

MODUL PRAKTIKUM
BAKTERIOLOGI DASAR



DISUSUN OLEH:

RINDITA, M. SI.

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK

FAKULTAS FARMASI DAN SAINS

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA

JAKARTA 2021

PEMBUATAN LAPORAN PRAKTIKUM

Laporan praktikum disusun setiap praktikan untuk melaporkan hasil serta menganalisisnya. Adapun format inti laporan praktikum Bakteriologi Dasar adalah sebagai berikut:

1. Halaman judul (*cover*)

Judul praktikum pada halaman judul disesuaikan dengan tema praktikum, contoh:

Laporan Praktikum

PRAKTIKUM 1 PEMBUATAN MEDIA CAIR DAN SEMISOLID

Disusun oleh:
Nama Lengkap
NIM/Kelas Praktikum



D4 ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
MARET (bulan pembuatan praktikum) 2019

2. Bab 1 (Pendahuluan)

Pada laporan praktikum, bab 1 yang berisi pendahuluan merupakan mukadimah atau pembukaan yang mendeskripsikan tentang pentingnya suatu praktikum untuk dilakukan. Bab ini dapat berisi dua sub bab, yaitu: a. Latar Belakang dan b. Tujuan Praktikum. Bab 1 ditulis singkat, sesuai tema praktikum, sehingga banyaknya halaman pada bab ini hanya satu sampai dua halaman saja. Contoh penulisan bab 1 adalah sebagai berikut:

a. Latar Belakang

Latar belakang dapat terdiri dari 3 sampai 6 paragraf yang memuat tentang hal-hal yang mendasari diadakannya suatu praktikum. Misalnya, jika praktikum tentang pembuatan media, maka paragraf pertama diawali dengan menuliskan definisi media.

Paragraf kedua bisa dilanjutkan dengan manfaat media bagi pertumbuhan bakteri, yang dilanjutkan dengan jenis-jenis media. Antara paragraf satu dengan yang lainnya dihubungkan oleh kata atau kalimat penghubung, dan setiap paragraf fokus membahas satu topik.

b. Tujuan Praktikum

Tujuan praktikum dapat ditulis dalam satu paragraf atau dalam bentuk poin-poin. Tujuan praktikum pembuatan media, misalnya, adalah untuk mengetahui cara pembuatan media yang baik dan benar. Selain itu, tujuan lainnya adalah untuk mengetahui perbedaan media cair, semisolid, dan padat.

3. Bab 2 (Tinjauan Pustaka)

Tinjauan pustaka berisi literatur-literatur pendukung tema praktikum yang dilaksanakan. Pada pembuatan media pertumbuhan bakteri misalnya, tinjauan pustaka dapat dibagi beberapa sub bab, seperti:

a. Jenis-jenis media

Dalam setiap sub bab, Anda dapat menuliskan literatur mengenai tema praktikum. Contohnya dalam sub bab ini, Anda dapat menyebutkan jenis-jenis media yang selama ini digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Menulis tinjauan pustaka bukan berarti menulis/mengetik ulang dari literatur (ingat bahwa seorang penulis yang beretika dilarang keras menyalin atau melakukan plagiarisme), melainkan menulis menggunakan kalimat sendiri (parafrase) dan mengutipnya dari literatur. Cara mengutip misalnya:

Menurut **Sunatmo (2009)**, terdapat dua kategori media yang diperlukan untuk menumbuhkan bakteri, yaitu media sintetik dan media media kompleks.

Keterangan: Sunatmo adalah penulis literatur yang dikutip, dan literatur yang dikutip adalah terbitan tahun 2009. Setiap literatur yang dikutip harus tersedia di daftar pustaka.

b. Media cair (definisi dan contohnya)

Dalam sub bab selanjutnya dapat ditulis seperti pada sub bab pertama, usahakan menulis lebih dari satu paragraf dalam setiap sub bab. Anda boleh memasukkan gambar, tetapi jika mengambilnya dari buku, jurnal penelitian, ataupun internet diharuskan mencantumkan sumbernya sebagai salah satu etika dalam menulis. Ketika memasukkan gambar dalam tulisan, maka Anda diharuskan merujuknya, contohnya dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Salah satu jenis *enrichment medium*. Sumber gambar:
<http://microbeonline.com/types-of-bacteriological-culture-medium/>

c. Media semisolid (definisi dan contohnya)

Penulisan tinjauan pustaka sebaiknya dibatasi, walaupun Anda dapat mencari sumber literatur sebanyak-banyaknya. Untuk keperluan laporan praktikum, batasi penulisan tinjauan pustaka antara dua sampai empat halaman saja.

d. Definisi dan guna proses menimbang dan sterilisasi

4. Bab 3 (Metodologi)

Penulisan metodologi dalam laporan praktikum meliputi beberapa hal teknis yang berkaitan dengan jalannya praktikum, yaitu sebagai berikut:

a. Waktu dan Tempat (dilaksanakannya praktikum)

Pada bagian ini dituliskan hari dan tanggal praktikum, serta jamnya, lalutuliskan juga tempat (nama laboratorium) dilaksanakannya praktikum.

b. Alat dan Bahan (sebutkan yang benar-benar digunakan saat praktikum)

Seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam praktikum dituliskan dalam bagian ini, bisa dalam bentuk paragraf maupun poin poin.

c. Prosedur/Cara Kerja (menggunakan kalimat pasif)

Tuliskan prosedur/cara/tahapan kerja untuk setiap jenis praktikum. Jika terdapat banyak tahapan, maka dapat dibuat beberapa sub bab lagi sebagai berikut:

1) Prosedur penimbangan media

Dalam bagian menulis prosedur, gunakanlah kalimat pasif, contoh:

Sebanyak 70 gr serbuk media NA **dimasukkan** ke dalam Erlenmeyer.

Keterangan: “dimasukkan” adalah contoh kata imbuhan pasif

2) Prosedur pembuatan media cair

Dalam menulis prosedur, tulislah sesuai urutan kerja dan dengan Bahasa Indonesia yang jelas sehingga pembaca dapat melakukan praktikum sesuai dengan deskripsi prosedurnya (mudah untuk dimengerti).

3) Prosedur pembuatan media semisolid

4) Prosedur sterilisasi

Penulisan metodologi dalam laporan praktikum sebaiknya juga dibatasi antara dua sampai empat halaman.

5. Bab 4 (Hasil dan Pembahasan)

Dalam menulis laporan praktikum, bagian ini adalah bagian yang paling menantang untuk dikerjakan karena melibatkan kemampuan menganalisis dari praktikan. Ketika menulis hasil, praktikan diminta menampilkan bukti-bukti data, yaitu segala jenis data yang diperoleh dari praktikum yang telah dilakukan.

Hasil penelitian dapat dideskripsikan sebagai data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif dapat berupa gambar/foto hasil praktikum, yang kemudian dideskripsikan sesuai hasil observasi/pengamatan langsung dari praktikan. Misalnya, dalam praktikum pembuatan media, praktikan dapat menampilkan gambar (diperoleh dari dokumentasi foto) media yang sudah jadi lalu membuat deskripsi warna, tekstur, dan bau dari media tersebut. Untuk membandingkan, bisa dengan mendeskripsikan media sebelum dan sesudah sterilisasi. Lebih lengkap lagi, Anda bisa membandingkan data pengamatan antara media cair, semisolid, dan padat.

Dalam membuat pembahasan, Anda tidak diperkenankan mengulang penjabaran prosedur praktikum dalam bagian ini. Isi pembahasan adalah analisis yang dilakukan terhadap hasil praktikum Anda, yang sebenarnya merupakan jawaban dari pertanyaan-pertanyaan yang dapat timbul dari hasil praktikum seperti: “Mengapa hasilnya demikian?”, “Proses apa yang terjadi?”, “Apakah praktikum saya berhasil? Mengapa?”. Analisis Anda harus didukung dengan teori yang terdapat dalam literatur (tinjauan pustaka) yang sudah Anda peroleh sebelumnya.

Perlu Anda pahami, bahwa dalam praktikum tidak melulu harus berhasil. Kegagalan selama proses praktikum dapat saja terjadi dan dapat disebabkan oleh banyak faktor, akan tetapi hal ini harus tetap dibahas. Mengingat bab ini adalah bab yang paling krusial dalam pembuatan laporan praktikum, maka setidaknya harus terdapat minimal tiga halaman hasil dan pembahasan, dan makin banyak maka nilainya akan semakin tinggi.

6. Bab 5 (Kesimpulan)

Dalam membuat kesimpulan, gunakan kalimat yang efektif dan jelas. Kesimpulan yang baik adalah menjawab tujuan dan ditulis dalam bentuk paragraf. Jika tujuan praktikum adalah “untuk mengetahui perbedaan antara media padat dan cair, serta semisolid” maka kesimpulan yang dapat dituliskan adalah “Dari praktikum ini dapat disimpulkan bahwa media padat adalah media yang dalam suhu ruang bertekstur padat, sedangkan media semisolid dalam suhu ruang bertekstur semipadat, dan media cair dalam suhu ruang bertekstur cair.”

7. Daftar Pustaka

Seluruh literatur yang Anda gunakan dalam menyusun laporan praktikum ini disusun dalam sebuah daftar pustaka. Gunakan literatur yang terbaru, sebaiknya 10 tahun terakhir jika ada, dan berasal dari buku perkuliahan (Mikrobiologi, Bakteriologi), situs internet terpercaya (contoh: <http://textbookofbacteriology.net/>) ataupun dari hasil-hasil penelitian para peneliti di bidang Mikrobiologi atau Bakteriologi (jurnal penelitian).

Sangat tidak disarankan mengutip dari buku SMA/SMK/buku catatan, situs internet yang tidak jelas penulisnya, atau dari blog-blog mahasiswa lain. Cara menulis daftar pustaka dapat mengikuti contoh sebagai berikut:

- Hogg S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex.
- Sunatmo, TI. 2009. *Mikrobiologi Esensial*. Edisi ke 1. Percetakan Ardy Agency: Jakarta.
- Sunatmo, TI. 2009. *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Departemen Biologi FMIPA IPB: Bogor.
- Tadesse A & Alem M. 2006. *Medical Bacteriology. Lecture Notes*. University of Gondar: Ethiopia.

PEMBUATAN MEDIA

Media adalah larutan nutrien yang dapat dibuat dan digunakan untuk menumbuhkan bakteri di laboratorium. Untuk mempelajari bakteri, diperlukan pengenalan terhadap berbagai macam media, mulai dari penyiapannya, sterilisasi, dan penyimpanannya. Bahan media saat ini sudah tersedia dalam bentuk bubuk, tidak perlu lagi ditimbang satu-persatu komponennya, sehingga memudahkan praktikan untuk menyiapkannya. Bagaimanapun, ketepatan penyiapannya harus diperhatikan sehingga media yang diharapkan dapat sesuai untuk pertumbuhan bakteri.

Media kultur adalah larutan yang mengandung nutrien. Daya tahan dan kemampuan tumbuh mikroorganisme tergantung pada ketersediaan nutrien dan lingkungan pertumbuhannya. Media dapat berbentuk **cair**, **semi padat/semisolid**, atau **padat**. Media cair yang tidak mengandung zat untuk memadatkan dinamakan media kaldu, sedangkan media yang ditambahkan zat untuk memadatkan seperti agar-agar dapat berupa media semi padat atau padat.

Agar-agar merupakan ekstrak alga marin yang terdiri atas senyawa karbohidrat kompleks galaktosa tanpa nilai gizi. Agar-agar mencair pada suhu 100°C dan menjadi padat pada suhu 40°C. Dengan ciri-ciri agar tersebut, maka organisme seperti mikroba patogen dapat ditumbuhkan pada media yang diinkubasi pada suhu 37.5°C atau sedikit di atas suhu tersebut tanpa khawatir media akan mencair. **Media padat** membutuhkan konsentrasi agar-agar 1.5-1.8%, sedangkan **media semi padat** konsentrasi agarnya kurang dari 1%. Keuntungan media padat adalah bahwa di permukaannya dapat ditumbuhkan mikrob yang dengan teknik isolasi tertentu menghasilkan suatu koloni yang terpisah.

Media padat yang masih dalam bentuk cair dapat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian dimiringkan membentuk agar-agar miring. **Media agar miring** dapat dipakai untuk menyimpan kultur mikroba, sedangkan **media agar-agar tegak** dipakai untuk mempelajari kebutuhan mikroba akan gas. Apabila media padat yang masih cair dituangkan ke dalam cawan petri, maka akan terbentuk **media cawan**.

Tabung reaksi dan **cawan petri** yang terbuat dari kaca atau plastik digunakan untuk kultivasi mikroba. Media yang sesuai dalam bentuk kaldu atau agar-agar dapat disimpan dalam tabung reaksi, sedangkan media padat dalam cawan petri. Media steril dalam tabung reaksi seringkali diberi sumbat kapas, yang saat ini dapat digantikan dengan tutup ulir dari logam, *stainless steel* atau plastik tahan panas.

Cawan petri memberi permukaan yang lebih luas untuk pertumbuhan mikroba, terdiri atas dua bagian yaitu bagian alas dan tutup yang agak longgar. Untuk penggunaan sehari-hari, cawan petri yang digunakan adalah yang berukuran diameter 15 cm, yang dapat menampung agar-agar cair sebanyak 15-20 ml. Agar-agar cair yang panas menjadi padat pada suhu 40°C, dan setelah inokulasi maka cawan petri disimpan dalam posisi terbalik untuk mencegah kondensasi dari bentuk yang ada dalam tutup yang jatuh ke permukaan agar-agar.

A. PEMBUATAN MEDIA CAIR

I. Tujuan

1. Tujuan umum

Peserta didik diharapkan mampu membuat media cair.

2. Tujuan Khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan mengenai media cair.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat media cair.
4. Melabel dan menyiapkan media cair yang telah dibuat.

II. Alat dan Bahan

1. Alat:

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 1. Neraca | 7. Tabung reaksi |
| 2. Kertas timbang | 8. Tabung durham |
| 3. Spatel | 9. Cawan petri |
| 4. <i>Beaker glass</i> | 10. Kapas |
| 5. Gelas ukur | 11. Dll |
| 6. Tabung <i>Erlenmeyer</i> | |

2. Bahan :

1. *Tryptic Soys Broth* (TSB)
2. Glukosa
3. Pepton
4. NaCl
5. MRVP

III. Prosedur Kerja

1. Pembuatan Media TSB dan MRVP

- a. Persiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu.
- b. Selanjutnya timbang media sesuai takaran yang tertera pada label yang terempel di botol media.
- c. Larutkan media dengan aquades lalu panaskan hingga homogen.
- d. Masukkan media ke dalam tabung lalu ditutup dengan kapas.
- e. Selanjutnya sterilkan media dengan menggunakan autoklaf.
- f. Setelah steril, simpan media di dalam lemari pendingin.

2. Pembuatan Media Pepton

- a. Persiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu.
- b. Selanjutnya, timbang media pepton sebanyak 1 gram dan 0,5 gram NaCl.
- c. Larutkan media dengan 100 ml aquades lalu panaskan hingga homogen.
- d. Masukkan media ke dalam tabung lalu tutup dengan kapas.
- e. Selanjutnya sterilkan media dengan menggunakan autoklaf.
- f. Setelah steril, simpan media di dalam lemari pendingin.

3. Pembuatan Media Gula – Gula

- a. Semua alat dan bahan disiapkan terlebih dahulu.

- b. Selanjutnya menimbang media glukosa/laktosa/manitol/maltosa/sukrosa sebanyak 1% dari banyaknya media yang kita butuhkan (contoh: bila akan membuat 50 ml maka timbang 0,5 gram).
- c. Larutkan media dengan pepton lalu tambahkan indikator fenol red dan KOH sampai bewarna merah.
- d. Masukkan media ke dalam tabung yang telah diberi tabung durham lalu ditutup kapas berwarna (kuning untuk glukosa, ungu untuk laktosa, hijau untuk manitol, merah untuk maltosa dan biru untuk sukrosa).
- e. Selanjutnya sterilkan media menggunakan autoklaf.
- f. Setelah steril, simpan media di dalam lemari pendingin.

B. PEMBUATAN MEDIA SEMI SOLID

I. Tujuan

A. Tujuan umum

Peserta didik diharapkan mampu membuat media semi solid.

B. Tujuan khusus

Peserta didik mampu:

1. Menjelaskan mengenai media semi solid.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat media semi solid.
4. Melabel dan menyimpan media yang telah dibuat.

II. Alat dan Bahan

A. Alat:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------|
| 1. Neraca analitik | 9. Api Bunsen |
| 2. Kertas timbang | 10. Pengaduk kaca |
| 3. Spatel | 11. <i>Hot plate</i> |
| 4. <i>Beaker glass</i> | 12. Botol semprot |
| 5. Gelas ukur | 13. Autoklaf |
| 6. Tabung <i>Erlenmeyer</i> | 14. Plastik tahan panas |
| 7. Tabung reaksi | 15. Label |
| 8. Kapas/ <i>aluminium foil</i> | |

B. Bahan:

1. Media SIM (*Sulfide Indole Motility*)
2. Aquades
3. Kertas pH

III. Prosedur Kerja

- a. Siapkan alat dan bahan terlebih dahulu sebelum memulai praktikum.
- b. Timbang media sesuai takaran yang tertera pada label yang tertempel di botol media, sesuaikan dengan jumlah media yang akan dibuat dengan membuat perhitungan.
- c. Larutkan media dengan aquades dengan cara memanaskannya di atas *hot plate* sambil diaduk dengan batang pengaduk kaca hingga homogen.

- d. Periksa pH media dengan menggunakan kertas pH.
- e. Masukkan media ke dalam tabung-tabung reaksi lalu ditutup kapas atau *aluminium foil* (dapat dikerjakan di dekat api Bunsen).
- f. Sterilisasi media dengan menggunakan autoklaf, lakukan sesuai prosedur sterilisasi.
- g. Setelah steril, simpan media di dalam lemari pendingin.

C. PEMBUATAN MEDIA PADAT

I. Tujuan

A. Tujuan Umum

Peserta didik diharapkan mampu membuat media padat.

B. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan mengenai media padat.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat media padat yang baik dan benar.
4. Melabel dan menyimpan media yang telah dibuat.

II. Alat dan Bahan

A. Alat:

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 1. Neraca | 7. Tabung reaksi |
| 2. Kertas timbang | 8. Tabung durham |
| 3. Spatel | 9. Cawan petri |
| 4. <i>Beaker glass</i> | 10. Kapas |
| 5. Tabung <i>Erlenmeyer</i> | 11. Dll |
| 6. Gelas ukur | |

B. Bahan:

1. *Mac Conkay Agar* (MCA)
2. *Natrium Agar* (NA)

III. Prosedur Kerja

- a. Siapkan semua alat dan bahan terlebih dahulu.
- b. Timbang media sesuai takaran yang tertera pada label yang tertempel di botol media.
- c. Larutkan media dengan aquades lalu panaskan hingga homogen.
- d. Selanjutnya sterilkan media menggunakan autoklaf.
- e. Setelah steril, masukkan media ke dalam cawan petri steril sebanyak 15-20 ml.
- f. Simpan media di dalam lemari pendingin.

TEKNIK DASAR INOKULASI BAKTERI PADA MEDIA

Isolasi bakteri adalah proses mengambil bakteri dari medium atau lingkungan asalnya dan menumbuhkannya di medium buatan sehingga diperoleh biakan yang murni. Bakteri dipindahkan dari satu tempat ke tempat lainnya harus menggunakan prosedur aseptik. Beberapa alat yang digunakan untuk menjalankan prosedur ini adalah bunsen dan *laminar air flow*. Bila tidak dijalankan dengan tepat, ada kemungkinan kontaminasi oleh mikroorganisme lain sehingga akan mengganggu hasil yang diharapkan.

Bakteri di alam umumnya tumbuh dalam populasi yang terdiri dari berbagai spesies. Oleh karena itu, untuk mendapatkan biakan murni, sumber bakteri harus diperlakukan dengan pengenceran agar didapat hanya 100-200 bakteri yang ditransfer ke medium, sehingga dapat tumbuh menjadi koloni yang berasal dari bakteri tunggal.

Ada beberapa metode untuk menginokulasi bakteri sesuai dengan jenis medium tujuannya. Pada medium agar tegak, dilakukan metode gores dengan menggunakan *loop ose*. Pada medium petridisk (cawan Petri), dapat menggunakan metode *streak plate* (metode gores), *pour plate* (metode cawan tuang), dan *spread plate* (metode cawan sebar). Setelah inokulasi, dilakukan proses inkubasi, yaitu penyimpanan medium pada inkubator dengan suhu dan periode tertentu.

Metode gores atau *streak plate* menggunakan *loop ose* dan menggoreskannya ke permukaan medium agar dengan pola tertentu dengan harapan pada ujung goresan, hanya sel-sel bakteri tunggal yang terlepas dari ose dan menempel ke medium. Sel-sel bakteri tunggal ini akan membentuk koloni tunggal yang kemudian dapat dipindahkan ke medium selanjutnya agar didapatkan biakan murni.

Metode tuang atau *pour plate* dilakukan dengan 2 cara, yaitu dengan mencampur suspensi bakteri dengan medium agar pada suhu 50°C kemudian menuangkannya pada cawan petri, selanjutnya menuang medium agar ke atasnya dan diaduk. Setelah agar mengeras, bakteri akan berada pada tempatnya masing-masing dan diharapkan bakteri tidak mengelompok sehingga terbentuk koloni tunggal.

Metode sebar atau *spread plate* dilakukan dengan menyemprotkan suspensi ke atas medium agar kemudian menyebarkannya secara merata dengan batang L. Dengan ini diharapkan bakteri terpisah secara individual kemudian dapat tumbuh menjadi koloni tunggal.

A. TEKNIK DASAR INOKULASI BAKTERI PADA MEDIA CAIR DAN SEMI SOLID

I. Tujuan

a. Tujuan Umum

Peserta didik diharapkan mampu memahami dan memiliki keterampilan melakukan isolasi dan inokulasi pada media cair dan semi solid.

b. Tujuan Khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep isolasi dan inokulasi.

2. Menjelaskan prinsip dan tujuan teknik isolasi dan inokulasi.
3. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
4. Melakukan isolasi dan inokulasi.
5. Membaca hasil inokulasi.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

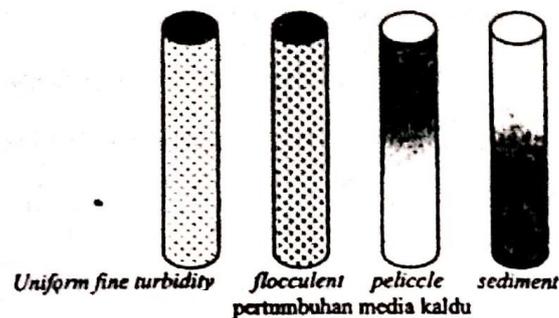
1. Ose
2. Bunsen
3. Inkubator
4. Jarum penanam
5. Rak tabung
6. DII

b. Bahan

1. TSB/pepton
2. SIM

III. Prosedur Kerja

1. Inokulasi pada media cair (TSB/pepton).
 - a. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan untuk melakukan praktik.
 - b. Tanam/inokulasi sampel yang tersedia pada media TSB/pepton dengan cara terlebih dahulu ose dipanaskan lalu diambil satu koloni sampel bakteri dan dimasukkan ke dalam media cair.
 - c. Selanjutnya media tersebut diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dan setelah 24 jam yang diamati hasilnya sbb:
 - Bila media keruh berarti ada pertumbuhan
 - Bila media tetap bening berarti tidak ada pertumbuhan
 Atau dapat melihat Gambar 2 untuk mengidentifikasi pertumbuhan kultur bakteri yang diinokulasi.
2. Inokulasi pada semi solid (*Sulfit Indol Moltility* (SIM))
 - a. Siapkan alat dan media yang dibutuhkan untuk melakukan praktik.
 - b. Setelah itu, tanam/inokulasi sampel yang tersedia pada media SIM dengan ditusuk tetapi tidak sampai dasar dengan menggunakan jarum penanam.
 - c. Inkubasi media tersebut dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri pada media kaldu (cair). Sumber: Sunatmo 2009

Keterangan:

- *uniform fine turbidity* : terdispersi secara halus
- *flocculent* : berjonjot atau bentuk agregat
- *pellicle* : tebal, seperti jalan setapak pada permukaan agar
- *sediment* : terakumulasi di bagian bawah berupa granular, berjonjot

B. TEKNIK DASAR INOKULASI PADA MEDIA PADAT

I. Tujuan

a. Tujuan Umum

Peserta didik diharapkan mampu memahami dan memiliki keterampilan melakukan isolasi dan inokulasi pada media padat.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep isolasi dan inokulasi.
2. Menjelaskan prinsip dan tujuan teknik isolasi dan inokulasi.
3. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
4. Melakukan isolasi dan inokulasi.
5. Membaca hasil inokulasi.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|--------------|------------------|
| A. Ose | D. Jarum pemanas |
| B. Bunsen | E. Rak tabung |
| C. Inkubator | F. DII |

b. Bahan

- a. *Mac Conkay Agar* (MCA)
- b. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
- c. *Natrium Agar* (NA)

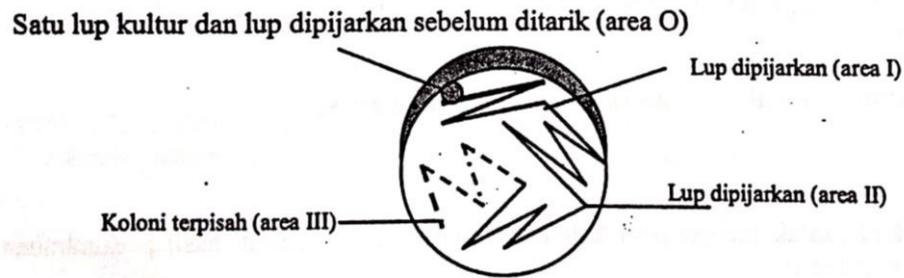
III. Prosedur Kerja

1. Inokulasi pada Media MCA atau NA

- a. Siapkan alat dan media yang dibutuhkan untuk melakukan praktikum.
- b. Setelah itu, tanam/inokulasikan sampel yang tersedia pada media MCA dengan metode cawan gores. Selanjutnya kedua media tersebut diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam – 48 jam. Teknik cawan gores adalah menyebarkan 1 lup kultur pada permukaan media cawan dengan 4 cara atau kuadran (sektor).

Langkah-langkahnya sebagai berikut (Gambar 3):

- Bukalah tutup cawan tidak terlalu lebar dengan tutup cawan tetap berada di atas cawan.
- Letakkan satu lup penuh kultur di atas permukaan agar pada area O.
- Pijarkan lup, dinginkan dan tarik lup lurus kurang lebih sejajar.
- Pijarkan lagi lup dan putar cawan 90°, lalu tariklah garis lurus kembali setelah menyentuh ujung area I memenuhi area II.
- Pijarkan lagi lup, lalu putar cawan 90° masuk ke area III setelah menyentuh area II dengan membuat garis yang lebih lebar. Dengan memijarkan lup, Anda telah mengurangi jumlah inokulum sehingga pada area III dapat diperoleh koloni yang terpisah.

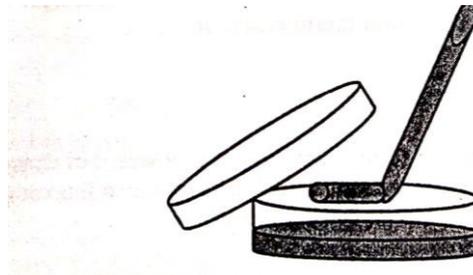


Gambar 3. Metode cawan gores (kuadran) untuk membuat isolat bakteri yang terpisah. Sumber: Sunatmo 2009

c. Inokulasi dengan metode cawan sebar

Untuk teknik ini dibutuhkan suspensi bakteri yang tidak pekat. Sel disebar pada permukaan media agar dengan bantuan kaca bentuk L dengan prosedur sebagai berikut (Gambar 4):

- Dengan bantuan lup inokulasi steril, letakkan sedikit suspensi di tengah permukaan media agar.
- Celupkan bagian pendek dari batang kaca penyebar ke dalam *beaker glass* yang berisi alkohol 95% kemudian lakukan di atas api Bunsen dengan bagian pendek pada posisi tegak, setelah nyalanya habis lalu dinginkan 10-15 detik.
- Ratakan suspensi dengan batang kaca bagian pendek pada permukaan agar.



Gambar 4. Metode cawan sebar. Sumber: Sunatmo 2009

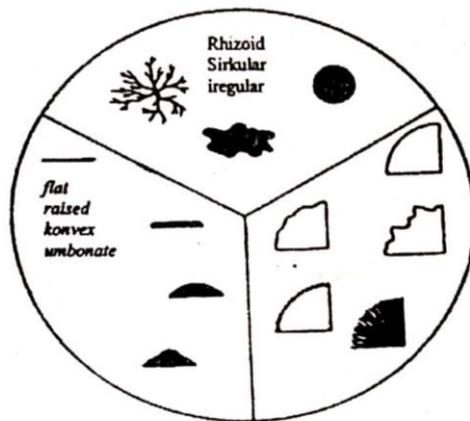
2. Inokulasi pada Media TSIA (agar miring)

- a. Siapkan alat dan media yang dibutuhkan untuk melakukan praktikum.
- b. Setelah itu, tanam/inokulasikan sampel yang tersedia pada media TSIA dengan cara menggoresnya terlebih dahulu (zigzag) lalu ditusuk tetapi sampai dasar dengan menggunakan jarum penanam (ose).
- c. Selanjutnya inkubasikan media tersebut di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24-48 jam, lalu amati pertumbuhannya.

IV. Hasil

Untuk mengamati hasil pertumbuhan bakteri, dapat membuat tabel seperti ini dan mengisinya, sesuai dengan panduan pada Gambar 5 untuk media cawan dan Gambar 6 untuk media agar miring.

No	Hasil Yang Diamati	Keterangan
1.	MCA	Bentuk : Ukuran : Warna : Elevasi : Tepi : Konsistensi :
2.	NA miring	
3.	SIM	
4.	TSIA	



Bentuk koloni:

- *rhizoid* : menyebar
- *sirkular* : bulat
- *iregular* : tidak beraturan

Elevasi:

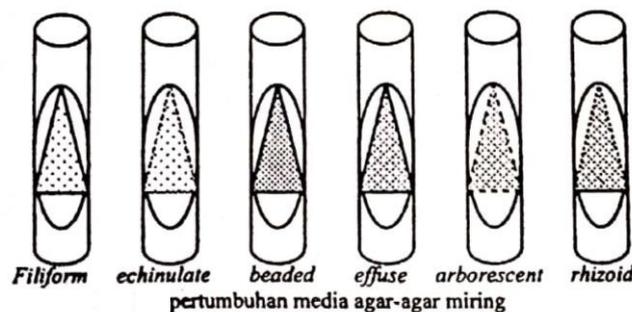
- *flat* : rata
- *raised* : agak tinggi
- *konvex* : cembung
- *umbonate* : agak tinggi, puncak cembung

Tepian:

- *entire* : tegas, rata
- *undulate* : bergelombang
- *lobate* : berlekuk
- *serrate* : bentuk geligi
- *filamentous* : seperti benang, tepi tidak rata

Gambar 5. Pertumbuhan bakteri pada media padat (cawan Petri).

Sumber: Sunatmo 2009



Gambar 6. Pertumbuhan bakteri pada media agar miring. Sumber: Sunatmo 2009

Keterangan:

- *filiform* : sinambung seperti benang dengan tepi licin
- *echinulate* : sinambung, seperti benang dengan tepi tidak beraturan
- *beaded* : koloni *nonconfluent* hingga *semi-confluent*
- *effuse* : tipis dan melebar
- *arborescent* : bentuk pohon dengan percabangan
- *rhizoid* : bentuk akar

PEWARNAAN BAKTERI

Penampakan mikroorganisme dalam keadaan hidup sulit diperoleh karena tidak hanya berukuran kecil, mikroorganisme juga transparan dan tak berwarna bila disuspensikan dalam media cair. Pewarnaan biologis lalu menjadi sangat penting terutama untuk tujuan diagnostik. Penggunaan mikroskop cahaya merupakan alat bantu yang sangat penting dalam pengamatan bakteri.

Substansi pewarna merupakan senyawa organik yang dapat mengikat komponen makroselular pada sel bakteri, seperti protein atau asam nukleat. Teknik pewarnaan bakteri yang umum dilakukan terbagi atas **pewarnaan sederhana** (satu macam pewarna) dan **pewarnaan diferensial** (dua macam pewarna).

Seperti kita ketahui bahwa bakteri memiliki ukuran yang sangat kecil dan tidak berwarna, hal ini membuat kita sukar mengamatinya tanpa diwarnai terlebih dahulu. Dengan demikian maka fungsi dari pewarnaan adalah:

- a. Mengamati dengan lebih baik morfologi bakteri secara kasar
Maksudnya adalah Anda dapat melihat bentuk bakteri lebih jelas bila terlebih dahulu diwarnai.
- b. Mengidentifikasi bagian-bagian struktural sel bakteri, seperti spora dan kapsul.
- c. Membantu mengidentifikasi dan atau membedakan bakteri yang serupa
Bila kita ingin melakukan identifikasi bakteri maka terlebih dahulu melakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui sifat bakteri dan mempermudah menentukan media yang akan digunakan.

I. Jenis-jenis Pewarnaan

Pewarnaan bakteri dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu:

a. Pewarnaan Sederhana (*simple staining*)

Tujuan pewarnaan sederhana adalah untuk melihat penampakan bentuk morfologi dan penataan sel bakteri. Pada pewarnaan ini, maka olesan bakteri hanya diwarnai dengan satu macam pewarna. Pewarna basa (*basic stains*) dengan kromogen (zat induk pada zat celup atau senyawa yang menghasilkan zat berwarna) bermuatan positif dapat digunakan karena asam nukleat dan beberapa komponen dinding sel bakteri yang bermuatan negatif dapat terikat kuat dengan kromogen kationik yang positif. Pewarna basa yang sering digunakan adalah biru metilena, ungu Kristal, dan karbol fuksin.

b. Pewarnaan Diferensial

Pewarnaan yang menggunakan lebih dari satu macam zat warna pewarnaan ini berfungsi untuk membedakan antara bakteri.

Contoh: pewarnaan Gram menggunakan gentinal violet, lugol dan fuchsin.

Pewarnaan BTA menggunakan karbol fuchsin dan biru dan metilen.

c. Pewarnaan Khusus

Pewarnaan yang dilakukan menggunakan satu campuran zat warna yang terdiri 2 atau 3 jenis zat warna tertentu. Pada pewarnaan ini bermacam-macam zat warna bekerja bersamaan terhadap sampel yang digunakan sesuai afinitas masing-masing sehingga diperoleh hasil yang berbeda-beda.

Fungsi pewarnaan ini mewarnai struktur khusus tertentu dari bakteri.

Contoh: giemsa

d. Pewarnaan Negatif

Suatu metode pewarnaan yang hanya mewarnai latar belakang sedangkan bakteri tidak diwarnai. Tentunya kita memilih jenis pewarnaan sesuai dengan kebutuhan sebagai contoh bila anda ingin melihat bentuk dan susunan bakteri maka anda dapat menggunakan pewarnaan spora.

II. Langkah Utama Pembuatan Pewarnaan

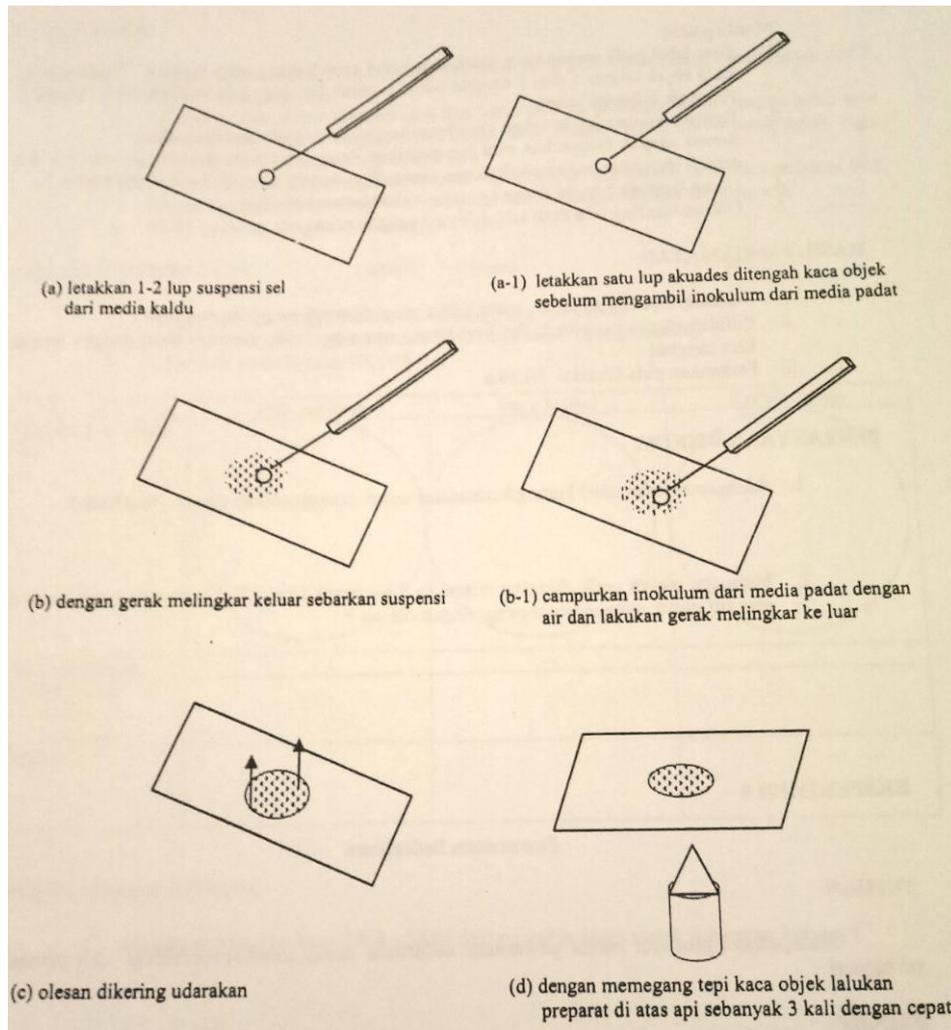
Walaupun pewarnaan terdiri dari beberapa jenis, namun ada langkah kerja yang utama dan pasti dilakukan pada saat kita membuat pewarnaan, yaitu menyiapkan olesan bakteri. Persiapan yang dilakukan untuk membuat olesan adalah (Gambar 7):

- a. Kaca objek, yang harus bebas dari debu dan minyak atau lemak yang diawali dengan pencucian dengan sabun, diikuti dengan pembilasan dengan air dan alkohol 95%, lalu dikeringkan. Peganglah selalu kaca objek pada bagian tepinya.
- b. Pemberian label dengan spidol biru perlu dijaga agar tidak kontak dengan pewarna.
- c. Pembuatan olesan yang sangat tipis sangat diperlukan, karena olesan yang tebal akan mengurangi cahaya yang menembus olesan, sehingga visualisasi yang baik sulit diperoleh. Olesan yang baik dapat terlihat apabila saat kering memperlihatkan lapisan tipis berwarna putih.
- d. Pembuatan olesan juga tergantung pada sumber inokulum yang dipakai, yaitu:
 - 1) Media kaldu. Ketuk bagian bawah tabung dengan jari agar diperoleh suspensi yang homogen. Tergantung pada diameter lup, maka ambillah 1-2 lup suspensi secara aseptis dan sebarkan dengan membuat gerak melingkar ke arah luar berdiameter 1 cm di atas kaca objek dan kering udarakan.
 - 2) Media padat. Organisme biasanya tumbuh rapat pada permukaan agar-agar, karena itu letakkan terlebih dahulu 1-2 lup akuades di tengah kaca objek. Kemudian dengan teknik aseptis, ambil seujung lup inokulum bakteri dan campurkan dengan akuades juga dengan gerakan melingkar ke arah luar berdiameter 1 cm. Olesan dikering udarakan tanpa ditiup atau digerakkan.
- e. Fiksasi panas, diperlukan agar olesan tidak mudah tercuci oleh pembilasan dengan melakukan preparat olesan kering udara dengan cepat di atas api. Hal ini dilakukan agar protein sel yang terkoagulasi melekat pada kaca objek.

Fungsi fiksasi dalam proses pewarnaan:

- a) Melakukan sampel (bakteri atau sel) pada kaca objek dalam bentuk yang tepat (sama dengan aslinya).
- b) Mengawetkan sediaan.
- c) Dengan dipanaskan maka diharapkan dapat mematikan bakteri.
- d) Bila dipanaskan maka pori-pori dinding sel akan terbuka sehingga zat warna mudah masuk dan terserap sempurna.

Prosedur atau tahapan fiksasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Prosedur fiksasi sebelum melakukan pewarnaan bakteri.

Sumber: Sunatmo 2009

III. Faktor yang mempengaruhi pewarnaan

a. Umur biakan

Umur biakan dapat mempengaruhi pewarnaan. Contohnya bila Anda akan melakukan pewarnaan spora maka umur biakan yang baik adalah 2 x 24 jam, karena pada umur itu biakan sudah membentuk spora dengan baik.

b. Kualitas zat warna reagen yang digunakan

Bila zat warna yang digunakan kualitasnya tidak baik, maka warna yang tampakpun kurang jelas atau bahkan bila zat warna yang digunakan adalah zat warna yang dibuat sendiri yang penyaringannya kurang sempurna maka pewarnaannya akan kotor seperti ada becak-becak zat warna, dsb.

c. Fiksasi

Fiksasi yang tidak sempurna dapat menyebabkan kurang rekatnya bakteri pada kaca objek sehingga pada pencucian akan lepas dan ikut tercuci dan pada saat diamati tidak tampak hasil yang diinginkan.

d. Intensifikasi pewarnaan.

e. Penggunaan zat warna penutup.

f. Substrat

A. PEWARNAAN SEDERHANA

Perwarnaan sederhana pengerjaannya hanya membutuhkan satu tahap pewarnaan dan hanya menggunakan 1 macam zat warna saja. Pewarnaan yang paling umum digunakan ini hanya dapat digunakan untuk melihat morfologi dari sel bakteri, yaitu membedakan bentuk kokus, batang dan spiral beserta susunannya dengan mewarnai sel. Hal yang menjadi dasar dari metode ini adalah sebagian besar bakteri mudah bereaksi dengan pewarnaan sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofilik (suka akan basa) sedangkan zat warna yang digunakan umumnya bersifat alkalin (komponen kromoforiknya bermuatan positif).

Bila dibandingkan dengan metode pewarnaan lainnya, pewarnaan sederhana merupakan satu metode yang pengerjaannya cepat. Karena dalam satu menit kita sudah dapat mengamati hasilnya. Sebagai contoh: bila Anda ingin melihat morfologi dari *Escherichia coli*, anda dapat memilih 1 macam zat warna yang akan digunakan untuk membuat sediaan pewarnaan sederhana seperti: biru metilen atau karbol fukhsin. Setelah melalui prosedur pewarnaan sederhana, maka Anda akan dapat melihat morfologi bakteri tersebut dengan warna sesuai dengan warna zat yang kita gunakan. Bila anda menggunakan biru metilen, maka warna sel yang teramati bewarna biru atau bila menggunakan karbol fukhsin maka akan bewarna merah.

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Peserta didik diharapkan mampu memahami dan memiliki ketrampilan membuat pewarnaan sederhana.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep pewarnaan sederhana.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat pewarnaan sederhana.
4. Menginterpretasi/membaca hasil pewarnaan.

II. Alat dan bahan

a. Alat

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1. Bunsen/lampu spirtus | 6. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 7. Mikroskop |
| 3. Ose | 8. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 9. Tisu |
| 5. Pipet pastur | |

b. Bahan

1. Zat warna: gentian violet, karbol fukhsin, *methylen blue*
2. Minyak imersi
3. NaCl bila menggunakan biakan yang berasal dari media padat
4. Sampel: suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

III. Prosedur kerja

1. Siapkan olesan bakteri dan semua olesan harus sudah difiksasi dengan panas.
2. Letakkan kaca objek di atas bak pewarna dan teteskan atau genangi olesan dengan salah satu pewarna yang dipilih, selama 15-30 detik untuk karbol fuksin, 20-60 detik untuk ungu kristal, dan 1-2 menit untuk metilena biru.
3. Bilas secara hati-hati dengan akuades mengalir untuk membuang kelebihan pewarna, lalu dengan bantuan kertas serap tekan preparat untuk mengambil sisa air yang ada.
4. Amati preparat dengan mikroskop cahaya (perbesaran 100x), tambahkan minyak imersi.
5. Deskripsikan bagaimana bentuk dan susunan sel bakteri yang teramati di bawah mikroskop, cocokkan dengan literatur.

B. PEWARNAAN NEGATIF

Pewarnaan negatif memiliki prinsip yaitu mewarnai latar belakang sediaan bakteri menjadi gelap, sehingga sel-sel bakteri yang transparan dapat tampak jelas terlihat di bawah mikroskop. Jenis zat warna yang dibutuhkan dalam pewarnaan ini adalah pewarna asam seperti tinta Cina atau nigrosin. Pewarnaan asam dengan kromogen bermuatan negatif tidak dapat menembus sel bakteri, karena sel bakteri yang juga bermuatan negatif, tetapi bakteri yang tak diwarnai akan tampak jelas dengan latar belakang yang gelap.

Pada pewarnaan ini, fiksasi tidak diperlukan dan sel tidak terganggu akibat perlakuan panas atau kimiawi, sehingga bentuk dan ukuran sel secara alami dapat dilihat. Bakteri yang sulit diwarnai seperti spirillum dapat diamati melalui pewarnaan negatif.

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Peserta didik diharapkan mampu memahami dan memiliki ketrampilan membuat pewarnaan negatif.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep pewarnaan negatif.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat pewarnaan negatif.
4. Menginterpretasi/membaca hasil pewarnaan.

II. Alat dan bahan

a. Alat

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1. Bunsen/lampu spirtus | 6. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 7. Mikroskop |
| 3. Ose | 8. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 9. Tisu |
| 5. Pipet pastur | |

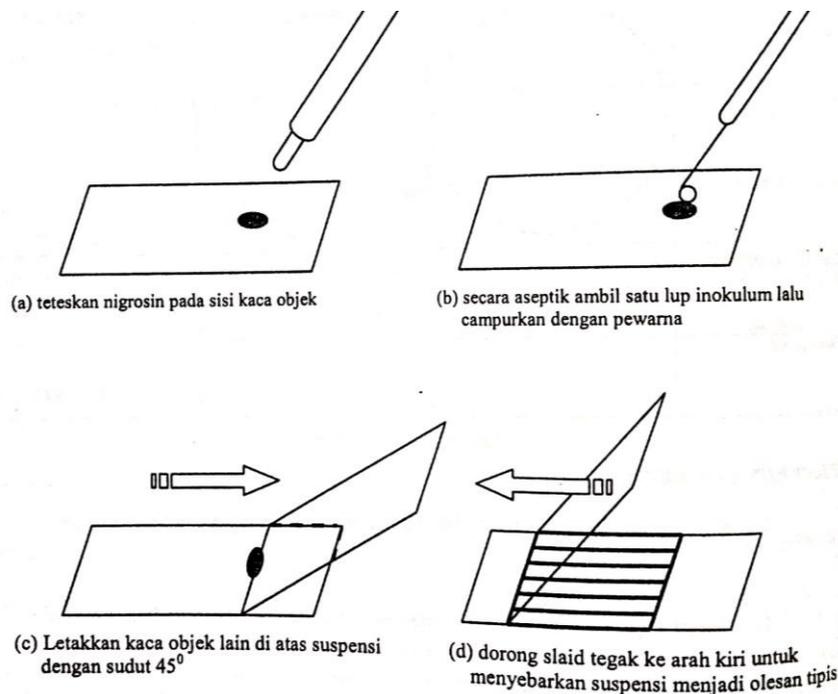
b. Bahan

1. Tinta Cina atau nigrosin

2. Minyak imersi
3. NaCl bila menggunakan biakan yang berasal dari media padat
4. Sampel: suspensi bakteri *Aquaspirillum itersonii*, *Micrococcus luteus*, dan *Bacillus cereus*

III. Prosedur kerja (Gambar 8)

1. Teteskan nigrosin pada satu sisi kaca objek yang bersih.
2. Secara aseptik, ambil satu lup suspensi bakteri dan campurkan dengan nigrosin.
3. Letakkan kaca objek kedua dengan sisi pendek di atas suspensi pada kaca objek yang pertama dengan sudut 45° , lalu doronglah ke arah kiri sehingga menghasilkan suatu olesan yang tipis.
4. Kering udarakan sediaan tanpa melakukan fiksasi panas.
5. Amati preparat Anda di bawah mikroskop, dengan perbesaran 100x, menggunakan minyak imersi.
6. Deskripsikan sel bakteri yang teramati, cocokkan dengan literatur.



Gambar 8. Prosedur pewarnaan negatif. Sumber: Sunatmo 2009

C. PEWARNAAN GRAM

Pewarnaan Gram adalah salah satu metode pewarnaan yang paling penting dan luas yang digunakan untuk mendeterminasi bakteri. Metode ini ditemukan pada tahun 1884 oleh ilmuwan dari Denmark yang bernama Hans Christian Gram (1853 – 1938). Cara yang dilakukannya adalah olesan bakteri yang sudah terfiksasi diberi zat pewarnaan kristal violet, larutan iodium, larutan alkohol (bahan pemucat), dan zat pewarnaan tandingannya berupa zat warna safranin atau air fuchsin. Hasil yang didapat dari penggunaan teknik tersebut adalah bakteri yang terwarnai dibagi

menjadi dua kelompok, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif akan mempertahankan zat warna kristal violet sehingga berwarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif akan kehilangan zat pewarnaan kristal violet setelah dicuci dengan alkohol dan pada saat diberi zat pewarna air fuchsin atau safranin akan berwarna merah.

Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan dalam struktur kimiawi dinding selnya yaitu kandungan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

- 1) Fase yang paling kritis adalah tahap dekolorisasi yang mengakibatkan CV-iodine lepas dari sel. Pemberian etanol jangan sampai berlebih yang akan menyebabkan *overdecolorization* sehingga sel Gram positif tambah seperti Gram negatif. Namun juga jangan sampai terlalu sedikit dalam penetasan etanol (*underdecolorization*) yang tidak akan melarutkan CV-iodine secara sempurna sehingga sel Gram negatif seperti Gram positif.
- 2) Preparasi pewarnaan Gram terbaik adalah menggunakan kultur muda yang tidak lebih lama dari 24 jam. Umur kultur akan berpengaruh pada kemampuan sel menyerap warna utama (CV), khususnya pada Gram positif.

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Peserta didik mampu memahami dan memiliki keterampilan membuat pewarnaan Gram.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan mengenai pewarnaan Gram.
2. Menjelaskan prinsip dan tujuan dari pewarnaan Gram.
3. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan untuk membuat pewarnaan Gram.
4. Membuat pewarnaan Gram.
5. Menginterpretasikan/baca hasil pewarnaan Gram.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 1. Bunsen/lampu spiritus | 6. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 7. Mikroskop |
| 3. Ose | 8. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 9. Tisu |
| 5. Pipet pasteur | 10. Bak warna |

b. Bahan

1. Cat Gram I (gentian violet)
2. Cat Gram II (lugol)
3. Cat Gram III (alkohol 96%)
4. Cat Gram IV (safranin)
5. Minyak imersi
6. NaCl untuk biakan padat

7. Koloni bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*

c. Prosedur Kerja

1. Siapkan olesan bakteri dan semua olesan harus sudah difiksasi dengan panas.
2. Letakkan kaca objek di atas bak pewarna dan teteskan atau genangi olesan dengan gentian violet di atas sediaan, diamkan selama 1 menit.
3. Cuci sediaan dengan air mengalir secara perlahan-lahan.
4. Teteskan lugol dan diamkan 1 menit.
5. Cuci kembali dengan air mengalir.
6. Teteskan alkohol 96% di atas sediaan sampai tidak ada zat warna ungu.
7. Cuci kembali dengan air mengalir.
8. Teteskan safranin dan diamkan 2 menit.
9. Cuci lagi dengan air mengalir dan keringkan dengan kertas tisu.
10. Amati dengan menggunakan mikroskop perbesaran lensa objek 100 kali dan memakai minyak imersi.
11. Deskripsikan bentuk dan warna sel bakteri yang teramati, cocokkan dengan literatur.

D. PEWARNAAN BTA

Tuberkulosis merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dengan jumlah penderita menempati urutan ketiga terbanyak di dunia. Tuberkulosis disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Pemeriksaan mikroskopis yang disarankan adalah pemeriksaan bakteri tahan asam (BTA) dengan pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen menggunakan sputum pasien yang diduga TB.

Pewarnaan ini ditunjukkan terhadap bakteri yang mengandung lemak dalam konsentrasi tinggi sehingga sukar menyerap zat warna, namun jika bakteri diberi zat warna khusus misalnya karbolfukhsin melalui proses pemanasan, maka akan menyerap zat warna dan akan tahan diikat tanpa mampu dilunturkan oleh peluntur yang kuat sekaligus seperti asam-alkohol. Karena itu bakteri ini disebut bakteri tahan asam (BTA). Pemeriksaan sputum dilakukan sebanyak 3 kali yaitu sewaktu, pagi dan sewaktu dalam jangka waktu 2 hari. Jadi pasien yang baru pertama kali datang ke laboratorium diberi tempat pengumpul dahak dan diminta untuk mengeluarkan sputum dan menampungnya di tempat sputum yang telah disediakan. Setelah itu, pada saat pasien akan pulang diberikan lagi 1 tempat penampung sputum untuk menampung sputum pagi sebelum makan. Sputum ini dibawa ke lab untuk diperiksa, setelah tiba di lab pasien kembali diminta menampung sputum kembali.

Langkah utama dalam pembuatan pewarnaan BTA adalah:

a. Membuat apusan dengan teknik *coiling*

Hal yang mesti diperhatikan pada saat membuat apusan adalah:

- 1) Jangan membuat spiral pada apusan yang kering.
- 2) Ose yang digunakan dicelupkan ke dalam desinfektan lalu dibakar sampai ose membara dan bila menggunakan lidi langsung dibuang ke dalam botol berisi desinfektan.

- 3) Pemanasan yang berlebih dapat merusak hasil.
 - 4) Menghindari panas matahari pada saat mengeringkan apusan. Untuk mengeringkan cukup diletakkan di rak pengering dan dibiarkan mengering sendiri tanpa dipanaskan atau dikeringkan dengan tisu.
- b. Membuat pewarnaan
- Hal-hal yang harus diperhatikan pada saat membuat pewarnaan BTA adalah:
- 1) Pada saat pemanasan jangan sampai mendidih.
 - 2) Pada saat mencuci usahakan agar jangan ada percikan ke sediaan lain.
 - 3) Jangan mengeringkan dengan kertas tisu.

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Peserta didik mampu memahami dan memiliki keterampilan membuat pewarnaan BTA.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep pewarnaan BTA.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat pewarnaan BTA.
4. Menginterpretasikan/baca hasil pewarnaan BTA.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1. Bunsen/lampu spritus | 1. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 2. Mikroskop |
| 3. Ose | 3. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 4. Tisu |
| 5. Pipet pastur | |

b. Bahan

1. Karbol fuchsin 0,3
2. Asam alkohol (3% HCL dalam etanol)
3. *Methylen blue* 0,3%
4. Minyak imersi
5. Sampel

III. Prosedur Kerja

Membuat apusan sediaan sebelum membuat pewarnaan terlebih dahulu membuat apusan. Apusan tidak boleh terlalu tipis dan harus rata.

1. Cara membuat apusan yang baik adalah:
 - a. Siapkan kaca objek dan letakkan bagian bawahnya pada pola ukuran 2x3.
 - b. Ambil sputum yang purulen dengan menggunakan aplikator dan letakkan di atas kaca objek.
 - c. Spiral-spiral kecil dibuat sewaktu apusan setengah kering dengan menggunakan aplikator mengikuti bentuk dan ukuran pola.
 - d. Keringkan apusan dengan diangin-diangin di atas rak sediaan.
 - e. Setelah kering, fiksasi apusan tersebut, lalu warnai.

2. Cara pembuatan pewarna BTA
 - a. Letakkan apusan dengan bagian apusan menghadap ke atas pada rak yang ditempatkan di atas bak cuci atau waskom.
 - b. Kemudian genangi seluruh permukaan sediaan dengan karbol fuchsin.
 - c. Panaskan bagian bawah apusan dengan menggunakan bunsen sampai keluar uap, diamkan selama 5 menit.
 - d. Bilas sediaan dengan hati-hati menggunakan air mengalir.
 - e. Miringkan sediaan dengan menggunakan pinset untuk membuang air.
 - f. Selanjutnya, genangi sediaan dengan asam alkohol sampai tidak tampak warna merah carbol fuchsin, lalu cuci dengan air mengalir.
 - g. Genangi permukaan sediaan dengan *methylene blue* selama 10-20 detik, lalu bilas dengan air mengalir dan keringkan sediaan pada rak pengering.

E. PEWARNAAN KAPSUL

Kapsul atau simpai adalah sekresi gelatin dari bakteri yang tersusun sebagai selubung tebal di sekeliling dinding sel. Kapsul tidaklah esensial bagi kehidupan sel, tapi dapat berfungsi sebagai makanan cadangan, perlindungan terhadap fagositosis (baik dalam tubuh inang maupun di alam bebas) atau perlindungan terhadap dehidrasi atau kekeringan dan meningkatkan virulensi bakteri. Kemampuan menghasilkan kapsul merupakan sifat genetik, tetapi produksinya sangat dipengaruhi oleh komposisi medium tempat ditumbuhkannya sel-sel yang bersangkutan. Komposisi medium juga dapat mempengaruhi ukuran kapsul.

Ukuran kapsul berbeda-beda menurut jenis bakterinya dan juga dapat berbeda diantaranya jalur-jalur yang berlainan dalam satu spesies. Kapsul mengandung polisakarida, polipeptida atau asam hialuronat. Tidak semua bakteri memiliki kapsul, contoh bakteri yang memiliki kapsul adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp., dsb. Kapsul pada bakteri berbentuk seperti lendir dan mempunyai sifat tidak dapat diwarnai. Bila ditambahkan zat warna, kapsul tidak mempunyai afinitas terhadap zat warna sehingga tidak terlihat pada sediaan yang telah diwarnai, oleh sebab itu dibutuhkan suatu metode pewarnaan agar dapat melihat struktur dari kapsul. Ada beberapa macam metode pewarnaan untuk melihat adanya kapsul yaitu metode Hiss, Burry Gins. Salah satu teknik yang paling sering digunakan adalah pewarnaan kapsul metode Burry Gins.

I. Tujuan

a. Tujuan Umum

Peserta didik mampu memahami dan memiliki keterampilan membuat pewarnaan kapsul.

b. Tujuan Khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep pewarnaan kapsul.
2. Menjelaskan prinsip dan tujuan pewarnaan kapsul.
3. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
4. Membuat pewarnaan kapsul.

5. Menginterpretasikan/ baca hasil pewarnaan kapsul.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|------------------|------------------|
| 1. Bunsen | 1. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 2. Mikroskop |
| 3. Ose | 3. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 4. Tisu |
| 5. Pipet pasteur | |

b. Bahan

1. *Salutio fuchsin*
2. Tinta cina
3. Minyak imersi
4. Sampel: koloni *Bacillus* sp.

III. Prosedur Kerja

1. Membuat apusan

- a. Bersihkan kaca objek dengan kapas alkohol.
- b. Ambil ose dan bakar ujungnya hingga berwarna merah.
- c. Ambil suspensi bakteri dan letakkan di atas kaca objek.
- d. Teteskan tinta cina di sisi suspensi bakteri.
- e. Campur kedua tetes tadi, kemudian dengan kaca objek yang lain hapuskan sepanjang permukaannya seperti membuat sediaan apusan darah tepi.

2. Pewarnaan Apusan

- a. Keringkan sediaan lalu rekatkan dengan melayangkan di atas nyala api, dua sampai tiga kali.
- b. Teteskan karbol fuchsin di atas hapusan, diamkan selama 2 menit.
- c. Cuci dengan air mengalir dan keringkan dengan kertas tisu.

3. Pengamatan hasil pewarnaan

- a. Letakkan sediaan/preparat pada meja benda mikroskop.
- b. Cari bayangan objek/latar belakang pada pembesaran lensa objektif 10 kali.
- c. Setelah menemukan bayangan/latar belakang sediaan, amati dengan menggunakan mikroskop perbesaran lensa objektif 100 kali dan memakai minyak emersi.

F. PEWARNAAN SPORA

Spora pada bakteri berfungsi sebagai pelindung dari kondisi yang secara kimiawi kurang menguntungkan, seperti nutrisi, sinar matahari, panas dan suasana kering. Spora dibentuk oleh jenis bakteri tertentu terutama genus *Bacillus* dan *Clostridium*. Pada umumnya, spora terdapat di dalam spora (endospora) dengan letak dan ukuran yang berbeda.

Pewarnaan spora dapat digunakan untuk membantu mengetahui identitas bakteri. Macam metode pewarnaan yang digunakan untuk melihat spora yaitu *Schaeffer-fulton*, *Bartolomew-mittwer*, *Klein* dan *Donner*. Namun yang paling sering digunakan adalah pewarnaan Klein.

Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat pewarna pada umumnya, tetapi sekali diwarnai, zat warna tersebut akan sulit hilang. Hal inilah yang menjadi dasar dari metode pengecatan spora secara umum. Pada metode Klein, endospora

diwarnai pertama dengan larutan fuchsin, biakan sel dicuci dengan air lalu ditutup dengan cat biru metilen. Pada penambahan biru metilen, sel spora tidak dapat menerimanya karena sudah terikat dengan cat pewarna. Akibatnya warna bakteri spora adalah merah. Teknik ini akan menghasilkan warna merah pada endospora dan warna biru pada sel vegetatifnya.

Letak spora pada bakteri ada beberapa yaitu:

- a. Sentral adalah spora terletak di bagian tengah sel bakteri.
- b. Terminal adalah spora terletak di bagian ujung sel bakteri.
- c. Sub tema adalah spora terletak di antara tengah dan ujung sel bakteri.

Agar pewarnaan yang Anda buat mendapatkan hasil yang memuaskan dan spora dapat terlihat jelas maka Anda harus memperhatikan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pewarnaan spora yaitu:

- a. Fiksasi
- b. *Smear* atau terlalu tebal
- c. Waktu pengecatan tidak tepat
- d. Konsentrasi reagen
- e. Umur bakteri
- f. Nutrisi

Prinsip Pewarnaan Spora

Pemanasan akan mengembangkan lapisan luar spora sehingga zat warna utama dapat masuk ke dalam spora sehingga berwarna merah. Melalui pendinginan, warna utama akan terperangkap di dalam spora, dengan pencucian zat warna utama yang ada pada sel vegetatif akan terlepas sehingga pada saat pewarnaan kedua (biru metilen), sel vegetatif akan berwarna biru.

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Peserta didik mampu memahami dan memiliki ketrampilan membuat pewarnaan spora.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

- a. Menjelaskan konsep pewarnaan spora.
- b. Menjelaskan prinsip dan tujuan pewarnaan spora.
- c. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- d. Membuat pewarnaan sederhana.
- e. Menginterpretasikan/baca hasil pewarnaan.

II. Alat dan bahan

a. Alat

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 1. Bunsen/lampu spiritus | 6. Penjepit kayu |
| 2. Kaca objek | 7. Mikroskop |
| 3. Ose | 8. Kapas alkohol |
| 4. Rak tabung | 9. Tisu |
| 5. Pipet pastur | |

b. Bahan

- a. larutan Fuchsin
- b. *Methylene blue*

- c. *Malachite green* 5%
- d. Minyak imersi
- e. Sampel

III. Prosedur kerja

1. Pewarnaan spora metode KLEIN

- a. Campur suspensi bakteri dengan karbol fuchsin dengan perbandingan 1 : 1.
- b. Panaskan di atas api kecil selama 5 menit atau dengan penangas air suhu 80 °C selama 10 menit.
- c. Bersihkan kaca objek dengan kapas alkohol.
- d. Ambil ose dan panaskan ujungnya hingga berwarna merah.
- e. Ambil suspensi bakteri yang telah dipanaskan dengan menggunakan ose.
- f. Letakkan suspensi bakteri di atas kaca objek.
- g. Sebarkan suspensi tersebut dengan gerakan berputar dari tengah melebar keluar.
- h. Keringkan sediaan lalu rekatkan dengan melayangkan di atas nyala api 2 – 3 kali.
- i. Cucikan dengan larutan asam alkohol.
- j. Bilas dengan air lalu teteskan *methylene blue* di atas sediaan.
- k. Diamkan selama 2 menit.
- l. Cuci dengan air mengalir secara perlahan – lahan lalu keringkan.
- m. Amati dengan menggunakan mikroskop perbesaran lensa objektif 100 kali dan memakai minyak imersi.

2. Pewarnaan spora metode SCHAEFFER FULTON

- a. Bersihkan kaca objek dengan kapas alkohol.
- b. Ambil ose dan panaskan ujungnya hingga berwarna merah.
- c. Ambil suspensi bakteri yang telah dipanaskan dengan menggunakan ose.
- d. Letakkan suspensi bakteri di atas kaca objek.
- e. Sebarkan suspensi tersebut dengan gerakan berputar dari tengah melebar keluar.
- f. Keringkan sediaan lalu rekatkan dengan melayangkan di atas nyala api 2 – 3 kali.
- g. Letakkan preparat *smear* pada rak pengecatan lalu tetesi 2-3 tetes *malachite green* 5% dan biarkan selama 1 menit, lalu panaskan di atas nyala lampu spiritus selama setengah menit atau kira-kira sampai timbul uap, jangan sampai mendidih lalu dinginkan.
- h. Cuci dengan air mengalir lalu tiriskan.
- i. Tetesi dengan cat safranin selama 1 menit.
- j. Cuci dengan air mengalir.
- k. Keringkan preparat di udara, dapat menggunakan kertas serap untuk menyerap air pada permukaan.

3. Pengamatan hasil pewarnaan

- a. Letakkan sediaan/preparat pada meja benda mikroskop.
- b. Cari bayangan objek/latar belakang pada pembesaran lensa objektif 10 kali.
- c. Setelah menemukan bayangan objek/latar belakang sediaan, amati dengan menggunakan mikroskop pembesaran lensa objektif 100 kali dan memakai minyak imersi.
 - Untuk **Metode Klein** akan tampak spora berwarna merah dan badan bakteri berwarna biru.

- Untuk **Metode Schaeffer Fulton** akan tampak spora berwarna hijau dan badan bakteri berwarna merah.

PENGAMATAN GERAK BAKTERI

A. TEKNIK LAKAPAN BASAH

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan mampu memahami mengenai gerak bakteri.

b. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep gerak bakteri.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat sediaan gerak bakteri teknik lekapan basah.
4. Mengamati gerak bakteri.

II. Alat dan Bahan

a. Alat

1. Kaca objek
2. Kaca penutup
3. Bunsen
4. Ose
5. Kapas alkohol
6. Mikroskop

b. Bahan

1. NaCl bila menggunakan biakan yang berasal dari media padat.
2. Sampel: suspensi bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*.

III. Prosedur Kerja

1. Bersihkan kaca objek dengan kapas alkohol terlebih dahulu sebelum digunakan.
2. Setelah itu, ambil ose dan bakar ujungnya hingga berwarna merah.
3. Lalu, ambil suspensi bakteri dengan menggunakan ose tersebut.
4. Selanjutnya, letakkan suspensi bakteri di atas kaca objek lalu tutup dengan kaca penutup.
5. Amati dengan objek pembesaran 10 dan 40x.

IV. Hasil

Deskripsikan hasil pengamatan seperti membuat tabel berikut dan buatlah pembahasan dengan menggunakan literatur.

Gambar	Keterangan

B. TEKNIK TETES GANTUNG

I. Tujuan

a. Tujuan umum

Setelah mempelajari materi ini anda diharapkan mampu memahami mengenai gerak bakteri.

b. Tujuan Khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

1. Menjelaskan konsep gerak bakteri.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Membuat sediaan gerak bakteri teknis tetes gantung.
4. Mengamati gerak bakteri.

II. Alat dan bahan

a. Alat

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1. Objek glass | 4. Ose |
| 2. Kaca penutup | 5. Kapas alkohol |
| 3. Bunsen | 6. Mikroskop |

b. Bahan

1. NaCl bila menggunakan biakan yang berasal dari media padat
2. Sampel: Suspensi bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*.

III. Prosedur Kerja

1. Sebelum digunakan, terlebih dahulu bersihkan kaca objek dengan kapas alkohol.
2. Setelah itu, ambil ose dan bakar ujungnya hingga berwarna merah.
3. Ambil suspensi dengan menggunakan ose tersebut.
4. Selanjutnya letakkan suspensi bakteri di atas kaca objek lalu tutup dengan kaca penutup.
5. Amati dengan objek pembesaran 10 dan 40x.

DAFTAR PUSTAKA

Sunatmo TI. 2009. Mikrobiologi Esensial. Penerbit Ardy Agency, Jakarta.

Sunatmo TI. 2009. Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium. Penerbit Ardy Agency, Jakarta.