

**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM
MIKROBIOLOGI**

Oleh;
Tim Penyusun



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

KATA PENGANTAR

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

Topik-topik praktikum yang ada di dalam buku ini disusun dengan memperhatikan fasilitas yang tersedia disamping memperhatikan pengetahuan dan keterampilan dalam bidang biologi yang perlu dikuasai oleh mahasiswa biologi. Dalam edisi ini penulis melakukan revisi pada beberapa topik dan menambahkan topik yang dirasa perlu, salah satu topik tersebut adalah teknik pewarnaan metode KOH.

Penulis rasakan masih ada kekurangan dalam penyusunan buku petunjuk praktikum mikrobiologi ini. Segala macam kritikan yang membangun dan saran dari semua pihak akan dihargai dan diterima dengan lapang hati. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi pemakainya.

Malang, Februari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

Tata Tertib Praktikum	3
Topik 1 Pembuatan Media dan Sterilisasi	4
Topik 2 Pengambilan Sampel dan Pemiakan Mikroorganisme	9
Topik 3 Teknik Isolasi	14
Topik 4 Respirasi Bakteri	17
Topik 5 Pewarnaan	19
Topik 6 Perhitungan Jumlah Mikroba	25
Topik 7 Uji kualitas Air Berdasar Nilai MPN Coliform	30
Topik 8 Uji daya Antimikroba dan Antifungi dari Antiseptik dan Tanaman Obat	34
Topik 9 Aplikasi Pemanfaatan Mikroorganisme Untuk Produk Makanan	37

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Dalam praktikum mikrobiologi, saudara bekerja dengan mikroorganisme oleh karena itu hendaknya berhati-hati karena mikroorganisme ini sangat kecil atau kasat mata dan tidak berwarna sehingga sukar dilihat atau diketahui keberadaannya. Walaupun bahan yang disediakan umumnya tidak berbahaya bagi kesehatan namun tetap harus berhati-hati dengan mikroorganisme.

Laksanakan dengan tertib dan seksama semua petunjuk yang telah diberikan oleh pembimbing, serta patuhilah semua tata tertib laboratorium sebagai berikut:

1. Letakkan tas dan benda-benda lain milik saudara yang tidak diperlukan pada tempat yang telah disediakan. Jangan sekali-kali meletakkan barang-barang lain diatas meja praktikum
2. Dilarang melakukan aktivitas makan dan minum didalam laboratorium mikrobiologi
3. Gunakanlah jas laboratorium selama praktikum berlangsung karena saudara akan bekerja dengan bahan-bahan kimia dan mikroorganisme
4. Lepaskanlah sepatu dan gunakanlah sandal khusus laboratorium saudara, gunakanlah masker dan sarung tangan (*hands glove* steril) bila perlu
5. Sebelum mulai bekerja dipelajari betul apa yang akan dilakukan. Buatlah skema kerja yang baik sehingga saudara dapat bekerja dengan tepat, cepat dan teliti
6. Kondisi steril penting dalam praktikum mikrobiologi, oleh karena itu ikutilah selalu cara kerja secara tepat dan steril. Apabila hal ini diabaikan maka tidak menutup kemungkinan saudara akan mengalami kegagalan
7. Jauhkan tangan saudara dari mulut, hidung, telinga selama bekerja di laboratorium
8. Kalau terjadi kesalahan atau kecelakaan segera lapor kepada asisten dan pembimbing
9. Setelah praktikum selesai, bersihkan semua alat-alat yang telah digunakan menurut ketentuan laboratorium. Meja dibersihkan dengan menggunakan desinfektan atau alkohol setelah selesai mengerjakan praktikum
10. Setiap kali selesai praktikum **DIWAJIBKAN** menyerahkan jurnal pekerjaan atau laporan sementara kepada asisten pendamping masing-masing untuk mendapatkan persetujuan keabsahannya
11. Sebelum meninggalkan laboratorium, matikan gas atau kompor pemanas, lampu, air dan jangan lupa mencuci tangan dengan desinfektan

TOPIK 1 PEMBUATAN MEDIA DAN STERILISASI

1. Pendahuluan MEDIA

Kelangsungan hidup dan pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh adanya nutrisi dan faktor lingkungan. Bahan nutrisi yang tersedia dapat berupa bahan alami dan dapat pula berupa bahan sintetis. Bahan nutrisi yang digunakan mikroorganisme biasanya berupa senyawa sederhana yang tersedia secara langsung atau berasal dari senyawa yang kompleks yang kemudian dipecah oleh mikroorganisme menjadi senyawa yang sederhana melalui proses enzimatik. Bahan nutrisi ini dapat berupa cairan atau padatan setengah padat (semi solid) yang disebut sebagai media.

Berdasarkan komposisi atau susunan bahannya

a. Media alami

Komposisi media ini tidak diketahui secara pasti baik jenisnya maupun ukurannya. Media ini sudah tersedia secara alami misalnya air, nasi, buah, biji, daging dan lain-lain

b. Media sintetis

Sering juga disebut media buatan. Komposisi senyawa berikut takarannya diketahui secara pasti, tidak tersedia secara alami tapi dibuat. Media sintetis sering digunakan untuk mempelajari sifat genetika mikroorganisme. Senyawa organik dan anorganik ditambahkan dalam media sintetis harus murni sehingga harganya mahal, misalnya: sabouroud agar, czapek's dox agar, cairan hanks dan lain-lain.

c. Media semi sintetis

Komposisinya sebagian diketahui secara pasti, sebagian lagi tidak disebut juga media setengah buatan misalnya potato dextrose agar, nutrient agar dan lain-lain.

Berdasarkan Bentuknya

a. Media cair

Komposisi dapat sintetis dapat pula alami. Keadaan cair karena tidak ditambahkan bahan pematat.

b. Media padat

Sama halnya dengan media cair hanya bedanya disini ditambahkan bahan pematat (agar-agar, amilum atau gelatin).

c. Media semi padat

Sebenarnya media ini termasuk media padat tapi karena keadaannya lembek disebut semisolid. Bahan pematat yang ditambahkan kurang dari setengah medium padat sedangkan komposisinya sama dengan yang lainnya.

Berdasarkan Kegunaannya

a. Media umum

Media ini digunakan secara umum artinya media ini dapat ditumbuhkan oleh berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur misalnya NA (nutrient agar) dan lain-lain.

b. Media selektif

Media ini dipakai untuk menyeleksi mikroorganisme sesuai dengan yang diinginkan, jadi hanya satu jenis mikroorganisme saja yang dapat tumbuh dalam media ini atau hanya satu kelompok tertentu saja, misalnya media *salmonella sigella* agar yaitu media khusus untuk mengamati atau menyelidiki *salmonella* atau *shigella* dari makanan atau bahan lain.

c. Media deferensial

Media ini digunakan untuk menyeleksi mikroorganisme. Medium ini dapat ditumbuhi berbagai jenis mikroorganisme tapi salah satu diantaranya dapat memberikan salah satu ciri yang khas sehingga dapat dibedakan dari yang lain dan dapat dipisahkan

d. Medium pengaya

Medium ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme untuk keperluan tertentu. Dibiakkan dalam medium ini supaya sel-sel mikroorganisme tertentu dapat berkembang dengan cepat sehingga diperoleh populasi yang tinggi. Komposisi medium sangat diperluka dan sangat menguntungkan bagi pertumbuhan sel mikroorganisme yang bersangkutan.

STERILISASI

Suatu alat dan bahan disebut steril apabila bahan tersebut bebas dari mikroorganisme. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu: cara kimia, mekanik atau fisik.

a. Sterilisasi cara kimia

Bahan atau senyawa kimia yang memiliki sifat membunuh mikroorganisme dapat digunakan untuk sterilisasi atau desinfektan, misalnya dibidang kedokteran. Contohnya alkohol 70%, detergen, karbol, lisol, merkurokrom dan lain-lain

b. Sterilisasi cara mekanik

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan alat penyaring yang sangat halus

c. Sterilisasi cara fisik

Umumnya dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu tinggi. Salah satu contohnya adalah menggunakan alat autoklaf, disterilkan pada suhu 121° C dengan tekanan 1,5 kg/cm² (15 lbs) dalam jangka waktu tertentu bergantung pada apa yang disterilkan.

A. Tujuan

1. Mengetahui cara pembuatan media
2. Mengetahui cara dan macam-macam sterilisasi

B. Praktikum

1. Pembuatan Media

Alat dan bahan

- | | |
|--------------------------------------|--------------------|
| - Timbangan | - Kompor pemanas |
| - Gelas ukur 500 ml | - Aquades |
| - Labu erlenmeyer 500 ml dan 1000 ml | - Kapas |
| - Tabung reaksi | - Kain kasa |
| - Kaca pengaduk | - Benang atau tali |
| - Autoklaf | - alcohol 70% |

- Beaker glass 500 ml dan 1000 ml

Cara Kerja

1. Membuat medium umum untuk bakteri (Nutrient Agar/NA dan Nutrien Broth/NB)

- a. NB manual

Beef extract.....	3 gram
Peptone	5 gram
Aquades	1000 ml
- b. NB instant

NB.....	20 gram
Aquades	1000 ml
- c. NA manual

Beef extract.....	3 gram
Peptone	5 gram
Agar-agar.....	15 gram
Aquades	1000 ml
- d. NA instan

NA.....	20 gram
Aquades	1000 ml

- a. Masukkan beef extract, peptone, agar-agar dan aquades ke dalam beaker glass 1000 ml
- b. Panaskan di atas kompor pemanas, aduk hingga homogen atau hampir mendidih
- c. Masukkan kedalam tabung reaksi masing-masing 10 ml untuk media tegak dan 5-7 ml untuk media miring
- d. Semua tabung medium ditutup dengan dengan kapas yang telah dibungkus dengan kain kasa
- e. Sterilkan dengan autoklaf
- f. Setelah disterilkan untuk media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung

2. Membuat medium untuk jamur (Potato Dextrose Agar)

- a. Manual

Kentang	200 gram
Dextrose	10 gram
Agar-agar.....	15 gram
Aquades	1000 ml
- b. Instan (disesuaikan dengan kemasan PDA instan)

PDA.....	39 gram
Aquades	1000 ml
- a. Kupaslah kentang lalu bersihkan, iris dadu sepanjang 1 cm kemudian dimasak dalam 500 ml aquades dan biarkan mendidih, jaga agar volume tetap
- b. Saring ekstrak kentang dan ambil filtratnya
- c. Tambahkan dekstrose dan agar-agar serta aquades panaskan pada api sedang sambil diaduk hingga homogen atau mendidih
- d. Masukkan pada tabung reaksi masing-masing 10 ml untuk media tegak dan 5-7 ml untuk media miring

- e. Semua tabung medium ditutup dengan dengan kapas yang telah dibungkus dengan kain kasa
- f. Sterilkan dengan autoklaf
- g. Setelah disterilkan untuk media tegak biarkan tabung dalam keadaan berdiri dan untuk media miring tabung miringkan dengan catatan media tidak sampai menyentuh tutup tabung

2. Sterilisasi cara kimia

- Alkohol 70 %

 - a. Semprotkan alkohol pada tangan dan meja yang akan digunakan untuk pengamatan
 - b. Bersihkan meja dengan lap bersih

3. Sterilisasi cara fisika

- 3 cawan Petri
 - Kertas HVS
 - Plastik
 - Karet
 - Autoklaf
- a. Bungkus masing-masing cawan Petri dengan kertas HVS kemudian masukkan ke dalam plastik
 - b. Istilah autoklaf dengan aquades setinggi batas sarangan
 - c. Aturlah suhu sebesar 121°C , dengan tekanan 1 atm dan aturlah waktu yang akan digunakan sampai pada angka 15-20 menit.
 - d. Pastikan lubang uap dalam keadaan tertutup (**CLOSE**)
 - e. Tarik tuas power sampai ketitik **ON** lalu tekan tombol **ON**, apabila lampu hijau menyala maka dapat dipastikan autoklaf dalam keadaan bekerja
 - f. Setelah alarm berbunyi maka tarik tuas power hingga ke titik **OFF** kemudian bukalah lubang uap dengan cara memutarnya kearah **OPEN**
 - g. Diamkan autoklaf selama 15 menit untuk memastikan bahwa uap telah keluar dan autoklaf dalam keadaan tidak panas.
 - h. Bukalah tutup autoklaf dan keluarkan alat-alat yang telah steril

TOPIK 2

PENGAMBILAN SAMPEL DAN PEMBIAKAN MIKROORGANISME

1. Pendahuluan

Mikroorganisme terdapat dimana-mana, baik didalam tanah, air, udara maupun pada makhluk hidup termasuk pada jaringan pada tubuh kita sendiri (kulit dan selaput lendir). Mikroorganisme mampu tumbuh dengan baik apabila tersedia media atau makanan sebagai substratnya.

Untuk mempelajari morfologi mikroba kita perlu menangkap dan membiakkannya pada media agar nutrisi (padat) terlebih dahulu. Biasanya mikroba akan tumbuh pada media ini setelah diinkubasi selama 1 x 24 atau 2 x 24 jam.

Sebelum melakukan pembiakan mikroorganisme, langkah yang perlu dilakukan adalah melakukan pengambilan sampel. Teknik pengambilan sampel merupakan suatu aspek penting yang harus diperhatikan ketika melakukan penelitian mikrobiologi. Sampel yang diambil haruslah merupakan representasi dari seluruh bagian yang diteliti. Untuk itu diperlukan teknik yang benar agar terhindar dari kesalahan yang mengakibatkan sampel menjadi bias. Beberapa prinsip pengambilan sampel antara lain adalah; sampel yang diambil merupakan perwakilan dari keseluruhan bagian yang diteliti; sampel yang diambil benar-benar dari sumbernya dan sampel tetap terjaga kondisinya seperti saat pengambilan sampai dilakukan tahap pembiakan dan analisa sampel

2. Tujuan

Mempelajari langkah-langkah pengambilan sampel

Mempelajari morfologi koloni mikroba pada media agar nutrisi padat

3. Praktikum

A. Pengambilan Sampel Bakteri Tanah

Alat:

Auger / Gurdi

Sarung tangan steril

Plastik klip steril

Neraca

Tabung eppendorf 14 ml steril

Bahan :

Buffer fosfat (10 ml)

Langkah Kerja:

1. Carilah lahan yang akan diambil sampel tanahnya
2. Cabuti rumput atau tanaman lain yang mungkin tumbuh di atas bagian lahan yang akan diambil sampel tanahnya
3. Pasang sarung tangan
4. Tancapkan auger. Jika tidak ada auger, bisa dilakukan dengan sendok atau spatula steril. Tanah yang diambil minimal 4 cm dari permukaan tanah.
5. Masukkan tanah ke dalam plastic klip steril
6. Timbang 1 gram sampel tanah dengan prosedur aseptis
7. Masukkan ke dalam tabung eppendorf
8. Tambahkan 10 ml buffer phosphate
9. Kocok – kocok tabung sebanyak 25 kali

10. Segera lakukan langkah pembiakan terhadap sampel

B. Pengambilan Sampel Bakteri pada Permukaan Daun

Alat:

Sarung tangan steril

Neraca

Spatula steril

Beaker glass 100ml steril

Bahan:

0,1 % larutan pepton dengan kandungan 1 % tergitol

Sayuran

Langkah Kerja:

1. Kenakan sarung tangan steril
2. Timbang 5 gram sayuran dengan prosedur aseptis
3. Masukkan sayuran ke dalam glass beaker
4. Tambah 45 ml larutan pepton, aduk menggunakan spatula selama 15 sampai 30 menit
5. Diamkan selama 30 menit
6. Homogenkan selama 10-15 detik
7. Segera lakukan langkah pembiakan terhadap sampel

C. Teknik Swab dengan Pelarut

Alat :

Template 10 x 10 cm steril

Swab steril (2 buah)

Glass beads (3 buah)

Tabung eppendorf 14 ml steril

Gunting steril

Bahan :

Aquades steril

Langkah Kerja :

1. Masukkan aquades steril sebanyak 10 ml
2. Tentukan permukaan yang akan diambil sampelnya, letakkan template di atas permukaan tersebut
3. Basahi swab pertama, usap permukaan bagian dalam template menggunakan swab dengan arah mendatar
4. Balik swab, ulangi mengusap permukaan dengan arah membujur
5. Patahkan pangkal swab yang terpegang oleh tangan, masukkan swab ke dalam tabung eppendorf
6. Ambil swab kering, ulangi langkah 3 sampai 5.
7. Kocok –kocok tabung eppendorf sebanyak 25 kali
8. Segera lakukan langkah pembiakan terhadap sampel

D. Teknik Pengambilan Sampel Bakteri Kulit (Teknik Swab)

Alat :

Swab steril

Bahan :

Larutan NaCl 0,85 %

Langkah Kerja:

1. Celupkan swab steril ke dalam larutan NaCl 0,85 %
2. Oles permukaan kulit dengan swab

3. Oles swab ke media agar
4. Inkubasi selama 24 jam
5. Lakukan pengamatan terhadap koloni bakteri

E. Pembiakan Sampel Cair dengan Metode Spread-Plate

Alat :

Laminar Air Flow

Batang kaca penabur bentuk L

Bunsen

Pipet 1 ml steril

3 Cawan yang berisi media NA

Kertas label

Bahan :

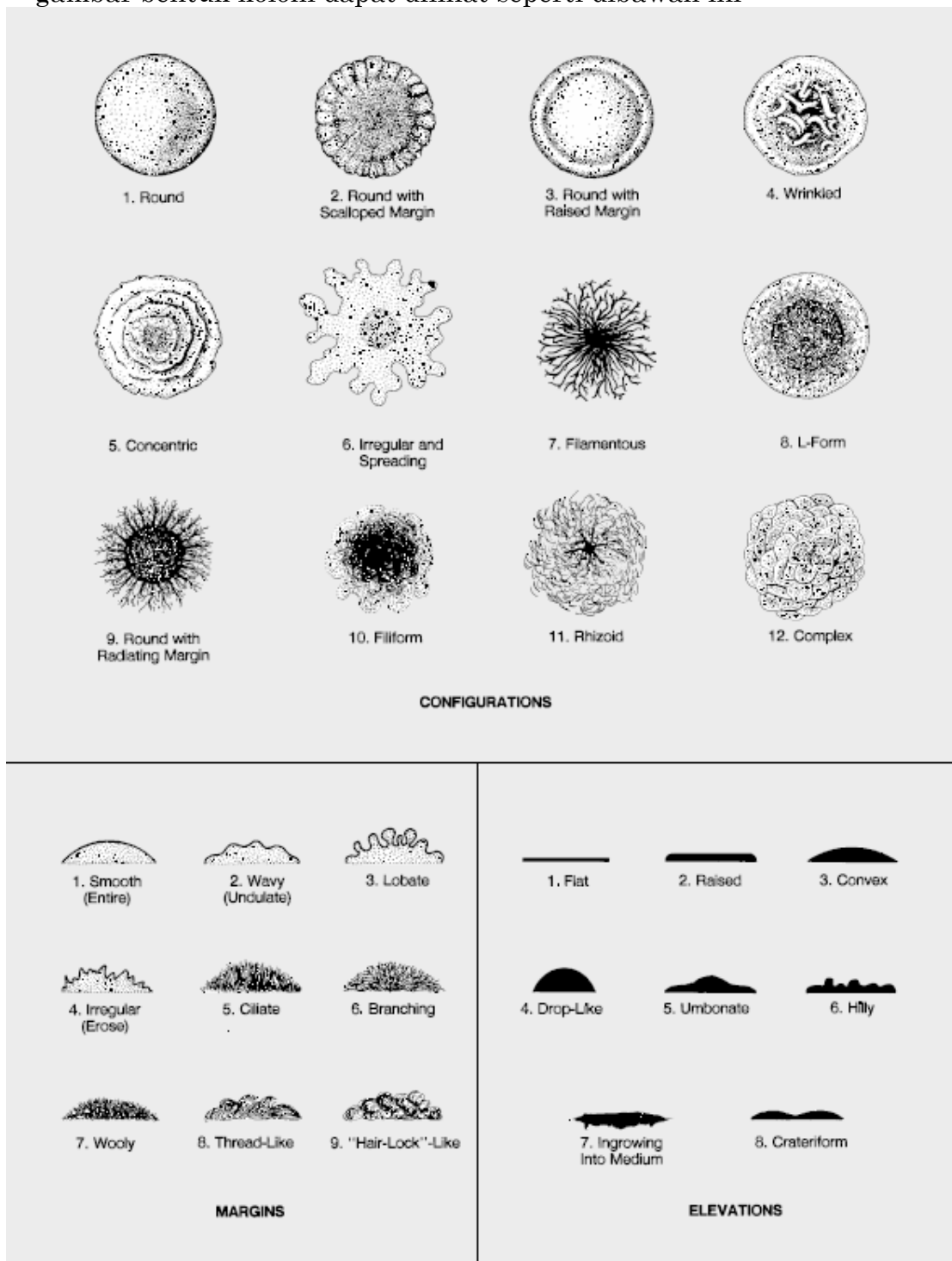
Alkohol 70 %

Sampel bakteri (bakteri tanah, permukaan daun, dan debu)

Langkah Kerja :

1. Beri label masing – masing cawan
2. Pipet 0,1 ml sampel, masukkan ke dalam media NA
3. Celupkan batang kaca penabur ke dalam alkohol 70 %
4. Panaskan di atas Bunsen
5. Biarkan dingin (di dalam cawan, ratakan sampel bakteri menggunakan batang kaca tersebut).
6. Lakukan langkah 3 sampai 6 terhadap dua sampel yang lain
7. Balik cawan, inkubasi selama 24 atau 48 jam pada suhu ruang atau pada 30°C
8. Lakukan pengamatan terhadap koloni mikroba meliputi :
 - jumlah koloni
 - warna koloni
 - bentuk koloni
 - ukuran koloni
 - mengkilat atau suram
 - dan sketsa atau gambar koloni

* gambar bentuk koloni dapat dilihat seperti dibawah ini



Gambar 1. Colony characteristics,
Benson (Companies, 2001)

TOPIK 3 TEKNIK ISOLASI

A. Pendahuluan

Dalam suatu substrat atau media dapat tumbuh lebih dari satu jenis mikroorganisme, dengan demikian kemudian dikembangkan satu teknis pemisahan yang disebut teknik isolasi, sehingga diperoleh hasil atau biakan yang hanya terdiri dari satu jenis mikroorganisme saja yang disebut biakan murni.

Teknik isolasi ada dua cara yaitu teknik menuang dan teknik menggores. Bila mikroorganisme yang akan dipisahkan berada dalam satu suspensi, untuk memisahkan dituangkan ke dalam medium tertentu, maka cara ini disebut teknik menuang (*poured plate*), sedangkan bila mikroorganisme berada dalam suspensi atau suatu padatan, lalu dengan jarum inokulasi diambil dan dioleskan pada medium tertentu, maka cara ini disebut teknik menggores (*streak plate*).

B. Tujuan

Melatih mahasiswa agar mampu memisahkan mikroorganisme dari suatu substrat ke substrat lain atau dari suatu biakan campuran hingga diperoleh biakan yang murni.

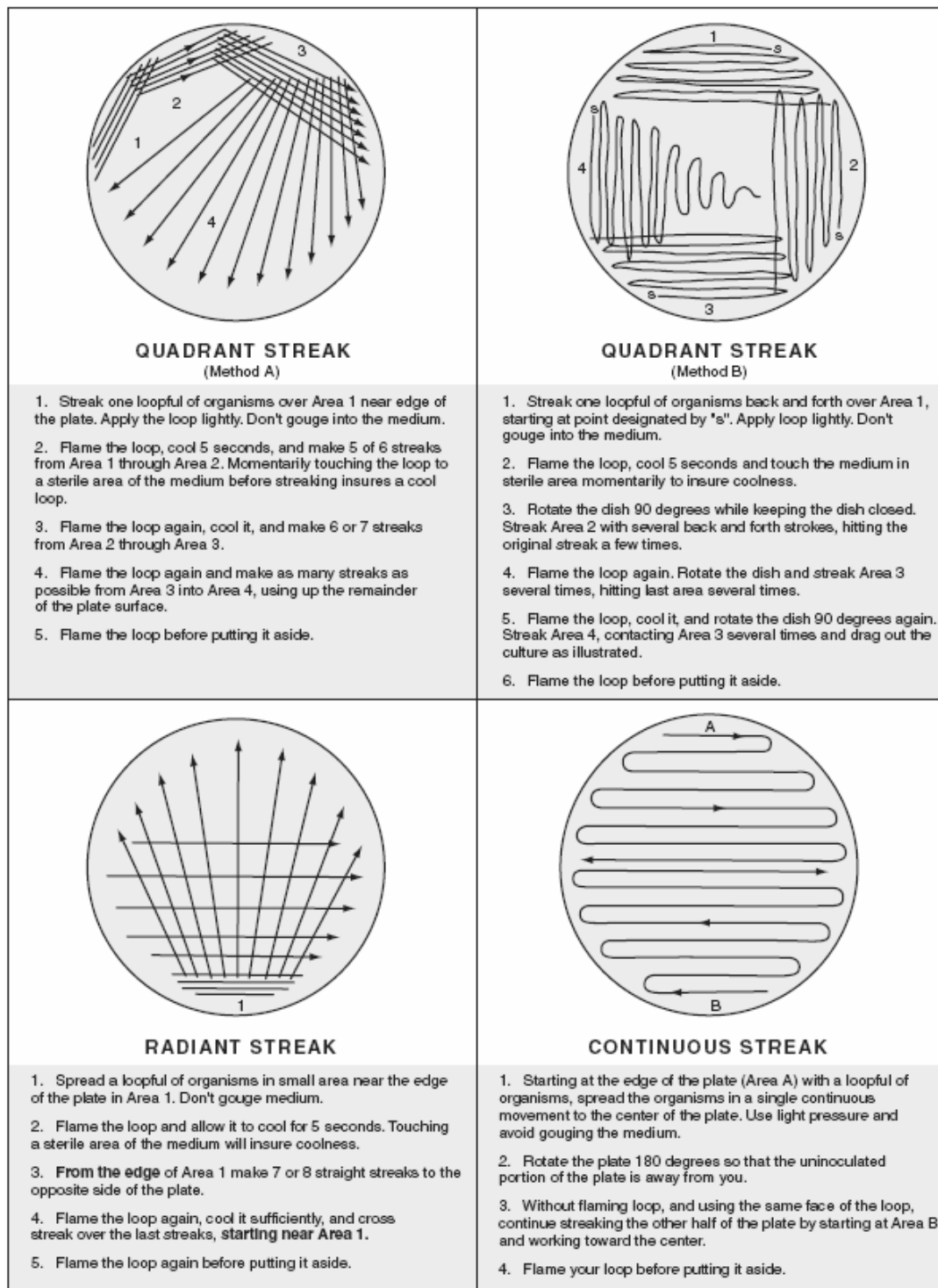
C. Praktikum

Alat dan Bahan

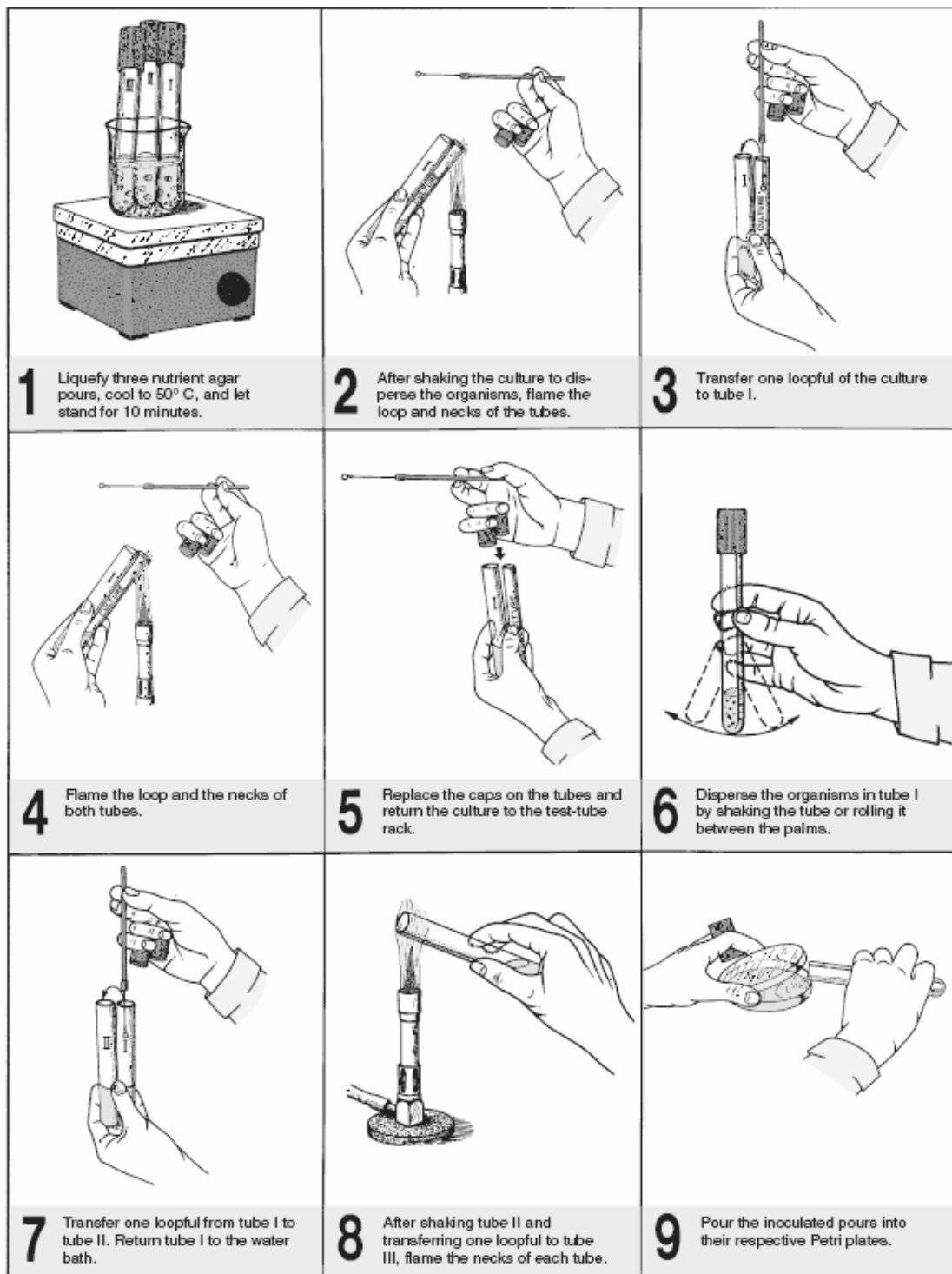
- jarum inokulasi ujung lurus dan ujung melengkung
- Bunsen
- Incubator
- Cawan Petri steril
- Biakan mikroba yang diperoleh dari hasil praktikum topik 3
- NA tegak steril
- NA miring steril

Langkah Kerja

1. cairkan media NA tegak dalam penangas air
2. tuangkan media NA ke dalam cawan Petri steril, diamkan hingga memadat
3. pilihlah 3 macam koloni dari biakan campuran hasil praktikum topik 3.
4. ambil sedikit bakteri dari biakan yang dipilih dengan menggunakan jarum inokulasi
5. goreskan pada medium padat dalam cawan Petri. Goresan dapat dimulai dari satu titik membentuk garis-garis yang sejajar
6. ambil bakteri dengan cara sama seperti sebelumnya, lalu goreskan pada agar miring steril
7. inkubasi semua biakan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam
8. lakukan pengamatan dan catatlah bentuk koloni bakteri tersebut



Gambar 2. Teknik streak plate
Benson (Companies, 2001)



Gambar 3. Teknik pour plate
Benson (Companies, 2001)

TOPIK 4 RESPIRASI BAKTERI

A. Pendahuluan

Kebutuhan akan oksigen bebas dari udara bagi bakteri untuk respirasi sangat berbeda, tergantung pada adanya enzim biooksidatif yang ada pada tiap spesies. Sehingga dikenal adanya istilah aerob dan anaerob. Respirasi yang menggunakan oksigen bebas sebagai penerima elektron disebut arespirasi aerob, sehingga yang menggunakan senyawa anorganik sebagai penerima elektron disebut respirasi anaerob.

B. Tujuan

- a. agar mahasiswa mengetahui sifat respirasi bakteri
- b. agar mahasiswa dapat mengidentifikasi bakteri berdasarkan sifat respirasinya

C. Dasar Teori

Pangamatan terhadap kelompok bakteri yang mempunyai perbedaan sifat respirasi dapat dilakukan pada media pertumbuhan bakteri baik media padat maupun media cair.

Pada media padat, koloni yang tumbuh dipermukaan media dengan elevasi tinggi cembung dan sebagainya merupakan kelompok bakteri yang memerlukan oksigen bebas dari udara. Sedangkan koloni yang tumbuh dibagian atau didalam media adalah kelompok bakteri yang tidak memerlukan oksigen bebas dari udara.

Untuk memperjelas pengamatan terhadap sifat respirasi bakteri biasanya digunakan media cair. Dalam media cair pertumbuhan bakteri tersebut dapat diamati lebih jelas dengan cara mengamati akumulasi dari sel-sel bakteri yang tumbuh, bakteri aerob akan berada diatas permukaan media karena ia akan mengambil oksigen bebas dari udara, bakteri anaerob akan berada didasar jauh dari permukaan. Bakteri yang anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar pada medium cair tersebut, sebagai bakteri mikroaerofil akan tumbuh sedikit dibawah permukaan.

D. Alat dan Bahan

- a. Biakan murni bakteri dalam media agar miring yang berumur 1 x 24 jam
- b. Media NB
- c. Incubator
- d. Tabung kultur atau tabung reaksi

E. Pengamatan

- a. Amati pertumbuhan bakteri pada media cair pada bagian atas, bawah, tengah ataupun merata (media keruh)
- b. Kelompokkan bakteri yang saudara amati, kelompok yang ada: aerob, anaerob, anaerob fakultatif dan mikroaerofil

F. Prosedur

- a. Siapkan 2 media cair dalam tabung kultur yang steril
- b. Ambil biakan murni bakteri yang sudah dibuat
- c. Inokulasikan sebanyak satu ose saja masing-masing biakan kedalam media cair secara aseptik
- d. Ratakan suspensi inokulum tadi dengan cara memutar-mutar atau memilin tabung kultur di antara kedua telapak tangan
- e. Inkubasikan pada suhu kamar selama 1 x 24 jam

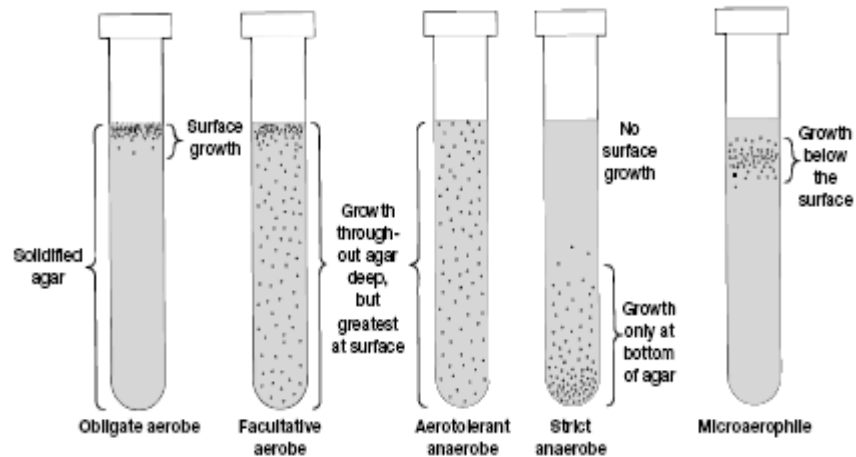
- f. Amati akumulasi pertumbuhan bakteri tersebut kemudian tentukan kelompok bakteri yang saudara amati

G. Analisis data

Menurut cara respirasinya, termasuk kelompok bakteri apa yang anda amati

H. Diskusi

- jelaskan masing-masing kelompok bakteri yang berbeda sifatnya terhadap kebutuhan oksigen
- berikan contoh bakteri (nama spesies) untuk masing-masing kelompok bakteri tersebut



Gambar 4. Pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanisme respirasinya
Harley Prescott (Companies, 2002)

TOPIK 5 PEWARNAAN

A. Pendahuluan

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

Prinsip dasar dari pewarnaan ini adalah ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut **kromogen**. Terjadi ikatan ion karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna. Berdasarkan adanya muatan ini maka dapat dibedakan pewarna asam dan pewarna basa.

Pewarna asam dapat terjadi bila senyawa pewarna bermuatan negatif. Dalam kondisi pH mendekati netral dinding sel bakteri cenderung bermuatan negatif, sehingga pewarna asam yang bermuatan negatif akan ditolak oleh dinding sel, maka sel tidak berwarna. Pewarna asam ini disebut juga **pewarna negatif**. Contoh pewarna asam misalnya: tinta cina, larutan nigrosin, asam pikrat, eosin dan lain-lain. Pewarna basa bisa terjadi bila senyawa pewarna bermuatan positif. Sehingga akan diikat oleh dinding sel bakteri jadi berwarna dan terlihat. Contoh dari pewarna basa misalnya : metilen blue, Kristal violet, safranin, dan lain-lain.

Teknik pewarna asam basa ini hanya menggunakan satu jenis senyawa pewarna, teknik ini disebut pewarna sederhana. Pewarna sederhana ini diperlukan untuk mengamati morfologi, baik bentuk maupun susunan sel. Teknik pewarna yang lain adalah pewarna diferensial, yang menggunakan senyawa lebih dari satu jenis. Diperlukan untuk mengelompokkan bakteri misalnya, bakteri Gram positif atau bakteri tahan asam dan tidak tahan asam, juga diperlukan untuk mengamati struktur bakteri seperti flagella, kapsula, spora dan nucleus.

Teknik pewarnaan bukan pekerjaan yang sulit tapi perlu ketelitian dan kecermatan bekerja serta mengikuti aturan yang berlaku yakni sbb:

1. **Mempersiapkan kaca obyek.** Kaca obyek ini harus bersih dan bebas lemak untuk membuat apusan bakteri yang akan diwarnai.
2. **Mempersiapkan apusan.** Apusan yang baik adalah yang tipis dan kering, terlihat seperti lapisan yang tipis. **Apusan ini dapat berasal dari cairan atau padat.**
 - **Biakan cair.** Suspensi sel sebanyak satu atau dua macam jarum inokulasi diletakkan pada kaca obyek, lalu diapuskan pada kaca obyek selebar 1-2 cm. biarkan mengering di udara atau di atas api kecil dengan jarak 25 cm
 - **Biakan padat,** bakteri yang dikultur pada medium padat tidak dapat langsung dibuat apusan seperti dari biakan cair, tapi harus diencerkan dulu. Letakkan setetes air pada kaca obyek, lalu dengan jarum inokulasi ambil bakteri dari biakan padat, letakkan pada tetesan air dan apuskan. Biarkan mengering di udara.
 - **Fiksasi dengan pemanasan.** Apusan bakteri pada kaca obyek bila tidak diletakkan secara kuat, dapat terhapus pada waktu proses pewarnaan lebih lanjut. Proses peletakan apusan pada kaca obyek dapat dilakukan diantaranya dengan cara memanaskan di atas api.

B. Praktikum

1. Pewarna sederhana

Tujuan: Mengetahui morfologi bakteri.

Alat dan Bahan

- Kaca Obyek
- Lampu Spiritus
- Kertas isap
- Larutan metilen blue
- Jarum inokulum
- Biakan mikroba yang diperoleh dari praktikum topik 3
- Mikroskop

Cara Kerja

a. Pewarna basa

1. Buat apusan bakteri yang akan diperiksa, lalu fiksasi
2. Teteskan metilen blue pada apusan bakteri, biakan terendam selama 1-2 menit
3. Cuci pewarna dengan air mengalir
4. Keringkan dengan cara diisap dengan kertas isap, jangan dilap atau dihapus
5. Amati dengan mikroskop dengan menggunakan minyak imersi pada perbesaran 1000 kali
6. Gambarkan bentuk sel bakteri yang saudara amati dan tuliskan warna yang terlihat

b. Pewarna asam

Alat dan bahan yang digunakan sama seperti pada pewarna basa, hanya zat pewarna yang digunakan adalah : tinta cina / larutan nigrosin, larutan iosin (pewarna asam).

1. Letakkan tetes tinta cina pada obyek
2. Letakkan satu atau dua mata jarum onokulasi biakan bakteri pada tetesan tinta cina, suspensikan dengan baik.
3. Dengan menggunakan kaca obyek yang lain, apuskan suspensi bakteri tadi pada seluruh permukaan kaca obyek. Biarkan mengering di udara.
4. Amat dengan mikroskop dengan menggunakan minyak atsiri
5. Gambar warna dan bentuk yang saudara amati

2. Pewarna Gram

Prinsip

Proses pewarnaan diferensial ini memerlukan 4 jenis reagen. Bakteri terbagi atas dua kelompok berdasarkan pewarnaan ini, yakni bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Perbedaan ini berdasarkan warna yang dapat dipertahankan bakteri. Reagen pertama disebut warna dasar, berupa pewarna basa, jadi pewarna ini akan mewarnai dengan jelas. Reagen kedua disebut bahan pencuci warna (*decolorizing agent*). Tercuci tidaknya warna dasar bergantung pada komposisi dinding sel, bila komponen dinding sel kuat mengikat warna, maka warna tidak akan tercuci maka warna perbandingan tidak akan terlihat, yang terlihat pada akhir hasil tetap warna dasar.

Tujuan : mengamati dan membedakan struktur yang terdapat dalam sel bakteri dan juga untuk membedakan kelompok bakteri berdasarkan reaksi terhadap warna yang sekaligus menunjukkan sifat bakteri tersebut.

Alat dan Bahan

- Kaca obyek
- Jarum inokulasi
- Lampu spiritus
- Kertas isap
- Mikroskop
- Aquades steril
- Pewarna Dasar :Larutan Gentian Violet
- Larutan Pengikat Warna Dasar : Lar. Iodium
- Larutan pencucu warna dasar : alcohol 96%
- pewarna perbandingan : larutan safranin
- Biakan murni bakteri

Cara Kerja

a. Pewarnaan basa

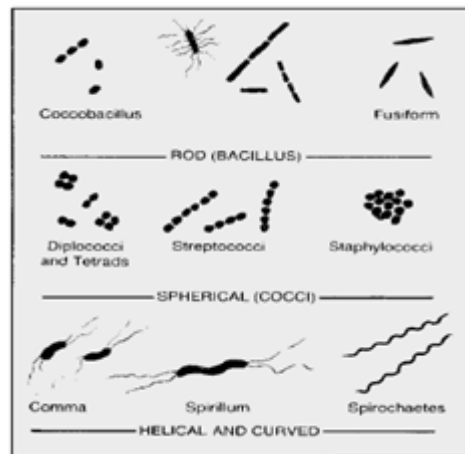
1. siapkan kaca benda lalu teteskan aquades diatasnya
2. membuat apusan bakteri yang akan diamati dengan menggunakan inokulum
3. teteskan metilen blue diatasnya biarkan selama 60 detik
4. keringkan dengan cara serap air yang masih menggenang dengan menggunakan kertas hisap
5. amati di bawah perbesaran mikroskop

b. Pewarnaan asam

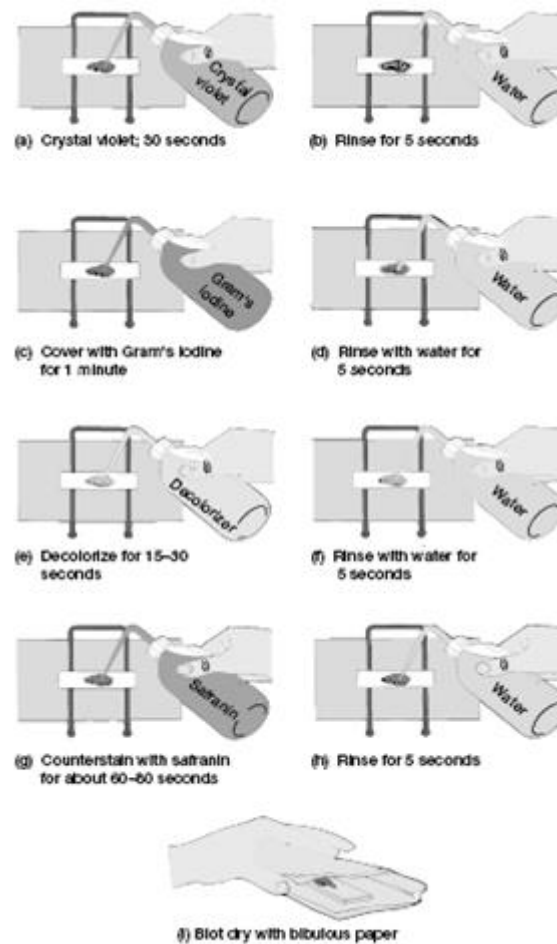
1. siapkan kaca benda lalu teteskan aquades diatasnya
2. buat apusan bakteri dengan menggunakan jarum inokulum
3. tetesan larutan eosin diatas apusan
4. ratakan campuran tersebut dengan menggunakan kaca benda
5. keringkan selama 60 detik
6. amati dibawah perbesaran mikroskop

c. Pewarnaan gram negative dan pewarnaan positif

1. siapkan kaca benda lalu teteskan aquades diatasnya
2. buat apusan dari dua biakan bakteri dengan menggunakan jarum inokulum
3. difiksasi diatas api bunsen selama 5 detik
4. teteskan larutan kristal violet diatasnya
5. kemudian biarkan selama 60 detik
6. siram dengan aquades
7. teteskan iodium di atas kaca benda kemudian diamkan selama 60 detik
8. teteskan alkohol 70% diatasnya kemudian diamkan selama 30 detik
9. teteskan larutan safranin kemudian diamkan selama 60 menit
10. teteskan aquades diatasnya
11. serap air yang menggenang diatas kaca benda dengan kertas serap
12. amati dibawah perbesaran mikroskop



Gambar 5. Macam – macam bentuk dan koloni bakteri Harley Prescott (2002)



Gambar 6. Metode Gram Staining Harley Prescott (2002)

d. Pewarna Spora

Beberapa sel bakteri memiliki struktur yang aktif berupa sel vegetatif dan struktur yang pasif yaitu spora. Spora selain merupakan struktur yang inaktif juga dapat tahan terhadap kondisi yang kurang menguntungkan bagi tumbuhan. Spora sepertinya halnya sel vegetatif dapat diwarnai sehingga dapat diamati lebih seksama. Teknik pewarnaan

adalah pewarnaan differensial, yaitu menggunakan lebih dari pewarna, yang hasilnya dapat membedakan spora dari sel vegetatif.

Tujuan : Mengetahui pewarnaan spora bakteri

Alat dan Bahan

- kaca obyek yang bersih
- jarum inokulum
- Bunsen
- Kertas hisap
- Aquades
- Larutan safranin
- Larutan hijau malakit
- Biakan bakteri
- Minyak imersi
- Mikroskop

Cara kerja

- a. siapkan kaca preparat lalu teteskan aquades diatasnya
 - b. buat apusan bakteri dengan menggunakan jarum inokulum, lalu ratakan dengan kaca preparat perlahan dengan cara menggeser perlahan hingga menjadi tipis dan rata
 - c. fiksasi di atas api bunsen selama 5 detik
 - d. teteskan larutan hijau malakit diatas apusan bakteri tersebut, lalu panaskan diatas api Bunsen selama 60 detik, jagalah jangan sampai apusan mongering. Jika kering tambahkan larutan hijau malakit
 - e. cuci dengan aquades atau air mengalir
 - f. teteskan larutan safranin kemudian diamkan selama 60 detik
 - g. cuci dengan menggunakan air mengalir, keringkan dengan menggunakan kertas hisap
 - h. amati dibawah perbesaran mikroskop dengan menggunakan minyak imersi. Sel vegetatif akan berwarna merah muda dan spora akan berwarna hijau
 - i. gambarlah sel dan sporanya
- e. **Pewarnaan KOH**

Tujuan: untuk mengamati gambaran mikroskopik jamur

Alat dan Bahan

- kaca obyek dan kaca penutup yang bersih
- jarum ose
- Biakan jamur
- Larutan KOH 20 %
- Mikroskop

Langkah Kerja

1. Buat apusan dari satu ose biakan jamur di atas gelas obyek
2. Tetesi dengan larutan KOH 20%
3. Tutup dengan kaca penutup
4. Panaskan di atas api Bunsen sambil digerak-gerakkan
5. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x

TOPIK 6 PERHITUNGAN JUMLAH MIKROBA

A. Pendahuluan

Perhitungan jumlah sel mikroba dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, antara lain secara langsung dengan hitung mikroskopik (*direct microscopic count*) menggunakan hemasitometer, dan secara tidak langsung dengan hitung cawan (*plate count*).

Hitung mikroskopik merupakan metode yang cepat dan murah, tetapi mempunyai beberapa kelemahan antara lain: sel-sel yang mati tidak dapat dibedakan dari sel hidup, sel-sel yang berukuran sangat kecil sulit dilihat sehingga kadang-kadang tidak terhitung.

Hitung cawan merupakan metode yang sensitive untuk menentukan jumlah sel mikroba. Prinsip metode hitung adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel mikroba itu akan berbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung dengan mata telanjang, dan disebut dengan "colony forming unit" = cfu.

Metode hitungan cawan ada dua yaitu metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*). Perhitungan jumlah mikroba dianggap valid jika dalam satu cawan tumbuh koloni sebanyak 30-300cfu. Sehingga jika pertumbuhan mikroba terlalu padat, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu.

B. Tujuan

1. Agar mahasiswa dapat melakukan perhitungan sel mikroba secara langsung.
2. Agar mahasiswa dapat melakukan perhitungan sel mikroba secara hitungan.
3. Agar mahasiswa dapat melakukan pemeriksaan kuantitas mikroba berdasarkan metode turbidimetri dengan menggunakan spektrofotometer

C. Konsep Dasar

Pertumbuhan dinyatakan sebagai kemampuan untuk menghasilkan dua sel baru dan hidup. Karena itu setiap pertumbuhan selalu dihasilkan sel baru yang dapat selalu bertambah setiap saat. Pertumbuhan sel akan dapat dilihat dari indikator makin membesarnya koloni bakteri. Analisa untuk pertumbuhan bakteri dapat dilakukan dengan dua cara yaitu membandingkan jumlah sel, berat kering, konsentrasi protein atau nitrogen atau kekeruhan.

Alat dan bahan

- Bakteri murni bakteri pada media NA
- Media nutrient cair steril
- Media nutrient padat steril
- Cawan petri steril
- Air pepton 0,1 %
-

D. Pengamatan

- a. Hitunglah jumlah sel mikroba pada pembesaran 500 X pada kotak-kotak besar (5 kotak) dan masukkan dalam table berikut:

No.	Kotak ke	Jumlah sel mikroba
1.	Atas	
2.	Bawah	

3.	Tengah	
4.	Ujung kiri	
5.	Ujung kanan	
Jumlah		

Tentukan / hitung jumlah sel mikroba dalam sampel dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel / kotak besar} \times 25 \times 10^3$$

Hitung jumlah sel dengan metode cawan dengan menggunakan rumus:

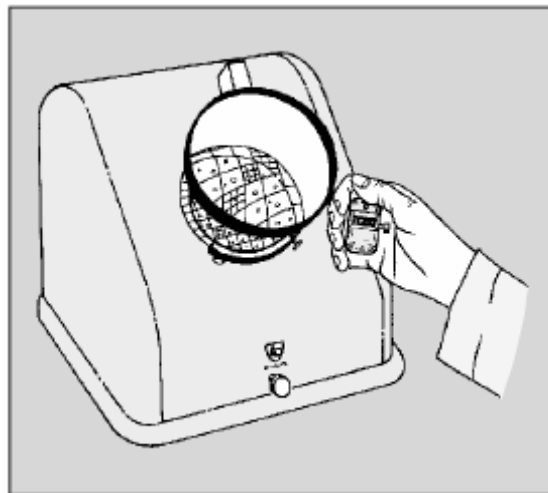
$$\text{Jumlah koloni} \times 1 / \text{pengenceran cfu}$$

E. Prosedur

a. Metode hitung langsung

- Siapkan slide hemasitometer dan kaca penutupnya yang bersih dan letakkan di atasnya. Cara membersihkan permukaan hemasitometer dan kaca penutup ialah dengan secarik kertas lensa yang dibasahi dengan setetes aquades steril sampai tidak terdapat sisa-sisa minyak pada permukaan.
- Homogenkan dulu sampel mikroba yang akan dihitung.
- Ambil sampel mikroba pipet steril dari media cair secukupnya (0,1 sampai 0.5 ml) lalu masukkan ke dalam parit-parit pada hemasitometer (jangan sampai berlebihan). Tinggi sampel yang berbeda diantara kaca benda dan kaca penutup adalah 0,01 mm.
- Letakkan hemasitometer yang telah diberi suspense bakteri di atas meja mikroskop. Amati menggunakan pembesaran lemah, perhatikan kotak-kotak skala yang ada pada slide tersebut. Ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan 0,04 mm², dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil.
- Hitunglah jumlah sel mikroba / ml sampel =

$$\text{Jumlah sel / kotak besar} \times 25 \times 10^3$$



Gambar 7. metode perhitungan menggunakan coloni counter Benson (Companies, 2001)

b. Metode hitung cawan

- Homogenkan dulu sampel mikroba yang akan dihitung
- Lakukan pengenceran terhadap sampel. Caranya ialah pengenceran 10⁻¹ diperoleh dengan memasukkan 1 ml sampel ke dalam 9 ml air pepton. Pengenceran 10⁻² diperoleh memasukkan 1 ml sampel dari pengenceran 10⁻¹

¹ kedalam 9 ml pepton. Pengenceran 10^{-3} diperoleh dengan memasukkan 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-3} kedalam 9 ml pepton, begitu juga seterusnya.

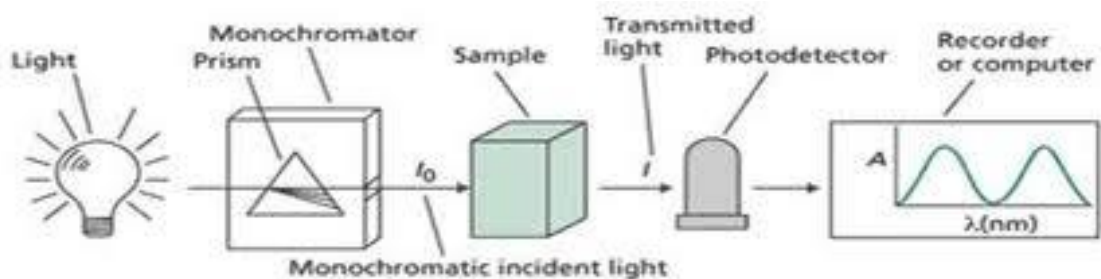
- Inokulasi sebanyak 0,1 ml hasil pengenceran ke permukaan media NA dengan cara taburan, kemudian ratakan dengan cara memutar-mutar cawan di atas meja. Inokulasi ini dapat pula dilakukan dengan metode tuang.
- Inokulasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam
- Amati koloni yang tumbuh, dan hitunglah jumlahnya. Perhitungan yang dianggap benar hanya pada cawan yang terdapat pertumbuhan koloni di antar 30-300 cfu.
- Hitunglah jumlah mikroba / ml sampel dengan rumus:

$$\text{Jumlah koloni} \times 1 / \text{pengenceran cfu}$$

c. Metode Turbidimetrik

Kuantitas mikroba menunjukkan banyaknya jumlah sel mikroba. Penghitungan jumlah sel bakteri dapat dilakukan dengan metode turbidimetri (uji kekeruhan) menggunakan spectrophotometer. Metode ini merupakan metode yang cepat untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu larutan secara tidak langsung. Mikroba dalam suatu bahan cair dapat dideteksi berdasarkan kekeruhannya. Pertumbuhan sel bakteri dalam suatu medium cair akan meningkatkan kekeruhan media, yang akan mempengaruhi jumlah sinar yang dapat ditransmisikan menembus medium.

Jumlah bakteri dapat dihitung menggunakan spektrofotometer yang prinsip kerjanya adalah membaca tingkat kekeruhan dalam media bakteri. Spektrofotometer dapat menghitung seluruh sel bakteri baik yang hidup maupun yang mati. Jadi semua suspensi yang ada dalam larutan kuvet akan terbaca semua. Prinsip kerja spektrofotometer adalah cahaya dari sumber radiasi jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian di serap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan.



Nilai yang keluar dari cahaya yang diserap dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel, sesuai dengan Hukum Beert-Lambert:

$$A = \epsilon bc$$

A = absorbansi

ϵ = epsilon atau Absorptivitas Molar ($M \cdot 1cm^{-1}$)

b = lebar celah (cm)

c = konsentrasi (M)

Pengukuran kekeruhan dilakukan pada panjang gelombang 600-700 nm, dimana pada panjang gelombang ini absorbansi sinar oleh komponen sel adalah minimum.

Alat-alat

1. Cuvet
2. Mikro Pipet 1ml
3. Blue tip
4. Tabung reaksi
5. Spektrofotometer

Bahan-bahan

1. Media NB steril
2. Biakan E.coli 24 jam dalam media NB

Langkah Kerja :

1. Siapkan enam buah tabung reaksi steril dan beri label: 0-5
2. Masukkan 3 ml NB steril masing-masing ke dalam tabung reaksi 0, 2, 3, 4, dan 5
3. Masukkan 3 ml kultur bakteri E.coli ke dalam tabung reaksi 1 dan 2
4. Lakukan serial dilution: ambillah 3 ml larutan dari tabung 2 dan masukkan ke tabung 3
5. Ganti blue tip setiap kali memindah larutan
6. Ambillah 3 ml larutan dari tabung 3 dan masukkan ke tabung 4
7. Ambillah 3 ml larutan dari tabung 4 dan masukkan ke tabung 5
8. Bacalah absorbansi masing-masing tabung reaksi dengan menggunakan spektrofotometer
9. Buatlah kurva standard yang didapat dari absorbansi dan konsentrasi larutan dengan menggunakan Microsoft Excel sehingga didapatkan persamaan x dan y
10. Bacalah absorbansi larutan yang tidak diketahui konsentrasinya
11. Hitung konsentrasinya melalui persamaan x dan y yang didapat dari standard

F. Analisa hasil

- a. Berdasarkan hitung langsung
- b. Berdasarkan hitung cawan
- c. Berdasarkan metode turbidimetri

G. Diskusi

- a. Apa yang dapat disimpulkan dengan menghitung sel mikroba?
- b. Apakah perhitungan dengan 2 metode menghasilkan perbedaan yang sangat besar? Berikan alasan saudara.

TOPIK 7

UJI KUALITAS AIR BERDASARKAN NILAI MPN COLIFORM

A. Pendahuluan

Coliform adalah kelompok bakteri yang mudah menyebar dan banyak terdapat di air dan dapat menyebabkan pencemaran pada air tersebut. Kualitas air ditentukan oleh banyak air kotor salah satunya adalah keberadaan bakteri coliform. Pemeriksaan kualitas air nilai MPN dari coliform dapat dilakukan dengan 3 tahap pengujian yaitu, uji pendugaan, uji penegasan dan uji penguat.

B. Tujuan

Agar mahasiswa dapat Melakukan penyajian kualitas air secara mikrobiologis berdasarkan nilai MPN coliform

C. Konsep dasar

Kelompok bakteri coliform sangat mudah menyebar hampir pada semua tempat. Tidak terkecuali dalam air. Umumnya bakteri coliform ini banyak terdapat pada lingkungan air, sebab feces merupakan salah satu bahan pencemaran yang banyak mengandung kelompok bakteri ini.

Adanya bakteri coliform menentukan kualitas air, umumnya dinyatakan dengan nilai MPN coliform. Makin besar nilai MPN melampaui nilai standart maka kualitas air sangat rendah, sebaliknya makin kecil nilai MPN dari standart minimal maka kualitas semakin baik.

D. Alat dan Bahan

- a. Tabung kultur
- b. Media Brilliant Green Lactase Bilebroth (BGLB)
- c. Media Eosin Methelin Blue (EMB)
- d. Sampel air yang diuji

E. Pengamatan

a. Uji pendugaan

Amati adanya gelembung udara di dalam tabung durham

b. Uji penegasan

Amati adanya gelembung udara di dalam tabung durham

c. Uji penguat

Amati pertumbuhan koloni pada media EMB

d. Tentukan nilai MPN setelah a, b, c, dilakukan

F. Prosedur

a. Uji pendugaan

- 1) Siapkan 9 tabung kultur yang masing-masing berisi 10 ml media cair kaldu lactose steril yang sudah dilengkapi dengan tabung durham. Aturlah letaknya pada rak tabung dan masing-masing beri kode (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3).
- 2) Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 10 ml kedalam tabung kultur yang berkode A1, A2, A3.
- 3) Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 1 ml kedalam tabung kultur yang berkode B1, B2, B3
- 4) Tuangkan air sampel menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 0,1 ml kedalam tabung kultur yang berkode
- 5) Inokulasikan 9 tabung kultur yang sudah diperlakukan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Amati adanya gelembung udara di dalam tabung durham. Catatlah kode tabung yang positif mengeluarkan gas. Mikroba penghasil gas yang tumbuh pada tabung adalah kelompok mikroba yang mampu memfermentasikan laktosa.

b. Uji penegasan

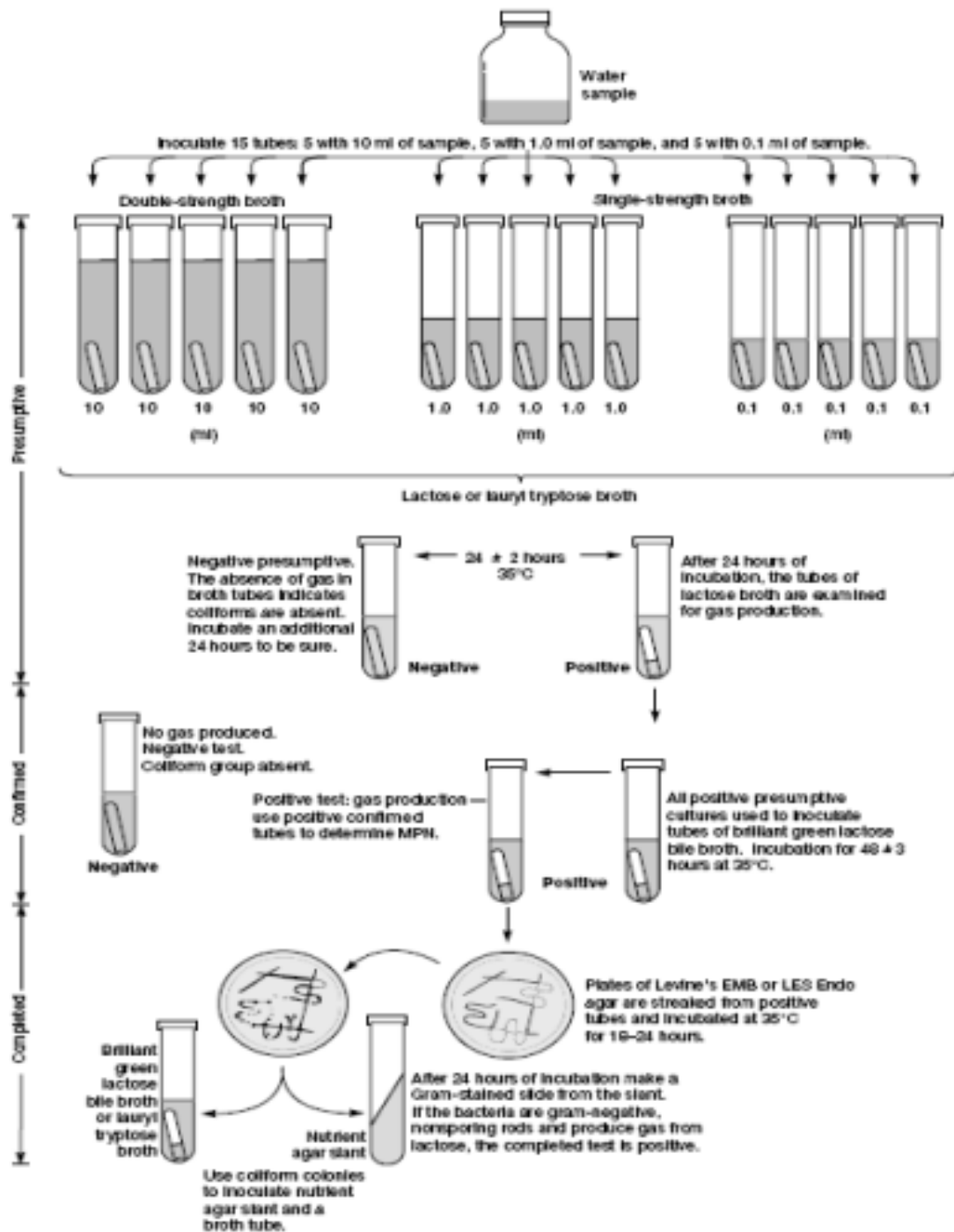
- 1) Siapkan tabung kultur yang masing-masing berisi 10 ml media cair BGLB steril yang sudah dilengkapi dengan tabung durham. Atur letaknya pada rak tabung dan masing-masing beri kode misalnya : (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3), sehingga jumlahnya sama dengan jumlah tabung yang positif saja.
- 2) Tuangkan air sample yang sudah diinkubasikan dalam media kultur laktosa menggunakan pipet steril masing-masing sebanyak 1 ml ke dalam tabung yang positif.
- 3) Inkubasikan tabung kultur yang sudah diperlukan pada suhu 45°C selama 1 x 24 jam.
- 4) Amati adanya gelembung udara di dalam tabung durham. Catatlah kode tabung yang positif mengeluarkan gas. Mikroba penghasil gas yang tumbuh pada tabung adalah kelompok mikroba yang mampu memfermentasikan laktosa dan tahan terhadap suhu tinggi 45°C mikroba ini disebut kelompok bakteri coliform fekal.

c. Uji penguat

Uji penguat dapat dilakukan dengan mendeteksi adanya bakteri *E. coli*, caranya ialah :

- 1) Inokulasi sample perlakuan dari tabung yang positif pada uji penegasan sebanyak satu ose ke permukaan media EMB secara zig-zag. Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
- 2) Amati pertumbuhan koloni pada media EMB koloni yang menampakkan adanya kilau metalik adalah koloni bakteri *E. coli*
- 3) Selanjutnya dapat dipastikan lagi dengan cara mengamati inokulum dari koloni tersebut secara langsung dengan menggunakan mikroskop
- 4) Buatlah sediaan yang diwarnai secara gram, kemudian amati di bawah mikroskop. Bakteri *E. coli* akan memperlihatkan sebagian bentuk batang, gram negative.
- 5) Setelah semua pengujian selesai, tentukanlah nilai MPN Coliformnya berdasarkan table MPN padalampiran. Nilai MPN ditentukan berdasarkan jumlah tabung yang positif dari perlakuan, dan dihitung = $MPN_{tabel} \times 1/\text{pengenceran tengah}$.

Untuk memperjelas perlakuan dapat diikuti gambar berikut :



Gambar 8. Metode uji coliform kualitas air
Harley Prescott (2002)

d. **Analisa Hasil**

- Tentukan beberapa nilai MPN Coliform dari sample
- Bandingkan dengan MPN standart yang ditentukan oleh DEPKES. Bagaimana kualitas air berdasarkan nilai MPN Coliform.

e. **Diskusi**

- Mengapa dalam penentuan kualitas air secara mikrobiologi factor keberadaan bakteri sangat menentukan?
- Apa sebabnya nilai MPN Coliform tidak melebihi ketentuan yang dipersyaratkan oleh Depkes?

TOPIK 8

UJI ANTI MIKROBA dan ANTIFUNGI DARI ANTISEPTIK

A. Pendahuluan

Mikroba dapat disingkirkan, dihambat dengan atau dibunuh menggunakan bahan kimia. Selain bahan kimia, pertumbuhan bakteri dapat dihambat oleh faktor-faktor lain yaitu oleh sinar matahari, logam, suhu dll. Berbagai jenis bahan kimia yang dibuat secara sintetik telah banyak dimanfaatkan orang untuk menyembuhkan luka dan telah diuji khasiatnya, zat yang demikian disebut dengan zat antiseptic.

B. Tujuan

- c. Agar mahasiswa dapat melakukan pengujian daya antimikroba terhadap bakteri
- d. Agar mahasiswa dapat mengidentifikasi bakteri uji terhadap antimikroba.

C. Dasar Teori

Bahan kimia dan fisika (seperti panas dan radiasi) memegang peran penting dalam pengendalian mikroba. Bahan kimia dan fisika dapat dikelompokkan berdasarkan atas pengaruh yang ditimbulkan terhadap mikroba. Jika bahan tersebut menyebabkan hambatan atau penghentian pertumbuhan mikroba, bahan tersebut disebut mikrobiostatik, sedangkan bahan yang mematikan mikroba disebut mikrobiosidal.

Antiseptik adalah senyawa kimia yang dapat menurunkan jumlah mikroba permukaan tubuh. Antiseptik sifatnya lebih lemah sehingga tidak merusak jaringan, misalnya : iodium, mercurochrome, dll.

Pengujian daya antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain :

- a. Cara cakram ('disk method'), uji dengan menggunakan cakram kertas saring yang telah di celupkan kedalam suatu mikroba, lalu diletakkan pada lempeng agar yang diuji
- b. Cara tabung ('tube method'), dibuat suatu deretan antimikroba dengan pengenceran konsentrasi tersebut dalam media cair, kemudian di tanami bakteri yang diuji. Daya antimikroba yang efektif diamati dari tabung yang tidak menampakkan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi yang terendah ('minimal inhibitory concentration' = M.I.C/konsentrasi hambatan minimal = K.H.H).

D. Alat dan Bahan

- a. Biakan murni bakteri dalam media nutrient cair yang berumur 24 jam
- b. Media lempeng nutrient agar (NA) steril
- c. Berbagai zat antiseptik : betadin, sabun yang mengandung antiseptik, iodium, wipol
- d. *Paper disc*
- e. Cotton buds

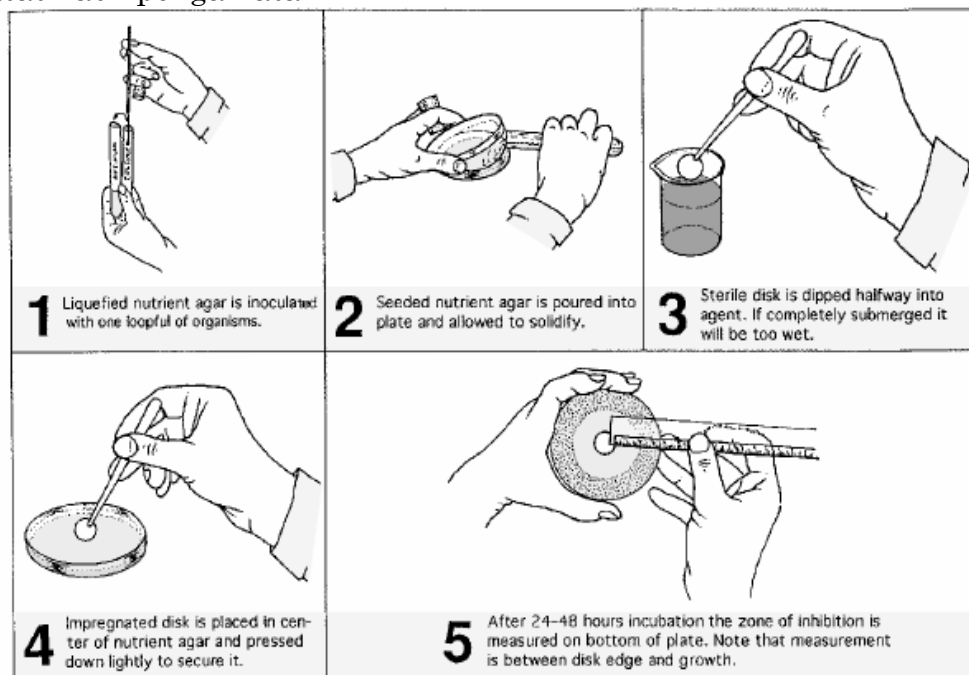
E. Pengamatan

Amati dan bandingkan lebar zona hambat untuk masing-masing antiseptic yang digunakan dalam praktikum.

F. Prosedur

- a. Sediakan dua media NA steril dan masing-masing beri kode sesuai dengan bakteri yang diuji
- b. Inokulasikan secara merata masing-masing biakan murni bakteri ke permukaan medium NA sesuai dengan kodenya. Caranya ialah secara

- aseptik, celupkan ujung 'cotton buds' ke dalam medium nutrien cair, kemudian oleskan pada permukaan oleskan pada permukaan medium lempeng NA sampai rata.
- Buatlah modifikasi *paper disc* dan siapkan sejumlah zat antiseptik yang diuji. Caranya dapat dibuat dari kertas hisap yang dibentuk bulat menggunakan perforator. Rendam *paper disc* di dalam zat antiseptic selama 15 menit
 - Siapkan media lempeng NA steril, sementara itu bagilah menjadi 4 sektor sesuai dengan antiseptik
 - Letakkan *paper disc* yang sudah direndam dalam antiseptik menggunakan pinset steril pada permukaan media NA yang sudah diinokulasi bakteri. Atur jarak antara *paper disc* agar tidak terlalu dekat, sesuaikan dengan kode sekornya.
 - Inokulasi kedua sediaan yang sudah diperlakukan ini pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - Ukurlah diameter zona hambat dari pertumbuhan bakteri pada masing-masing perlakuan
 - Catat hasil pengamatan



Gambar 8. Metode zona hambat
Benson (2001)

G. Analisa Data

- Apa artinya jika zona hambat makin besar/makin kecil?
- Menurut hasil pengamatan, antiseptik mana yang paling kuat dan paling lemah untuk menekan pertumbuhan bakteri. Jelaskan !

H. Diskusi

- Samakah ukuran zona hambat dari masing-masing antiseptik?
- Untuk spesies bakteri yang berbeda, bagaimana zona hambat yang terbentuk, beda atau tidak, jelaskan !

I. Laporan

Laporan yang dibuat hendaknya membahas mengenai zona hambat untuk masing-masing antiseptic dan perbandingannya, juga bagaimana untuk bakteri dari spesies yang berbeda.

J. Tugas Untuk Mahasiswa

Pelajari mekanisme penghambatan zat antiseptic terhadap pertumbuhan mikroba.

TOPIK 9 PEMANFAATAN MIKROBA UNTUK PRODUK MAKANAN

A. Pendahuluan

Susu fermentasi adalah produk susu yang diperoleh dari fermentasi susu melalui penambahan mikroorganisme yang sesuai dan mengakibatkan penurunan pH dengan atau tanpa koagulasi. Yoghurt adalah minuman sehat yang terbuat dari fermentasi susu sapi. Istilah yoghurt berasal dari bahasa Turki, yang berarti susu asam. Yoghurt diartikan sebagai bahan makanan yang berasal dari susu sapi dengan bentuk menyerupai bubur atau es krim yang rasanya asam. Yoghurt dibuat melalui proses fermentasi menggunakan campuran bakteri asam laktat (BAL) yang dapat menguraikan gula susu (laktosa) menjadi asam laktat. Adanya asam laktat inilah yang menyebabkan yoghurt berasa asam. Aroma yang spesifik dari yoghurt terdiri dari komponen-komponen karbonil dengan diasetil dan acetaldehid yang dominan. Proses fermentasi menyebabkan kadar laktosa dalam yoghurt berkurang, sehingga yoghurt aman dikonsumsi oleh orang yang lanjut usia atau yang alergi terhadap susu.

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri gram-positif yang tidak membentuk spora dan dapat memfermentasikan karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat. Berdasarkan taksonomi, terdapat sekitar 20 genus bakteri yang termasuk BAL. Beberapa BAL yang sering digunakan dalam pengolahan pangan adalah *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*.

Ada beberapa macam produk yoghurt, sesuai dengan jenis mikroba fermentator mungkin teknologi pembuatannya. Yoghurt komersial dibagi menjadi tiga kategori utama, yaitu *Plain/natural yoghurt* (yoghurt tanpa penambahan bahan lain, selain susu dan kultur), *fruit yoghurt* (yoghurt yang ditambah buah) dan *flavoured yoghurt* (yoghurt yang berasa). Pada dasarnya pembuatan yoghurt meliputi pemanasan susu, pendinginan, inokulasi dan inkubasi susu.

B. Tujuan

1. Agar mahasiswa mengetahui aplikasi pemanfaatan mikroorganisme untuk pembuatan produk makanan
2. Agar mahasiswa mampu membuat yoghurt

C. Alat-alat

1. Panci besar dan kecil dengan tutupnya
2. Sumber panas (kompor)
3. Fermentor (toples dengan tutupnya)
4. Pengaduk
5. Bak
6. Thermometer batang

D. Bahan-bahan

1. Susu sapi segar 1 L

2. Bakteri starter 2%: *S. thermophilus*, *L. bulgariicus*, *L. acidophilus*, *bifidobacterium*
3. Gula 5%
4. Flavouring agent (essense)
5. Skim milk 2%

E. Cara kerja

1. Didihkan air dalam panci besar
2. Masukkan susu segar ke dalam panci kecil
3. Masukkan panci kecil ke dalam panci besar dan tunggu sampai suhu susu mencapai 70-75°C
4. Angkat panci kecil dan masukkan panci ke dalam bak yang berisi air dingin untuk mempercepat pendinginan
5. Ukur suhu susu sampai mencapai suhu 40°C
6. Tambahkan starter sebanyak 2% lalu aduk sampai merata
7. Tambahkan essense secukupnya dan aduk
8. Masukkan susu ke dalam botol-botol kecil secara aseptis di dalam LAF
9. Biarkan dalam suhu ruangan selama 1x24 jam
10. Amati perubahan yang terjadi pada susu, yoghurt berhasil terbentuk jika terjadi perubahan pada tekstur dan rasa, yaitu lebih kental (menggumpal) dan asam