

MODUL
PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI DASAR



TIM DOSEN:

RINDITA, M.Si.

NURUL AZMAH N., M.KES.

SEMESTER GENAP

TAHUN 2022/2023

PROGRAM STUDI D4 ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA

DAFTAR ISI

Pembuatan Laporan Praktikum	1
Pembuatan Media	5
Teknik Dasar Inokulasi Pada Media	10
Pewarnaan Bakteri	17
Praktikum Gerak Bakteri	23

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, lalu tuliskan 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 (mengggunakan 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. DII |
| 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 tertempel 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:

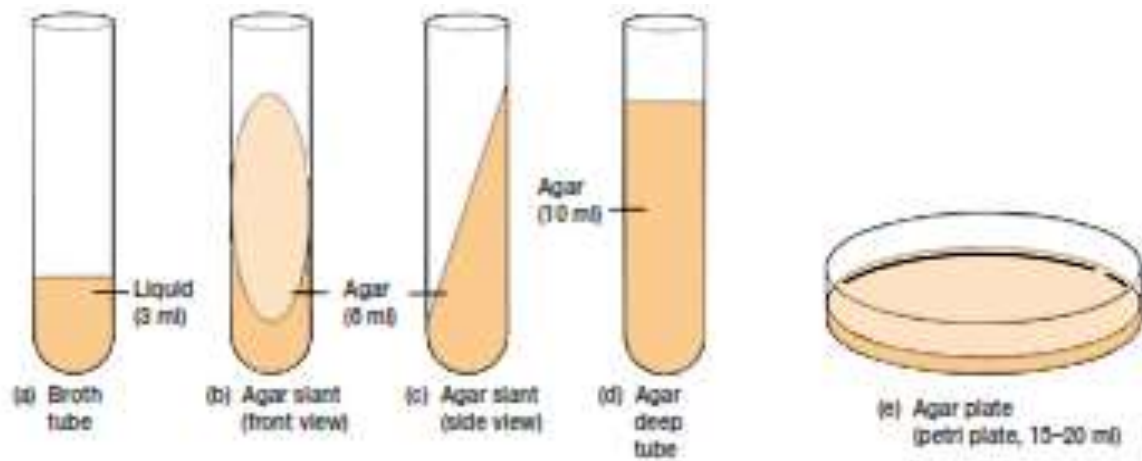
- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 1. Neraca | 7. Tabung reaksi |
| 2. Kertas timbang | 8. Tabung durham |
| 3. Spatel | 9. Cawan petri |
| 4. <i>Beaker glass</i> | 10. Kapas |
| 5. Tabung <i>Erlenmeyer</i> | 11. DII |
| 6. Gelas ukur | |

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 terempel 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.



Gambar 2. Bentuk media yang digunakan dalam kultur (a. Media cair, b. Media miring (diliat dari depan), c. Media miring (diliat dari samping), d. Media semisolid, e. media agar dalam cawan petri). Sumber: Harley-Prescott 2002

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 50⁰C 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

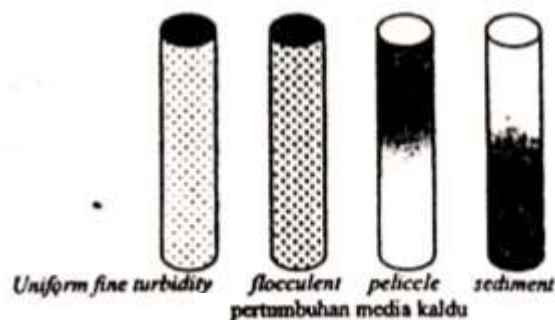
1. Ose
2. Bunsen
3. Inkubator
4. Jarum penanam
5. Rak tabung
6. DII

B. Bahan

1. TSB/pepton
2. SIM

III. Prosedur Kerja

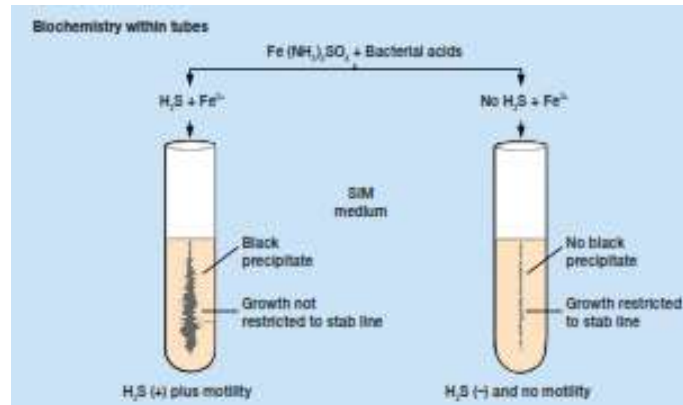
1. Inokulasi pada media cair (TSB/pepton).
 - a. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan untuk melakukan praktik.
 - b. Tanam/inokulasi sampel yang tersedia pada media TSB/pepton dengan cara terlebih dahulu ose dipanaskan lalu diambil satu koloni sampel bakteri dan dimasukkan ke dalam media cair.
 - c. 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 Movelity* (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 3. 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



Gambar 4. Pertumbuhan bakteri pada media semisolid (SIM). Sumber: Harley-Prescott 2002

Keterangan:

- H₂S (+) plus motility : Bekas tusukan pada medium berwarna hitam, dan atau medium berubah menjadi hitam
- H₂S (-) dan tidak ada motility : Medium tidak berwarna hitam, bekas tusukan tidak berwarna hitam, dan bekas tusukan tidak menyebar.

B. TEKNIK INOKULASI PADA MEDIA PADAT

I. Tujuan

1. Tujuan Umum

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

2. Tujuan khusus

Peserta didik diharapkan mampu:

- a. Menjelaskan konsep isolasi dan inokulasi.
- b. Menjelaskan prinsip dan tujuan teknik isolasi dan inokulasi.
- c. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- d. Melakukan isolasi dan inokulasi.
- e. Membaca hasil inokulasi.

II. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Ose
- b. Bunsen
- c. Inkubator
- d. Jarum pemanas
- e. Rak tabung
- f. DII

2. Bahan

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

III. Prosedur Kerja

1. Inokulasi pada Media MCA atau NA

A. Teknik inokulasi dengan metode gores

- 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.

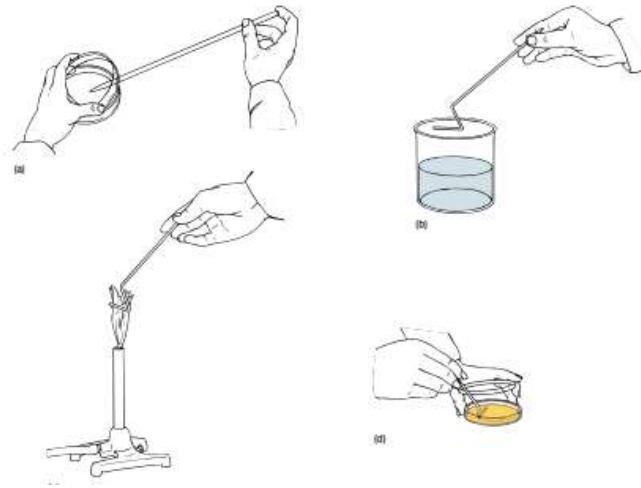


Gambar 5. Metode cawan gores (kuadran) untuk membuat isolat bakteri yang terpisah. Sumber: Sunatmo 2009

B. Teknik inokulasi dengan metode cawan sebar

Untuk teknik ini dibutuhkan suspensi bakteri yang tidak pekat. Sel disebarkan pada permukaan media agar dengan bantuan kaca bentuk L dengan prosedur sebagai berikut (Gambar 6):

- 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 lalukan 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.

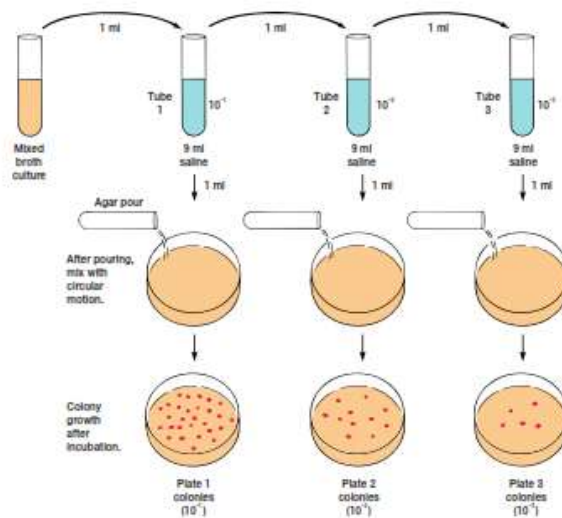


Gambar 6. Metode cawan sebar. Sumber: Harley-Prescott 2002

C. Teknik inokulasi dengan metode tuang

Metode ini biasa digunakan pada sampel dengan pengenceran, koloni yang dihasilkan pada sampel ini akan berpisah – pisah, semakin tinggi pengenceran sampel maka koloni yang diperoleh akan padat dan banyak, dan semakin rendah pengenceran sampel maka koloni yang diperoleh akan sedikit dan terpisah – pisah. Prosedur kerja sebagai berikut (Gambar 7):

- Metode ini dimulai dengan membuat pengenceran suspensi bakteri, pengenceran menggunakan NaCl steril
- Suspensi bakteri yang telah diencerkan kemudian dituang di cawan petri steril sebanyak 1 ml
- Kemudian media NA (suhu 50°C) dituang didalam cawan petri yang telah berisi suspensi bakteri, media dihomogenkan dengan menggoyangkan cawan petri membentuk angka 8.
- Setelah media padat, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 7. Metode tuang. Sumber: Harley-Prescott 2002

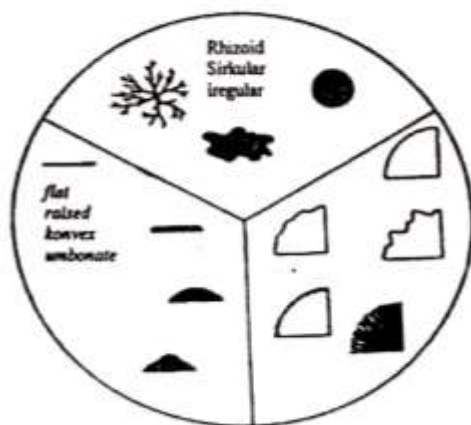
2. Inokulasi pada Media TSIA (agar miring)

- Siapkan alat dan media yang dibutuhkan untuk melakukan praktikum.
- 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).
- 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	



entire
undulate
lobate
serrate
filamentous

Bentuk koloni:

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

Elevasi:

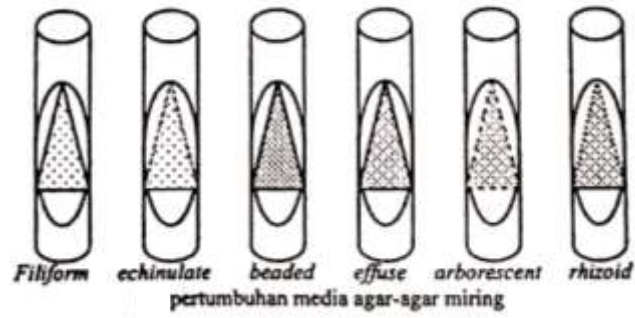
- *flat* : rata
- *raised* : agak tinggi
- *konvex* : cembung
- *umbonate* : agak tinggi, puncak cembung

Tepian:

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

Gambar 8. Pertumbuhan bakteri pada media padat (cawan Petri).

Sumber: Sunatmo 2009



Gambar 9. 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. (Gambar 10)

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. (Gambar 11)

Pewarnaan BTA menggunakan karbol fuchsin dan metilen biru. (Gambar 11)

c. Pewarnaan Khusus (Gambar 12)

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 (Gambar 13)

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

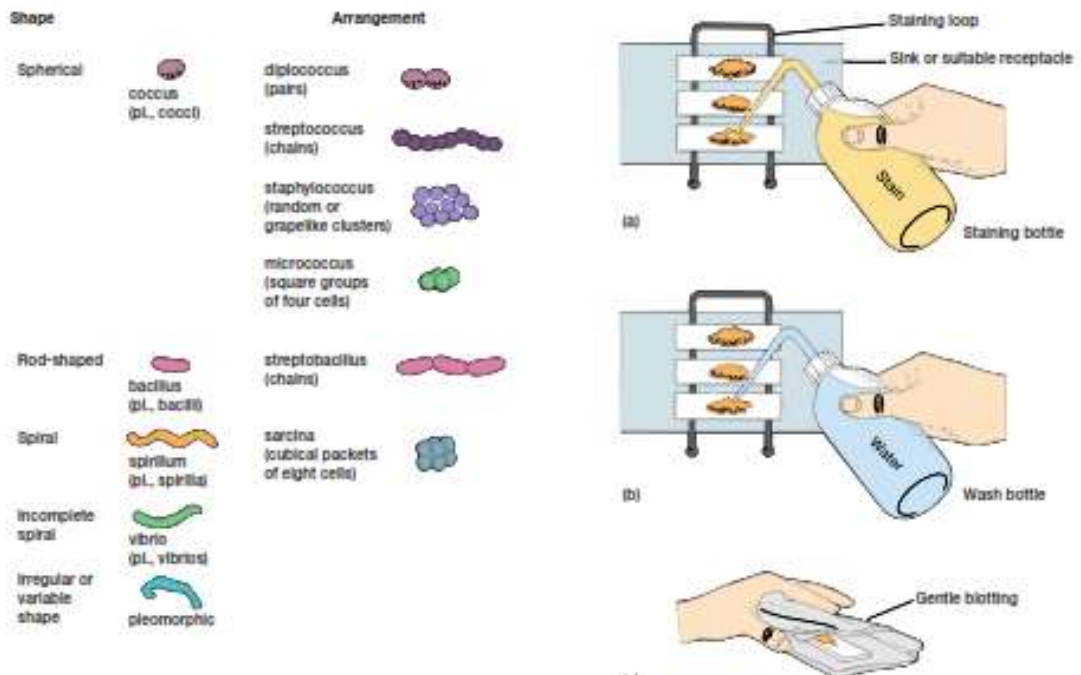
Walaupun pewarnaan terdiri dari beberapa jenis, namun ada langkah kerja yang utama dan pasti dilakukan pada saat kita membuat pewarnaan, yaitu menyiapkan olesan bakteri. Persiapan yang dilakukan untuk membuat olesan adalah (Gambar 14):

- 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.

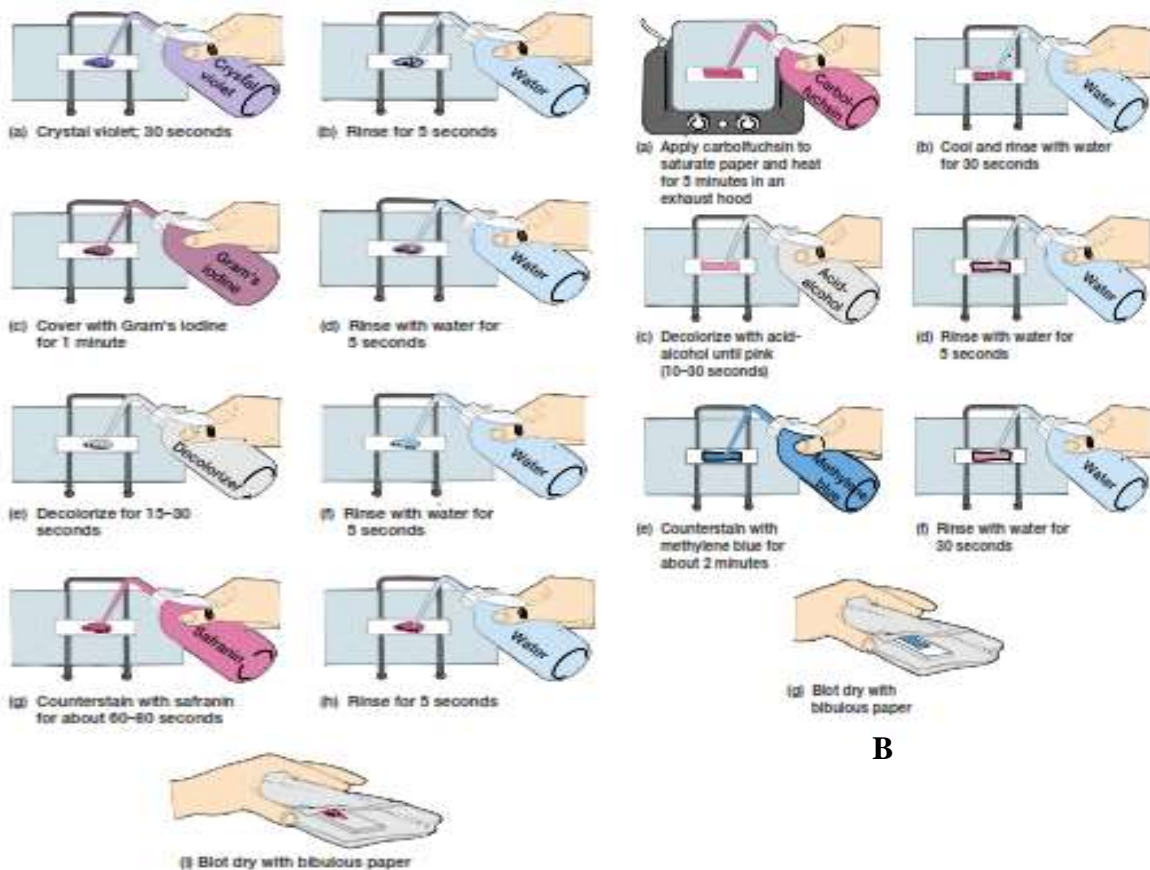
Fungsi fiksasi dalam proses pewarnaan:

- 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.

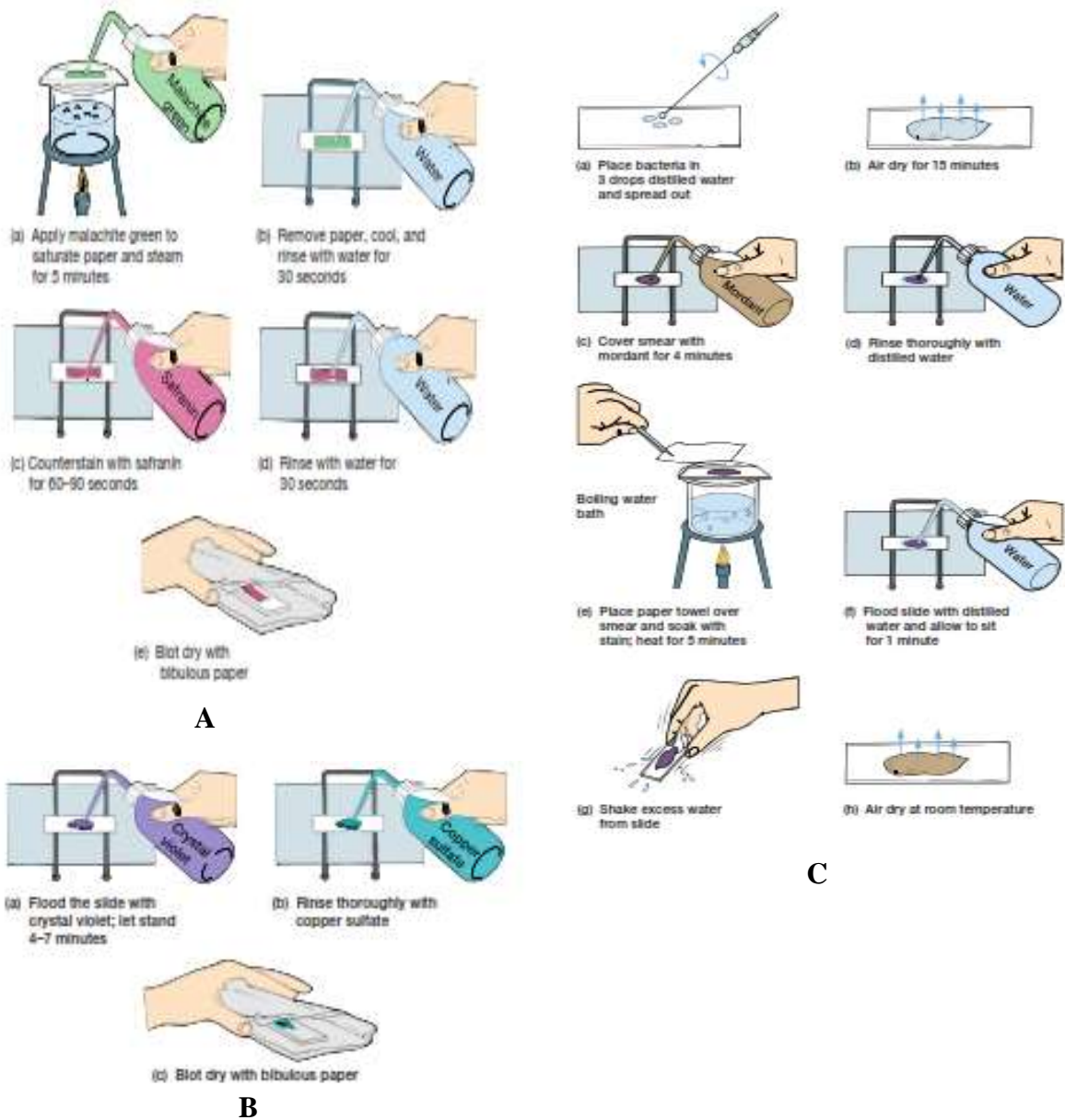
Prosedur atau tahapan fiksasi dapat dilihat pada Gambar 14.



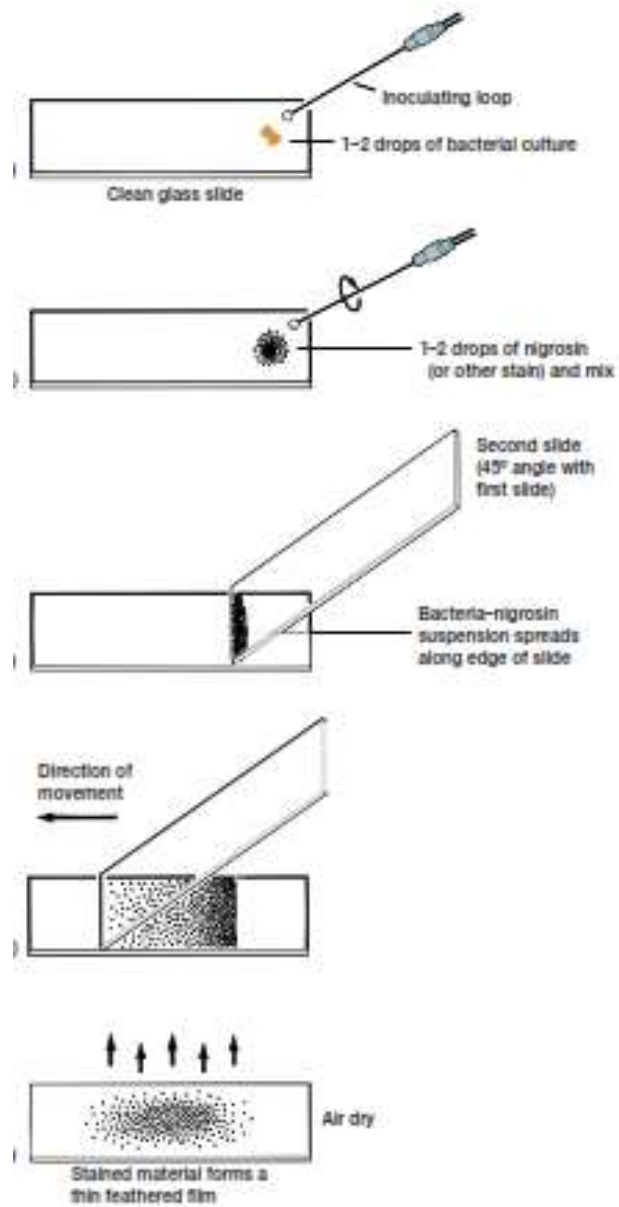
Gambar 10. Bentuk bakteri dan prosedur kerja pewarnaan sederhana.
Sumber: Harley-Prescott 2002



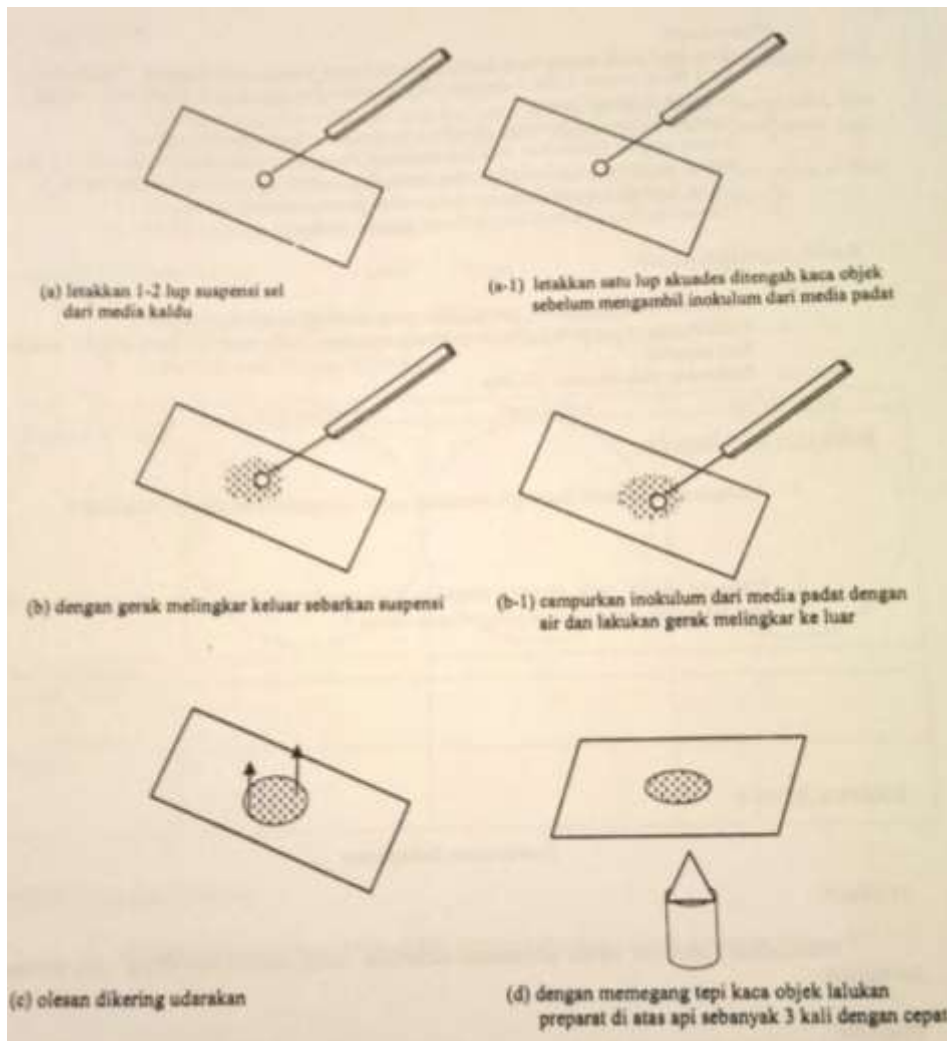
A
Gambar 11. Prosedur kerja pewarnaan A. Pewarnaan gram, B. Pewarnaan BTA. Sumber: Harley-Prescott 2002



Gambar 12. Prosedur kerja perwarnaan khusus A. Pewarnaan endospora, B. Pewarnaan Kapsul, C. Pewarnaan Flagel. Sumber: Harley-Prescott 2002



Gambar 13. Prosedur kerja pewarnaan negatif. Sumber: Harley-Prescott 2002



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

PRAKTIKUM XII

GERAK BAKTERI 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 pada kotak berikut ini.

Gambar	Keterangan

V. Pembahasan

Buatlah pembahasan dengan menggunakan literatur.

VI. Kesimpulan

	Dosen I	Dosen II	Pembuat laporan
Paraf			
Nama jelas			

DAFTAR PUSTAKA

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

Harley-Prescott. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition, The McGraw-Hill Companies.