

Petunjuk Praktikum Mikrobiologi

PENYUSUN :

Aliyah Purwanti, M.Si
apt. Sholihatil Hidayati, M.Farm.

Program Studi Sarjana Farmasi
Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi
2024/2025



UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN

Jl. Dr Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax. (0331) 483536,
E_mail : fikes@uds.ac.id Website: <http://www.uds.di.ac.id>

KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

Nomor : 958/FIKES-UDS/K/II/2025

Tentang

PENETAPAN BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM MATA KULIAH PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI FAKULTAS ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS dr. SOEBANDI SEMESTER IV TAHUN AKADEMIK 2024/2025

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA DEKAN FAKULTAS ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

- Menimbang :
- Bahwa untuk memperbaiki kualitas dan mutu akademik secara berkelanjutan Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dipandang perlu untuk menyusun buku petunjuk praktikum;
 - Bahwa Buku Petunjuk Praktikum Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi yang telah tersusun tersebut, dinilai layak dan memenuhi persyaratan teknis akademis dan administrasi untuk dijadikan pedoman dalam pelaksanaan perkuliahan praktikum pada Prodi tersebut;
 - Bahwa untuk penetapan Buku Petunjuk Praktikum seperti yang termaktub pada huruf a dan b di atas, perlu diterbitkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi;
- Mengingat :
- Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional;
 - Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi;
 - Peraturan Pemerintah Nomor 60 Tahun 1999 tentang Pendidikan Tinggi;
 - Peraturan Pemerintah Nomor. 57 Tahun 2021 tentang Standar Nasional Pendidikan
 - Permendiknas Nomor 62 Tahun 2016 tentang Sistem penjaminan Mutu Pendidikan Tinggi
 - Permendikbud Nomor 3 Tahun 2020 Tentang Standar Nasional Pendidikan
 - Keputusan Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor 234/U/2000 tentang Pedoman Pendirian Perguruan Tinggi;
 - Keputusan Menteri Pendidikan, Kebudayaan, Riset Dan Teknologi Republik Indonesia Nomor 291/E/O/2021 tentang Perubahan Bentuk Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Dr. Soebandi Di Kabupaten Jember Menjadi Universitas dr. Soebandi Di Kabupaten Jember Provinsi Jawa Timur Yang Diselenggarakan Oleh yayasan Pendidikan Jember International School;
 - Statuta Universitas dr. Soebandi

Tembusan Kepada Yth :

- Rektor Universitas dr. Soebandi*
- Para Warek Universitas dr. Soebandi*
- Kaprodi Farmasi*
- Arsip*



UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN


Jl. Dr Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax. (0331) 483536,
E_mail : fikes@uds.ac.id Website: <http://www.uds.di.ac.id>

MEMUTUSKAN

- Menetapkan :
- PERTAMA** : Surat Keputusan Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi tentang Penetapan Buku Petunjuk praktikum mata kuliah Praktikum Mikrobiologi Semester IV Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Tahun Akademik 2024/2025;
- KEDUA** : Modul ini digunakan sebagai acuan dalam praktikum mata kuliah Praktikum Mikrobiologi Semester IV Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi;
- KETIGA** : Keputusan ini ditetapkan sampai Tahun Akademik 2024/2025 berakhir;
- KEEMPAT** : Hal-hal yang belum diatur dalam keputusan ini akan di atur lebih lanjut;
- KELIMA** : Surat Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan; dan apabila dikemudian hari terdapat kekeliruan, maka akan diadakan perbaikan sebagaimana mestinya.

DI TETAPKAN DI : JEMBER
PADA TANGGAL : 14 Februari 2025

Universitas dr. Soebandi
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,



Ai Nur Zannah, S.ST, M. Keb
NIK. 19891219 201309 2 038

Tembusan Kepada Yth :

1. Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Para Warek Universitas dr. Soebandi
3. Kaprodi Farmasi
4. Arsip

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur ke hadirat Allah SWT atas kesempatan yang diberikan untuk selesainya penyusunan Buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi ini. Buku petunjuk ini disusun berdasarkan kebutuhan mahasiswa Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi, khususnya untuk para mahasiswa yang menempuh mata kuliah Praktikum Mikrobiologi.

Buku petunjuk ini terdiri dari beberapa bagian tetapi secara garis besar buku petunjuk praktikum ini berisi teknik – teknik dasar mikrobiologi beserta aplikasinya. Sebagai acuan dalam kegiatan praktikum maka diharapkan buku petunjuk ini dapat membantu mahasiswa, khususnya mahasiswa yang menempuh mata kuliah mikrobiologi lanjut dan umumnya bagi mahasiswa biologi atau mahasiswa yang serumpun dalam menguasai ketrampilan dasar mikrobiologi.

Pada akhirnya tak ada gading yang retak. Saran dan kritik untuk pengembangan lebih lanjut guna penyempurnaan buku petunjuk ini benar - benar sangat diharapkan dan semoga bermanfaat.

Penyusun

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iv
Daftar Isi	v
Visi Misi Program Studi Sarjana Farmasi Fikes UDS	vi
Capaian Pembelajaran Praktikum Mikrobiologi.....	vii
Jadwal dan Rencana Kegiatan Praktikum Mikrobiologi	viii
Tata Tertib Praktikum Mikrobiologi.....	ix
Evaluasi Penilaian Praktikum Mikrobiologi	x
Format Laporan Praktikum Mikrobiologi.....	xi
Budaya K3 dalam Praktikum Mikrobiologi.....	1
Alat dan Bahan Praktikum Mikrobiologi.....	3
Teknik Aseptis dan Sterilisasi.....	6
Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroorganisme.....	12
Teknik Inokulasi & Preservasi Mikroba	16
Isolasi Mikroorganisme	21
Identifikasi Mikroorganisme/Teknik Pewarnaan.....	23
Analisis Senyawa Antimikroba.....	26
Teknik <i>Most Probable Number</i> (MPN)	32
Teknik <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	39
Daftar Pustaka.....	45

VISI MISI
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

1. Visi Program Studi Farmasi

Menjadi Program Studi Farmasi unggul dan berdaya guna dalam IPTEKS bidang Farmasi dan berakhlakul karimah.

2. Misi Program Studi Farmasi

- a. Menyelenggarakan pendidikan di bidang sains-teknologi kefarmasian dan farmasi klinis-komunitas yang unggul dan berbasis IPTEKS
- b. Menyelenggarakan penelitian bidang farmasi yang inovatif dan berkontribusi pada IPTEKS berbasis sumber daya alam dan kearifan lokal
- c. Menyelenggarakan pengabdian masyarakat dalam bidang farmasi berbasis IPTEKS yang bermanfaat bagi masyarakat berbasis sumber daya alam dan kearifan lokal
- d. Menyelenggarakan tata kelola Program Studi Farmasi yang berprinsip pada *good governance*
- e. Membudayakan nilai – nilai akhlakul karimah pada setiap kegiatan civitas akademika Program Studi Farmasi

CAPAIAN PEMBELAJARAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

1. Capaian Pembelajaran Lulusan

- a. Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam proses formulasi, produksi dan pengendalian mutu sediaan farmasi sesuai standar prosedur (CPL-1)
- b. Mampu menerapkan ilmu dan teknologi di bidang matematika dan ilmu alamiah dasar yang mendasari kemampuan meneliti dan mengembangkan ilmu pengetahuan dengan semangat peningkatan kompetensi diri secara mandiri dan terus-menerus (CPL-6)

2. Capaian Pembelajaran Mata Kuliah

- a. Mahasiswa mampu mendemonstrasikan teknik – teknik dasar mikrobiologi, diantaranya, penerapan teknik aseptik, pembuatan media pertumbuhan mikroorganisme, menginokulasi dan mengisolasi mikroorganisme.
- b. Mahasiswa mampu mendemonstrasikan beberapa analisis mikrobiologi, diantaranya mengkultivasi mikroorganisme, identifikasi mikroskopis suatu mikroorganisme, analisis kontaminasi mikroorganisme, serta analisis senyawa antimikroba.

JADWAL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

No.	Kelas	Shift	Jadwal		Ruang
			Hari	Jam	
1.	23A	1	Selasa	10.00-12.50	Laboratorium Biologi Farmasi (Mikrobiologi)
		2		12.50-15.40	
2.	23B	1	Senin	10.00- 12.50	
		2		12.50-15.40	
3.	23C	1	Kamis	10.00-12.50	
		2		12.50-15.40	

RENCANA KEGIATAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

TM ke-	Materi
1	Kontrak Pembelajaran; Pengantar Praktikum Mikrobiologi (Pengenalan materi, alat dan bahan, serta teknik aseptik)
2	Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroorganisme dan Sterilisasi
3	Teknik Inokulasi dan preservasi mikroba
4	Isolasi Mikroorganisme
5	Identifikasi Mikroorganisme hasil isolasi (Teknik Pewarnaan)
6-8	Uji antimikroba metode difusi cakram&sumuran dan analisa data hasil uji
9-12	Teknik <i>Most Probable Number</i> (MPN) (<i>Presumptive, Confirm, Completed test</i>) dan analisa data hasil uji
13-14	Teknik <i>Total Plate Count</i> (TPC) dan analisa data hasil uji
15-16	Ujian Praktikum

TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

1. Praktikan adalah mereka yang telah terdaftar di Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dan telah mengikuti mata kuliah Mikrobiologi Dasar pada semester sebelumnya.
2. Praktikan diwajibkan berseragam rapi, bersepatu, tidak diperkenankan memakai sandal kecuali dengan alasan yang dapat diterima.
3. Praktikan wajib memakai jas lab dengan rapi selama praktikum berlangsung dan menyiapkan kelengkapan lain seperti sarung tangan karet dan masker.
4. Praktikan hadir tepat waktu, keterlambatan lebih dari 15 menit tidak diijinkan mengikuti praktikum.
5. Bila tidak dapat mengikuti praktikum, mahasiswa diwajibkan membuat surat ijin atau menyerahkan surat keterangan dokter bila mahasiswa tidak dapat mengikuti praktikum karena sakit.
6. Acara praktikum susulan (**inhal**) **PADA PRINSIPNYA TIDAK ADA**, namun dengan alasan khusus, pelaksanaannya dapat bertukar jadwal dengan praktikan lain. Praktikan yang bertukar jadwal **HARUS** menyertakan surat tukar jadwal.
7. Praktikan yang dua kali berturut-turut tidak mengikuti acara praktikum tanpa alasan tepat, dinyatakan hilang hak praktikumnya.
8. Praktikan menyediakan sendiri alat tulis.
9. Setiap praktikan wajib membuat Jurnal dan Laporan praktikum dalam bentuk tulis tangan di Buku Logbook Praktikum dan dikumpulkan sesuai arahan dosen pengampu. Bagi yang mengumpulkan laporan terlambat akan dikenakan sanksi berupa pengurangan nilai.
10. Sebelum pelaksanaan praktikum, hendaknya praktikan telah memahami dan menguasai acara praktikum yang akan dilaksanakan (akan diadakan test, baik bersifat pengetahuan umum maupun yang berhubungan dengan acara praktikum, sebelum atau sesudah praktikum).
11. Seluruh acara praktikum yang ada harus dilakukan dengan sungguh-sungguh.
12. Praktikan diwajibkan menjaga ketertiban, kebersihan dan memelihara alat-alat dan bahan yang digunakan dalam praktikum. Bagi yang merusakkan atau menghilangkan alat-alat diwajibkan untuk mengganti sesuai dengan *spec* semula.
13. Keluar masuk ruangan harus berdasar izin dari dosen pengampu/laboran yang sedang bertugas.
14. Hal-hal yang belum diatur dalam tata tertib ini akan ditentukan kemudian.

Tim Dosen Praktikum Mikrobiologi

EVALUASI PENILAIAN (ASSESSMENT) PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Penilaian dalam Praktikum Mikrobiologi meliputi :

1. Ujian Praktikum : 30%
2. Laporan : 30%
3. Tugas/LKM : 20%
4. Sikap : 20%

Hasil dari pengolahan nilai di atas akan menentukan nilai akhir mahasiswa dalam Praktikum Mikrobiologi yaitu:

- A ≥ 80
- AB 75 – 79.9
- B 70 - 74.9
- BC 65 – 69.9
- C 60 – 64.9
- CD 55 – 59.9
- D 50 – 54.9
- E < 50

**FORMAT LAPORAN
PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI**

Halaman Cover LOGBOOK PRAKTIKUM



**LOGBOOK
PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI**

**NAMA : ALIYAH PURWANTI
NIM : 0709129002
KELAS : 21E
SHIFT/KELOMPOK : III/9**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
TAHUN AKADEMIK 2024/2025**

Halaman Isi Jurnal & Laporan Praktikum

Jurnal*	Laporan**
Topik Praktikum: A. Tujuan B. Tinjauan Pustaka C. Alat dan Bahan D. Skema Prosedur Kerja	Topik Praktikum: A. Tujuan B. Tinjauan Pustaka C. Alat dan Bahan D. Skema Prosedur Kerja E. Hasil Pengamatan F. Hasil Pengukuran (Jika Ada) G. Pembahasan H. Kesimpulan Dan Saran I. Daftar Pustaka J. Lampiran (dokumentasi dan lembar pengamatan***)

Jurnal

Keterangan:

***jurnal:** ditulis oleh setiap individu sebelum praktikum di logbook praktikum dan dikumpulkan saat hari H praktikum.

****laporan:** ditulis oleh setiap individu setelah praktikum, melanjutkan penulisan jurnal dan dikumpulkan H+7 setelah praktikum (teknik pengumpulan mengikuti arahan dosen pengampu).

*****lembar pengamatan:** dicetak oleh setiap kelompok di kertas A4 dan dibawa saat praktikum dan hari pengamatan untuk menuliskan hasil praktikum dan hasil pengamatan.

PENGANTAR

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

BUDAYA K3 DALAM PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Praktikum Mikrobiologi merupakan praktikum yang dilaksanakan di ruang Laboratorium Biologi Farmasi (Mikrobiologi) dengan aktivitas yang sebagian besar melibatkan kultur mikroorganisme. Budaya K3 perlu diperkenalkan dan diterapkan dalam kegiatan Praktikum Mikrobiologi dan Parasitologi guna mencegah terjadinya kecelakaan kerja atau kontaminasi saat praktikum.

Kultur mikroorganisme memerlukan perlakuan khusus ketika digunakan dalam kegiatan praktikum. Teknik kerja yang steril dan aseptik perlu diterapkan ketika kita bekerja dengan kultur mikroorganisme. Beraktivitas secara steril berarti beraktivitas pada kondisi bebas dari semua bentuk hidup mikroorganisme termasuk endospora bakteri. (Nester dkk., 2004)

Sterilisasi merupakan upaya membebaskan setiap benda atau substansi dari semua kehidupan dalam bentuk apapun atau proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada suatu benda. Mikroorganisme dapat dimatikan dengan panas (kalor), gas – gas seperti formaldehid atau etiloksida, sinar ultra violet dan gama, atau dengan senyawa kimia seperti alkohol 70%.

Sementara itu, beraktivitas secara aseptis berarti beraktivitas pada kondisi tercegah dari serangan agen infeksi yang dapat menginfeksi jaringan atau material steril. (Benson, 2001) Teknik aseptik digunakan untuk menghindari dan mengurangi efek paparan saat kontak dengan kultur mikroorganisme. (Harley and Prescott, 2002). Teknik aseptik juga bermanfaat untuk mencegah kontaminasi pada kultur biakan murni.

Beberapa teknik aseptik yang perlu diperhatikan dalam kegiatan Praktikum Mikrobiologi antara lain :

1. Menggunakan jas laboratorium (sangat disarankan yang memiliki lengan panjang), masker, dan sarung tangan saat bekerja. Menyemprotkan alkohol 70% ke tangan bersarung tangan sebelum bekerja untuk menjamin kondisi aseptis. Jika diperlukan kaca mata pelindung (*google*) juga dapat digunakan untuk mencegah kontaminasi di area sekitar mata.
2. Mencuci tangan dengan sabun dan cairan antiseptik sebelum dan setelah praktikum.
3. Menyeka meja kerja dengan alkohol 70% sebelum dan sesudah praktikum.

4. Media, larutan fisiologis, dan alat – alat kaca yang akan digunakan menjadi tempat kontak dengan kultur harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi dapat dilakukan dengan autoklaf.
5. Sebelum membuka ruangan atau bagian steril di dalam tabung/cawan/erlenmeyer sebaiknya bagian mulut (bagian yang memungkinkan masuknya kontaminan) dibakar atau dilewatkan api terlebih dahulu.
6. Pinset, kawat ose, batang L, dapat disemprot alkohol terlebih dahulu, lalu dilewatkan pada api.
7. Ujung jarum inokulum atau kawat ose yang akan digunakan harus dipijarkan terlebih dahulu. Setelah dipijarkan, harus ditunggu beberapa saat sebelum digunakan atau dapat ditempelkan pada tutup cawan bagian dalam untuk mempercepat transfer panas yang terjadi.
8. Usahakan bagian alat yang dipakai dalam kondisi steril didekatkan ke bagian api.
9. Jika bekerja di *laminar air flow/biological safety cabinet* maka pembakar bunsen tidak perlu digunakan, tetapi jika di luar *laminar air flow/ biological safety cabinet*, semakin banyak pembakar bunsen yang digunakan, maka semakin terjamin kondisi aseptisnya.
10. Jika ada biakan mikroorganisme yang tercecer atau tumpah, maka harus segera dibersihkan dengan menuangkan alkohol 70 atau 96 % di atas tumpahan tersebut, lalu dilap dengan tisu. Lalu tisu dibuang ditempat khusus limbah kultur.

Adanya potensi bahaya berupa kontaminasi maupun infeksi dalam kegiatan Praktikum Mikrobiologi ini tidak harus ditakuti secara berlebihan dengan selalu menghindari kegiatan praktikum atau bersifat pasif di dalam setiap acara praktikum. Namun, kita harus bertindak lebih aktif dan mencari tahu setiap potensi bahaya yang dapat timbul di dalam setiap topik praktikum agar kita selalu waspada dan berhati-hati dalam setiap tindakan sehingga dapat terhindar dari setiap bahaya yang dimungkinkan terjadi kapan saja.

ALAT DAN BAHAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

A. TUJUAN

1. Mengetahui jenis – jenis alat/instrumen yang digunakan dalam Praktikum Mikrobiologi serta mampu mendeskripsikan prinsip kerja dan fungsi alat/instrumen yang digunakan dalam Praktikum Mikrobiologi.
2. Mengetahui jenis – jenis, karakteristik dan fungsi bahan – bahan yang digunakan dalam Praktikum Mikrobiologi.

B. PENDAHULUAN

Praktikum mikrobiologi dilakukan di dalam laboratorium mikrobiologi yang memiliki kekhasan dibanding laboratorium yang lain. Alat-alat yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi prinsipnya adalah alat gelas yang juga digunakan untuk praktikum yang lain, namun cara penggunaan dan perlakuannya berbeda dengan yang dilakukan di laboratorium yang lain.

Di dalam praktikum mikrobiologi, mahasiswa akan berinteraksi dengan makhluk hidup mikroskopis yang disebut sebagai mikroba/mikroorganisme meliputi bakteri dan jamur. Mikroorganisme yang tidak terlihat dengan mata telanjang ini memiliki potensi dapat menyebabkan penyakit (bersifat patogen), sehingga di dalam praktikum mikrobiologi harus dibuat kondisi yang aman, untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Hal inilah yang menyebabkan alat-alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril, dan lingkungan kerja juga harus diusahakan dalam kondisi kontaminasi mikroorganisme seminimal mungkin. Alat-alat yang akan digunakan maupun setelah selesai digunakan harus diberi perlakuan khusus yang tidak ditemui para praktikum yang lain.

Salah satu contoh perlakuan khusus adalah: alat-alat dibungkus sebelum disterilkan (dengan menggunakan kertas coklat atau kertas perkamen), semua alat yang memiliki mulut harus disumbat (dengan kapas terbungkus kasa atau kertas atau aluminium foil), selesai dipakai semua alat harus direbus terlebih dahulu sebelum dicuci, dan lain-lain. Perlakuan - perlakuan tersebut wajib dimengerti dan dilakukan oleh semua orang yang bekerja di laboratorium mikrobiologi dan parasitologi.

Peralatan/instrumen yang sering kita temui dalam Praktikum Mikrobiologi dan Parasitologi antara lain:

1. Instrumen

Autoklaf, *Laminar air flow/biological safety cabinet*, Inkubator, Sentrifuga, *Colony counter*, Mikroskop cahaya, Neraca analitik, pH meter, Oven, *Hot plate stirrer*, Mikropipet, *Waterbath*, *Vortex mixer*

2. Alat - Alat Gelas

Cawan petri, Tabung reaksi, Speader/Batang L, Pembakar Bunsen spiritus, Erlenmeyer, Gelas ukur, *Beaker glass*, Pipet tetes, kaca preparat, *cover glass*

3. Alat - Alat Non Gelas

Pinset, Kawat ose, Botol semprot, Penjepit kayu, Rak tabung reaksi

C. PROSEDUR KERJA

Setiap praktikan mengisi tabel yang ada di bagian pengamatan sesuai dengan ketentuan berikut:

1. Pada Tabel 1. Alat Gelas dan Non Gelas:

Isikan fungsi dari setiap alat pada kolom "**Fungsi**" dan dokumentasikan alat yang dimaksud sesuai dengan yang tersedia di laboratorium, lalu sesuaikan ukuran dan tempelkan di kolom "**Gambar**".

2. Pada Tabel 2. Instrumen:

Isikan prinsip kerja dan fungsi dari instrumen yang dimaksud, sertakan referensi/literatur sumber yang praktikan gunakan.

Contoh: prinsip kerja mikropipet adalah (Andita, 2010). Referensi/literatur bisa dari jurnal penelitian nasional/internasional atau buku, tidak dari laporan praktikum orang lain/blog. Kolom "**Gambar**" diisi dengan hasil dokumentasi instrumen yang dimaksud sesuai yang tersedia di laboratorium.

3. Pada Tabel 3. Bahan:

Isi kolom "**Karakteristik**" dari bahan yang disebutkan serta fungsinya pada kolom "**Fungsi**". Dalam mengisi kolom karakteristik dan fungsi harus menyertakan referensi/literatur sumber yang digunakan.

Contoh: Karakteristik etanol 70% menurut Lindawati (2021) antara lain Referensi/literatur bisa dari jurnal penelitian nasional/internasional atau buku, tidak dari laporan praktikum orang lain/blog.

***Catatan:** semua tabel diisi dengan tulis tangan menggunakan tinta hitam. Hasil dokumentasi alat dan instrumen yang akan ditempel di kolom "**Gambar**" mohon disesuaikan ukurannya dengan ukuran kolom, digunting dengan rapi dan ditempel dengan *double tape*.

D. Hasil Pengamatan

Tabel 1. Alat Gelas dan Non Gelas

No.	Nama Alat	Fungsi	Gambar
1.	Cawan Petri		
2.	Kawat ose		
3.	Batang L/ <i>spreader</i>		
4.	Kaca preparat dan <i>cover glass</i>		
5.	Jangka sorong		
6.	Pembakar Bunsen/ <i>Spirtus</i>		
7.	Tabung durham		
8.	<i>Cork borer</i>		

Tabel 2. Instrumen

No.	Instrumen	Prinsip Kerja dan Fungsi	Gambar
1.	Autoklaf		
2.	<i>Biological Safety Cabinet</i>		
3.	Mikroskop		
4.	Oven		
5.	Inkubator		
6.	<i>Colony counter</i>		
7.	<i>Vortex</i>		
8.	Mikropipet		
9.	<i>Hotplate stirrer</i>		

Tabel 3. Bahan

No.	Nama Bahan	Karakteristik	Fungsi
1.	Etanol 70%		
2.	<i>Nutrient Agar</i>		
3.	<i>Potato Dextrose Agar</i>		
4.	<i>Plate Count Agar</i>		
5.	<i>Muller Hilton Agar</i>		
6.	<i>Nutrient Broth</i>		
7.	<i>Lactose broth</i>		
8.	<i>Briliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth</i>		
9.	<i>Eosin Methylen Blue (EMB) Agar</i>		
10.	<i>Triple Sugar Iron Agar (TSIA)</i>		
11.	<i>Gram stain-kit</i>		
12.	Larutan fisiologis NaCl 85%		
13.	<i>Spirtus</i>		
14.	<i>Paper disk/cakram antibiotik</i>		
15.	Larutan standar <i>Mc Farland</i>		

TEKNIK ASEPTIS DAN STERILISASI

A. Tujuan

1. Mampu mempraktikkan sterilisasi secara kimiawi dan fisik dalam praktikum mikrobiologi dan parasitologi

B. Prinsip dasar

Prinsip dasar prosedur laboratorium mikrobiologi adalah mencegah terjadinya kontaminasi dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Metode tersebut diantaranya dengan cara-cara teknik aseptik dan sterilisasi.

Teknik aseptik adalah salah satu upaya untuk mendapatkan kondisi yang bebas dari mikroorganisme sehingga dapat mencegah terjadinya infeksi mikroorganisme dari luar tubuh ke dalam tubuh. Teknik ini perlu diaplikasikan saat sebelum, sedang dan sesudah berlangsungnya aktivitas yang melibatkan mikroorganisme seperti salah satunya adalah praktikum mikrobiologi dan parasitologi. Teknik aseptik diperlukan untuk menghindari kesalahan penafsiran terhadap hasil yang diperoleh tidak perlu terjadi.

Keberadaan *Biological Safety Cabinet* (BSC) di laboratorium mikrobiologi dan parasitology merupakan salah satu bentuk mengaplikasikan teknik aseptis. BSC merupakan kabinet kerja yang disterilkan untuk kerja mikrobiologi. BSC memiliki suatu pengatur aliran udara yang menciptakan aliran udara kotor (dimungkinkan ada kontaminan) untuk disaring dan diresirkulasi melalui filter. Aliran udara diatur untuk menghambat udara luar masuk dan udara di dalam keluar, untuk mencegah kontaminasi dari luar dan pencemaran bakteri dari ruang BSC. Udara yang keluar disaring melewati penyaring sehingga sel-sel yang berbahaya tidak lepas keluar ke ruangan lain. BSC juga dilengkapi dengan lampu UV yang berfungsi sebagai pembunuh mikroba yang berada pada interior BSC.



Gambar 1. *Biological Safety Cabinet* (BSC)

Dapat kita simpulkan bahwa pada BSC yang diproteksi ada 3, yaitu produk, analis dan lingkungan kerja, karena aliran udara tidak terpapar langsung ke analis, udara di meja kerja juga telah steril karena adanya *double filter*, udara yang keluar ruang kerja pun telah melalui filter terlebih dahulu.

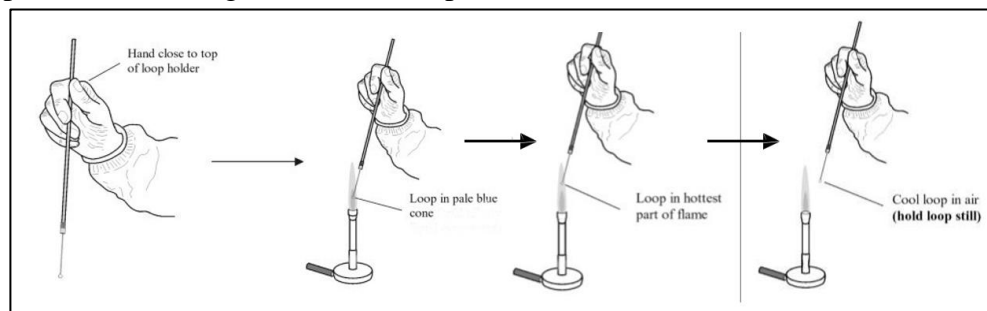
Sterilisasi mutlak dibutuhkan untuk inaktivasi total seluruh bentuk kehidupan mikroba, yang berkaitan dengan kemampuan reproduksi mikroba. Sterilisasi dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya :

1. Sterilisasi Panas Kering

Prinsip kerja sterilisasi dengan panas kering adalah panas yang ditimbulkan dapat mendenaturasi protein dan memberikan efek toksik pada kontaminan akibat kenaikan kadar elektrolit. Metode ini dapat digunakan jika selama sterilisasi dengan bahan kimia dirasa kurang dapat membunuh mikroba.

a) Metode Pembakaran Langsung (Incenerasi)

Metode ini sangat efektif untuk membunuh spora maupun bakteri yang menghasilkan toksin. Metode ini dilakukan dengan membakar peralatan sampai memijar. Alat-alat yang dapat disterilkan dengan cara ini adalah alat-alat yang terbuat dari logam, misalnya alat penanam bakteri, (kawat ose) maupun gelas seperti mulut tabung reaksi sewaktu pembuatan kultur.



Gambar 2. Pemijaran Kawat Ose

b) Metode Sterilisasi Udara Panas

Metode ini memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan pemanasan langsung, karena energi panas sulit mempenetrasi bahan yang akan disterilkan. Metode ini dapat diaplikasikan dengan membungkus alat yang terbuat dari gelas dengan kertas lalu memasukkannya ke dalam oven dan dipanaskan dengan suhu 160-180°C selama 1-2 jam.



Gambar 3. Sterilisasi Panas Kering dengan Oven

2. Sterilisasi Panas Basah

Panas basah membunuh kuman dengan cara mendenaturasi dan mengkoagulasi protein, terutama enzim-enzim dan membran sel kontaminan. Daya bunuh panas basah lebih

baik dibandingkan dengan panas kering karena panas basah lebih mudah mempenetrasi ke dalam sel daripada panas kering.

a) Sterilisasi dengan Autoklaf

Autoklaf diisi dengan akuades sampai batas air. Alat gelas yang akan disterilkan dibungkus/ditutup dengan kertas dan mulut- mulut alat gelas kosong ditutup dengan kapas lemak dan alumunium foil, lalu ditata di dalam autoklaf. Media yang akan disteril diletakkan di dalam wadah dan ditutup dengan kapas lemak dan alumunium foil dan diposisikan berdiri. Pintu autoklaf ditutup rapat kemudian katup untuk pipa uap dibuka. Setelah uap air banyak yang keluar katup ditutup. Temperatur akan naik sampai suhu 121°C. Autoklaf sudah diatur sehingga tekanannya mencapai 15 psi atau 1 atm/cm². Penghitungan waktu 15-20 menit dimulai sejak termometer pada autoklaf menunjuk suhu 121°C. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga manometer menunjukkan angka 0, lalu tutup autoklaf bisa dibuka. Media yang mengandung vitamin, gelatin atau gula harus segera dikeluarkan dari autoklaf agar zat-zat tersebut tidak terurai.



Gambar 4. Sterilisasi Panas Basah dengan Autoklaf

b) Perebusan/Pendidihan

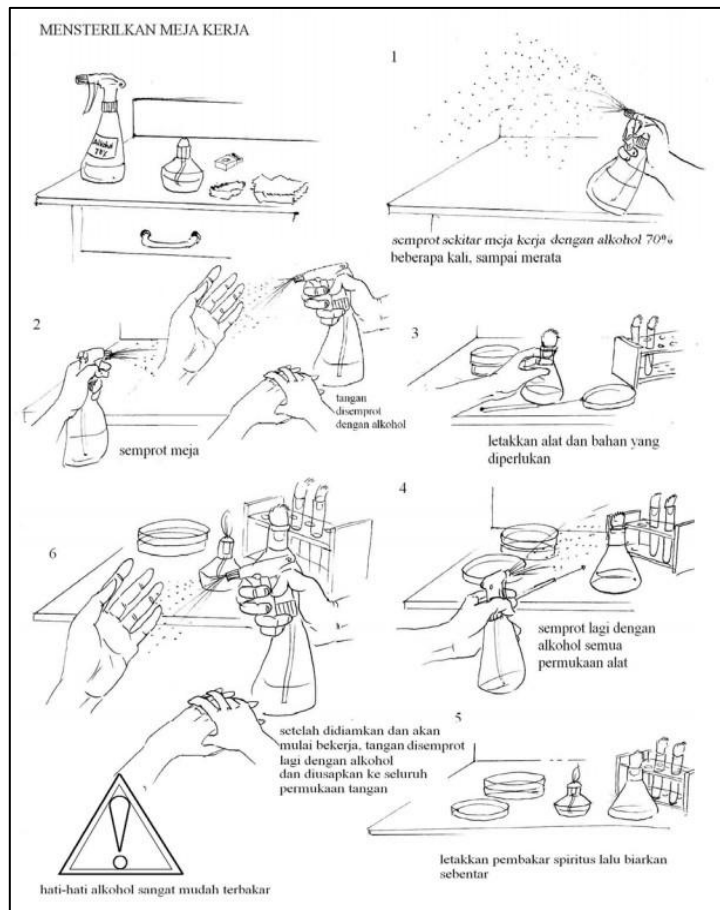
Alat yang akan disterilisasi dengan cara perebusan dibersihkan terlebih dahulu, kemudian direbus sampai semua alat terendam dalam air. Hampir semua sel vegetatif bakteri akan hancur dalam waktu beberapa detik setelah perebusan. Hal ini tidak berlaku pada spora jamur, kista protozoa, dan beberapa virus seperti virus hepatitis. Sebenarnya mikroorganisme biasanya mati dalam beberapa menit pada suhu 80°C. Namun endospora bakteri mempunyai ketahanan yang luar biasa terhadap panas dan mungkin masih bertahan pada suhu air mendidih sampai 20 jam. Efek mematikan air mendidih dapat ditingkatkan dengan penambahan 2% natrium karbonat atau deterjen. Spora yang tahan terhadap air mendidih selama 10 jam, bisa mati pada suhu 98°C dalam waktu 10-30 menit dalam larutan tersebut.



Gambar 5. Sterilisasi Panas Basah dengan Teknik Perebusan/Pendidihan

3. Sterilisasi Kimiawi

Sterilisasi secara kimiawi berarti melibatkan senyawa kimia untuk membunuh atau mengurangi resiko kontaminasi saat bekerja dengan mikroorganisme. Salah satu senyawa kimia yang dapat digunakan adalah alkohol 70%. Alkohol efektif membunuh bakteri dan fungi, tetapi tidak dapat membunuh endospora & virus *non-enveloped*. Alkohol dapat melarutkan lipid dari membran mikroorganisme sehingga dapat melakukan penetrasi untuk selanjutnya dapat mendenaturasi protein pada mikroorganisme tersebut. Alkohol 70% dapat digunakan untuk mensterilkan area kerja dan tangan sebelum dan sesudah melakukan kerja dengan mikroba.



Gambar 6. Sterilisasi Kimiawi dengan Alkohol 70%

C. Prosedur

1. Penggunaan *Biological Safety Cabinet* (BSC)

- a) Sambungkan kabel instrumen ke stop kontak.
- b) Pasang kunci dan putar kunci ke arah "I"
- c) Tekan tombol POWER
- d) Nyalakan lampu UV dengan menekan tombol "UV Lamp". Diamkan selama kurang lebih 30 menit.
- e) Matikan UV dengan menekan tombol "UV Lamp".
- f) Nyalakan blower dengan menekan tombol "Fan".
- g) Nyalakan lampu dengan menekan tombol "LED Lamp"
- h) Buka *front window* dengan menekan tombol panah ke atas "Glass Window Up" atau bisa dengan menginjak panel kaki berwarna merah sampai batas aman (garis kuning di kanan kiri *window*).
- i) Jika memerlukan aliran listrik, tekan tombol "Socket"
- j) Jika telah selesai bekerja di ruang BSC, bersihkan area kerja dengan etanol dan tisu/lap bersih.
- k) Tutup *front window* dengan menekan tombol panah ke bawah "Glass Window Down" atau dengan menginjak panel kaki berwarna hitam sampai front window rapat.
- l) Matikan *blower* dan lampu dengan menekan tombol yang sama seperti poin 6 dan 7.
- m) Nyalakan UV seperti poin 4.
- n) Setelah 30 menit, matikan BSC dengan memutar kunci ke arah "0"
- o) Cabut stop kontak.

2. Penggunaan Autoklaf untuk Sterilisasi Panas Basah

- a) Sambungkan kabel ke sumber daya listrik.
- b) Pindahkan saklar ke ON untuk menyalakan alat.
- c) Tuang 1,5L air ke dalam wadah dan siap untuk digunakan. Tambahkan air sampai batas yang ditentukan sebelum digunakan lagi.
- d) Masukkan benda yang akan disteril pada pelat saringan di drum sterilisasi, bungkus dengan benar, sisakan ruang di antara bungkusannya sehingga uap dapat menembus, dengan demikian kualitas sterilisasi terjamin.
 - Alat gelas, seperti tabung reaksi, erlenmeyer, beaker glass yang akan disterilkan ditutup dengan kapas lemak berbalut kassa atau aluminium foil, lalu ditata di dalam autoklaf.
 - Media yang akan disteril diletakkan di dalam wadah dan ditutup dengan kapas lemak dan aluminium foil dan diposisikan berdiri.
 - Cawan petri berbahan gelas dibungkus dengan kertas coklat, dan diposisikan terbalik
 - Pinset, blue tip, yellow tip dibungkus dengan plastik tahan panas atau aluminium foil.

- e) Masukkan drum sterilisasi ke dalam wadah.
- f) Kencangkan mur kupu (*wing nuts*) sampai tutup dan wadah tertutup dengan kunci pas.
- g) Masukkan steker ke stop kontak, lalu tutup klep pada katup.
- h) Nyalakan sakelar *Pre-Heat*, pilot *Pre-Heat* menyala dan alat mulai panas, ketika uap terdesak keluar, tutup 2 klep, bersama dengan pemanasan yang sedang berlangsung, jarum akan menunjukkan tekanan uap. Matikan sakelar *Pre-Heat* ketika katup pengaman mengeluarkan uap secara otomatis.
- i) Putar tombol kontrol tekanan ke posisi tekanan yang Anda inginkan (maks. 0,14MPa)
- j) Putar pengatur waktu ke waktu nyata, tambahkan 10 menit searah jarum jam, lalu kembali ke waktu sterilisasi.
- k) Matikan sakelar *Pre-Heat*, nyalakan sakelar waktu, alat memasuki keadaan termostat, pilot akan menyala pada waktu ini (termostat berfungsi) ketika waktu mencapai waktu yang ditentukan, daya pemanas akan terputus, lampu pilot meredup dan alarm berbunyi, lalu pengatur waktu mati dan sterilisasi selesai
- l) Untuk mematikan alat, kosongkan isi autoklaf terlebih dahulu.
- m) Posisikan saklar power pada posisi "OFF".
- n) Cabut kabel dari sumber daya listrik

Catatan:

PEMBUATAN MEDIA PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

A. Tujuan

1. Mampu membuat media pertumbuhan mikroorganisme yang akan digunakan dalam pengerjaan mikrobiologi, serta dapat melakukan sterilisasi terhadap alat, media dan larutan pengencer tersebut.

B. Prinsip Dasar

Media pertumbuhan merupakan komponen utama yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam pertumbuhannya. Di dalam media pertumbuhan terkandung berbagai komponen nutrisi seperti gula, amilum, protein, mineral dll. Komponen tersebut ada yang makro elemen dan mikro elemen. Makro elemen adalah komponen yang banyak dibutuhkan mikroorganisme sedang mikro elemen adalah komponen yang sedikit dibutuhkan mikroorganisme tapi mempunyai peran penting dalam pertumbuhan mikroba.

Dalam pembuatan medium harus ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi antara lain:

1. Mengandung *nutrisi* yang mendukung pertumbuhan mikroba
2. Tidak mengandung zat penghambat pertumbuhan
3. Mempunyai faktor lingkungan yang mendukung pertumbuhan mikroba (pH, tekanan osmosis)
4. Steril, supaya yang tumbuh dalam media adalah mikroba yang berasal dari sampel yang ditanam.

Berikut ini jenis media dan fungsinya :

1. Media Cair

Media yang digunakan untuk pembedahan sebelum disebarkan media padat, tidak cocok untuk isolasi mikroba dan tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni kuman. Contoh : *Nutrient broth* (NB); *Pepton dilution fluid* (PDF); *Lactose Broth* (LB); *Mac Conkey Broth* (MCB), dan lain-lain.

2. Media Semi Padat

Media yang mengandung agar sebesar 0.5 %

3. Media Padat

Media yang mengandung komposisi agar sebesar 15% dan biasa digunakan untuk mempelajari koloni kuman, untuk isolasi serta untuk memperoleh biakan murni. Contoh : *Nutrient Agar* (NA); *Potato Detrose Agar* (PDA); *Plate Count Agar* (PCA), dan lain-lain.

a) Media isolasi

Media yang mengandung unsur esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba.

b) Media diperkaya

Media yang mengandung bahan dasar untuk pertumbuhan mikroba dan zat-zat tertentu yang ditambahkan seperti serum, kuning telur, dan lain-lain.

4. 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.

C. Prosedur Kerja

1. Alat

- | | |
|--------------------|----------------------------|
| a) Cawan petri | g) <i>Hotplate stirrer</i> |
| b) Erlenmeyer | h) <i>Magnetic stirrer</i> |
| c) Gelas ukur | i) Neraca analitik |
| d) Tabung reaksi | j) Autoklaf |
| e) Pipet | k) BSC |
| f) Batang pengaduk | l) Rak tabung reaksi |

2. Bahan

- a) *Nutrient agar* (NA)
- b) *Nutrient broth* (NB)
- c) *Potato Dextrose Agar* (PDA)
- d) *Plate Count Agar* (PCA)
- e) *Aquadest*
- f) Alkohol 70%
- g) Kapas lemak
- h) Tip pipet
- i) Kasa steril

3. Cara Kerja

- a) Timbang masing – masing media sesuai prosedur di kemasan. (Catatan: Buatlah media sesuai kebutuhan/sesuai instruksi dari Dosen/Penanggung jawab praktikum).

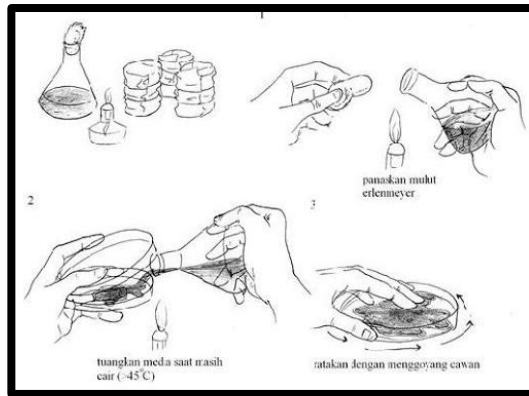
Media	Volume (mL)	Jumlah Media yang ditimbang (gram)
NA		
NB		
PDA		
PCA		

- b) Setiap serbuk media dimasukkan secara hati-hati ke dalam Erlenmeyer, beri label agar tidak tertukar.
- c) Tambahkan *aquadest* dan aduk sampai merata dengan batang pengaduk
- d) Untuk media yang perlu dipanaskan, gunakan pemanas/*hotplate stirrer* sampai media tercampur homogen (kuning dan jernih), hati-hati jangan sampai media mendidih dan meluap
- e) Untuk pembuatan media agar miring NA, sebelum di autoklaf, tuangkan media NA untuk agar miring sejumlah kurang lebih 5 mL ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 tabung reaksi. Agar miring ini akan digunakan untuk kultur atau pembiakan bakteri. Sisa media NA biarkan dalam erlenmeyer.
- f) Untuk media PDA, tuangkan media untuk agar tegak sejumlah kurang lebih ± 9 mL ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 tabung reaksi dan sisa media PDA biarkan dalam Erlenmeyer.
- g) Untuk media cair (NB) masukkan sejumlah 9 mL ke dalam tabung reaksi.
- h) Untuk media PCA biarkan dalam Erlenmeyer.
- i) Tutup erlenmeyer dan tabung reaksi yang berisi media dengan kapas penutup tabung.
- j) Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama 15 menit.
- k) Untuk media agar miring, setelah media keluar dari autoklaf, segera diposisikan miring dan ditunggu sampai membeku.



Gambar 7 Agar Miring

- l) Untuk media *agar plate*, tuangkan dalam cawan petri steril di dalam *biological safety cabinet* (BSC) dan tunggu sampai beku.



Gambar 8 Pembuatan Agar Plate

m) Untuk media cair dan media agar tegak diposisikan di rak tabung reaksi setelah selesai diautoklaf.



Gambar 9 Posisi tabung untuk Media Agar tegak dan Cair

- n) Diamkan dan simpan selama 24 jam. Apabila media tetap bersih dan tidak ditumbuhi oleh bakteri maupun jamur, maka media tersebut dapat digunakan untuk praktikum selanjutnya.
- o) Jika media terkontaminasi, maka harus dimusnahkan dan tidak dapat digunakan untuk praktikum selanjutnya.
- p) Media yang tidak langsung digunakan dapat disimpan di dalam lemari pendingin

TEKNIK INOKULASI DAN ISOLASI MIKROORGANISME

A. Tujuan

1. Mampu menginokulasi bakteri pada berbagai bentuk media pertumbuhan mikroorganisme
2. Mampu mengisolasi kultur murni dari kultur campuran

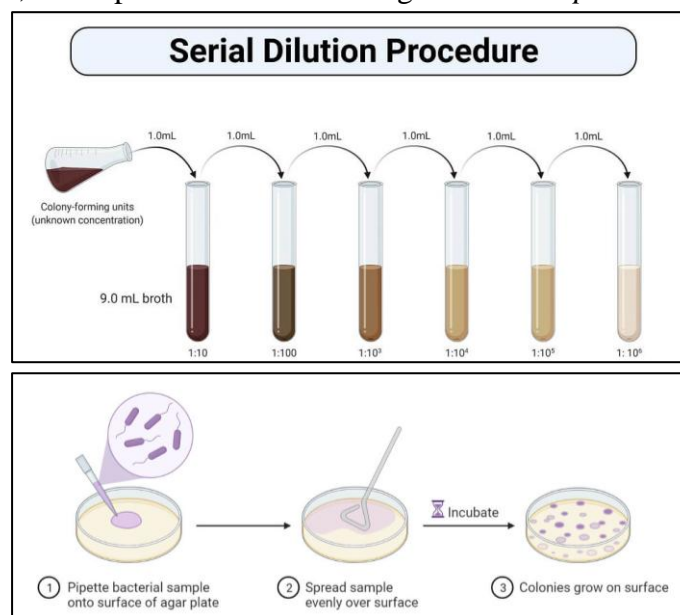
B. Prinsip Dasar

Penanaman mikroorganisme (bakteri, jamur) atau inokulasi merupakan aktivitas memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Inokulasi dilakukan dalam kondisi aseptik, yakni kondisi dimana semua alat yang ada dalam hubungannya dengan medium dan pengerjaan, dijaga agar tetap steril. Hal ini untuk menghindari terjadinya kontaminasi (Dwijoseputro, 1998). Ruang tempat penanaman bakteri harus bersih dan keadannya harus steril agar tidak terjadi kesalahan dalam pengamatan atau percobaan. Inokulasi dapat dilakukan dalam sebuah kotak kaca yang biasa disebut sebagai *biological safety cabinet* atau *laminar air flow* ataupun dalam ruangan yang terjaga kesterilannya (Pelczar, 1986).

Pada pembiakan/penanaman bakteri/mikroba perlu diperhatikan kebutuhan nutrisi untuk mikroba tersebut sehingga dapat tumbuh dengan baik. Teknik untuk menanam bakteri adalah sebagai berikut:

1. *Spread plate method* (cara tebar/sebar)

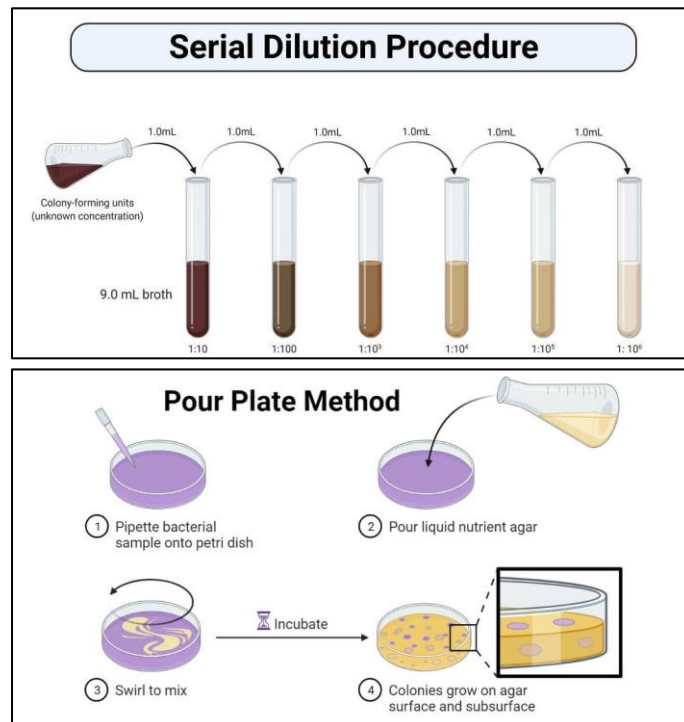
Teknik ini dilakukan dengan cara menuang/memipet sejumlah kultur mikroba yang telah diencerkan sebelumnya pada permukaan media agar padat (*agar plate*) steril di cawan petri, lalu dipulas atau disebar dengan bantuan *spreader*/batang L.



Gambar 10 Metode Sebar

2. *Pour plate method* (cara tuang)

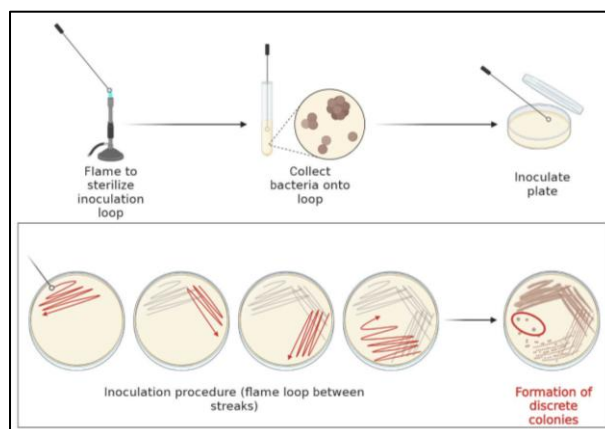
Teknik ini dilakukan dengan cara menuang/memipet sejumlah kultur mikroba yang telah diencerkan sebelumnya dan media agar steril yang masih cair ke dalam cawan petri steril, lalu menggoyangkan perlahan agar tercampur sempurna.

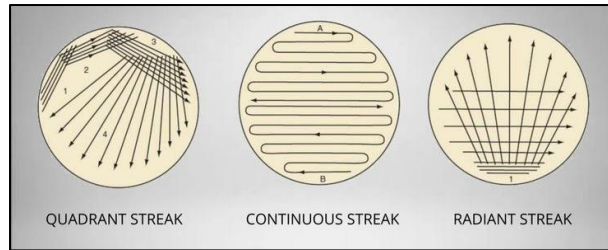


Gambar 10 Metode Tuang

3. *Streak plate method* (cara gores)

Teknik ini dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan media agar padat dengan menggunakan kawat ose sehingga membentuk pola tertentu. Metode ini biasanya digunakan untuk mendapatkan kultur murni dari kultur campuran atau biasa kita kenal dengan isolasi. Rangkaian proses isolasi mikroba dari habitat alaminya menjadi suatu biakan murni dalam medium buatan, menuntut suatu kerja yang cepat, cermat dan terampil.





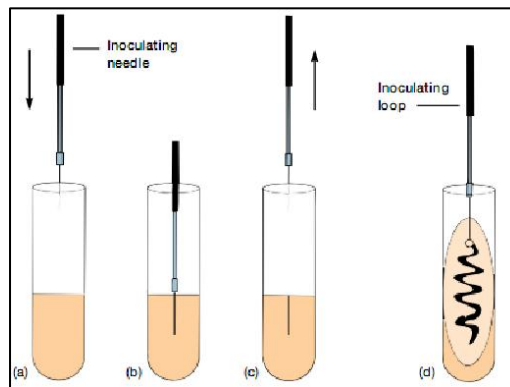
Gambar 11 Metode Gores

4. Inokulasi Media Agar Tegak

Teknik inokulasi dengan cara menusukkan ose pada permukaan agar tegak.

5. Inokulasi Media Agar Miring

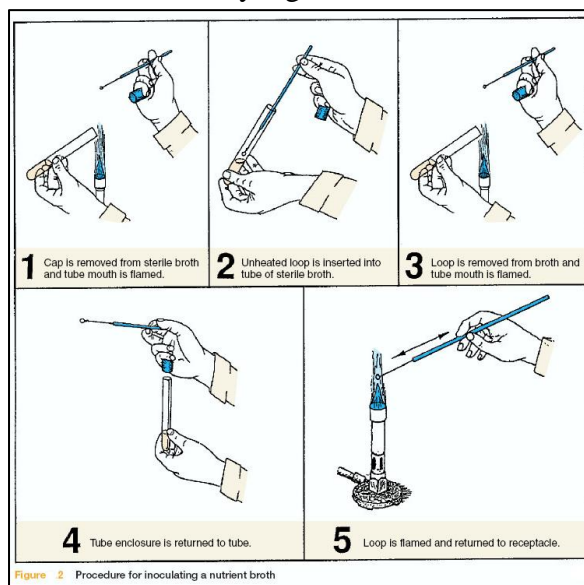
Teknik inokulasi dengan cara menggosokkan kultur mikroba pada permukaan agar miring steril dengan menggunakan kawat ose.



Gambar 12 Inokulasi Agar tegak dan miring

6. Inokulasi Media Cair

Teknik ini dilakukan dengan cara mencelupkan kawat ose yang sudah dioleskan pada biakan kuman ke dalam wadah yang berisi media cair steril.



Gambar 13 Inokulasi Media Cair

Berbagai jenis bakteri telah dimanfaatkan manusia sebagai penghasil antibiotik pada industri obat-obatan dan kedokteran, probiotik pada industri makanan, biofertilizer pada industri pertanian dan perikanan, agen bioremediasi pada pengolahan limbah dan penanganan pencemaran lingkungan. Bakteri selain sangat beragam jenisnya juga sangat dipengaruhi faktor lingkungan sehingga dapat mengalami perubahan karakter, baik fisiologis maupun genetik. Karena itulah para peneliti berupaya mencari berbagai teknik untuk menyimpan dan mengawetkannya agar ketersediaan isolat mikroba yang stabil dan pemanfaatannya dapat berkelanjutan.

Upaya penyimpanan dan pemeliharaan plasma nutfah bakteri dalam jangka waktu tertentu dan apabila suatu saat diperlukan dapat dengan mudah diperoleh kembali dengan kondisi yang relatif stabil merupakan Preservasi bakteri. Keberhasilan preservasi bakteri ditentukan oleh penguasaan teknologi, ketersediaan fasilitas dan ketersediaan tenaga yang terampil. Adapun tujuan preservasi adalah menahan laju aktivitas metabolisme bakteri sehingga viabilitas (daya tumbuh) nya dapat dipertahankan, memelihara isolat bakteri sehingga mempunyai recovery (daya tumbuh kembali) dan kelangsungan hidup yang tinggi dengan perubahan karakter yang minimum (Machmud, 2001).

Preservasi jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba, sehingga apabila suatu saat diperlukan, dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia. Dalam kaitannya dengan pemanfaatan koleksi mikroba, tujuan koleksi dan preservasi mikroba dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu untuk keperluan (1) pribadi atau lembaga nonkomersial dan (2) lembaga dan swasta komersial.

Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan memindahkan secara berkala jangka pendek misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru. Teknik ini memerlukan waktu dan tenaga yang banyak. Beberapa teknik penyimpanan sederhana yang efektif untuk penyimpanan isolat jangka pendek atau menengah, dan biasanya tidak sesuai untuk penyimpanan jangka panjang. Di antara teknik tersebut ialah penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manikmanik porselin, lempengan gelatin, dan P₂O₅ dalam keadaan vakum. Walaupun tidak digunakan secara luas, teknik tersebut hanya memerlukan peralatan yang sederhana dan mudah diperoleh, sehingga dapat bermanfaat bagi lembaga yang belum memiliki peralatan canggih (Skerman, 1973).

C. Prosedur Kerja

a. Alat

- 1) Cawan petri steril
- 2) Kawat ose
- 3) Batang L
- 4) Bunsen
- 5) Mikropipet

b. Bahan

- 1) *Nutrient agar* (NA) miring steril
- 2) *Nutrient agar* (NA) *plate* steril
- 3) *Nutrient broth* (NB) steril
- 4) *Potato Dextrose Agar* (PDA) tegak steril
- 5) *Potato Dextrose Agar* (PDA) *plate* steril
- 6) Kultur bakteri
- 7) Kultur jamur
- 8) Alkohol 70%
- 9) Kapas lemak
- 10) Tip pipet
- 11) Kasa steril
- 12) Gliserol

c. Cara Kerja

Inokulasi Media Agar Miring

- a) Siapkan media NA miring steril
- b) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
- c) Pijarkan kawat ose, biarkan dingin.
- d) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri
- e) Goreskan kawat ose pada permukaan agar miring secara zigzag.
- f) Pijarkan kembali kawat ose
- g) Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 4°C, suhu ruang, suhu 37°C

Inokulasi Media Agar Tegak

- a) Siapkan media PDA tegak steril
- b) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.
- c) Pijarkan kawat ose, biarkan dingin.
- d) Sentuhkan ujung kawat ose pada koloni jamur
- e) Tusukkan kawat ose pada permukaan agar tegak secara tegak lurus steril.
- f) Tarik kawat ose
- g) Pijarkan kembali kawat ose
- h) Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 4°C, suhu ruang, suhu 37°C

Inokulasi Media Cair

- a) Siapkan media NB steril
- b) Siapkan biakan bakteri yang akan ditanam kembali.

- c) Pijarkan kawat ose, biarkan dingin.
- d) Ambil kultur dengan ujung kawat ose
- e) Celupkan kawat ose ke dalam media NB steril.
- f) Tarik kawat ose
- g) Pijarkan kembali kawat ose
- h) Inkubasikan

Preservasi dalam akuades steril

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

Preservasi dalam gliserol konsentrasi rendah.

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

Isolasi Kultur Murni dengan Metode *Streak Plate*

- a) Buka tabung yang berisi kultur yang akan dipindahkan, panasi mulut tabung dengan api bunsen spiritus.
- b) Pijarkan kawat ose, tunggu beberapa saat agar tidak terlalu panas
- c) Masukkan ose steril ke dalam biakan, ambil sedikit biakan.
- d) Buka cawan berisi media agar steril, panasi tutup cawan petri dengan api bunsen spiritus.
- e) Pindahkan/goreskan biakan dari ose dengan bentuk goresan kuadran
- f) Panasi kembali tutup cawan petri, tutup segera
- g) Cawan petri bisa *dishield* dengan plastik wrap.
- h) Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 4°C, suhu ruang, suhu 37°C serta diberi

D. Hasil Pengamatan

a. Hasil Inokulasi pada media agar miring

Nama Kultur	:
Karakteristik koloni	:
Dokumentasi	:

b. Hasil Inokulasi pada media agar tegak

Nama Kultur	:
Karakteristik koloni	:
Dokumentasi	:

c. Hasil Inokulasi pada media cair

Nama Kultur	:
Karakteristik koloni	:
Dokumentasi	:

d. Hasil Inokulasi dan isolasi pada media agar *plate*

Nama Kultur	:
Karakteristik koloni	:
Dokumentasi	:

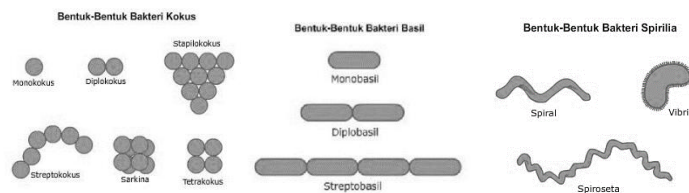
IDENTIFIKASI MIKROORGANISME: TEKNIK PEWARNAAN

A. Tujuan

1. Mampu mengidentifikasi mikroorganisme dengan melakukan teknik pewarnaan

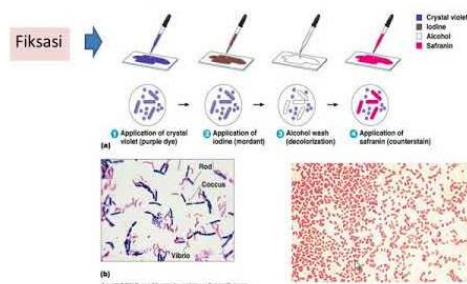
B. Prinsip Dasar

Bentuk bakteri beraneka ragam yaitu basil (tongkat/batang), *coccus*, dan spirillum. Bakteri berbentuk basil juga dapat dibedakan lagi menjadi monobasil, diplobasil, dan streptobasil. Bakteri berbentuk kokus dapat dibagi menjadi monokokus, diplokokus, stafilocokus, streptokokus, sarkina, dan tetrakokus, sedangkan untuk bakteri spirilia hanya dibagi tiga yaitu spiral, vibrio, dan spiroseta (Dwidjoseputro, 1998).



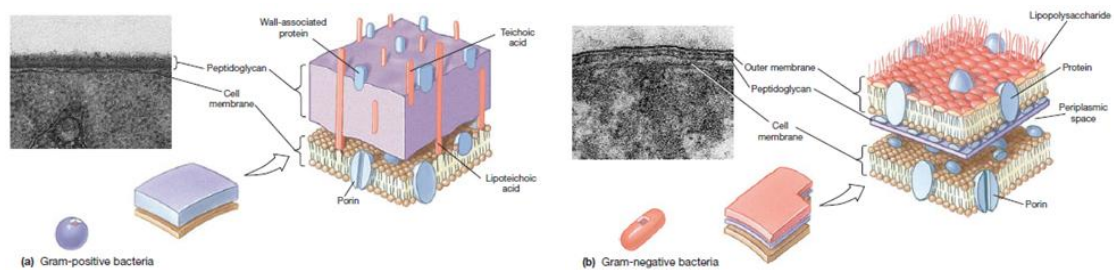
Melihat dan mengamati bakteri dalam keadaan hidup sangat sulit, karena selain bakteri itu tidak berwarna juga transparan dan sangat kecil. Untuk mengatasi hal tersebut maka dikembangkan suatu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama dalam penelitian-penelitian mikrobiologi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

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri dengan mudah. Pewarnaan gram untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yakni gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884. Prinsip dasar teknik pewarnaan bakteri adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarnaan yang disebut kromogen. Terjadi ikatan ion karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarnaan. Berdasarkan adanya muatan ini maka dapat dibedakan pewarna asam dan pewarna basa.



Prosedur dalam teknik pewarnaan gram dapat diawali dengan membuat pulasan bakteri di atas kaca objek. Pada pembuatan pulasan perlu diperhatikan ketebalan dari bakteri yang dipulas, tidak terlalu padat atau tipis sehingga tidak mengganggu pengamatan dan diperoleh hasil yang baik. Langkah selanjutnya adalah memfiksasi pulasan bakteri

tersebut. Fiksasi dilakukan dengan cara melewatkan preparat di atas api spirtus bunsen atau merendamnya dengan metanol. Fiksasi bertujuan melekatkan bakteri pada glass objek dan mematikan bakteri. Setelah fiksasi dilakukan maka teknik pewarnaan dapat segera dilakukan. Bakteri diberi warna dasar kristal violet dan diberikan larutan iodine kemudian dilunturkan dengan alkohol, sebagian bakteri akan berwarna ungu, karena sel mengikat senyawa kristal violet-iodine dan sebagian bakteri lain akan kehilangan warna dasar dan mengambil warna kedua, yaitu safranin/fuchsin yang berwarna merah. Bakteri yang mempertahankan warna dasar ungu termasuk bakteri Gram positif dan yang mengambil warna kedua, yaitu merah disebut bakteri Gram negatif.



C. Prosedur Kerja

1. Alat

- | | |
|-----------------------|------------------|
| a) Mikroskop | f) Beaker glass |
| b) Kaca objek | g) Kertas saring |
| c) <i>Cover glass</i> | h) Pinset |
| d) Jarum ose | i) Pipet tetes |
| e) Bunsen | |

2. Bahan

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| a) Biakan bakteri | e) Lugol |
| b) <i>Aquadest</i> | f) Alkohol 95% |
| c) Karbol kristal ungu | g) <i>Immersion oil</i> |
| d) Fuchsin/Safranin | |

3. Cara Kerja

- Ambil satu ose biakan bakteri, letakkan pada kaca objek, suspensi dengan air kemudian difiksasi
- Tambah pewarna kristal ungu (*crystal violet*), biarkan selama lima menit, cuci dengan air
- Tambah cairan lugol, biarkan 45 – 60 detik, cuci dengan air
- Bilas dengan alkohol 95% sampai warna ungu tidak mengalir, cuci dengan air
- Tambahkan pewarna fuchsin/safranin, diamkan 1-2 menit, cuci dengan air, keringkan
- Tambah minyak imersi, tutup dengan *cover glass*, periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x dan 100 x objektif

D. Hasil Pengamatan

Karakteristik biakan :
Dokumentasi :
Kesimpulan :

ANALISIS SENYAWA ANTIMIKROBA

A. Tujuan

1. Mampu melakukan uji kepekaan bakteri terhadap berbagai antibiotika dan atau senyawa bahan alam
2. Mampu menginterpretasi hasil tes uji kepekaan antibiotika dan atau senyawa bahan alam

B. Prinsip Dasar

Penyakit infeksi bakteri dapat diobati dengan antibiotika baik yang bersifat bakterisida maupun bakteriostatika. Dalam usaha 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 atau biasa kita amati dengan melihat diameter zona bening 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. Pengamatan dilihat dengan mengukur diameter zona bening di sekitar sumuran.

Pada metode dilusi, pengujian dapat dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, dapat menentukan minimum kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Prosedur 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 dan 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. Pada metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (*solid*).

C. Prosedur Kerja

1. Alat

- | | |
|------------------|------------------|
| a) Cawan petri | f) Pinset |
| b) Beaker glass | g) Kawat ose |
| c) Erlenmeyer | h) Pipet ukur |
| d) Tabung reaksi | i) Jangka sorong |
| e) Mikropipet | |

2. Bahan

- a) Suspensi bakteri
- b) Standar *Mc. Farland*
- c) Cakram antibiotik/*paper disk*
- d) Alkohol 70%
- e) *Aquadest* steril
- f) Kapas usap steril
- g) Media *Muller Hinton Agar* (MHA)
- h) *Nutrient broth* (NB)

3. Cara Kerja

Preparasi media

- a) Media untuk uji antibakteri disesuaikan dengan jenis bakteri yang akan dianalisis. Sebagai contoh MSA untuk analisis adanya *Staphylococcus sp.*, EMB untuk analisis adanya bakteri *E. coli* dan sebagainya. Media dibuat dalam volume tertentu dengan mengikuti aturan pembuatan di label wadah setiap media.
- b) Larutkan media pada *aquadest*, jika perlu pemanasan gunakan *hotplate stirrer*.
- c) Media harus disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum digunakan.
- d) Setelah disterilisasi, media dituang secara aseptis ke dalam cawan petri steril di dalam BSC, dan dibiarkan hingga membeku.
- e) Setelah membeku, pastikan tidak ada kontaminasi, maka media dapat digunakan untuk pengujian antimikroba.

Preparasi Kultur

- a) Bakteri yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri, terlebih dahulu ditumbuhkan kembali dengan membuat biakan agar miring.
- b) Kemudian dari biakan tersebut diambil masing - masing satu *ose* bakteri stok,
- c) Selanjutnya diinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL media NB cair steril,
- d) Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (dikultur).
- e) Setelah 24 jam, kultur diambil sejumlah tertentu (μL) untuk disuspensikan ke media cair steril, yaitu larutan NaCl 0,85% fisiologis steril.
- f) Inkubasi selama 3-4 jam
- g) Uji kekeruhannya dengan spektrofotometri dan bandingkan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL)

Preparasi standar *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL)

- a) Larutan H_2SO_4 1% (b/v) dipipet sebanyak 9,95 mL dimasukkan ke tabung reaksi steril
- b) Selanjutnya, larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% (b/v) dipipet sebanyak 0,05 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril
- c) Campur dan kocok dengan bantuan *vortex*.

- d) Ukur nilai absorbandinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600-625 nm

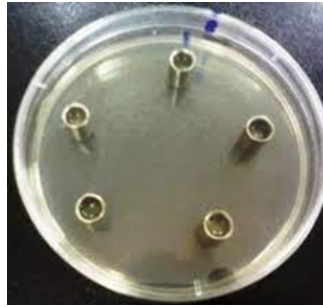
Larutan 1 : 1% Barium Klorida encer (1% b/v BaCl ₂)	
Larutan 2 : 1% Asam Sulfat encer (1% b/v H ₂ SO ₄)	
Komposisi bahan standar <i>McFarland</i>	
Standar <i>McFarland</i>	
No. 0,5	0,05 mL BaCl ₂ dalam 9,95 mL H ₂ SO ₄
No. 1	0,1 mL BaCl ₂ dalam 9,9 mL H ₂ SO ₄
No. 2	0,2 mL BaCl ₂ dalam 9,8 mL H ₂ SO ₄
No. 3	0,3 mL BaCl ₂ dalam 9,7 mL H ₂ SO ₄
No. 4	0,4 mL BaCl ₂ dalam 9,6 mL H ₂ SO ₄
No. 5	0,5 mL BaCl ₂ dalam 9,5 mL H ₂ SO ₄
No. 6	0,6 mL BaCl ₂ dalam 9,4 mL H ₂ SO ₄
No. 7	0,7 mL BaCl ₂ dalam 9,3 mL H ₂ SO ₄
No. 8	0,8 mL BaCl ₂ dalam 9,2 mL H ₂ SO ₄
No. 9	0,9 mL BaCl ₂ dalam 9,1 mL H ₂ SO ₄
No.10	1,0 mL BaCl ₂ dalam 9,0 mL H ₂ SO ₄
Standar <i>McFarland</i> tersedia di pasaran (Whitman dan MacNair, 2010).	

Metode Cakram

- Kapas usap steril dimasukkan ke dalam suspensi bakteri
- Usapkan suspensi bakteri pada lempeng agar muller hitton secara merata dan aseptik
- Berikan label pada media (S=sampel; K⁺=kontrol positif; K⁻=kontrol negatif)
- Ambil *paper disk* yang telah dijenuhkan dengan ekstrak yang akan diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan pinset steril dan letakkan di atas lempeng yang telah ditanami bakteri dengan label sampel uji
- Ambil *paper disk* yang telah dijenuhkan dengan kontrol positif menggunakan pinset steril dan letakkan di atas lempeng yang telah ditanami bakteri dengan label sampel K⁺
- Ambil *paper disk* yang telah dijenuhkan dengan kontrol negatif menggunakan pinset steril dan letakkan di atas lempeng yang telah ditanami bakteri dengan label K⁻
- Inkubasi pada 35-37°C selama \pm 24 jam
- Amati hasil yang terjadi dan hitung diameter zona bening yang terbentuk dengan jangka sorong.

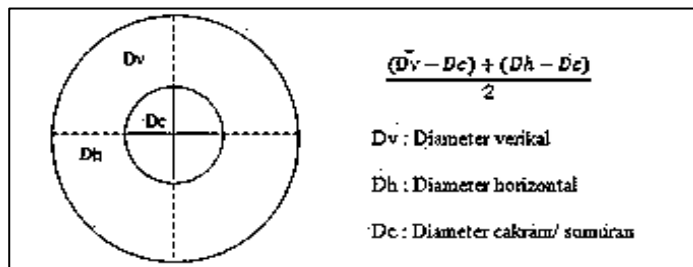
Metode Sumuran

- Tuangkan 10 mL media agar steril ke dalam cawan petri steril sejumlah replikasi yang diperlukan sesuai dengan desain pengujian yang digunakan, biarkan memadat dengan tetap memperhatikan kondisi aseptis
- Tuang kembali 10 mL media agar steril yang telah disuspensikan bakteri tertentu ke atas media agar yang telah membeku hasil dari tahap pertama,
- Letakkan sejumlah *cylinder cup stainless* steril dengan jarak yang sudah diatur, setelah memadat *cylinder cup* diambil hingga terbentuk sumuran yang siap dituang sampel uji



- d) Sejumlah volume sampel, kontrol positif, kontrol negatif dimasukkan pada sumuran yang sudah terbentuk secara aseptik
- e) Inkubasikan pada suhu dan waktu tertentu
- f) Amati hasil yang terjadi dan hitung diameter zona bening yang terbentuk dengan jangka sorong.

Rumus Perhitungan Diameter Zona Bening



Kategori Respon Hambatan Senyawa Antimikroba

Diameter zona bening	Respon hambatan pertumbuhan
≤ 10 mm	Tidak ada
11 – 15 mm	Lemah
16 – 20 mm	Sedang
> 20 mm	Kuat

D. Hasil Pengamatan

1. Hasil Pengamatan Aktivitas Antibakteri: Metode Cakram

Nama mikroorganisme	:
Kontrol positif	:
Kontrol negatif	:
Senyawa uji	:
Hasil absorbansi <i>Mc Farland 0,5</i>	:
Hasil absorbansi kultur	:
Perhitungan Diameter Zona Bening	:
Kesimpulan (Kategori Respon Hambatan Senyawa Antimikroba:	:
Dokumentasi	:

2. Hasil Pengamatan Aktivitas Antibakteri: Metode Sumuran

Nama mikroorganisme	:
Kontrol positif	:
Kontrol negatif	:
Senyawa uji	:
Hasil absorbansi <i>Mc Farland 0,5</i>	:
Hasil absorbansi kultur	:
Perhitungan Diameter Zona Bening	:
Kesimpulan (Kategori Respon Hambatan Senyawa Antimikroba:	:
Dokumentasi	:

MOST PROBABLE NUMBER (MPN)

A. Tujuan

1. Mampu melakukan teknik *most probable number* (MPN)
2. Mampu menginterpretasi data hasil *most probable number* (MPN)

B. Prinsip Dasar

Enumerasi adalah teknik perhitungan jumlah mikroba dalam suatu media tanpa mengidentifikasi jenis mikroba (bakteri, jamur, yeast), yang bertujuan untuk menentukan jumlah sel dari suatu kultur bakteri secara kuantitatif (Rosalia, 2010). Secara garis besar teknik perhitungan jumlah mikroba dalam suatu media dapat dibedakan menjadi (Hadietomo, ratna 1990):

1. Perhitungan secara langsung, antara lain dengan membuat preparat dari suatu bahan (preparat sederhana diwarnai atau tidak diwarnai) dan penggunaan ruang hitung (*counting chamber*).
2. Perhitungan secara tidak langsung antara lain dengan perhitungan pada cawan (*total plate count*), perhitungan melalui pengenceran, perhitungan jumlah terkecil atau terdekat (*MPN methode*), cara kekeruhan atau turbidimetri. Melalui metode ini, jumlah mikroorganisme yang akan diketahui adalah jumlah mikroorganisme pada suatu bahan yang masih hidup saja (*viable count*). Cara perhitungan tidak langsung dapat digunakan untuk sampel berwujud padat maupun cair. Sebelum dilakukan perhitungan jumlah mikroorganisme untuk sampel padat, sampel perlu dilarutkan atau dibuat suspensi, dengan memperhitungkan faktor pengencerannya, dimana, fungsi pelarutan adalah untuk menghomogenkan sampel agar setiap pengambilan mengandung jumlah yang sama.

Perhitungan atau penentuan jumlah mikroba dalam suatu sampel (makanan dan minuman) dilakukan untuk mengetahui seberapa besar masalah bahan makanan itu tercemar oleh mikroba. Semakin sedikit total mikroba yang tercemar menurut jumlah angka total standar yang ditentukan suatu lembaga maka makanan atau minuman tersebut dapat dikatakan baik dan memenuhi syarat. Akan tetapi, jika jumlah total mikroba yang tercemar lebih dari angka total standar maka makanan atau minuman itu dapat dianggap tidak baik dan tidak layak untuk dikonsumsi (Joyevan & Purnaman, 2017).

Metode MPN merupakan salah satu metode perhitungan secara tidak langsung yang biasanya digunakan untuk menghitung jumlah mikroba, misalnya *Coliform* di dalam sampel yang berbentuk cair maupun padat dengan melakukan pengenceran terlebih dahulu. Metode MPN merupakan uji deretan tabung yang menyuburkan pertumbuhan *Coliform* sehingga diperoleh nilai untuk menduga jumlah *Coliform* dalam sampel yang diuji. Uji positif, yaitu tabung yang mengalami perubahan pada mediumnya baik itu berupa perubahan warna atau terbentuknya gelembung gas pada dasar tabung Durham, akan menghasilkan angka indeks. Angka ini disesuaikan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah *Coliform* dalam sampel.

Metode MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*presumptive test*), uji konfirmasi (*confirmed test*), dan uji kelengkapan (*completed test*).

C. Prosedur Kerja

1. Alat

- | | |
|----------------------|--------------------|
| a) Tabung durham | f) Gelas ukur 10mL |
| b) Tabung reaksi | g) Bunsen |
| c) Rak tabung reaksi | h) Inkubator |
| d) Mikropipet | i) <i>Vortex</i> |
| e) Kawat ose | j) BSC |

2. Bahan

- | | |
|---------------------|---|
| a) Alkohol 70% | f) <i>Media Lactose broth</i> |
| b) Akuades steril | g) <i>Briliant Green Lactose Bile Broth</i> |
| c) Tips mikropipet | h) <i>Eosin Methylen Blue Agar</i> |
| d) Spirtus | i) <i>Triple Sugar Iron Agar</i> |
| e) Sampel air minum | |

3. Cara Kerja

Uji Pendugaan (*Presumptive Test*)

- Menyiapkan 100 mL sampel air sumur yang akan diperiksa.
- Siapkan 3 buah tabung reaksi masing-masing berisi 9 mL akuades steril dan 9 buah tabung reaksi berisi tabung Durham yang telah diisi 3 mL medium kaldu *lactose/lactose broth*.
- Secara aseptik, inokulasikan 1 mL sampel air sumur ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril dan mengocok tabung tersebut sehingga diperoleh pengenceran sebesar 10^{-1} .
- Melakukan pengenceran dengan cara yang sama ke tabung ke-2 dan ke-3 yang berisi 9 mL akuades steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} .
- 9 tabung reaksi yang sudah berisi medium *lactose broth*, diberi kode A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, dan C3. Masukkan 1 mL sampel dengan pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung A1, A2, A3. Masukkan 1 mL sampel dengan pengenceran 10^{-2} ke dalam tabung B1, B2, B3. Memasukkan 1 mL sampel dengan pengenceran 10^{-3} ke dalam tabung C1, C2, dan C3.
- Inkubasikan semua tabung reaksi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Jika timbul gas dalam tabung Durham pada bagian dasar, maka dilanjutkan dengan melakukan tes penegasan. Jika tidak ada gas, ditunggu hingga 1x24 jam berikutnya. Jika tetap tidak ada gas, maka sampel air minum tersebut tidak perlu diperiksa lebih lanjut dan dinyatakan negatif.

Uji Konfirmasi (*Confirmed Test*)

- Menyiapkan tabung reaksi yang berisi tabung durham dan 3mL media BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*) sesuai jumlah tabung yang positif gas pada pemeriksaan *presumptive test* sebelumnya.
- Dari tiap tabung yang positif pada media LB (*Lactose Broth*) diambil dengan menggunakan ose, kemudian memindahkannya ke dalam tabung BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*)

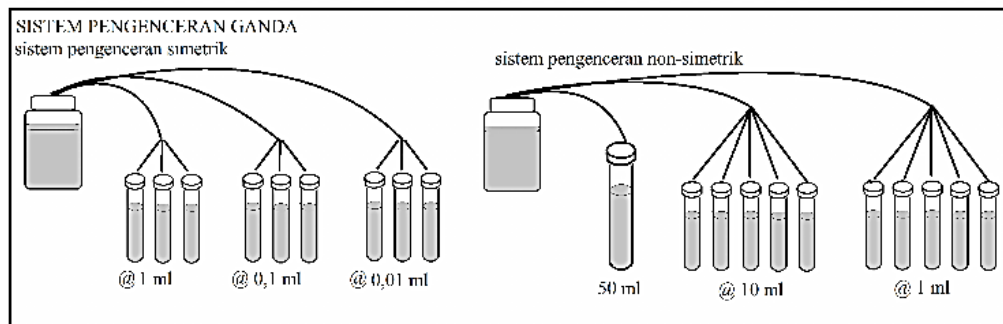
- c) Menginkubasi media BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*) pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam (jika terdapat gas pada bagian dasar tabung Durham, berarti dalam sampel air minum terdapat bakteri *Coliform* fekal. Jika tidak ada gas, maka menunggu sampai 48 jam. Jika ada gas, berarti sampel air tersebut mengandung bakteri *Coliform* fekal).
- d) Melakukan pembacaan yaitu dengan melihat jumlah tabung BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*) yang menunjukkan kekeruhan dan positif gas.
- e) Mencocokkan hasil tabung yang positif dengan tabel MPN.

Uji Kelengkapan (*Completed Test*)

- a) Dari tiap tabung yang positif pada media BGLB, melanjutkan dengan melakukan *streak* pada media EMB dengan ose bulat.
- b) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c) Mengamati pertumbuhan koloni dan melanjutkan pada media TSI menggunakan ose jarum, menanam pada media TSI.
- d) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- e) Mengamati pertumbuhan pada media TSI

Interpretasi Data Hasil MPN

Dari setiap pengenceran, masing-masing dimasukkan 1 mL masing-masing ke dalam tabung yang berisi medium, dimana untuk setiap pengenceran dipakai 3 atau 5 seri tabung.



Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dihitung jumlah tabung yang positif. Misalnya, pada pengenceran pertama 3 tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran kedua menghasilkan 2 tabung yang positif, pada pengenceran ketiga menghasilkan 1 tabung positif. Dari hasil tersebut didapatkan kombinasinya menjadi 3,2,1. Angka kombinasi ini lalu dicocokkan dengan tabel MPN, kemudian nilai MPN tersebut dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$MPN \text{ sampel (MPN/ml atau MPN/g)} = \frac{\text{nilai MPN tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran yang di tengah}$$

***Catatan:** tabel yang dipakai untuk memilih nilai MPN dari 3 seri tabung berbeda dengan tabel untuk 5 seri tabung.

Tabel 1. Daftar MPN coliform (menggunakan 3 tabung)

Kombinasi/jumlah tabung yang positif			MPN per gram/ml
1 : 10	1 : 100	1 : 1000	
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210

Tabel 2. Daftar MPN Coliform menggunakan 5 tabung

Kombinasi/Jumlah tabung positif	MPN/100 ml	Kombinasi/Jumlah tabung positif	MPN/100 ml
0-0-0	< 2	4-2-0	22
0-0-1	2	4-2-1	26
0-1-0	2	4-3-0	27
0-2-0	4	4-3-1	33
		4-4-0	34
1-0-0	2		
1-0-1	4	5-0-0	23
1-1-0	4	5-0-1	30
1-1-1	6	5-0-2	40
1-2-0	6	5-1-0	30
		5-1-1	50
2-0-0	4	5-1-2	60
2-0-1	7		
2-1-0	7	5-2-0	50
2-1-1	9	5-2-1	70
2-2-0	9	5-2-2	90
2-3-0	12	5-3-0	80
		5-3-1	110
3-0-0	8	5-3-2	140
3-0-1	11		
3-1-0	11	5-3-3	170
3-1-1	14	5-4-0	130
3-2-0	14	5-4-1	170
3-2-1	17	5-4-2	220
		5-4-3	280
4-0-0	13	5-4-4	350
4-0-1	17		
4-1-0	17	5-5-0	240
4-1-1	21	5-5-1	300
4-1-2	26	5-5-2	500
		5-5-3	900
		5-5-4	1600
		5-5-5	1600

D. Hasil Pengamatan dan Perhitungan

Hasil Pengamatan Seri 3 Tabung

Pengenceran	Hasil +/-								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
10 ⁻¹									
10 ⁻²									
10 ⁻³									
Kombinasi									
Angka MPN (tabel seri 3 tabung)	:								
Perhitungan	:								
Kesimpulan	:								
Dokumentasi	:								

Hasil Pengamatan Seri 5 Tabung

Pengenceran	Hasil +/-														
	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
10^{-1}															
10^{-2}															
10^{-3}															
Kombinasi															
Angka MPN (tabel seri 5 tabung)						:									
Perhitungan	:														
Kesimpulan	:														
Dokumentasi	:														

TOTAL PLATE COUNT (TPC)

A. Tujuan

1. Mampu melakukan pengujian *total plate count* (TPC) bakteri
2. Mampu menginterpretasi hasil pengujian *total plate count* (TPC) bakteri

B. Prinsip Dasar

Enumerasi adalah teknik perhitungan jumlah mikroba dalam suatu media tanpa mengidentifikasi jenis mikroba (bakteri, jamur, yeast), yang bertujuan untuk menentukan jumlah sel dari suatu kultur bakteri secara kuantitatif (Rosalia, 2010). Secara garis besar teknik perhitungan jumlah mikroba dalam suatu media dapat dibedakan menjadi (Hadietomo, ratna 1990):

1. Perhitungan secara langsung, antara lain dengan membuat preparat dari suatu bahan (preparat sederhana diwarnai atau tidak diwarnai) dan penggunaan ruang hitung (*counting chamber*).
2. Perhitungan secara tidak langsung antara lain dengan perhitungan pada cawan (*total plate count*), perhitungan melalui pengenceran, perhitungan jumlah terkecil atau terdekat (*MPN metode*), cara kekeruhan atau turbidimetri. Melalui metode ini, jumlah mikroorganisme yang akan diketahui adalah jumlah mikroorganisme pada suatu bahan yang masih hidup saja (*viable count*). Cara perhitungan tidak langsung dapat digunakan untuk sampel berwujud padat maupun cair. Sebelum dilakukan perhitungan jumlah mikroorganisme untuk sampel padat, sampel perlu dilarutkan atau dibuat suspensi, dengan memperhitungkan faktor pengencerannya, dimana, fungsi pelarutan adalah untuk menghomogenkan sampel agar setiap pengambilan mengandung jumlah yang sama.

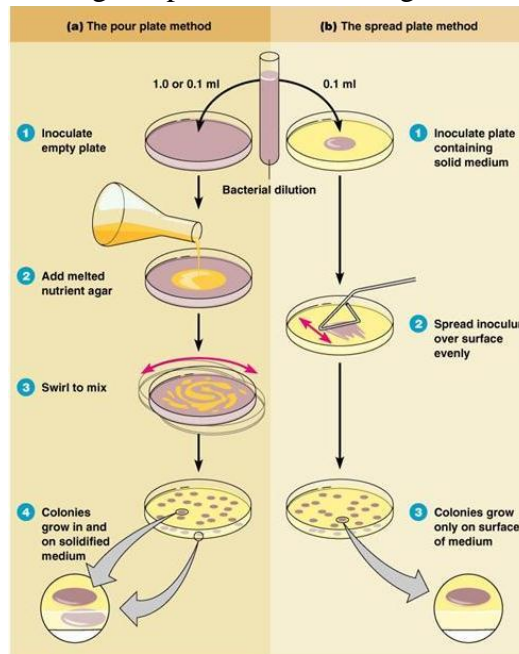
Perhitungan atau penentuan jumlah mikroba dalam suatu sampel (makanan dan minuman) dilakukan untuk mengetahui seberapa besar masalah bahan makanan itu tercemar oleh mikroba. Semakin sedikit total mikroba yang tercemar menurut jumlah angka total standar yang ditentukan suatu lembaga maka makanan atau minuman tersebut dapat dikatakan baik dan memenuhi syarat. Akan tetapi, jika jumlah total mikroba yang tercemar lebih dari angka total standar maka makanan atau minuman itu dapat dianggap tidak baik dan tidak layak untuk dikonsumsi (Joyevan & Purnaman, 2017).

Metode *Total Plate Count* (TPC) merupakan metode yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroba yang terdapat dalam satu sampel atau sediaan, dan biasanya metode ini disebut juga dengan metode ALT (Angka Lempeng Total). Prinsip dari metode ini adalah menumbuhkan sel mikroorganisme yang masih hidup pada medium, kemudian mikroorganisme akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung, selanjutnya akan dihitung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop (Nunik & Junianto, 2012).

Metode TPC memiliki beberapa kelebihan diantaranya: hanya sel yang masih hidup yang dihitung, beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus, dan dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk berasal dari satu sel mikroba dengan penampakan mikroba yang spesifik. Kekurangan dari metode ini antara lain: hasil perhitungan tidak dapat menunjukkan jumlah sel mikroba

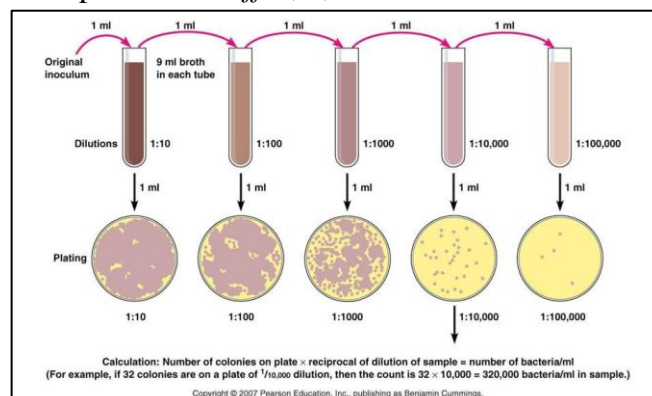
yang sebenarnya karena adanya kemungkinan terbentuk koloni, faktor persiapan medium dan inkubasi yang tidak sama dapat menghasilkan jumlah mikroba yang berbeda, mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak, jelas dan tidak menyebar, dan tahap persiapan dan inkubasi membutuhkan waktu yang lama sehingga koloni mikroba dapat tumbuh dan dihitung.

Metode TPC dapat dibedakan menjadi dua cara, yakni metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*). Kedua metode tersebut dapat dibedakan dari tahap awal penggunaan media agar dan tidak menggunakan media agar. Pada metode tuang, tahapan awal yang dilakukan adalah pengenceran sampel yang kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri lalu ditambahkan media steril dan dibiarkan membeku, sedangkan pada metode permukaan terlebih dahulu harus membuat media agar steril, kemudian dilanjutkan menuang sampel di atas media agar tersebut dan menyebarkannya.



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Pengenceran bertujuan untuk mengurangi jumlah kandungan mikroba dalam sampel sehingga nantinya dapat diamati dan dihitung jumlah mikroorganisme secara spesifik dan didapatkan perhitungan yang tepat. Jumlah yang didapat yang terbaiknya adalah di antara 30 sampai 300 koloni. Tahap-tahap pengenceran biasanya dilakukan secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000, dan seterusnya. Larutan yang digunakan dalam pengenceran dapat berupa larutan *buffer*, 0,85% NaCl atau larutan Ringer (Lud, 2010).



Perhitungan koloni bakteri biasanya mengikuti suatu standar yang disebut *Standart Plate Count*, dimana pada standar ini dijelaskan cara menghitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni dalam satu sampel. Teknik perhitungan berdasarkan *Standart Plate Count* (SPC) adalah sebagai berikut:

1. Setiap cawan akan dihitung apabila mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300 atau berjumlah sekitar 300.
2. Beberapa jumlah koloni yang tidak jelas atau tidak terlihat dapat dihitung menjadi satu koloni.
3. Satu kumpulan rantai koloni yang terlihat seperti suatu garis tebal dapat dihitung sebagai satu koloni.
4. Perbandingan jumlah bakteri dilihat dari hasil pengenceran yang lebih besar dan pengenceran lebih sebelumnya; apabila hasilnya menunjukkan sama atau 2 yang digunakan adalah jumlah mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya.
5. Apabila dalam pengenceran menggunakan ulangan dan hasilnya sesuai dengan standar, maka harus dirata-rata (Lud, 2008).
6. Rumus perhitungan jumlah koloni :

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

Cara pelaporan dan perhitungan koloni menurut *Standart Plate Count* (SPC) sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal), jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, maka dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua, contohnya didapatkan $1,7 \times 10^4$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/gram.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)
279	29	1	$2,8 \times 10^3$
707	267	13	$2,7 \times 10^4$

2. Apabila pada semua hasil pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni per cawan petri dapat disimpulkan bahwa pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi maka jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dapat dilaporkan kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran dan jumlah yang sebenarnya harus tetap dicantumkan dalam tanda kurung.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)
11	3	1	$1,1 \times 10^2$

3. Apabila pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri dapat disimpulkan bahwa pengenceran yang dilakukan terlalu rendah maka jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasil yang dapat dilaporkan adalah lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran dan jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)
578	489	329	$3,3 \times 10^5$

4. Apabila jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan jumlah koloni antara 30 dan 300 dan perbandingan pengenceran hasil tertinggi (X) dan terendah (Y) tersebut lebih kecil atau sama dengan dua ($X : Y \leq 2$) dapat dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan menghitung faktor pengencernya.

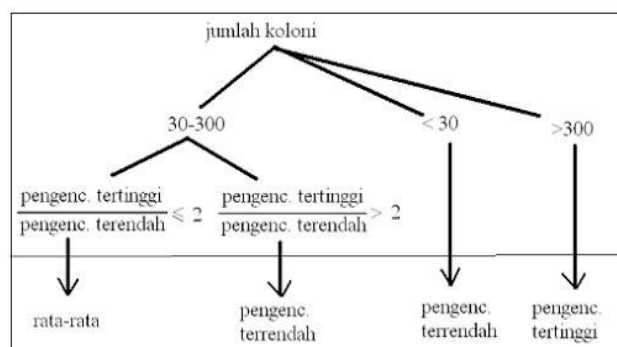
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)	
241	31	5	X = $3,1 \times 10^3$ Y = $2,4 \times 10^3$	X/Y ≤ 2 ,
			maka, (X+Y)/2 sehingga terlaporkan: $2,8 \times 10^3$	

5. Apabila jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan jumlah koloni antara 30 dan 300 dan perbandingan pengenceran hasil tertinggi (X) dan terendah (Y) tersebut lebih besar dari dua ($X : Y > 2$), maka yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)	
287	68	5	X = $6,8 \times 10^3$ Y = $2,9 \times 10^3$	X/Y > 2 ,
			sehingga terlaporkan = Y = $2,9 \times 10^3$	

6. Apabila digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut dan tidak boleh hanya dari 1 cawan petri, sehingga harus memilih tingkat pengenceran yang dapat menghasilkan jumlah koloni 30 dan 300 dari kedua cawan petri tersebut.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SPC (<i>standar plate count</i>)	
287	68	5	X ₁ = $6,8 \times 10^3$ X ₂ = $4,5 \times 10^3$	X _{rata} ² = $5,7 \times 10^3$
			Y ₁ = $2,9 \times 10^3$ Y ₂ = $2,7 \times 10^3$	Y _{rata} ² = $2,8 \times 10^3$
267	45	9	Karena X _{rata} ² / Y _{rata} ² ≤ 2 Maka, (X _{rata} ² + Y _{rata} ²) / 2 = $4,3 \times 10^3$	



C. Prosedur Kerja

1. Alat

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| a) Cawan petri steril | h) Batang L |
| b) Tabung reaksi | i) Kawat ose |
| c) Rak tabung reaksi | j) Bunsen |
| d) Neraca analitik | k) Inkubator |
| e) Mikropipet | l) Vortex |
| f) Erlenmeyer | m) <i>Colony counter</i> |
| g) Gelas ukur | |

2. Bahan

- Suspensi bakteri
- Alkohol 70%
- Aquadest* steril
- Larutan fisiologis NaCl 85% steril
- Media *Plate Count Agar* (PCA)
- Tips mikropipet
- Spirtus

3. Cara Kerja

- Siapkan 3 buah tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades steril untuk pengenceran.
- Tandai juga 4 buah cawan petri dengan 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} .
- Pipet 1 mL atau timbang 1 gram sampel secara aseptis dan masukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} , campur hingga rata.
- Lakukan pengenceran bertingkat hingga kadar 10^{-2} dan 10^{-3} (pipet 1 mL larutan 10^{-1} ke dalam tabung 10^{-2} , dst). Kocok hingga rata.
- Metode tuang dilakukan dengan memindahkan secara aseptis 0,1 mL larutan sampel asli dan setiap pengencerannya ke dalam cawan petri steril. Lalu tuang 9 mL medium PCA steril (suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$). Putar cawan agar sampel dan media bercampur rata. Pasang plastic shield/bungkus dengan kertas coklat.
- Metode sebaran dilakukan dengan menuang 0,1 mL sampel asli dan setiap pengencerannya ke atas 9 mL media agar steril yang telah membeku dan diratakan dengan *spreader*/batang L steril secara aseptis.
- Inkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Hitung jumlah koloni yang terbentuk. Hasil yang baik adalah cawan petri yang mengandung 30-300 koloni. Hitung juga konsentrasi bakteri dalam sampel asli.

D. Hasil Pengamatan dan Perhitungan

Pengenceran	Jumlah Koloni		SPC (<i>standar plate count</i>)
10^{-1}			
10^{-2}			
10^{-3}			
10^{-4}			
Kesimpulan:	Jumlah sel bakteri/mL adalah		
Dokumentasi:			

DAFTAR PUSTAKA

- Cappuccino, James G. dan Sherman, N. (2014). *Manual Laboratorium Biologi*. EGC. Jakarta.
- Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan: Jakarta.
- Harti, A.S. (2015). *Mikrobiologi Kesehatan*. Andi Offset. Yogyakarta.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H and Stahl, D.A. 2015. *Brock Biology of Microorganism 14 th edition*. Pearson Education, US.
- MicrobeHolic. (2020). Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) - Definisi, Komposisi, Cara Pembuatan dan Interpretasi Hasil. <https://www.microbeholic.com/2020/12/eosin-methylene-blue-agar-emba-definisi-komposisi-cara-pembuatan-dan-intepretasi-hasil.html>
- Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press: Jakarta.
- Radji, M. (2010). *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Safitri, R., & Novel, S. S. (2010). *Medium Analisis Mikroorganisme (Isolasi dan Kultur)*. Trans Info Media. Jakarta.
- Suprapti, L., Heruwati, A., Sukesi, A. D., Setiyono, H., Indahwati, T., & Handayani, W. (2020). *Pedoman Pembuatan media Dan Reagensia Racik*. Deepublish. Yogyakarta.