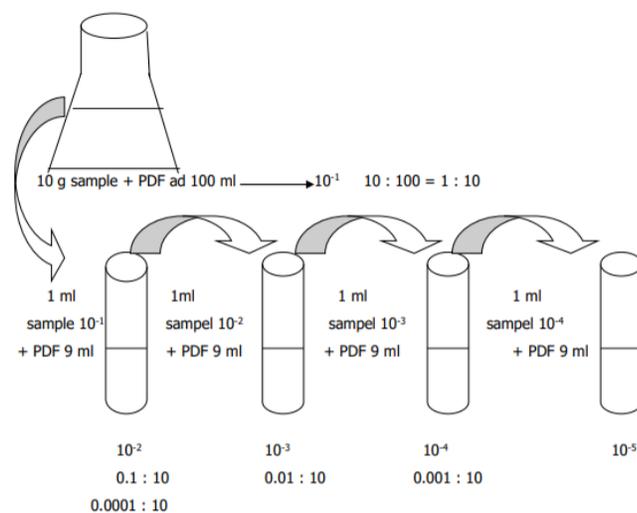
MODUL PRAKTIKUM IX ANGKA LEMPENG TOTAL BAKTERI

A. DASAR TEORI

Angka Lempeng Total bakteri adalah jumlah koloni bakteri aerob mesofil yang terdapat dalam tiap gram ataupun ml sampel uji. Bakteri mesofil merupakan bakteri yang tumbuh pada temperatur minimal 10-20°C, optimal pada suhu 20-40°C dan maksimal pada suhu 40-45°C. Uji ALTB mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo. Untuk mendapatkan ALTB representatif dilakukan terhadap beberapa pengenceran sample seperti 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} dst. Sampel bentuk padat diperlakukan sebagai berikut; sampel padat dihancurkan dalam kemasan sebelum dibuka, timbang sebanyak 25 g, larutkan dengan PDF hingga 250 ml. Sampel bentuk serbuk seperti jamu, timbang sebanyak 10 g, larutkan dengan PDF hingga 100 ml. Sampel cair seperti minuman ringan tidak perlu diencerkan lebih dahulu.

Sampel yang akan diuji terlebih dahulu dihomogenkan dalam larutan pepton pengencer (pepton dilution fluid, PDF) sehingga didapat pengenceran 10^{-1} . Dari hasil pengenceran tersebut, dipipet sebanyak 1 ml ke dalam tabung pertama yang berisi 9 ml larutan pengencer PDF sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Campuran dikocok homogen. Pengenceran dilakukan demikian seterusnya sehingga diperoleh pengenceran bertingkat 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan seterusnya. Dari setiap hasil pengenceran, dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Selanjutnya, ke dalam setiap cawan petri, dituang sebanyak 15-20 ml media Plate Count Agar (PCA). Cawan petri segera digoyangkan perlahan supaya sampel tercampur rata dengan media pembedihan. Setelah media membeku, cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.

Pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 30-300 koloni dicatat. Pada setiap pemeriksaan, selalu disertakan media control uji (blanko). Angka lempeng total untuk 1 gram atau 1 mL sampel dihitung dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran. ALTB dihitung dari petri dengan jumlah koloni representatif jika tidak terdapat jumlah koloni representatif, ALTB merupakan prakiraan dari pengenceran tertinggi.



Cara Pengenceran Sampel

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mampu melakukan pengujian angka lempeng total bakteri (ALTB)
2. Mampu menginterpretasi hasil pengujian ALTB

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a. Petri dish
 - b. Tabung reaksi
 - c. Pipet ukur
 - d. Erlemeyer
2. Bahan
 - a. Pepton Dilution Fluid (PDF)
 - b. Plate Count Agar (PCA)
 - c. Sample makanan, minuman, jamu
 - d. Alkohol 70%

E. PROSEDUR KERJA

1. Bersihkan alat yang akan digunakan dengan alkohol
2. Buat pengenceran sample dengan PDF
3. Masukkan 1 ml sample tiap pengenceran ke dalam petri dish steril (duplo)
4. Tambahkan PCA secukupnya aduk hingga rata, biarkan membeku
5. Inkubasi 24 – 48 jam pada suhu 37°C

6. Hitung angka lempeng total bakteri

F. HASIL PENGAMATAN

Contoh

Sampel : Tolak Angin
 Diproduksi : Sido Muncul
 No. Batch : KLM 12345
 No. Registrasi : TR 768892001
 Konsentrasi sampel : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}
 Jumlah koloni tiap sampel :
 10^{-3} : 150 170
 10^{-4} : 25 40
 10^{-5} : 10 17

$$\begin{aligned} \text{ALTB} &: (150 + 170) : 2 : 10^{-3} = (150 + 170) : 2 \times 10^3 \text{ Kol/g} \\ &= 160 \cdot 10^3 = 1,6 \times 10^5 \text{ Kol/g} \end{aligned}$$

Syarat ALTB Jamu Serbuk $< 10^6$ Kol/G

Kesimpulan : Jamu Sido Muncul dengan No. Bacth KLM 12345 memenuhi syarat ALTB

a. ALTB Pada Sampel Jamu

Sampel :
 Diproduksi :
 No. Batch :
 No. Registrasi :
 Konsentrasi sampel : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}
 Jumlah koloni tiap sampel :
 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}

Perhitungan ALTB (Syarat ALTB Jamu Serbuk $< 10^6$ Kol/G)

Kesimpulan :

b. ALTB Pada Sampel Makanan Ringan

Sampel :
 Diproduksi :
 No. Batch :
 No. Registrasi :
 Konsentrasi sampel : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}
 Jumlah koloni tiap sampel :
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}

Perhitungan ALTB (Syarat ALTB Makanan Ringan $< 10^4$ Kol/G)

Kesimpulan :

c. ALTB Pada Sampel Minuman Ringan

Sampel :
Diproduksi :
No. Batch :
No. Registrasi :
Konsentrasi sampel : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}
Jumlah koloni tiap sampel :
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}

Perhitungan ALTB (Syarat ALTB Minuman Ringan $< 2 \cdot 10^2$ Kol/ml)

Kesimpulan :

MODUL PRAKTIKUM X

UJI *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN) COLIFORM

A. DASAR TEORI

MPN Coliform adalah suatu metode penentuan angka mikroorganisme dengan metode Angka Paling Mungkin yang digunakan luas di lingkungan sanitasi untuk menentukan jumlah koloni Coliform di dalam air, susu dan makanan lainnya. Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah bakteri yang dapat memfermentasi laktosa membentuk gas, misalnya bakteri Coliform.

Metode MPN menggunakan medium cair di dalam tabung reaksi, dimana prinsipnya adalah menghitung jumlah tabung yang positif yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Tabung pada pengujian MPN dinyatakan positif apabila timbul kekeruhan dan atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham.

Pengujian menggunakan metode MPN terdiri atas dua cara, yaitu menggunakan deretan 3 tabung dan deretan 5 tabung reaksi. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian dan kepekaan yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak. Namun pada prinsipnya cara penentuan menggunakan deretan 5 tabung sama dengan metode MPN menggunakan deretan 3 tabung.

Pengujian MPN dilakukan dengan menggunakan sampel berbentuk cair, apabila sampel yang akan digunakan berbentuk padatan maka sampel tersebut harus dibuat cair (suspensi) lebih dahulu dengan perbandingan 1 : 10.

Tahapan uji kualitatif koliform secara lengkap terdiri dari tiga tahap, yaitu:

1. Uji Penduga

Uji ini menggunakan *Lactose Broth* atau *Mac Conkey Broth* (MCB), apabila sampel yang digunakan mengandung bakteri asam laktat, misalnya susu, dapat digunakan *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB). Bakteri asam laktat dapat memfermentasi laktosa dan membentuk gas, hingga dapat mengakibatkan pembacaan uji positif yang salah. Inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 24 jam, dan tabung dinyatakan positif jika terbentuk gas sebanyak 10% atau lebih dari volume di dalam tabung durham. Tabung yang tidak menunjukkan gas diperpanjang lagi inkubasinya sampai 48 jam. Jika tetap tidak terbentuk gas, dihitung sebagai tabung negatif.

2. Uji Penguat

Terbentuknya gas di dalam *Mac Conkey Broth* (MCB) atau di dalam *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) tidak selalu menunjukkan jumlah bakteri koli karena mikroba lainnya mungkin juga ada yang dapat memfermentasi laktosa dengan membentuk gas, misalnya bakteri asam laktat dan beberapa khamir tertentu. Uji penguat dilakukan dengan memindahkan sebanyak 1 ose biakan dari tabung yang membentuk gas pada media *Mac Conkey Broth* (MCB) / *Brilliant*

Green Lactose Bile Broth (BGLBB) ke dalam tabung yang berisi 10 ml *Brilliant Green Lactose Bile 2%* (BGLB 2%). Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Gas yang terbentuk pada tabung Durham dalam media *Brilliant Green Lactose Bile* (BGLB) 2% memperkuat bukti adanya bakteri Koliform.

3. Uji Pelengkap

Uji pelengkap dilakukan untuk mengidentifikasi jenis bakteri Coliform dalam sampel yang menunjukkan tabung positif pada uji penguat. Tabung yang menunjukkan hasil positif diambil 1 ose biakan dan digoreskan di atas media endo agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika hasil uji pelengkap menunjukkan terbentuknya koloni hijau metalik pada media endo agar, hasil tersebut menyatakan bahwa terdapat bakteri *Escherichia coli* pada sampel. Jika hasil uji pelengkap menunjukkan terbentuknya koloni berwarna merah tanpa kilap hijau metalik, hasil tersebut menyatakan bahwa bakteri Coliform yang terkandung dalam sampel bukan *Escherichia coli* tetapi kemungkinan jenis lain dari bakteri Coliform seperti *Enterobacter aerogenes*.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

Mampu melakukan uji Most Probable Number (MPN) Coliform pada sampel makanan, minuman ataupun jamu

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Tabung Durham
 - c. Kawat ose
 - d. Pipet ukur
 - e. Erlenmeyer
 - f. Lampu bunsen
2. Bahan
 - a. *Lactose broth*
 - b. *MacConkey Broth* (MCB)
 - c. *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB)
 - d. Endo Agar
 - e. Sampel uji

E. PROSEDUR KERJA

1. Uji Penduga

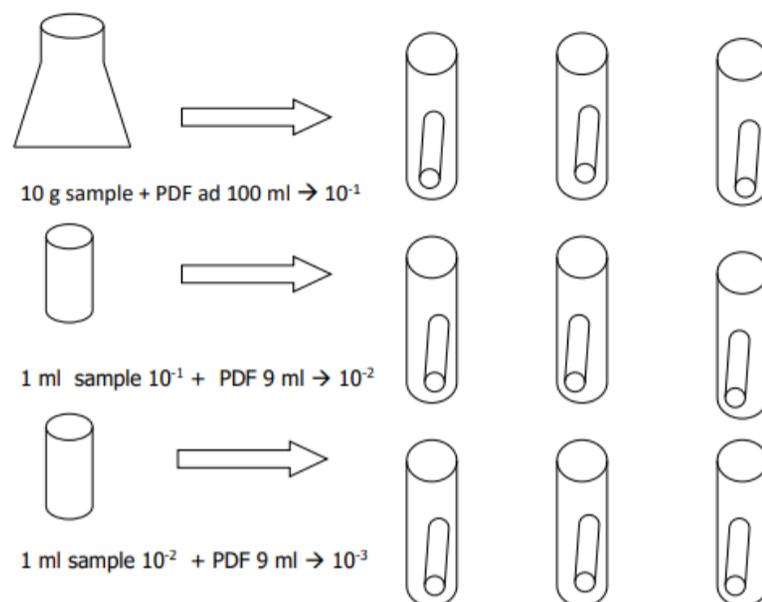
- a. Siapkan 9 tabung reaksi berisi 9 ml MCB/LB steril dengan serial pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Tiap pengenceran terdapat masing-masing 3 buah tabung.
- b. Sampel dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam masing-masing 3 tabung sesuai pengenceran.
- c. Beri tanda untuk setiap sampel dan pengenceran agar tabung tidak tertukar dan mempermudah pengamatan.
- d. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C
- e. Amati dan catat tabung yang menunjukkan reaksi positif dengan adanya gelembung udara pada tabung Durham dan atau mengalami perubahan warna dari ungu menjadi keruh pada larutan uji.
- f. Apabila setelah diamati 24 jam tidak terbentuk gas pada tabung Durham, maka inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam.

2. Uji Penguat

- a. Pindahkan 1 ose dari tabung yang menunjukkan hasil positif dari uji penduga kedalam tabung yang berisi BGLB steril.
- b. Beri tanda untuk setiap sampel serta pengencerannya agar tabung tidak tertukar dan mempermudah pengamatan
- c. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C .
- d. Setelah 24 jam amati dan catat tabung yang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham.
- e. Apabila setelah diamati 24 jam belum terjadi perubahan, maka inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam.

3. Uji Pelengkap

- a. Hasil biakan positif pada uji penguat MPN Coliform diambil 1 ose biakan
- b. Goreskan ke permukaan media Endo agar secara zig-zag
- c. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- d. Amati pertumbuhan koloni pada media Endo agar.
- e. Koloni yang menampakkan adanya warna merah dengan hijau metalik merupakan koloni bakteri *Escherichia coli*.



F. HASIL PENGAMATAN

a. Sampel Jamu

Sampel :

Diproduksi :

No. Batch :

No. Registrasi :

Tabung gas positif

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN

Syarat MPN Coliform < 3 /g

Kesimpulan :

Gambar hasil uji :



b. Sampel Makanan Ringan

Sampel :

Diproduksi :

No. Batch :

No. Registrasi :

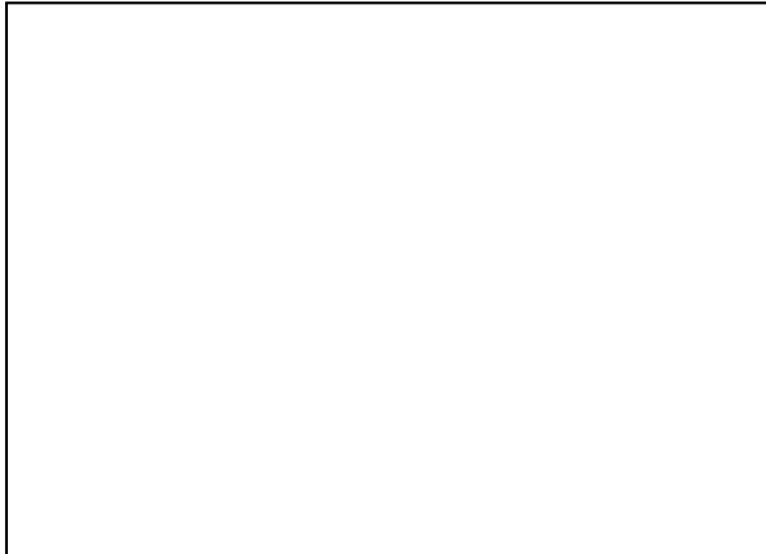
Tabung gas positif

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN

Syarat MPN Coliform < 3 /g

Kesimpulan :

Gambar hasil uji :



c. Sampel Minuman Ringan

Sampel :

Diproduksi :

No. Batch :

No. Registrasi :

Tabung gas positif

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN

Syarat MPN Coliform < 3 /g

Kesimpulan :

Gambar hasil uji :



TABEL MPN COLIFORM

Jumlah Tabung Positif Gas			MPN per Gram/ml	Batas Keyakinan	
1 : 10	1 : 100	1 : 1000		Min	Max
0	0	0	3		
0	0	1	3	< 0.5	5
0	1	0	3	< 0.5	9
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	9	1	36
3	0	1	14	3	37
3	0	2	15	3	44
3	1	0	20	7	89
3	1	0	21	4	47
3	1	2	28	10	150
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	640	74	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	2400		

MODUL PRAKTIKUM XI

UJI KEPEKAAN BAKTERI TERHADAP ANTIBIOTIKA

A. DASAR TEORI

Penyakit infeksi bakteri dapat diobati dengan antibiotika baik yang bersifat bakterisida maupun bakteriostatika. Untuk mengatasi penyakit dengan tepat diperlukan data kepekaan kuman penyebab infeksi tersebut terhadap antibiotika yang tersedia. Pengujian kepekaan antibiotik dapat dilakukan dengan metode difusi atau dilusi.

Pada metode difusi prinsipnya adalah terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan cara cakram atau sumuran. Pada metode difusi cakram, kertas cakram yang mengandung antibiotik diletakkan di atas media yang telah mengandung mikroba, kemudian diinkubasi dan dibaca hasilnya berdasarkan kemampuan penghambatan mikroba di sekitar kertas cakram. Metode difusi sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang sudah ditanami bakteri. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran tersebut dan diinkubasikan. Zona jernih yang terbentuk di sekitar cakram atau sumuran merupakan indikator penghambatan antibiotik terhadap pertumbuhan mikroba.

Metode pengujian berikutnya adalah dengan metode dilusi. Pada metode ini dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, dapat menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) dan *Minimum Bacterial Concentration* (MBC) atau kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada agen medium cair yang ditambahkan dengan agen mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut dilanjutkan dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

Metode Dilusi Padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

B. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mampu melakukan uji kepekaan kuman terhadap berbagai antibiotik dengan metode difusi dan dilusi.
2. Mampu menginterpretasi hasil tes uji kepekaan antibiotika

C. PENTUNJUK UMUM

1. Gunakan APD selama praktikum
2. Catat semua hal yang diamati dalam lembar kerja
3. Penanganan limbah organik harus melalui persetujuan instruktur

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a. Alat gelas : cawan petri, beaker glass, pipet, erlenmeyer, tabung reaksi
 - b. Mikropipet
 - c. Pinset
 - d. Kawat ose
 - e. Pipet ukur
 - f. Jangka sorong
2. Bahan
 - a. Suspensi kuman
 - b. Standar Mc. Farland
 - c. Cakram antibiotik
 - d. Media Muller Hinton Agar (MHA)
 - e. Aquadest steril
 - f. Alkohol 70 %
 - g. Kapas usap steril

E. PROSEDUR KERJA

1. Cara Cakram
 - a. Kapas usap steril dimasukkan kedalam suspensi kuman
 - b. Pada lempeng agar Muller Hitton usapkan suspensi kuman dengan kapas secara merata
 - c. Dengan menggunakan pinset ambil cakram antibiotika dan letakkan diatas lempeng yang telah ditanami kuman
 - d. Inkubasi pada 35° C selama 16-18 jam
2. Cara Tabung
 - a. Buat suspensi antibiotika dengan kadar tertentu
 - b. Masukkan 1 ml suspensi kuman kedalam tubung reaksi yang telah berisi larutan antibiotika
 - c. Inkubasi pada suhu 35° C selama 16-18 jam

F. HASIL PENGAMATAN

No.	Nama Bakteri	Antibiotik	Diameter Hambat (cm)

DAFTAR PUSTAKA

- Cappuccino, J.G. dan N. Sherman. 2002. *Microbiology A Laboratory Manual (7 th Edition)*. Perason Education Inc. Publishing as Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Departemen Kesehatan RI. 2009. *Peraturan Kepala BPOM RI No. HK.00.06.1.52.4011 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Dwidjoseputro, D. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan: Malang
- Harley, J.P. and L.M. Prescott. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology 5th edition*. McGraw-Hill. New York.
- Harmita dan Maksum Radji. 2005. *Buku Ajar Analisis Hayati*, Edisi Kedua. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Imam Supardi. dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi dalam Pengolah dan Keamanan Pangan*. Bandung: Yayasan Adikarya IKAPI.
- Jawet, Melnick, and Adelberg. 2001. *Medical Microbiology*, ed. 22, California Appleton and Lange.
- Kementrian Kesehatan. 2017. *Bahan Ajar Farmasi: Mikrobiologi dan Parasitologi*. Jakarta : PPSDM
- Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine, ed 4*. William & Wikins: New York.
- Madigan, Michael T., David, P., Clarck, David S., John, M. Martinko. 2011. *Brock Microbiology of Microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings publishing.
- Maksum Radji. 2009. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Srikandi Fardiaz. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta : PT. Raja Grafindo.
- Staf Pengajar Mikrobiologi FKUI. 2005. *Penuntun Praktik Mikrobiologi Kedokteran*. Medical Multimedia Indonesia: Jakarta
- Syamsuri, 2007. *IPA Biologi*. Jakarta: PT Elangga.
- Tournas, V., M.E. Stack, P.B. Mislivec, and H.A. Koch. 2001. *Yeast, Molds, and Mycotoxins*. Washington, D.C.: U.S. Food & Drug Administration. Center for Safety & Applied Nutrition.