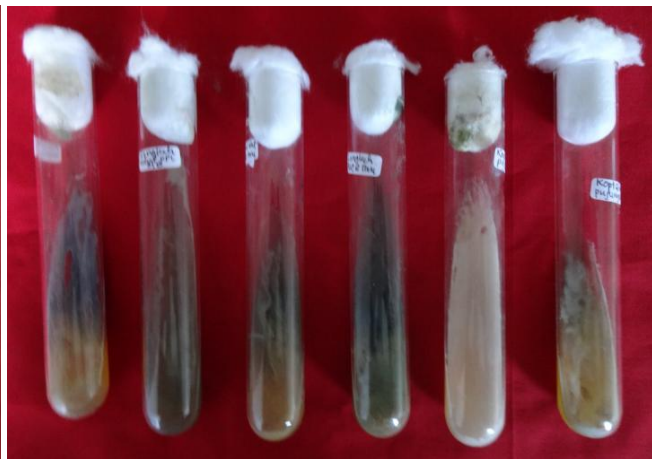
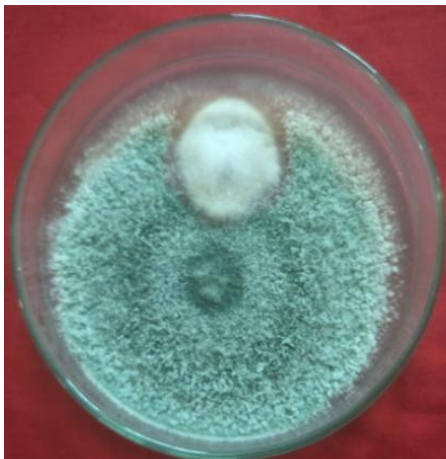
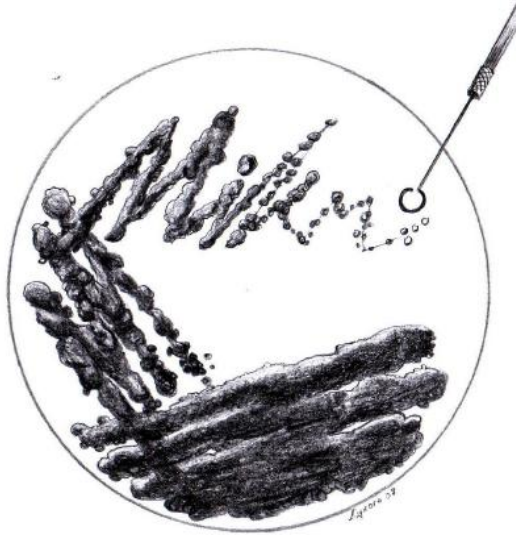




MODUL

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



DR. DRS. I WAYAN SUANDA, S.P., M.Si

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN (IKIP) PGRI BALI
DENPASAR
2018**

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Tuhan Yang Maha Esa/Ida Sanghyang Widhi Wasa, atas rahmat dan karunia-Nya, maka Modul Praktikum Mikrobiologi ini dapat selesai sesuai dengan rencana. Modul Praktikum Mikrobiologi ini dibuat dengan harapan agar dapat menuntun mahasiswa dalam melakukan kegiatan praktikum atau percobaan/penelitian di laboratorium, khususnya praktikum mikrobiologi sebagai landasan dalam mengambil mata kuliah Mikrobiologi Umum di Program Studi (Prodi) Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) IKIP PGRI Bali. Kegiatan praktikum mikrobiologi ini merupakan bagian (*inklud*) dengan mata kuliah Mikrobiologi Umum bagi mahasiswa yang kuliah di Prodi Pendidikan Biologi FPMIPA IKIP PGRI Bali, yang dimasukkan dalam kelompok Mata kuliah Keahlian Berkarya (MKB) dengan kode mata kuliah MKB.

Pentingnya penyediaan literatur sebagai sumber dalam kegiatan praktikum dipandang perlu untuk menyusun Modul Praktikum Mikrobiologi yang sesuai dengan silabus maupun jumlah SKS yang tersedia yaitu 1 SKS dari 3 SKS dalam mata kuliah Mikrobiologi Umum, sehingga tujuan instruksional yang diharapkan dalam pembelajaran dapat tercapai. Oleh karena keterbatasan yang dimiliki penulis, maka Modul Praktikum Mikrobiologi ini tentu masih banyak kekurangan yang ditemukan sehingga penulis harapkan saran dan koreksi yang bersifat membangun untuk sempurnanya modul ini.

Akhirnya semoga Modul Praktikum Mikrobiologi ini bermanfaat untuk memberikan pencerahan kepada mahasiswa dan bagi kita semua. Selamat bekerja !

Denpasar, Februari 2018

Penulis,

DAFTAR ISI

	halaman
COVER	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
SOP PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DI LABORATORIUM	iv
PRAKTIKUM 1. STERILISASI ALAT DAN BAHAN	1
I. Sterilisasi Panas Kering	2
II. Sterilisasi Panas Basah	3
PRAKTIKUM 2. PEMBUATAN MEDIA	5
I. Pembuatan Medium Padat <i>Potato Dekstrosa Agar</i> (PDA).....	7
II. Pembuatan Medium <i>Nutrien Agar</i> (NA)	8
III. Pembuatan Medium <i>Mac Conkey Agar</i>	8
IV. Prosedur Kerja Pembuatan Media Secara Umum	8
PRAKTIKUM 3. PENGAMATAN TERHADAP MIKROORGANISME YANG UMUM DITEMUKAN	9
PRAKTIKUM 4. PEMBUATAN BIAKAN MURNI PADA MEDIA AGAR CAWAN PETRI DAN MEDIA AGAR MIRING	11
I. Pembuatan Biakan Murni pada Media <i>Agar</i> Miring	11
II. Pembuatan Biakan Murni pada Media <i>Agar</i> di Cawan Petri..	12
PRAKTIKUM 5. PENYIAPAN PREPARAT BAKTERI	14
PRAKTIKUM 6. PEWARNAAN SEL BAKTERI	17
I. Tahap Persiapan Pewarnaan Gram	19
II. Prosedur Kerja Pewarnaan Gram	19
PRAKTIKUM 7. ENUMERASI ATAU PENENTUAN ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DAN ANGKA KAPANG KHAMIR (AKK) SERTA ISOLASI BAKTERI PADA MAKANAN DAN MINUMAN	20
1. Angka Lempeng Total (ALT)	21
2. Angka Kapang Kamir (AKK)	22
PRAKTIKUM 8. MENENTUKAN JUMLAH <i>COLIFORM</i> DAN <i>Eschericia</i> <i>coli</i> PADA MAKANAN DAN MINUMAN	23
PRAKTIKUM 9. <i>ESSAY</i> MIKROBIOLOGI	27
LAMPIRAN 01. Tabel MPN 333 Menurut Formula Thomas	27
LAMPIRAN 02. Pemindahan Bakteri secara Aseptik	29
LAMPIRAN 03. Ciri-Ciri Koloni	29
LAMPIRAN 04. Penyiapan Lekapan basah	30
LAMPIRAN 05. Bentuk dan Penataan Dasar Bakteri	30
LAMPIRAN 06. Jamur yang Umum Ditemukan	31
LAMPIRAN 07. Jenis-Jenis Organisme <i>Aquatik</i> yang umum ditemukan	32
LAMPIRAN 08. Organisme <i>Aquatik</i> seperti Ganggang Biru dan G. Hijau	32
LAMPIRAN 09. Penyiapan Olesan Bakteri diikuti Fiksasi panas	33
LAMPIRAN 10. Pemindahan Biakan ke atas Gelas Objek secara Aseptik	33
LAMPIRAN 11. Prosedur Pewarnaan Sederhana	34
LAMPIRAN 12. Prosedur Pewarnaan Gram	34
LAMPIRAN 13. Contoh Laporan Praktikum Mikrobiologi	34
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN GAMBAR	38

STANDAR OPERASIONAL PROSEDUR (SOP)

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DI LABORATORIUM

Untuk Melindungi diri dan semua laboran serta mencegah terjadinya pencemaran dan terkontaminasi bahan yang digunakan dalam kegiatan praktikum, maka perlu dilaksanakan kegiatan sesuai Standar Operasional Prosedur (SOP) dan peraturan yang ada di laboratorium (lab), sebagai berikut:

1. Kenakan jas lab dan kelengkapan lainnya (masker, sarung tangan dsb. bila perlu) selama bekerja di laboratorium, untuk melindungi kontaminasi yang tidak disengaja serta untuk melindungi pakaian dari zat warna dan bahan kimia lainnya.
2. Letakkan tas dan benda-benda lain yang tidak diperlukan pada tempat yang telah disediakan. Jangan meletakkan tas di atas meja praktikum.
3. Lepaslah sepatu dengan menaruh yang rapi dan menggantinya dengan alas kaki khusus untuk bekerja di laboratorium, untuk menghindari kontaminasi dan kebersihan laboratorium.
4. Cucilah tangan secara baik dengan air dan deterjen, sebelum dan setelah praktikum.
5. Bersihkan dengan baik meja dan peralatan laboratorium dengan desinfektan sebelum dan sesudah praktikum.
6. Jangan makan, minum, camilan atau merokok di laboratorium.
7. Perlakukan semua organisme yang ditangani sebagai patogen (menimbulkan penyakit). Kebanyakan sediaan yang ada di laboratorium tidak berbahaya, tetapi beberapa diantaranya berbahaya.
8. Biakan mikroorganisme (mikroba) tidak diperkenankan dibawa keluar ruangan laboratorium (kecuali ada ijin dari instruktur/petugas).
9. Usahakan mikroorganisme yang ditangani tidak tercecer dan tidak tercampur dengan mikroorganisme lain. Bila biakan yang sedang dipindahkan tercecer di meja/lantai, tuangkan desinfektan kemudian sekap dengan kertas serap/tisu dan buang di tempat yang telah disediakan.
10. Bila memecahkan tabung berisi mikroorganisme, tuangkan desinfektan ke atasnya, sapukan dan buang di tempat yang telah disediakan.

11. Matikan api bunsen saat tidak digunakan/meninggalkan tempat tersebut.
12. Hati-hati bekerja di laboratorium, bila terjadi kecelakaan atau hal yang membahayakan cepat lapor kepada petugas/instruktur dan apabila memecahkan alat lab, maka diharapkan menggantikan sebanyak 3 (tiga) kalinya.
13. Sebelum meninggalkan laboratorium, cuci tangan dan bersihkan meja serta kotoran lainnya, sehingga ruangan laboratorium bersih kembali. Jangan sekali-kali membuang bahan/sisa bahan praktikum maupun sampah lainnya ke *wastafel* (saluran air keran), karena dapat menyumbat dan merusak saluran air.
14. Kembalikan semua alat-alat dan bahan praktikum ke tempatnya serta pastikan keran air tidak terbuka dan cek kembali alat-alat yang berhubungan dengan listrik saat akan meninggalkan ruangan laboratorium.
15. Baca dan pahami Modul Praktikum Mikrobiologi sebelum bekerja di laboratorium.
16. Catat semua hasil pengamatan setiap kegiatan praktikum dengan jelas, benar dan rapi, yang disertai dengan gambar-gambar dan keterangan yang singkat dan jelas. Gambar sebaiknya menggunakan pensil.
17. Buatlah laporan hasil praktikum dengan baik, benar dan rapi sesuai petunjuk instruktur/pembimbing, meliputi:
 - Judul Praktikum/Percobaan
 - Hari/tanggal praktikum/percobaan
 - Tujuan praktikum/percobaan
 - Dasar Teori
 - Cara Kerja
 - Hasil Pengamatan
 - Pembahasan
 - Simpulan
 - Daftar Pustaka/Referensi/Sumber pendukung.

Catatan:

Hasil praktikum ini dijadikan portofolio berupa laporan praktikum mikrobiologi (lihat Lampiran 13 hal. 35).

PRAKTIKUM 1

STERILISASI ALAT DAN BAHAN

A. Tujuan : memahami beberapa cara sterilisasi

B. Teori:

Sterilisasi dalam mikrobiologi ialah suatu proses mematikan semua organisme yang terdapat pada suatu benda atau alat.

Ada 3 (tiga) cara utama yang umum dipakai dalam sterilisasi, yaitu:

1. Penggunaan panas, meliputi 2 cara diantaranya:
 - a. Sterilisasi panas lembab (sistem basah) yaitu bila panas yang digunakan bersama-sama dengan uap air.
 - b. Sterilisasi panas kering (sistem kering) yaitu bila panas yang digunakan tanpa kelembaban.
2. Penggunaan bahan kimia yaitu sterilisasi kimia yang dilakukan dengan menggunakan gas atau radiasi.
3. Penggunaan penyaringan atau sterilisasi yaitu filtrasi yang menggunakan kertas saring "Whatman" (*Whatman filter paper*).

Pemilihan metode sterilisasi didasari pada sifat bahan yang akan disterilkan. Metode sterilisasi yang umum digunakan secara rutin di laboratorium mikrobiologi ialah menggunakan panas. Alat yang digunakan untuk sterilisasi basah berupa autoklaf (suhu 121°C, selama 15 menit). Bahan-bahan yang biasa disterilkan dengan cara ini, diantaranya: medium biakan, medium tercemar dan bahan-bahan dari karet. Namun beberapa medium akan rusak bila dipanaskan sampai suhu 121°C, sehingga suhu yang digunakan lebih rendah, misal pada kaldu fermentasi tertentu, gelatin nutrien dan susu litmus.

Sterilisasi panas kering kurang efisien dibandingkan sterilisasi panas lembab, sebab perlu suhu yang tinggi dan waktu yang lebih lama, suhu yang digunakan 160°C-175°C, selama 90 menit. Metode ini dapat diterapkan pada apa saja yang tidak rusak, menyala, hangus atau menguap pada suhu setinggi itu (160°C-175°C). Alat-alat yang disterilkan dengan cara ini berupa pecah belah, seperti: pipet, tabung reaksi, cawan Petri dari kaca, botol sampel, spuit dan bahan-bahan yang tidak tembus uap, seperti:

gliserin, minyak, vaselin dan bahan-bahan berupa serbuk. Alat dan bahan yang disterilkan harus dibungkus, disumbat atau ditempatkan dalam tempat tertentu untuk mencegah kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven/autoklaf.

C. Alat dan Bahan:

1. autoklaf/*pressure cooker*
2. oven
3. alat-alat yang akan disterilkan
4. bahan seperti: larutan Na_3PO_4 1%, HCl 1% dan 3%, alkohol, fenol 5%.

D. Cara Kerja

I. Sterilisasi Panas Kering

a. Alat-alat gelas yang masih baru

1. Rebus alat-alat yang masih baru (cawan Petri, erlenmeyer, corong, tabung reaksi, labu, dsb) dalam larutan Na_3PO_4 1% sampai mendidih beberapa saat.
2. Cuci dengan air sampai bersih, rendam dalam larutan HCl 1% selama 24 jam. Perendaman untuk melarutkan lapisan fosfat.
3. Cuci kembali dengan air. Bilas dengan air suling sampai benar-benar bersih.
4. Alat-alat tersebut selanjutnya dibungkus dengan kertas buram/aluminium foil untuk melindungi pencemaran lebih lanjut.
5. Keringkan dalam oven pada temperatur 170°C , selama 90 menit.

b. Alat-alat gelas yang sudah dipakai

1. Panaskan semua alat gelas yang telah dipakai dalam *pressure cooker*, selama 20 menit untuk mematikan mikroorganisme (mikroba) patogen.
2. Setelah langkah nomor 1 selesai, kemudian agar-agar dibuang di tempat yang telah disediakan (jangan sekali-kali membuang ke *wastapel*/keran air), dapat menyumbat saluran air setelah agar-agar dingin dan padat.
3. Selanjutnya ikuti langkah nomor 1 s/d 5, seperti pada sterilisasi I.a (pada alat-alat gelas yang masih baru).

c. Pipet masih baru

Sterilisasi pipet yang masih baru sama dengan sterilisasi alat-alat gelas yang masih baru.

d. Pipet yang sudah dipakai

1. Pipet yang telah dipakai harus didesinfeksi dengan larutan fenol 5% atau desinfektan lain selama 30 menit.
2. Keringkan pada suhu kamar.
3. Selanjutnya ikuti langkah nomor 1 s/d 5, seperti pada sterilisasi I.a (pada alat-alat gelas yang masih baru). Perhatikan larutan HCl 1% yang digunakan untuk merendam harus masuk ke dalam pipet.

e. Gelas objek dan gelas penutup yang masih baru

1. Rendam gelas objek dan gelas penutup dalam larutan alkohol asam (mengandung 3% HCl) selama 3-5 jam.
2. Cuci dengan air, kemudian bilas dengan air suling
3. Keringkan dengan cara menggosoknya dengan kain yang halus/tisu. Pegang tepi gelas objek (*objek glass*) dan gelas penutup (*cover glass*) agar tidak terjadi pengotoran lemak oleh jari tangan.
4. Simpan gelas objek dan gelas penutup dalam cawan Petri.
5. Sebelum dipakai, gelas objek dan gelas penutup harus dilalukan/dilewatkan di atas api bunsen (dipanggang beberapa detik) untuk membakar sisa lemak. Dinginkan sejenak, setelah dingin baru kemudian digunakan.

f. Gelas objek dan gelas penutup yang sudah dipakai

1. Sama dengan langkah I.a.1
2. Sama dengan langkah I.a.2
3. Selanjutnya ikuti langkah nomor 3 s/d 5 I.e (gelas objek dan gelas penutup yang masih baru).

II. Sterilisasi Panas Basah (Sterilisasi Medium)

1. Pelajari cara penggunaan *pressure cooker* sebelum digunakan
2. Tuangkan air suling/*aquades* secukupnya

3. Labu atau tabung yang telah berisi medium ditata sedemikian rupa dalam suatu tempat aluminium, sehingga tersedia ruangan untuk gerakan uap air secara bebas di atas labu/tabung selama sterilisasi. Kemudian masukkan ke dalam *pressure cooker*.
4. Tutup *pressure cooker* dengan baik, kemudian panaskan. Bila uap air mulai keluar dengan deras (bunyi mendesis), api agak dkecilkan. Waktu dihitung mulai terdengar bunyi mendesis selama 15 menit.
5. Pada akhir proses, matikan pemanasan dan tunggu sampai tidak terdengar bunyi mendesis. Jangan sekali-kali mencoba membuka tutupnya bila masih ada bunyi mendesis dan suhu belum turun. Setelah dingin tutup dibuka perlahan-lahan.
6. Selesai menggunakan alat ini, buang sisa air di dalamnya dan keringkan dengan baik.

III. Cara Penggunaan Autoklaf

- a. Isi autoklaf dengan air sebanyak volume 3.000 - 5.000 mL atau secukupnya.
- b. Siapkan alat atau bahan yang akan disterilkan pada autoklaf.
- c. Masukkan alat dan bahan yang ada di dalam rak tersebut ke dalam bejana autoklaf dan tutup dengan rapat (kecuali klep udara).
- d. Panaskan autoklaf ini dan biarkan semua udara yang ada di dalamnya keluar (ditandai dengan keluarnya tetes-tetes air melalui klep udara).
- e. Tutup klep udara bila semua udara dalam autoklaf sudah keluar.
- f. Pemanasan dilanjutkan sampai suhu 121°C dan tekanan 15 lbs, selama 15 menit
- g. Pemanasan dihentikan, suhu dikembalikan ke suhu kamar dan pada tekanan titik 0 (tekanan titik nol).

Hal-hal yang penting bila di dalam Autoklaf terdapat:

1. 100% uap air murni, maka suhu yang dicapai adalah 121°C dan tekanan 15 lbs.
2. 2/3 bagian uap air dan 1/3 udara, maka suhu dan tekanan yang dicapai adalah 115°C dan 15 lbs.
3. 1/3 bagian uap air dan 2/3 udara, maka suhu dan tekanan yang dicapai adalah 109°C dan 15 lbs
4. 100% udara, maka suhu dan tekanan yang dicapai adalah 100°C dan tekanan 15 lbs.

PRAKTIKUM 2

PEMBUATAN MEDIUM

A. Tujuan : Untuk mempelajari prosedur umum pembuatan medium sebagai media tumbuh jamur dan bakteri

B. Teori :

Medium atau media ialah bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme (mikroba) di atas atau di dalamnya. Media harus mengandung air, karbon, nitrogen, mineral dan faktor tumbuh. Air merupakan komponen utama protoplasma, serta merupakan media masuknya nutrisi ke dalam sel dan keluarnya sekresi/ekresi dari dalam sel. Air yang digunakan sebaiknya air suling atau *aquades*.

Berdasarkan komposisi kimianya, media digolongkan menjadi 3 macam, yaitu:

1. Medium Sintetik, yaitu media yang komposisi kimianya atau bahan pembentukannya secara keseluruhannya terbuat dari bahan-bahan sintetik.

Contoh: *Agar Sabouraud*, *Endo Agar*, *Agar Czapek Dox*, dan lain-lain.

2. Medium Semi Sintetik yaitu media yang bahan pembentukannya terdiri dari campuran bahan-bahan alami dan bahan sintetik.

Contoh: *Agar Tauge*, *Agar Kentang Dextrosa*, dan lain-lain.

3. Medium Alami, yaitu media yang komponen pembentukannya terdiri dari bahan-bahan alami. Contoh: kentang, daging, nasi, kaldu nutrisi (ekstrak daging).

Berdasarkan wujudnya, medium digolongkan menjadi 3 macam, yaitu:

1. Medium Cair, adalah media yang tidak ditambahkan zat pematat (*Agar-Agar*), sehingga media ini dalam keadaan encer (cair). Media untuk pembiakan organisme dalam jumlah besar dan pelaksanaan fermentasi. Contoh: *Laktose Broth*, *Nutrien Broth*.

2. Medium Semi Padat yaitu media yang mengandung bahan yang sama dengan media cair tetapi ditambahkan sedikit *Agar* (setengah konsentrasi *Agar*), sehingga menjadi agak padat. Media ini dipakai untuk menumbuhkan mikroba yang memerlukan air dan hidup dalam lingkungan *anaerob* atau *anaerob* fakultatif. Media ini juga dipakai untuk menguji motilitas suatu bakteri.

3. Media Padat, yaitu media cair yang ditambahkan dengan *Agar*, sehingga menjadi padat. Media ini untuk mengamati penampilan/morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni.

Contoh: *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrosa Agar* (PDA), gelatin dan silika gel.

Menurut kegunaan medium, maka medium digolongkan menjadi:

1. Medium Umum : media yang digunakan untuk menumbuhkan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum. Contoh: *Nutrient Agar* (media untuk menumbuhkan kelompok bakteri), *Potato Dextrosa Agar* (media untuk menumbuhkan jamur), dan lain-lain.
2. Medium Pengaya : media yang dipakai untuk menyuburkan mikroba tertentu sebelum ditumbuhkan pada media yang dipakai dalam penelitian. Contoh: *Selenit Broth* (untuk menyuburkan bakteri *Salmonella*).
3. Medium Selektif : media yang dipakai untuk menumbuhkan species tertentu dari mikroba dengan menghambat pertumbuhan species lain yang tidak dikehendaki. Contoh: media *Salmonella shigella Agar* (SSA) untuk menumbuhkan bakteri *Salmonella* dan *Shigella*. Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah mikroba yang memfermentasikan laktosa seperti: *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Mikroba yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap kilap logam, sedangkan mikroba lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna.
4. Medium Penghitung : media yang dipakai untuk menghitung jumlah mikroba suatu bahan. Media ini dapat berupa media umum dan media selektif.

C. Alat dan Bahan :

Alat: gelas kimia, corong, tabung reaksi, cawan Petri, labu erlenmeyer (kalau bisa merek *pyrex*), batang pengaduk gelas, neraca, oven, *pressure cooker*, papan miring, indikator dan lampu bunsen.

Bahan: kentang, daging tidak berlemak, pepton (protein daging), *Agar-Agar*, sukrosa/glukosa, air suling/*aquades*, serbuk *Mac Conkey Agar*, kapas untuk sumbat, kain penyaring dan spritus.

D. Cara Kerja :

I. Pembuatan Media Padat *Potato Dekstrosa Agar (PDA)*

1. Kentang yang telah dikuliti dipotong kotak-kotak (± 1 cm), kemudian dicuci bersih. Pembuatan media PDA sebanyak 1.000 mL yaitu: timbang kentang 250 g, kemudian rebus dalam 1.000 mL air suling (*aquades*) selama ± 15 menit (sampai kentang lembek). volumenya supaya tetap 1.000 mL.
2. Rebusan kentang disaring dengan kain saring/alat saring, dimana volumenya supaya tetap 1.000 mL. Filtratnya ditampung dalam labu erlenmeyer.
3. Tambahkan 20 g sukrosa/glukosa ke dalam suspensi tersebut dan tambahkan antibiotik 250-500 mg (untuk media jamur ditambahkan antibiotik bakteri dan media bakteri ditambahkan antibiotik jamur) diaduk sampai larut, selanjutnya disteril dalam autoklaf suhu 121°C dan tekanan 15 lbs, selama 15 menit. Suspensi inilah disebut media.
4. Media dituangkan ± 10 mL kedalam cawan Petri diameter 9 cm atau ketebalan 1 mm, kemudian cawan Petri diputar-putar di atas meja supaya media merata.
5. Sisa media dapat digunakan untuk membuat media miring dengan cara menuangkan media ke dalam tabung reaksi sampai sepertiga tinggi tabung. Kemudian sumbat dengan kapas dan sandarkan pada papan dengan posisi miring, sehingga permukaan media dalam tabung miring.
6. Biarkan media dingin dan padat. Kemudian pada permukaan luar pada dasar cawan Petri ditulis dengan spidol permanen atau kertas label, yaitu: nama, tanggal, dan singkatan nama media. Media dalam cawan Petri tersebut siap digunakan. Bila tidak segera digunakan, media dalam cawan Petri selanjutnya dimasukkan kedalam kantong plastik dan simpan dalam lemari es (kulkas) sampai diperlukan.

II. Pembuatan Media *Nutrien Agar (NA)*

1. Membuat media volume 200 mL yaitu sebanyak 100 g daging yang tidak berlemak dipotong kotak-kotak (± 1 cm), kemudian direndam dalam 200 mL air suling (*aquades*) semalam (12 jam) dalam lemari es. Buang lemak yang mungkin terdapat

mengapung di atas permukaan air. Kemudian peras suspensi dengan kain saring/kasa steril. Tambahkan air suling, sehingga volume air tetap 200 mL.

2. Tambahkan 1 g pepton dan 4 g *Agar-Agar*, selanjutnya suspensi dipanaskan sampai mendidih 100°C, selama 20 menit. Suspensi ini dinamakan media, yang kemudian disterilkan selama 15 menit di dalam oven.
3. Selanjutnya ikuti langkah nomor 4 s/d 6 seperti pada praktikum 2. D.I. (Pembuatan Media Padat PDA).

III. Pembuatan Media *Mac Conkey Agar*

1. Ambil 50 g serbuk *Mac Conkey Agar* kemudian dilarutkan kedalam 1.000 mL air suling. lalu dipanaskan sampai mendidih (suhu 100°C) selama 20 menit. Suspensi ini disebut media yang kemudian disterilkan selama 15 menit di dalam oven/autoklaf.
2. Selanjutnya ikuti langkah nomor 4 s/d 6 seperti pada praktikum 2. D.I (Pembuatan Media Padat PDA).

IV. Prosedur Kerja Pembuatan Media Secara Umum

1. Timbanglah sebanyak gram media instan (lihat takaran media pada brosur pembuatan media).
2. Suspensikan media dalam *aquades* (air murni) sampai volume akhir yang diperlukan (lihat brosur pembuatan media).
3. Masukkan ke dalam wadah (sesuai dengan keperluan pemeriksaan), contoh dapat dimasukkan ke dalam tabung reaksi; tabung *Durham* bila media ini digunakan untuk pengujian bakteri *Coliform*).
4. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit (sesuaikan dengan prosedur pembuatan media).
5. Bila tidak digunakan langsung, simpan media pada tempat yang sejuk dan kering (bisa dalam lemari pendingin/kulkas).

PRAKTIKUM 3
**PENGAMATAN TERHADAP MIKROORGANISME
YANG UMUM DITEMUKAN**

A. Tujuan : Mengamati jenis-jenis mikroorganisme yang ada disekitar kita.

B. Teori :

Mikroorganisme (mikroba) terdapat dimana-mana, dari dasar laut sampai ke puncak gunung es, dalam tanah dan debu, di udara, dalam air susu maupun pada permukaan jaringan tubuh kita sendiri. Sesungguhnya memang kita dikelilingi oleh bakteri, jamur, *protozoa* dan mikroorganisme lain.

Ukuran mikroba yang sangat kecil dan ringan menyebabkan mudah terhembus ke mana-mana oleh aliran udara atau membonceng pada partikel debu. Sel-sel mikroba yang renik dan tidak tampak oleh mata telanjang sesungguhnya ada di sekeliling kita, pada diri kita dan di dalam tubuh kita. Oleh karena itu teknik aseptik amat diperlukan bila bekerja di laboratorium mikrobiologi. Misalnya membersihkan meja praktikum dengan disinfektan sebelum dan sesudah kegiatan praktikum. Mulai sekarang jadikan hal ini suatu kebiasaan sebagai Standar Operasional Presedur (SOP) untuk menjadi budaya bekerja di laboratorium.

C. Alat dan Bahan

Alat: 3 cawan Petri yang berisi media NA, 3 cawan Petri yang berisi media PDA, 3 cawan Petri yang berisi media *Mac Conkey Agar*, 1 batang penyekat steril (dibuat dari lidi dengan cara membungkus salah satu ujungnya dengan kapas)

Bahan: Air limbah Tukad Badung (LTB), Air limbah peternakan (LP), Air limbah rumah tangga (LRT), air selokan, air sumur gali, air mineral isi ulang dan lain-lain, sesuai yang akan dipraktikumkan

D. Cara Kerja:

1. Ambil media dalam cawan Petri, tulis dengan spidol permanen nama kelompok, nama media dan tanggal percobaan pada permukaan dasar cawan Petri (jangan menulis pada tutup cawan Petri untuk mencegah tertukarnya tutup tersebut).
2. Angkat tutup cawan Petri media NA, 1 cawan Petri media PDA dan 1 cawan Petri media *Mac Conkey Agar*, celupkan batang penyekat steril ke dalam air steril dalam tabung, kemudian dicelupkan ke dalam air limbah Tukad Badung dan akhirnya dioleskan pada permukaan *Agar* di cawan Petri.
3. Hal yang sama juga dilakukan terhadap limbah peternakan dan limbah rumah tangga atau limbah selokan.
4. Kembalikan tutupnya dan letakkan cawan Petri dalam posisi terbalik dan inkubasikan di dalam *handnkast* pada suhu kamar (37°C).
5. Setelah diinkubasikan selama 24 jam, amati masing-masing cawan Petri, berapa banyaknya koloni yang terdapat pada permukaan cawan Petri. Bandingkan koloni antara media NA, media PDA, dan media *Mac Conkey Agar*.
6. Pengamatan terus dilakukan sampai 3 x 24 jam inkubasi.
7. Catat hasil pengamatan seperti Tabel 01 berikut:

Tabel 01.

No.	Sumber Koloni	Derajat pertumbuhan	Jumlah Macam Koloni	Dua macam koloni yang tumbuh terbanyak	
				Sketsa	Ciri utama
1.	Limbah Tukad Badung				
2.	Limbah Peternakan				
3.	Limbah Rumah Tangga atau selokan				
4.	Limbah lain				

PRAKTIKUM 4

PEMBUATAN BIAKAN MURNI PADA MEDIA AGAR DI CAWAN PETRI DAN MEDIA AGAR MIRING

A. Tujuan : Mempelajari cara-cara mengisolasi spesies-spesies mikroorganisme (mikroba) dari suatu campuran.

B. Teori :

Flora mikroba di lingkungan mana saja pada umumnya terdapat dalam populasi campuran. Untuk mencirikan dan mengidentifikasi suatu spesies mikroorganisme tertentu, spesies tersebut harus dipisahkan, kemudian ditumbuhkan menjadi biakan murni.

Piaraan murni dapat diperoleh dari piaraan campuran dengan cara berikut: ambil salah satu koloni dari piaraan campuran, kemudian koloni ditanam pada medium baru yang steril dengan teknik aseptik. Piaraan yang diperoleh dengan cara demikian disebut piaraan pertama (*primary culture*) dan sifatnya murni. Piaraan semacam ini dapat disimpan, tetapi tiap-tiap waktu tertentu (± 2 bulan) harus diremajakan dengan memindahkannya ke medium baru. Piaraan yang diperoleh dari *primary culture* disebut piaraan turunan (*sub culture*). Piaraan murni yang disimpan dinamakan “*stock culture*”

C. Alat dan Bahan:

Alat : jarum ose bulat, bunsen, rak tabung reaksi, *handkast/laminar airflow* dan cawan Petri

Bahan: piaraan campuran dari Praktikum 3, medium Agar NA, PDA dan *Mac Conkey Agar*, medium Agar miring NA, PDA dan *Mac Conkey Agar*.

D. Cara Kerja :

I. Pembuatan Biakan Murni pada Media Agar Miring

Buat biakan murni untuk setiap koloni pada media Agar miring. Untuk koloni bakteri, pada media Agar miring NA dan *Mac Conkey Agar*, sedangkan untuk koloni

jamur/kapang (koloni yang berbenang-benang) pada media *Agar* miring PDA (perhatikan Lampiran 2) dengan cara sebagai berikut:

1. Bakar kawat/jarum inokulasi sampai pijar merah di atas kerucut biru dari nyala api spiritus (lampu bunsen), kemudian dinginkan.
2. Pegang tabung reaksi yang telah berisi *Agar* miring pada tangan kiri. Angkat tutup cawan Petri yang berisi biakan campuran, kemudian sentuhkan kawat inokulasi yang telah dingin pada koloni, tarik jarum isolasi, cawan Petri yang berisi biakan ditutup.
3. Ujung kawat/jarum isolasi sekarang telah berisi sedikit koloni yang disentuhkan tersebut di atas.
4. Cabut tutup/sumbat kapas pada mulut tabung dengan memakai kelingking kanan. Dinding mulut tabung yang telah terbuka dibakar (dilalukan) di atas lampu bunsen dengan cara melingkar/memutar di atas nyala biru lampu bunsen.
5. Oleskan secara perlahan kawat dari bawah menuju ke atas permukaan *Agar* miring sepanjang permukaan garis tengah media. Panasi mulut tabung dan kemudian tutup kembali dengan tutup kapas tadi.
6. Kawat inokulasi kembali dibakar untuk mematikan sisa mikroorganisme yang melekat pada kawat inokulasi.
7. Letakkan tabung media *Agar* miring pada rak tabung reaksi. Simpan pada suhu kamar (37°C). Pindahkan ke dalam lemari/rak sampai keesokan harinya (24 jam).
8. Amati setiap selang waktu 24 jam. Catat hasil pengamatan seperti Tabel 02 (sebagai pedoman perhatikan Lampiran 03).

II. Pembuatan Biakan Murni Media *Agar* pada Cawan Petri

Buatlah biakan murni untuk setiap koloni berupa media *Agar* pada cawan Petri. Untuk koloni bakteri pada media *Agar* di cawan Petri NA dan *Mac Conkey Agar*, sedangkan untuk jamur/kapang (koloni yang berbenang-benang) pada media *Agar* di cawan Petri PDA, dengan cara sebagai berikut (cara sama seperti praktikum 4 poin I. dari 1 s/d 8, cuma media *Agar* miring diganti dengan media *Agar* pada cawan Petri).

Tabel 02

No.	Mikroorganisme	Morfologi Koloni					
		Diameter	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi	Bau
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							
Dst.							

PRAKTIKUM 5
PENYIAPAN PREPARAT BAKTERI

A. Tujuan : Mempelajari cara membuat preparat (olesan) bakteri dengan baik sebagai prasyarat untuk pewarnaan.

B. Teori :

Olesan bakteri yang baik dan disiapkan sebagaimana mestinya merupakan prasyarat bagi berhasilnya berbagai macam teknik pewarnaan. Olesan yang baik adalah yang tidak terlalu tebal atau tidak terlalu tipis dan bila difiksasi dengan panas akan tahan pencucian satu kali atau lebih selama berlangsungnya proses pewarnaan, sehingga organisme tidak hilang tercuci namun sel-selnya tidak menjadi salah bentuk atau menyusut.

Ada beberapa hal penting yang harus diperhatikan, diantaranya:

1. Gelas objek (kaca objek) yang dipakai tidak boleh tergores dan harus bersih betul.
2. Kemampuan menaruh jumlah organisme, yang tepat pada gelas objek, sehingga olesan yang dihasilkan tidak terlalu tebal atau terlalu tipis. Hal ini perlu keterampilan dan pengalaman. Penyiapan olesan berbeda-beda tergantung dari media apa mikroorganisme diambil, apakah dari media cair atau medium padat.
3. Olesan bakteri harus betul-betul kering udara sebelum difiksasi dengan panas. Fiksasi dengan panas harus dilakukan secukupnya saja dan tidak boleh berlebihan.
4. Penyiapan harus menggunakan teknik aseptik untuk menghindari terkontaminasinya biakan yang digunakan.

C. Alat dan Bahan

Alat : gelas objek, Sengkelit/*ose* bulat, bunsen (lampu bahan bakar spritus), mikroskop, botol pijit dan bak pewarna.

Bahan: alkohol 95%, sabun pembersih, kertas tisu, air suling/*aquades*/air steril, garam fisiologis, biakan murni yang telah dikerjakan, zat pewarna biru *metilen Loffler* (*metheline blue*) dan zat pewarna *karbol fuhsin*

D. Cara Kerja :

1. Bersihkan gelas objek dengan tisu secara baik, sehingga bebas dari lemak dan kotoran lainnya. Lakukan pembersihan ditempat cuci/*wastafel*, dengan sabun pembersih dan alkohol.
2. Tulis nama organisme (mikroba) yang akan dioleskan dengan singkatan umum menggunakan spidol permanen atau kertas label disisi kiri gelas objek.
3. Buat lingkaran di tengah-tengah pada permukaan bawah gelas objek dengan spidol permanen. Bila sudah berpengalaman tidak usah dilakukan lagi (perhatikan Lampiran 10 dan 11).
4. Buat olesan dengan teknik aseptik dengan cara meletakkan 1-2 lup penuh air steril/garam fisiologis pada gelas objek, kemudian dengan lup inokulasi pindahkan sedikit biakan.
5. Sebarkan mikroorganisme hingga rata di dalam lingkaran yang digambar pada permukaan bawah gelas objek.
6. Biarkan olesan tersebut kering udara.
7. Setelah olesan betul-betul kering, lakukan fiksasi dengan panas dengan cara melewati/melalukan gelas objek tersebut beberapa kali di atas api lampu bunsen sampai gelas objek terasa agak panas, bila ditempelkan pada punggung tangan.
8. Dilakukan pewarnaan di atas bak pewarna, yaitu dengan menggunakan pewarna sederhana seperti pewarna metilen biru, diamkan selama 1-2 menit dan jika menggunakan pewarna *karbol fuksin*, diamkan selama 15-30 detik.
9. Pegang gelas objek dengan pinset dan miringkan. Kemudian bilas zat warna tersebut dengan air dari botol pijit sampai zat warna dalam air mengalir tinggal sedikit saja, kemudian dikeringanginkan.
10. Setelah kering, amati pada mikroskop dengan pembesaran 100 kali (10x10) dan pembesaran 400 kali (10x40).

PRAKTIKUM 6
PEWARNAAN SEL BAKTERI

A. Tujuan : Untuk Mempelajari Prosedur Pewarnaan Sel Bakteri

B. Teori :

Pewarnaan sederhana ialah pewarnaan yang digunakan untuk melihat bakteri dengan jelas tetapi tidak dapat membedakan jenis-jenis bakteri yang berbeda dengan morfologi yang sama. Pengenalan bentuk (morfologi) mikroorganisme (mikroba), kecuali mikroalgae harus dilakukan pewarnaan terlebih dahulu agar dapat diamati dengan jelas. Tujuan dari pewarnaan adalah sebagai berikut:

1. Mempermudah pengamatan bentuk (morfologi) sel mikroorganisme (khususnya bakteri)
2. Memperjelas ukuran bakteri
3. Mengamati struktur luar dan struktur dalam sel mikroba.
4. Melihat reaksi jasad terhadap pewarna yang diberikan, sehingga sifat fisik, kimia dari jasad dapat diketahui. Pewarnaan dapat digunakan sebagai salah satu cara klasifikasi bakteri. Berhasil atau tidaknya pewarnaan sangat ditentukan oleh waktu pemberian warna dan umur biakan yang diwarnai, (umur biakan yang baik adalah 24 jam).

C. Alat dan Bahan :

Alat: gelas objek bersih, kaca penutup, *ose* bulat (sengkelit), gelas kimia, bak pewarna dan mikroskop.

Bahan: lampu bunsen, alkohol 70 % dan 95%, *aquades* steril dalam botol pijit, kristal ungu/*karbon gentian violet*, *Safranin* 1%, larutan yodium/*lugol/iodine*, pewarna metilen biru (*metheline blue*), *kristal violet*, *karbol fuhsin*, kertas tisu, garam fisiologis dan kultur bakteri.

D. Cara Kerja :

1. Gelas objek dicuci dengan sabun serta air bersih dan kemudian disterilkan dengan alkohol 95%, kemudian diberi kode.
2. Bakteri diambil sedikit dengan menggunakan jarum *ose* bulat (*sengkelit*) yang telah dipijarkan di bunsen, kemudian diletakkan di atas gelas objek yang telah diisi garam fisiologis atau *aquades* steril di tengah-tengah.
3. Buat hapusan bakteri pada air yang diletakkan pada gelas objek dengan cara menggesek-gesekkan jarum *ose* bulat (*sengkelit*) yang berisi biakan bakteri sampai terbentuk lapisan film tipis dan merata, kemudian dikeringanginkan selama 5 menit.
4. Fiksasi dengan melewati di atas nyala api bunzen/pembakar spiritus pada jarak 30 cm dari atas nyala api, dalam keadaan posisi terbalik, dimana bagian yang ada bakterinya tidak langsung dikenai api bunsen.
5. Tetesi olesan bakteri dengan larutan pewarna primer, yaitu *Metheline Blue* mewarnai sel selama 30-60 detik, Kristal violet dalam 10 detik, *Karbol fuhsin* dalam 5 detik, pada sediaan yang telah difiksasi,
6. Cuci dengan air mengalir atau air suling dalam botol pijit dan keringanginkan atau dengan meletakkan diantara kertas saring.
7. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali (10x10) dan pembesaran 400 kali (10x40) dengan menggunakan minyak *emersi*.

1. Pewarnaan *Gram*

Pewarnaan *Gram* merupakan pewarnaan yang sangat penting dan paling umum digunakan untuk klasifikasi bakteri. Pewarnaan *Gram* disebut juga pewarnaan deferensial karena kemampuannya untuk membedakan suatu kelompok bakteri dengan kelompok lainnya. Melalui pewarnaan ini bakteri dapat dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu:

1. *Gram* positif, yaitu bakteri yang dapat menahan kompleks pewarna primer ungu kristal sampai pada akhir percobaan (sel-sel tampak gelap atau ungu).
2. *Gram* negatif, yaitu bakteri yang kehilangan kompleks warna ungu kristal pada waktu pembilasan dengan alkohol, tetapi kemudian terwarnai oleh pewarna *safranin* sehingga sel-sel tampak merah muda.

Prinsip dari pewarnaan ini adalah sebagai berikut:

1. Mewarnai mikroorganisme dengan pewarna dasar, yaitu dengan Kristal violet atau Gentian violet.
2. Fiksasi, yaitu untuk menguatkan perlekatan warna dasar, misalnya dilakukan dengan garam iodine (modifikasi larutan *lugol*).
3. Pencucian atau penghapusan warna dasar dengan alkohol, aseton atau campuran alkohol dengan aseton.
4. Warnai kembali dengan pewarna pembanding atau warna kontras yang berbeda dengan pewarna dasar, yaitu untuk mewarnai sel-sel yang telah hilang warnanya oleh penghapusan warna. Misal dalam hal ini dipakai *Safranin* atau *Karbol fuhsin*.

Bakteri yang setelah diwarnai dengan pewarna dasar warnanya tidak terhapus oleh alkohol akan berwarna violet karena terwarnai oleh kristal violet, dan tidak lagi menyerap pewarna kontras. Kelompok bakteri yang menunjukkan warna ini dikelompokkan menjadi bakteri gram positif. Sedangkan kelompok bakteri yang telah diwarnai dengan pewarna dasar dan warnanya telah terhapus setelah diperlakukan dengan alkohol atau aseton, akan menyerap pewarna *safranin* atau *karbol fuhsin* yang dipakai sebagai pewarna kontras, sehingga pada preparat akan terlihat warna merah (warna *safranin* atau *karbol fuhsin*). Kelompok bakteri yang demikian disebut dengan bakteri *gram* negatif.

Tahap Persiapan Pewarnaan *Gram*

Alat dan bahan yang perlu dipersiapkan dalam pewarnaan *gram* yaitu: alat berupa mikroskop dan gelas objek; bahan berupa kultur media bakteri yang diisolasi, larutan kristal violet, larutan garam yodium/iodine/lugol, alkohol 95%, larutan *safranin*, minyak *emersi* dan *xylol*.

II. Prosedur Kerja Pewarnaan *Gram*

1. Buat apusan bakteri pada gelas objek yang bersih dan tidak basah
2. Fiksasi di atas api bunsen pada jarak 25-30 cm di atas nyala api bunsen
3. Warnai dengan larutan kristal violet selama 60-90 detik
4. Cuci dengan air suling dalam botol pijit

5. Tetesi dengan larutan garam iodine, dan biarkan selama 60 detik
6. Cuci dengan larutan alkohol 95% sampai warnanya terhapus, biasanya dalam waktu 30 detik.
7. Cuci dengan air mengalir
8. Warnai dengan safranin atau karbol fuhsin selama 5-15 menit.
9. Cuci dengan air dan buang kelebihan air melalui pengeringan dengan kertas tisu, tanpa menggesek-gesek sediaan.
10. Keringanginkan atau di atas nyala api bunsen.
11. Amati pada mikroskop dengan pembesaran 100 kali dengan memberikan minyak *emersi*.

PRAKTIKUM 7

ENUMERASI ATAU PENENTUAN ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DAN ANGKA KAPANG KHAMIR (AKK) SERTA ISOLASI BAKTERI DAN KAPANG/KHAMIR PADA MAKANAN DAN MINUMAN

- A. Tujuan: 1. Mengamati dan mempelajari prosedur dalam menentukan total mikroba atau Angka Lempeng Total bakteri dan Angka Kapang Kamir yang terdapat dalam sampel beberapa jenis makanan dan minuman.
2. Menguji bahwa sampel yang diuji tidak boleh mengandung mikroba melebihi batas yang ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan manusia

B. Teori

Angka Lempeng Total (ALT) adalah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C (SNI, 1992). Uji ALT (Angka Lempeng Total) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total (ALT) dalam tiap gram contoh bahan (Anonim, 1992; Anonim, 2000).

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25°C dan dinyatakan dalam satuan koloni/mL (Soekarto, 2008). Uji AKK (Angka Kapang Khamir) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan kapang dan khamir setelah cuplikan (suspensi sampel) diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C. Setelah inkubasi, dipilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan populasi koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya (Anonim, 1992; Anonim, 2000).

Metode yang digunakan adalah metode seri pengenceran atau metode plating (*plating method*). Metode ini dilakukan dengan menanam sampel yang telah diencerkan

pada media pertumbuhan, kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh setelah diinkubasikan. Apabila nilai ALT dan AKK suatu produk makanan atau minuman melebihi standar yang dipakai acuan Standar Nasional Indonesia (SNI) dan SK Dirjen POM yaitu standard BPOM 5×10^{-1} CFU/g (BPOM, 2008), bila melebihi standar BPOM maka produk tersebut tidak memenuhi syarat.

I. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

A. Tahap Persiapan

Alat : cawan Petri, tabung reaksi, pipet ukur (mikropipet), bola hisap, lampu bunsen, kertas label, spidol permanen, hot splite, inkubator dan alat hitung koloni (*Count coloni*)

Bahan : media *Letheem Broth* (LB), *Plate Count Agar* (PCA), jamu gendong.

B. Prosedur Pengujian

1. Siapkan 1 botol yang berisi 90 mL *Letheem Broth* dan 5 buah tabung reaksi yang berisi 9 mL *Letheem Broth*
2. Cairkan Medium PCA dalam penangas air
3. Siapkan 6 buah cawan Petri dan beri label pengenceran dari tingkat 10^{-1} sampai 10^{-6}
4. Ambil 10 mL atau 10 mg sampel dan masukkan ke dalam botol yang berisi 90 mL *Letheem Broth*, sehingga didapat pengenceran 10^{-1}
5. Dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL *Letheem Broth*, sehingga di dapat pengenceran 10^{-2} , demikian seterusnya sampai pada pengenceran 10^{-6}
6. Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam cawan Petri yang sesuai dengan label pengenceran
7. Tuangkan PCA ± 15 mL ke dalam cawan Petri (suhu $40-45^{\circ}\text{C}$)
8. Goyangkan secara simultan dengan tangan atau alat sekker, sehingga suspensi tercampur merata
9. Biarkan suspensi memadat, selanjutnya diinkubasi pada posisi terbalik pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam
10. Amati pertumbuhan koloni setiap 24 jam dan lakukan penghitungan.

C. Prosedur Penghitungan Koloni

1. Cawan Petri yang dipilih adalah cawan Petri yang ditumbuhi antara 30 sampai 300 koloni
2. Kalikan jumlah koloni dengan faktor pengenceran, bila terdapat lebih dari satu cawan Petri yang ditumbuhi bakteri antara 30-300 koloni, maka masing-masing dikalikan dengan faktor pengenceran, kemudian dirata-ratakan dan akan didapat jumlah bakteri dengan satuan *Coloni Form Unit* per mililiter (CFU/mL atau CFU/mg)

II. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

A. Tahap Persiapan

Alat : cawan Petri, tabung reaksi, pipet ukur (mikropipet), bola hisap, lampu bunsen, kertas label, spidol permanen, hot splite, inkubator dan alat hitung koloni (*Count coloni*)

Bahan: Media *Potato Dextrrose Agar* (PDA), Larutan pengencer *Pepton Dilution Fluid* (PDF) atau aquades, sampel uji (jamu gendong), Kloramfenikol 100 mg/L.

B. Prosedur Pengujian

1. Siapkan 1 botol yang berisi 90 mL pengencer *Pepton Dilution Fluid* atau aquades dan 5 buah tabung reaksi yang berisi 9 mL *Pepton Dilution Fluid* atau aquades
2. Cairkan Medium PDA dalam penangas air
3. Siapkan 6 buah cawan Petri dan beri label pengenceran dari tingkat 10^{-1} sampai 10^{-6}
4. Ambil 10 mL atau 10 mg sampel dan masukkan ke dalam botol yang berisi 90 mL, *Pepton Dilution Fluid* atau aquades sehingga didapat pengenceran 10^{-1}

C. Prosedur Penghitungan Koloni

Dari masing-masing pengenceran dipipet 1 mL dituangkan ke dalam cawan Petri steril yang telah berisi media PDA 15 mL dan digoyangkan sehingga campuran tersebut merata. Setelah agar membeku, cawan Petri dibalik dan diinkubasikan pada suhu 25°C atau pada suhu kamar selama 5 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-4 atau ke-5. Koloni kapang dan khamir dihitung setelah 4-5 hari. Uji sterilitas media

dilakukan dengan menuangkan media PDA dalam cawan Petri dan dibiarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PDA dan dibiarkan memadat.

PRAKTIKUM 8

MENENTUKAN JUMLAH *Coliform* DAN *Eschericia coli* PADA MAKANAN DAN MINUMAN

A. Tujuan : Mengamati dan mempelajari prosedur menentukan jumlah *Coliform* dan *Eschericia coli* (*E. coli*) pada makanan dan minuman

B. Teori

Pengukuran derajat pencemaran makanan dan minuman secara mikrobiologis dapat ditunjukkan dengan menentukan kehadiran bakteri indikator, seperti *Coliform* dan *Eschericia coli* (*E. coli*). Analisis dilakukan dengan menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) atau angka paling mungkin yang terdiri dari 3 tahapan tes pengujian, yaitu: Uji Dugaan, Uji Penetapan dan Uji Pelengkap.

C. Tahap Persiapan

Alat : pipet ukur 10 mL, 1 mL, tabung reaksi, tabung *Durham*, jarum ose, *hot plate*, inkubator.

Bahan: media *Pepton Delution Fluid* (PDF), *Lactose Broth* (LB), *Brilient Green Bile Broth* (BGBB), *Eosin Metheline Blue Agar* (EMBA), *Nutrient Agar* (NA), set pewarna *Gram*, media *Indol Methile Red Voges Proskauer* dan *Citrat* (IMViC)

D. Prosedur Pengujian

1. Secara aseptik (suci hama), timbang sebanyak 25 g sampel makanan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi 225 mL media PDF, kecuali sampel bentuk cair dapat langsung ditanam pada Uji Penduga atau bisa diencerkan dengan cara yang sama seperti di atas (secara aseptik).
2. Uji Dugaan
 - a. Siapkan 3 seri tabung reaksi lengkap dari tabung *Durham* dan media LB konsentrasi ganda, dan 6 tabung reaksi dari tabung *Durham* dan media LB tingkat pengenceran 1 kali (10^{-1}).
 - b. Ambil dengan mikropipet masing-masing 10 mL sampel yang sudah diencerkan, masukkan ke dalam 3 seri tabung reaksi yang berisi media LB konsentrasi ganda.

- c. Ambil dengan mikropipet 1 mL sampel yang sudah diencerkan, masukkan ke dalam 3 seri tabung yang berisi media LB dengan konsentrasi 1 kali.
- d. Ambil dengan mikropipet 1 mL sampel yang sudah diencerkan, masukkan ke dalam 3 seri tabung yang berisi media LB dengan konsentrasi 1 kali.
- e. Inkubasi pada suhu kamar ($t = 37^{\circ}\text{C}$) selama 24-48 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh adanya gas dalam tabung *Durham*, berupa gelembung.

3. Uji Penetap

- a. Tabung berisi suspensi yang menunjukkan positif diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung *Durham* dan media BGGB dengan cara mengambil 1 tetes atau menggunakan *ose*.
- b. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil positif akan ditunjukkan dengan terdapatnya gas di dalam tabung *Durham*.
- c. Tabung yang menunjukkan positif pada media BGGB ini, digesekan (disetrik) pada permukaan media EMBA. Jumlah *Coliform* dapat ditentukan dengan menghitung jumlah tabung yang positif pada masing-masing seri tabung, kemudian nilainya dapat dilihat pada tabel *Most Probable Number* (MPN) di Lampiran 01 hal. 26.
- d. Penentuan bakteri *E. coli* dapat dilihat dengan adanya koloni berwarna hijau dengan kilap logam dan bintik biru di tengahnya.

4. Uji Pelengkap

- a. Koloni bakteri yang tumbuh dengan ciri berwarna hijau disertai kilap logam dan bintik biru, selanjutnya di tanam pada media NA miring.
- b. Inkubasi pada suhu 37°C , selama 24-48 jam
- c. Lakukan pewarnaan Gram.
- d. Lakukan uji IMViC

Selain 3 cara uji tersebut di atas, berikut perlu juga dijelaskan beberapa uji yang lain seperti berikut:

1. Uji Indol

- a. Dari biakan yang ada pada media NA miring, diinokulasikan pada media *Tryptone Broth*
- b. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

- c. Tambahkan larutan *Kovac* untuk tiap biakan, dan kocok
 - d. Diamati setelah 10 menit
 - e. Hasil positif dinyatakan bila pada biakan terbentuk cincin warna merah tua pada permukaan media.
2. Uji MR-VP
- a. Dari biakan NA miring, diinokulasikan pada media MR-VP
 - b. Inkubasi pada suhu 37°C, selama 48 jam
 - c. Tambahkan 5 tetes larutan metil merah tiap tabung biakan selanjutnya dikocok.
 - d. Amati perubahan warna biakan
 - e. Hasil positif ditunjukkan bila biakan berubah menjadi berwarna merah.
3. Uji *Voges Proskauer*
- a. Dari biakan NA miring diinokulasikan pada media *Voges Proskauer*
 - b. Inkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam
 - c. Dalam 1 mL biakan ditambahkan 0,6 ml larutan *Alfa-naftol* dan 0,2 larutan kalium hidroksida (KOH) 40%, dikocok hingga homogen.
 - d. Amati perubahan warna biakan
 - e. Hasil positif, bila warna biakan menjadi merah muda hingga merah menyala.
4. Uji Citrat
- a. Dari biakan NA miring diinokulasikan pada media *Simmon's Citrat Agar*
 - b. Inkubasi pada suhu 37°C, selama 24-48 jam
 - c. Amati pertumbuhan dan perubahan warna biakan
 - d. Perubahan warna biakan menunjukkan reaksi positif, sedangkan bila biakan tetap berwarna hijau menunjukkan reaksi negatif.

Eschericia coli (*E. coli*) merupakan bakteri *Gram* negatif berbentuk batang pendek dan pada reaksi IMViC memberikan hasil sebagai berikut:

- 1. Uji Indol, menunjukkan hasil positif
- 2. Uji Metil Red, menunjukkan hasil positif
- 3. *Voges Proskauer*, menunjukkan hasil negatif
- 4. Citrat, menunjukkan hasil negatif.

PRAKTIKUM 9
ESSAY MIKROBIOLOGI

A. Tujuan : Mengetahui daya hambat beberapa bahan uji terhadap mikroba

B. Teori

Pertumbuhan mikroorganisme (mikroba) dapat dihambat atau dicegah dengan menggunakan zat-zat kimia, seperti fungisida (Jamur), bakterisida (bakteri dan lain-lain). Dengan perlakuan fisik seperti sinar UV, pemanasan yang tinggi dan lain sebagainya. Penghambatan biologis dengan perlakuan mikroorganisme lain sebagai antagonis. Sifat antagonis ini disebabkan oleh adanya hasil metabolisme yang berupa senyawa kimia atau enzim yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba, seperti antibiotika. Pada percobaan ini, kita akan menggunakan metode Kertas Cair (*Kirby Bauer*) untuk mengetahui apakah bahan yang kita uji memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan mikroba.

C. Tahap Persiapan

Alat : cawan Petri, sedangkan bahan seperti media *Nutrient Agar* (NA), biakan bakteri, beberapa antibiotika

Bahan: media *Nutrient Agar* (NA), biakan bakteri, beberapa antibiotika dan bahan alam (nabati), *aquades* dan kertas saring berbentuk cakram (kertas *disc*).

D. Prosedur Kerja

1. Cairkan media NA dalam penangas air, kemudian dinginkan sampai suhu 40°C
2. Masukkan 1 mL suspensi biakan bakteri ke dalam cawan Petri steril
3. Tuangkan media NA ke dalam cawan Petri yang sebelumnya sudah berisi 1 mL suspensi biakan bakteri, dan biarkan membeku
4. Rendam kertas saring berbentuk cakram dalam larutan antibiotika dan ekstrak bahan alam (nabati) lainnya, selama ± 2 detik
5. Letakkan kertas cakram yang sudah direndam dalam larutan antibiotika dan ekstrak bahan alam lainnya pada permukaan medium yang telah membeku
6. Inkubasi pada suhu 30-37°C, selama 24-48 jam

7. Amati dan ukur *zone* hambatan (daerah hambatan) yang terjadi dari masing-masing perlakuan.

Lampiran 01.

Tabel MPN 333 Menurut Formula Thomas

Jumlah TB Gas pada Penanaman			Indek MPN Per 100 mL	Jumlah TB Gas pada Penanaman			Indek MPN Per 100 mL
3 x 10 mL	3 x 1 mL	3x 0,1 mL		3 x 10 mL	3 x 1 mL	3 x 0,1 mL	
0	0	0	0	2	0	0	10
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	19
0	0	3	9	2	0	3	24
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	20
0	1	2	9	2	1	2	25
0	1	3	12	2	1	3	30
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	26
0	2	2	12	2	2	2	31
0	2	3	16	2	2	3	37
0	3	0	9	2	3	0	27
0	3	1	13	2	3	1	33
0	3	2	16	2	3	2	38
0	3	3	19	2	3	3	44
1	0	0	4	3	0	0	29
1	0	1	7	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	49
1	0	3	14	3	0	3	60
1	1	0	2	3	1	0	46
1	1	1	1	3	1	1	58
1	1	2	1	3	1	2	72
1	1	3	18	3	1	3	86
1	2	0	12	3	2	0	76
1	2	1	12	3	2	1	95
1	2	2	19	3	2	2	116
1	2	3	23	3	2	3	139
1	3	0	15	3	3	0	190
1	3	1	19	3	3	1	271
1	3	2	23	3	3	2	438
1	3	3	27	3	3	3	1.898

Keterangan :

MPN = *Most Probable Number* (Cara Perhitungan Terdekat).

Lampiran 02

Gambar 02. Pemindahan Bakteri secara Aseptik

Lampiran 03

Gambar 03. Ciri-Ciri Koloni

Lampiran 04

Gambar 04. Penyiapan Lekapan Basah

Lampiran 05

Gambar 05. Bentuk dan Penataan Dasar Bakteri

Keterangan:

- A. Kokus : 1. tunggal; 2. berpasangan (*diplokokus*); 3. rantai (*streptokokus*); 4. gerombol seperti anggur (*stafilokokus*); 5. kelompok empat (*tetrad*); 6. kubus.
- B. Batang : 1. tunggal; 2. berpasangan (*diplobasilus*); 3. rantai (*streptobasilus*); 4. bentuk pagar; beberapa basilus membentuk endospora; 6. bentuk V, X, Y.
- C. 1. kokus; 2. bentuk koma.
- D. Spiral : 1. kumparan ketat dan panjang (*spiroketa*); kumparan longgar, pendek dan kaku (*spirillum*).

Lampiran 06

Gambar 06. Jamur yang Umum Ditemukan

Keterangan :

1. *Penicillium*: hijau kebiruan, susunan konidia seperti sapu.
2. *Aspergillus*: hijau kebiruan dengan area kuning sampai pada permukaannya
3. *Verticillium*: coklat merah muda, konidia berbentuk elips.
4. *Trichoderma*: hijau, secara mikroskopis menyerupai *Penicillium*.
5. *Geocladium*: hijau kehitaman, tumbuh lebih cepat dari pada *Penicillium* dan *Aspergillus*.
6. *Hormodendrum*: permukaan hijau muda sampai kelabu, permukaan bawah kelabu sampai hitam.
7. *Pleospora*: permukaan sawo matang sampai hijau dengan permukaan belakang coklat sampai hitam, memperlihatkan Askospora.
8. *Scopulariopsis*: coklat muda, konidia berdinding kasar.
9. *Paecilomyces*: coklat kekuningan, konidia berbentuk elips.
10. *Alternaria*: permukaan hitam dengan tepian kelabu, permukaan belakang berwarna hitam.
11. *Helminthosporium*: permukaan hitam dengan tepian kelabu.
12. *Pullularium*: permukaan hitam, mengkilat seperti kulit berdinding tebal, spora menguncup.
13. *Diplosporium*: permukaan seperti wol dan warna kulit permukaan belakang mempunyai pusat merah dan dikelilingi warna coklat.
14. *Oospora*: permukaan berwarna kulit, hifa pecah menjadi sel-sel berbentuk empat persegi panjang dan berdinding tipis.
15. *Fusarium*: pusat berwarna rose tua dengan tepi merah muda, konidia seringkali berbentuk bulan sabit.
16. *Trichothecium*: permukaan putih sampai merah muda, konidia bersel dua.
17. *Mucor*: miselium putih sampai kelabu hitam,, hifa nonseptat, sporangia dan sporangiopora.
18. *Rhizopus*: putih sampai kelabu hitam, nonseptat, rhizoid seperti akar dan sporangiopora.
19. *Syncephalastrum*: permukaan putih sampai kelabu hitam.
20. *Nigrospora*: permukaan putih sampai kelabu, permukaan belakang hitam.
21. *Montospora*-pusat kelabu hitam dengan tepi kelabu muda, konidia coklat kuning.

Lampiran 07

Gambar 07. Jenis-jenis organisme *aquatik* yang umum ditemukan seperti: *Protozoa* berpigmen dan tak berpigmen, *Flagellata* dan *Ciliata*

Lampiran 08

Gambar 08. Organisme *Aquatik* seperti Ganggang biru dan Ganggang hijau

Lampiran 09

Gambar 09. Penyiapan olesan bakteri diikuti fiksasi panas

Lampiran 10

Gambar 10. Pemindahan biakan ke atas gelas objek secara *aseptik*

Lampiran 11

Gambar 11. Prosedur Pewarnaan sederhana

Lampiran 12

Gambar 12. Prosedur Pewarnaan *Gram*

LAPORAN HASIL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Oleh

KELOMPOK : I (SATU)

1. Widya Astuti Suandari (NIM: 2009.V.2.015)
2. Ni Kadek Sri Handayani Wulandari (NIM: 2009.V.2.021)
3. Moh. Brahmantia Putra (NIM: 2009.V.2.033)
4. Samuel Erica Dunga (NIM: 2009.V.2.065)

SEMESTER : IV
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN (IKIP) PGRI BALI
DENPASAR
2018

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. Cetakan Pertama. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Direktorat Jenderal POM. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta.
- Anonim. 1992. Cara Uji Cemarkan Mikroba. SNI (Standar Nasional Indonesia). SNI 01-2897-1992. Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM). 2008. Pengujian Mikrobiologi Pangan. *Infopom*. Vol. 9 (2): 1-11.
- Benjamin Cummings; San Fransisco Mc Kane, L., Kandel, J. 1996. Microbiology: Essentials and Application. Mc Graw Hill Inc. New York.
- Harley Prescott. 2002. Laboratory Exercise in Microbiology: Fifth Edition. The Mc. Graw Hill Companies.
- Holt, *et.al.* 2000. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. USA.
- Jutono, J.; Soedarsono, S.; Hartadi, S.; Kabirun S dan Suhadi D. 1980, Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum. Departemen Mikrobiologi. Yogyakarta: Fakultas Pertanian UGM
- Jawetz dan Melnick. 1996. Mikrobiologi Kedokteran. EGC. Jakarta.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. Brock Biology and Microorganisms. 12th ed, Pearson.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. and J. Parker, Brock. 2000. Biology of Microorganisms, 9 th ed. Prentice Hall International Inc., Upper Saddle River. New York.
- Murray, P.R. 1999. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. Washington.
- McKane, L. and Kandel, J. 1996. Microbiology: Essentials and Application. Mc Graw Hill Inc. New York.
- Nduka Okafor. 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Published By Science Publisher. Enfield, NH, USA. An Imprint Of Edenbridge Ltd.

Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 2008. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 1 & 2. Jakarta: Universitas Indonesia

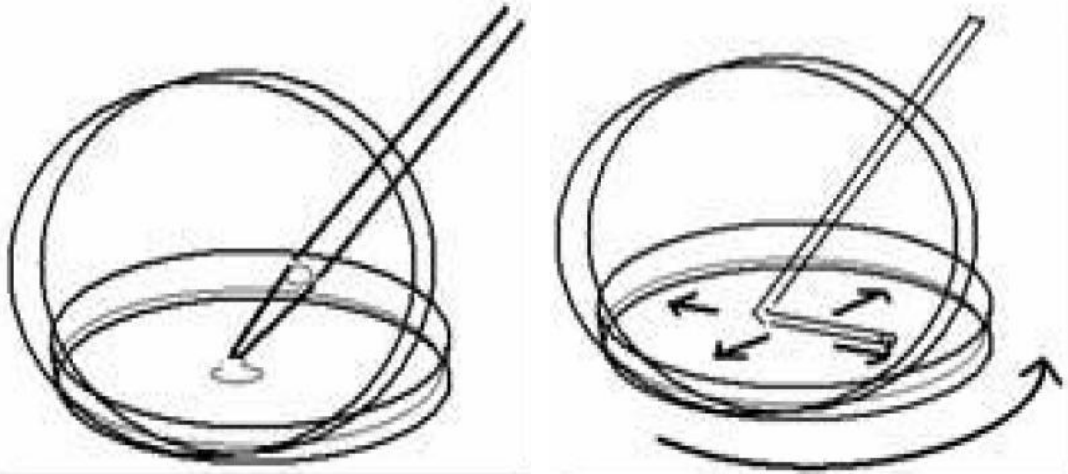
Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. 1976. *Microbiology*. New York. Mc. Graw-Hill Book Company.

Soekarto. 2008. Kapang Dalam Bahan Pangan.
<http://www.scumdoctor.com/Indonesian/firstaid/kapang/.html>.
Diakses pada 28 November 2013.

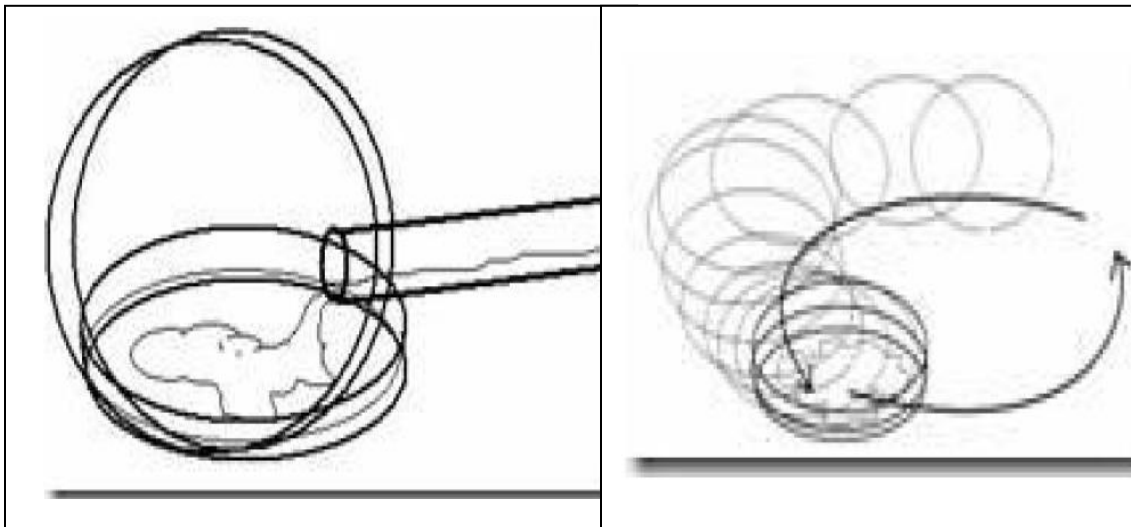
SNI. 1992. Cara Uji Cemarkan Mikroba. SNI 01-2897-1992. Jakarta. pp. 4, 36.

Volk, W.A. dan Wheeler, M.F. 1988. Mikrobiologi Dasar. Jakarta: Penerbit. Erlangga.

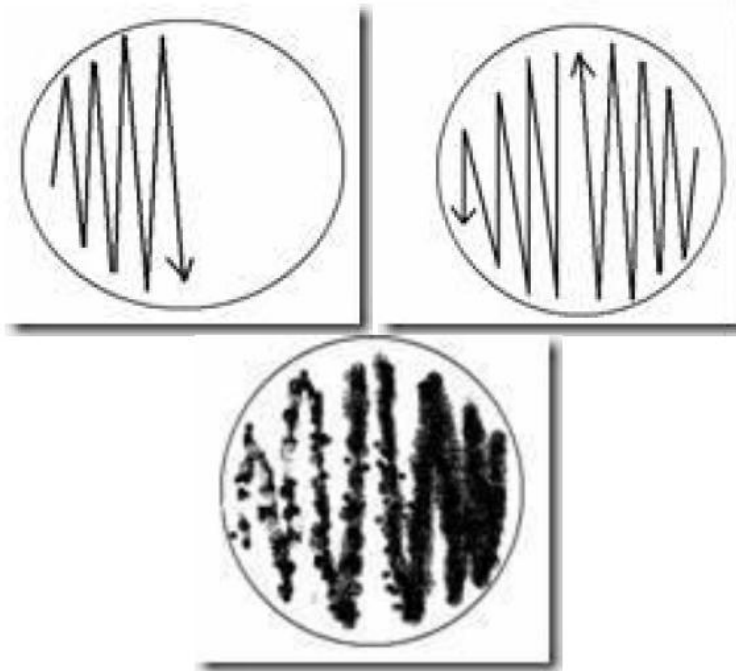
LAMPIRAN GAMBAR



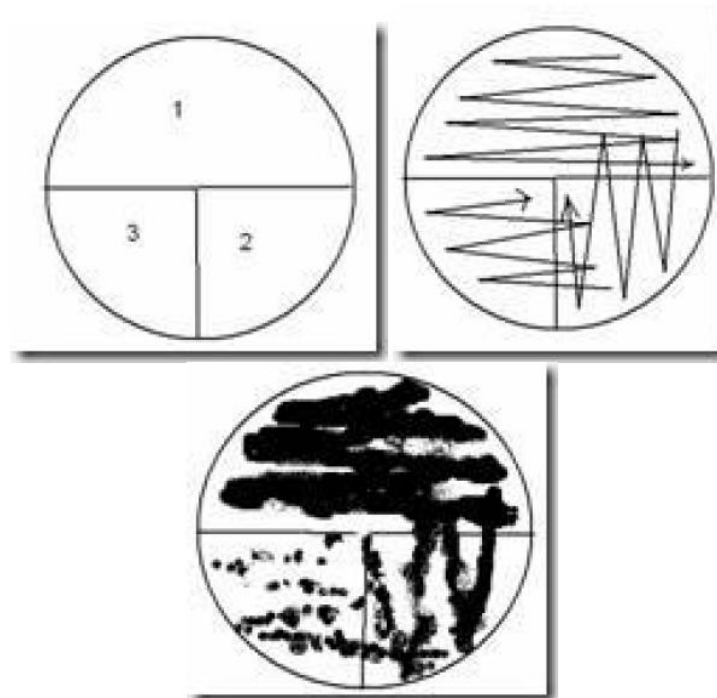
Gambar `1. Spread plate method



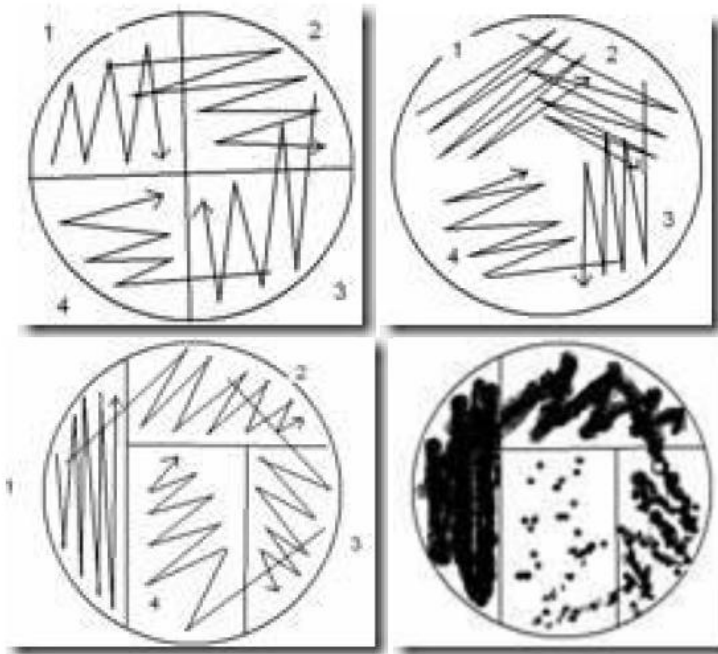
Gambar 2. Pour Plate Method



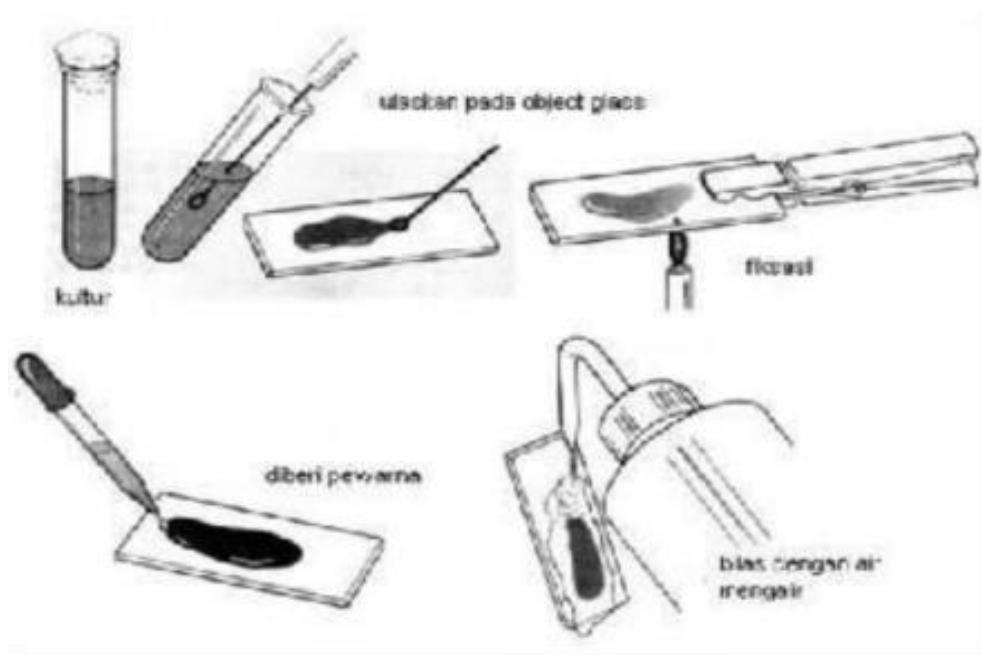
Gambar 3. Streak Plate Method secara Goresan Sinambung



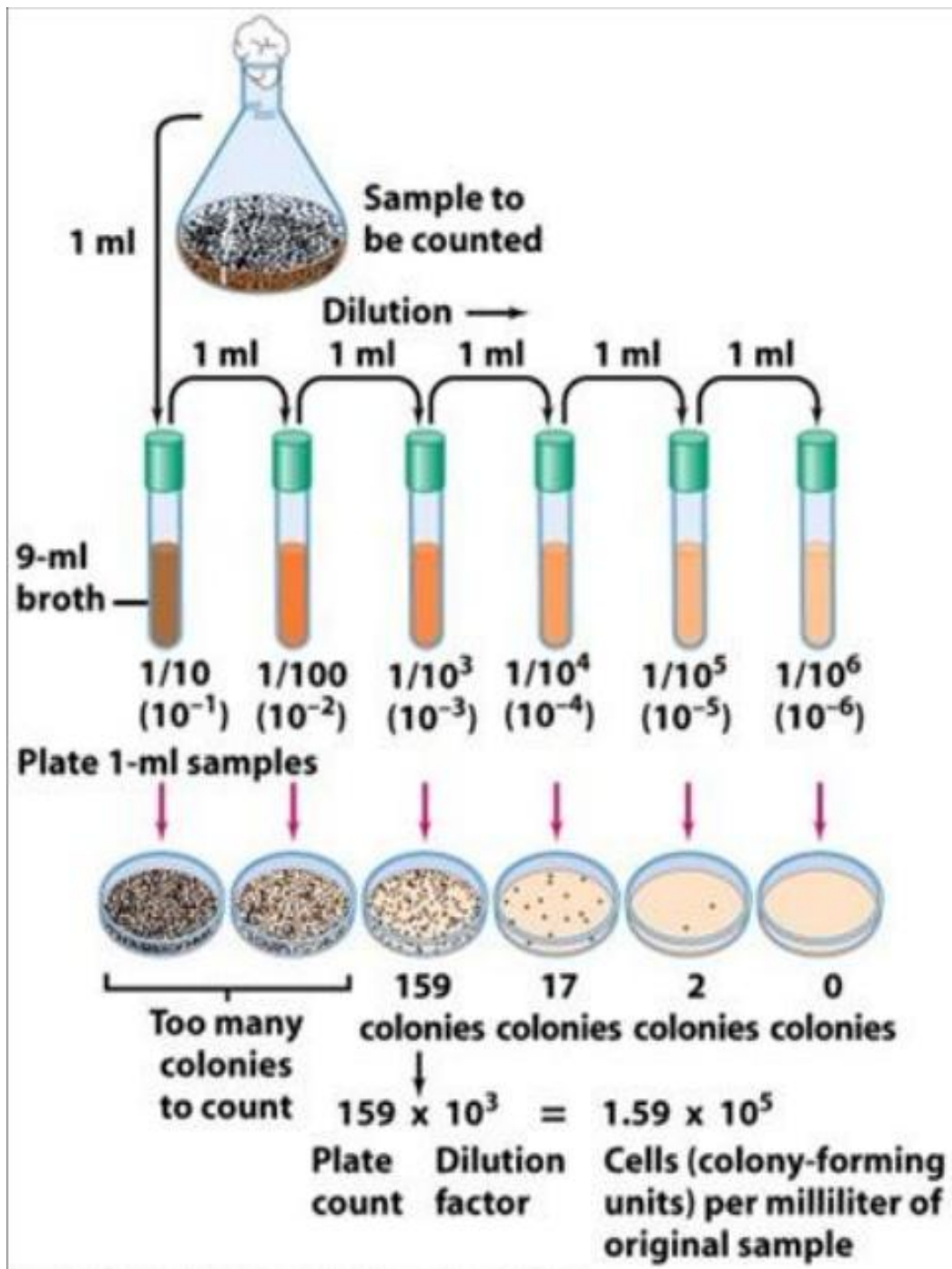
Gambar 4. Streak Plate Method secara Goresan T



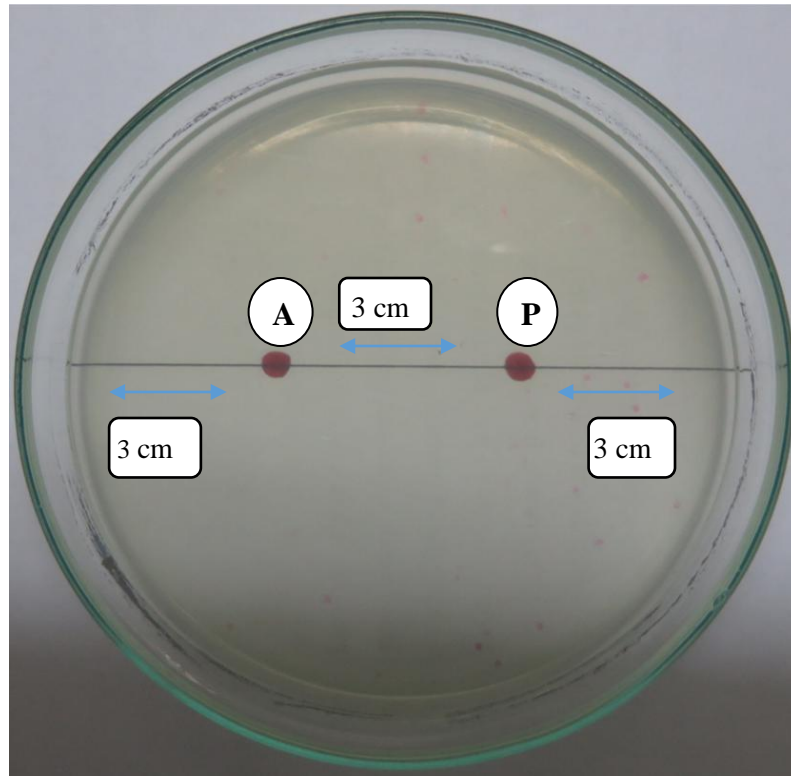
Gambar 5. Streak Plate Method dengan lebih banyak Sektor



Gambar 6. Teknik Pengecatan Bakteri



Gambar 7. Teknik Pengenceran



Gambar 8. Metode *Dual Culture*