

PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Disusun oleh : Nurhayati



FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
INDRALAYA
2015

TATA TERTIB DI LABORATORIUM

Dalam pelaksanaan praktikum ada beberapa hal yang harus di perhatikan oleh para mahasiswa peserta praktikum (praktikan), agar proses praktikum dapat berjalan dengan baik . Adapun tata tertib yang harus dipathui tersebut adalah sebagai berikut:

1. Semua tas dan benda lain yang tidak ada hubungannya dengan praktikum diletakkan pada tempat yang telah disediakan.
2. Selama mengikut praktikum praktikan diwajibkan mengenakan jas lab. Hal ini dikarenakan dengan memakai jas lab tidak saja dapat melindungi diri para praktikan dari kontaminasi akan tetapi juga agar saudara dapat terhindar dari kotoran ataupun zat warna yang mungkin dipakai.
3. Setiap praktikan diwajibkan menjaga kebersihan meja dan alat-alat lab yang digunakan.
4. Setiap praktikan harus mencuci tangan sebelum ataupun sesudah praktikum di laksanakan.
5. Selama praktikum berlangsung dilarang makan, minum ataupun merokok.
6. Setiap kelompok mahasiswa praktikum bertanggung jawab atas kebersihan alat-alat yang digunakan masing-masing kelompok.
7. Pada saat praktikum selesai, setiap kelompok mhs peserta praktiukm waib membersihkan meja ataupun alat-alat yang mereka gunakan serta sampah atau kotoran sisa praktikum, sehingga saat meninggalkan laboratorium ruangan tersebut dalam keadaan bersih
8. Kerusakan alat-alat seperti cawan petri, tabung reaksi dan lain-lainnya maka peserta praktikum wajib mengganti alat-alat yang dirusak atau dipecahkan tersebut.
9. Setiap mahasiswa wajib membuat laporan praktikum serta wajib mengikuti ujian praktikum
10. Bagi mahasiswa yang persentase kehadiran praktikum kurang dari 85 persen maka mahasiswa bersangkutan tidak diperbolehkan mengikuti ujian ahkir praktikum mikrobiologi.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, syukuri kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat rahmat dan kasih sayang-Nya juga Penuntun praktikum mikrobiologi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penuntun praktikum mikrobiologi ini disusun untuk membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum mata kuliah Mikrobiologi, sehingga dapat menguasai ketrampilan di laboratorium secara maksimal sesuai dengan apa yang didapat selama mengikuti perkuliahan. Penuntun praktikum mikrobiologi ini mencakup pengenalan alat-alat laboratorium pada umumnya, sterilisasi alat, cara dasar dalam pembuatan medium pertumbuhan, isolasi mikroorganisme, pengenalan keberadaan mikroorganisme serta pengenalan morfologi mikrobial, teknik pemindahan dan pemisahan mikrobial, pengukuran serta penghitungan mikrobial serta pengenalan protozoa.

Disadari bahwa penyusunan buku ini belum lah sempurna, maka masukan yang positif dari pembaca sangat diharapkan demi perbaikan di masa datang. Semoga buku ini bermanfaat bagi kita semua

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENGENLAN ALAT-ALAT LABORATORIUM	1
II. STERILISASI	8
III. PERBUATAN MEDIUM PERTUMBUHAN	9
IV. ISOLASI MIKROORGANISME	13
V. PENGENALAN KEBERADAAN MIKROBIA	22
VI. TAMAN MIKROBIA	26
VII. PEMINDAHAN MIKROORGANISME	29
VIII. PENGHITUNGAN DAN PENGUKURAN MIKROBIA	31
IX. PENGAMATAN GERAKAN PROTOZOA	40
DAFTAR PUSTAKA	

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Mikroskop cahaya dan bagian-bagiannya	2
2. Inkubator dan colony counter	5
3. Teknik pengenceran bertingkat	15
4. Pengenceran bertingkat dan penanaman	16
5. Inokulasi secara goresan sinambung	18
6. Teknik goresan T	19
7. Kotak-kotak pada haemocytometer	32
8. Cara kalibrasi pengukuran mikrobial	37
9. Skala micrometer untuk pengukuran panjang dan lebar mikroba	38

I. PENGENALAN DAN ALAT-ALAT LABORATORIUM

Tujuan : tujuan dari pengenalan mikroskop dan alat-alat laboratorium agar mahasiswa mengenal alat-alat ataupun bagian dari alat-alat yang akan mereka gunakan selama praktikum berlangsung serta memahami cara penggunaannya. Adapun alat-alat laboratorium tersebut meliputi: mikroskop, autoklaf, incubator, colony counter, laminar flow, hot plate dan stirrer merupakan alat-alat besar yang akan dijelaskan pada bab ini secara jelas. Alat-alat lain adalah alat-alat kecil yang penggunaannya akan langsung dijelaskan pada saat praktikum berlangsung yaitu mikropipet, cawan petri, labu erlenmeyer, mortal dan pestle, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, tabung durham, jarum ose, pinset, pH meter, micrometer, timbangan dan lain-lain.

Mikroskop

Mikroskop merupakan alat yang sangat erat hubungannya dengan mikrobiologi, hal ini dikarenakan kita harus bekerja dengan mikrobia yang ukurannya sangat kecil. Mikroskop adalah alat yang sangat peka sehingga harus digunakan dengan hati-hati. Apabila saudara masih ragu dalam penggunaannya mintalah pertolongan dengan para asisten saudara. Kebersihan dari alat ini juga harus dijaga. Setiap praktikan harus membersihkan mikroskopnya apabila telah selesai

menggunakan alat tersebut. Dalam kegiatan ini para praktikan harus membersihkannya dengan menggunakan kertas lensa yang telah tersedia dan juga minyak emersi.

Mikroskop berguna untuk melihat sel-sel mikroorganisme seperti sel bakteri. Adapun bagian-bagian dari mikroskop cahaya antara lain adalah: 1. lensa okuler untuk memperbesar bayangan yang terbentuk oleh lensa objektif, 2. lensa objektif untuk memperbesar specimen, 3. Lensa objektif, 4. Pengatur focus kasar yaitu skrup untuk menaikkan dan menurunkan meja benda, 5. Pengatur focus halus yaitu skrup untuk menaikkan dan menurunkan meja benda secara halus, 6. meja benda tempat meletakkan specimen, 7. Sumber cahaya, 8. Kondensor cahaya dan penjepit specimen (Gambar 1).



Gambar 1. Mikroskop cahaya dan bagian-bagiannya

Cara kerja:

Lensa objektif berfungsi untuk pembentukan bayangan pertama dan menentukan struktur serta bagian renik yang akan terlihat bayangan akhir serta kemampuan untuk memperbesar objek sehingga dapat memiliki suatu ukuran daya pisah suatu lensa objektif yang akan menentukan daya pisah spesimen sehingga mampu menunjukkan struktur renik yang berdekatan sebagai suatu dua benda terpisah.

Lensa adalah lensa yang terdapat dibagian ujung atas tabung berdekatan dengan mata pengamat dan berfungsi untuk memperbesar bayangan yang dihasilkan oleh lensa objektif sampai 4 hingga 25 kali.

Lensa kondensor merupakan lensa yang berfungsi mendukung terciptanya pencahayaan pada objek yang akan dilihat sehingga dengan pengaturan yang tepat maka akan diperoleh daya pisah maksimal.

.

Autoclaf

Autoclaf adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan seperti media yang akan digunakan dalam praktikum mikrobiologi. Alat ini menggunakan uap air panas bertekanan kira 2 atm(=15 Psi) dengan lama sterilisasi umumnya 15 menit.

Cara Penggunaan :

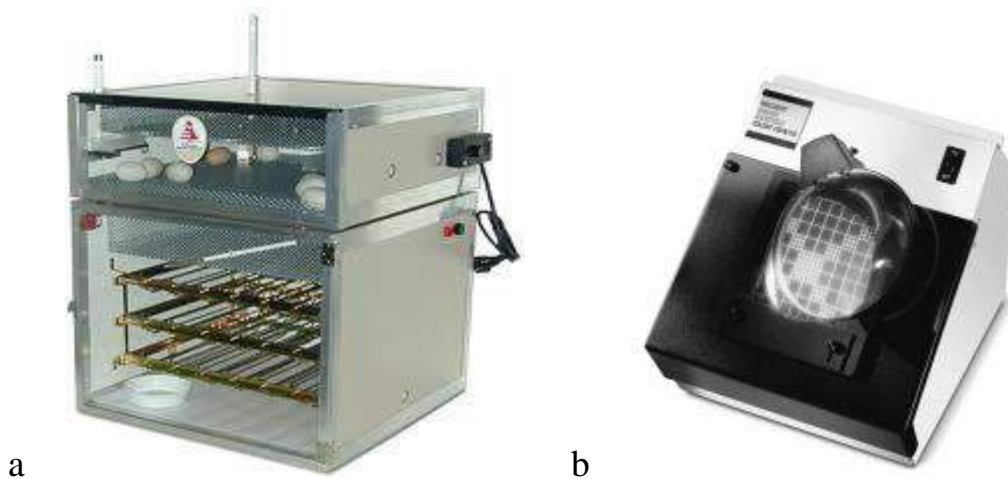
1. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Air harus sampai ke batas yang telah ditentukan, dan gunakan air steril agar tidak terbentuk karat pada lat tersebut.
2. masukkan semua peralatan yang akan disterilkan demikian juga bahan ataupun media yang akan digunakan.
3. Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf.
4. Nyalakan autoklaf, atur waktu (minimal 15 menit).
5. Tunggu samapai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Tutup klep pengaman sampai kencang.
6. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *preisuregauge* menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan isi autoklaf dikeluarkan dengan hati-hati.

Inkubator

Inkubator merupakan alat untuk menginkubasikan mikrobia pada suhu yang telah ditentukan (Gambar 3a).

Colony counter:

Adalah alat yang berguna untuk menghitung koloni tang tumbuh dalam cawan petri (Gambar 3b)



Gambar 3. Inkubator (a) dan Colony counter (b)

Laminar flow

Laminar air flow untuk pengerjaan secara aseptis karena mempunyai pola pengaturan dan penyaringan aliran udara sehingga aseptis dan aplikasi sinar UV beberapa jam sebelum digunakan (Gambar 4).

Hot plate stirrer dan Stirrer bar

Hot plate stirrer dan Stirrer bar (magnetic stirrer) berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (*plate*) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Pengadukan dengan bantuan batang magnet.

II. STRILISASI

Tujuan: mahasiswa mengerti dan memahami cara sterilisasi dengan baik.

Sterilisasi adalah suatu proses pembebasan suatu bahan atau alat dari semua bentuk organism hidup.

Sterilasi dapat dilakukan baik secara mekanik, fisik maupun kimiawi. Sterilisasi secara mekanik adalah dengan menggunakan saringan berpori sangat kecil antara 0.22 mikron sampai 0.45 mikron sehingga mikroba tertahan pada saringan. Cara ini biasanya dilakukan untuk sterilisasi bahan yang tidak tahan atau peka terhadap panas seperti antibiotik ataupun senyawa enzim.

Sterilisasi secara fisik adalah sterilisasi yang dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran. Seperti pembakaran alat pada ap secara langsung contoh pemanasan jarum ose atau pinset, pemanasan kering dengan menggunakan oven, biasanya untuk sterilisasi alat-alat seperti tabung reaksi, cawan petri dll, penggunaan uap air panas yang ditujukan untk sterilisasi bahan-bahan yang banyak mengandung air , penggunaan autoklaf ataupun dengan penyinaran UV. Sterilisasi secara kimia adalah sterilisasi dengan menggunakan bahan deinfektan seperti alkohol dll.

III. PEMBUATAN MEDIUM PERTUMBUHAN

Tujuan :

Mahasiswa mengerti serta memahami mengenai media pertumbuhan, fungsi serta cara pembuatan media pertumbuhan.

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikrobia untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Dalam mempelajari morfologi maupun fisiologi serta untuk keperluan identifikasi suatu mikrobia umumnya akan sangat berhubungan dengan media pertumbuhan. Media pertumbuhan bagi mikrobia dapat berupa media cair ataupun media padat.

Suatu media pertumbuhan umumnya terdiri dari bahan dasar seperti air sebagai pelarut, agar atau gelatin ataupun silica gel yang berfungsi memadatkan media. Disamping itu media pertumbuhan harus mengandung unsur atau senyawa yang diperlukan oleh mikrobia. Unsur-unsur tersebut dapat berupa C, H, O, N dan P (unsure makro) dan Fe, Mg (unsure mikro) serta vitamin serta bahan tambahan lainnya seperti phenol red yang berguna sebagai indikator tingkat kemasaman media dan antibiotik.

MACAM-MACAM MEDIA PERTUMBUHAN

Media pertumbuhan mikrobia dapat dibedakan berdasarkan sifat fisiknya, komposisi media dan tujuan kegunaannya.

Berdasarkan sifat fisiknya media pertumbuhan dapat dibedakan atas 3 yaitu:

1. Medium padat: medium yang komposisi agarnya 15%
2. Medium setengah padat: medium yang komposisi agarnya 0.4%
3. Medium cair: yaitu medium yang tidak mengandung agar contoh nutrient broth (NB), lactose broth (LC)

Berdasarkan komposisinya medium pertumbuhan dikelompokkan dalam :

1. Medium sintetis yaitu medium yang komposisi zat kimianya (glukosa agar dll) diketahui secara jelas dan pasti.
2. Medium semi sintetis yaitu medium yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti contoh PDA yang terdiri dari agar, deskstrosa dan ekstrak kentang (ekstrak kentang tdk diketahui apa komposisi senyawanya)
3. Medium non sintesis yaitu medium yang dibuat langsung dari bahan dasarnya. Contoh tomato juice agar.

Berdasarkan tujuan penggunaannya:

1. Media untuk isolasi: umumnya media yang mengandung semua unsure essensial untuk pertumbuhan contoh NA
2. Medium selektif: medium yang selain mengandung nutrisi juga mengandung senyawa tertentu yang berfungsi untuk menghambat atau menekan pertumbuhan mikrobia bukan sasaran. Contoh medium yang ditambah dengan amphisilin untuk menekan mikrobia lainnya.
3. Medium diperkaya: medium yang mengandung bahan dasar untuk pertumbuhan mikrobia tetapi ditambah komponen kompleks lainnya seperti serum, kuning telur atau lainnya.
4. Medium untuk peremajaan kultur
5. Medium untuk karakterisasi bakteri.

PEMBUATAN MEDIA

NUTRIEN AGAR (NA)

Bahan :

Bahan yang digunakan antara lain adalah: beef extract sebanyak 3 g, peptone 5 gram, agar 15 gram dan aquadest sebanyak 1000 ml.

CARA KERJA

1. Timbang beef, agar dan peptone menggunakan alat penimbang
2. Larutkan ekstrak beef dan peptone ke dalam 500 ml aquadest
3. Larutkan agar ke dalam 500 ml aquadest sambil terus diaduk dan dipanaskan diatas kompor atau hot plate stirrer.
4. Tuangkan larutan beef ekstrak dan peptone ke dalam larutan agar sambil terus diaduk sampai homogeny.
5. Ukur pH larutan menggunakan pH meter atau kertas pH, apabila belum netral dapat ditambahkan HCl atau NaOH.
6. Masukkan media ke dalam Erlenmeyer dan sterilisasikan menggunakan autoklaf.
7. Apabila sterilisas telah selesai, dinginkan media
8. Tuangkan secara aseptis dalam laminar flow untuk membuat media tegak ataupun miring..

POTATO DEKSTROSA AGAR (PDA)

Bahan yang diperlukan antara lain: kentang sebanyak 3 gram, dektrosa 5 gram, agra 15 gram dan aquadest sebanyak 100 ml.

Cara Kerja

1. Kupas dan iris kentang, lalu cuci bersih dan selanjutnya rebus dengan aquadest selama 1-2 jam
2. Saring rebusan kentang menggunakan penyaring dan gelas baker
3. Larutkan agar dan dektrosa dala 500 ml aquadest dan hingga homogeny serta didihkan diatas kompor atau hot plate stirrer.
4. Gabungkan larutan agar dan dektrosa dengan ekstrak kentang dan aduk sampai homogen. Atur pH hingga 5-6 dengan menambahkan HCl atau NaOH dan ukur dengan pH meter.
5. Masukkan larutan ke dalam erlenmeyer atau dapat langsung dibuat agar pinggan atau agar miring
6. Sterilkan media dengan autoklaf

Nutrien Broth (NB)

Komposisi untuk media NB sama dengan NA tetapi tidak memakai agar sebagai pematat. Proses pembuatannyapun lebih sederhana, tinggal melarutkan peptone dan beef extract kemudian ditampung dalam labu Erlenmeyer atau tabung reaksi dan siap disterilisasi. Proses pembuatan ini tidak memerlukan panas, peptone dan beef extract akan mudah larut sempurna pada air suhu kamar jika diaduk.

Diskusi

1. Apa gunanya media bagi mikrobia
2. Aa beda pertumbuhan mikrobia yang saudara amati pada Medium padat, setengah cair dan cair

Lembar Pembahasan

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

IV. ISOLASI MIKROORGANISME

Tujuan : mahasiswa mengerti dan memahami cara mengisolasi dan memisahkan mikrobial sampai ke biakan murni

Pada umumnya kita dapat menjumpai mikrobial pada setiap tempat baik dalam tanah, udara, air bahkan pada hampir semua yang ada terdapat mikrobial. Tentu saja dalam mempelajari mikroorganism mahasiswa harus mengerti dan memahami bagaimana mengisolasi dan memisahkan mikrobial tersebut agar didapat biakan murni sesuai dengan yang dikehendaki sehingga dapat dipelajari morfologi, biologi ataupun karakteristik mikrobial tersebut.

Sebelum dapat melakukan isolasi maka yang harus dilakukan terlebih dahulu adalah pengambilan sampel atau contoh. Sampel yang diambil dapat berupa tanah, air, bagian tanaman ataupun manusia dan lain-lain.

MACAM-MACAM CARA ISOLASI MIKROBIAL

Isolasi Dengan Cara Pengenceran (*Dilution*)

Teknik Preparasi Suspensi

Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam aquades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

Teknik Pengulasan (Swab), dilakukan menggunakan cotton bud steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan cotton bud memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari cotton bud kontak dengan permukaan sampel. Ulas akan lebih baik jika cotton bud dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan attraktan (contoh pepton water).

Pencucian. Ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. Pencucian merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam aquades dengan perbandingan 1 : 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan aquades 45 ml. Selanjutnya air cucian diinokulasikan ada media yang telah disiapkan. Amati pertumbuhan mikrobial yang terjadi pada media setelah diinokulasikan selama 3 sampai 7 hari di ruang dengan suhu kamar.

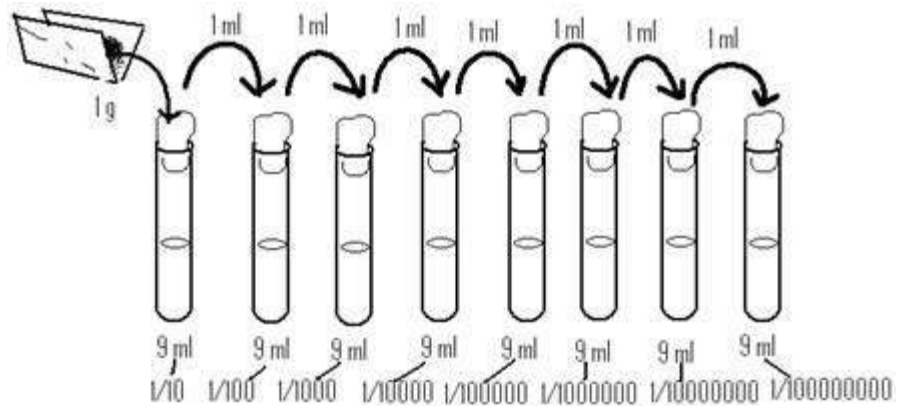
Penghancuran (Maserasi), Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antar lain biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tidak perlu dimaserasi. Hasil maserasi selanjutnya di inokulasikan pada media yang telah disiapkan. Selanjutnya inkubasikan cawan etri yang telah diinokulasikan tersebut pada suhu ruang. Setelah 3 sampai 7 hari masa inkubasi, amati mikrobial yang tumbuh pada media tersebut.

Teknik Pengenceran Bertingkat

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisma dari pengenceran sebelumnya.

Cara Kerja :

1. Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan aquades yang digunakan jika memakai teknik pencucian dan pengolesan sudah termasuk pengencer 10^{-1} . Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya sampai homogen.
2. Ambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ketelapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

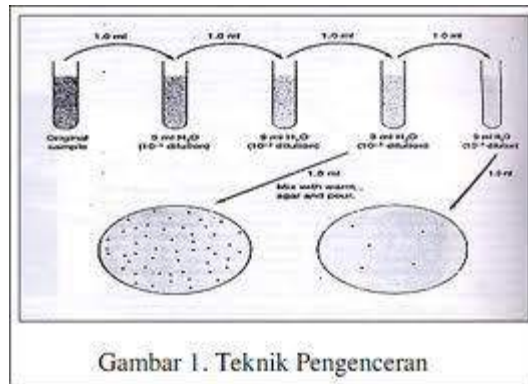


Gambar 3. Teknik pengenceran bertingkat

Teknik Penanaman

Penanaman dari suspensi

Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir.



Gambar 4. Pengenceran bertingkat dan penanaman

Agar tabur (Spread Plate)

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut : ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat. Kemudian disebar dengan menggunakan batang L yang telah disterilkan terlebih dahulu pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata.

Agar Tuang

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat (>45oC) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Cara ini akan menyebarkan

sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya O₂ dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut : Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair , teteskan 1 ml secara aseptis.suspensi sel kedalam cawan kosong, tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi.

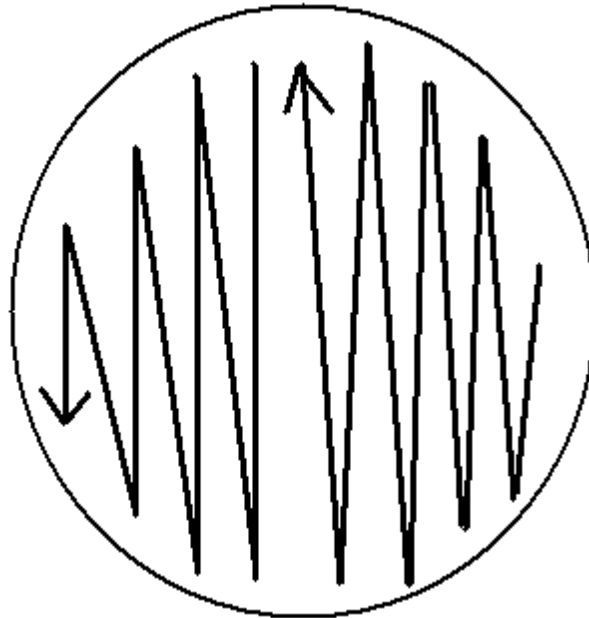
Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

Bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.

Goresan Sinambung

Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru

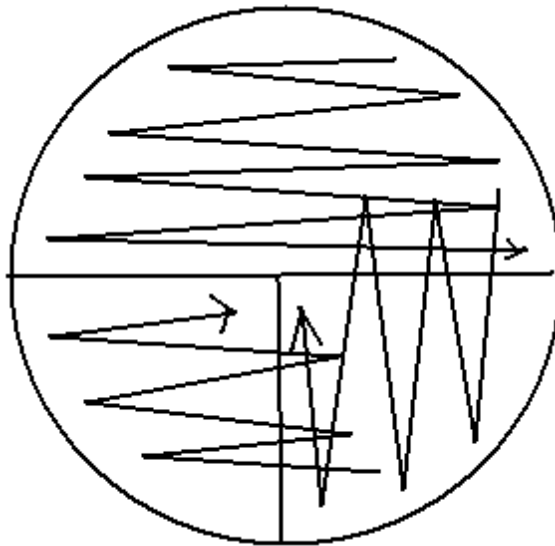
Cara kerja : Sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar. Putar cawan 180^oC lanjutkan goresan sampai habis.



Gambar 5. Inokulasi secara goresan sinambung

Goresan T

Cara kerja : Bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker, inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag. Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2 (*streak* pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna. Lakukan hal yang sama pada daerah 3



Gambar 6. Teknik goresan secara T

Goresan Kuadran (Streak quadrant)

Cara kerja : Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganisma. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah :

Adapun cara isolasi dilakukan dengan mengambil tanah seberat 1 g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-7} . Tiga pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam pada medium NA dan , diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam. Koloni yang tumbuh sedikit terpisah kemudian dipilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA baru dengan teknik streak kuadran lalu inkubasi.

Isolasi Jamur dari Tanah

Tanah ditaruh dalam cawan petri dipanaskan dengan oven pada suhu 80°C selama 30 menit , selanjutnya tanah yang telah dioven diambil 1 g dimasukkan ke dalam tabung dan dilakukan pengenceran bertingkat. Selanjutnya dilakukan penanaman secara spread streak pada media PDA yang telah di beri antibitotik dan steril,lalu inkubasikan.

Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada medium PDA baru,inkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.

Diskusi:

1. Bagaimana pertumbuhan mikrobia yang diinokulasikan dengan berbagai teknik di atas
2. Apa perbedaan pertumbuhan mikrobia yang dilakukan dengan menggunakan teknik-teknik yang telah dijelaskan diatas
3. Adakah perbedaan populasi jamur ataupun bakteri yang disolasi dari tanah yang menggunakan cara pengenceran ataupun cara tabur?

Lembar Pembahasan

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

V. PENGENALAN KEBERADAAN MIKROBIA

Tujuan: Mahasiswa diharapkan mengenal dan mengetahui keberadaan mikrobia disekitar kita baik yang terdapat di udara, tanah ataupun anggota tubuh kita.

Mikrobia atau jasad renik dapat di jumpai dimana saja, hal ini dapat di buktikan dengan melakukan pengamatan menggunakan mikroskop.

Udara merupakan bagian yang terbuka di bumi ini seringkali mengandung berbagai macam mikrobia . Keberadaan mikrobia di udara ini dapat saja karena diterbangkannya mikrobia oleh angin, vector, air hujan dan lain sebagainya.

Tanah sebagai medium yang baik bagi kehidupan mikro organism. Mikroorganism dalam tanah merupakan suatu populasi campuran dari protozoa, bakteri, alga , jamur dan lain sebagainya. Umumnya mikrobia tersebut lebih banyak terdapat di atau dekat permukaan tanah.

Air merupakan zat yang mutlak bagi setiap makhluk hidup dan kebersihan air merupakan syarat utama bagi terjaminnya kesehatan. Berdasarkan tempatnya air dapat berada dalam tanah, air hujan dan sebagainya. Air banyak mengandung mikroorganisme terutama air tanah. Air tanah banyak mengandung senyawa organik ataupun anorganik sehingga merupakan tempat yang baik bagi kehidupan mikrobia, sehingga tidaklah aneh apabila air banyak mengandung mikrobia baik yang bersifat patogen maupun yang bersifat nonpatogen.

PENGAMATAN JASAD RENIK DI UDARA

Bahan dan alat: bahan yang diperlukan antara lain adalah agar pinggan.

Cara kerja:

Tiap kelompok praktikan mengambil tiga agar pinggan yang telah disiapkan pada praktikum sebelumnya. Buka cawan petri masing-masing 5 menit, 10 menit dan 15 menit. Cawan petri selanjutnya di tutup kembali dan diinkubasikan selama 2x24 jam.

Setelah 48 jam amati apa yang terjadi pada masing-masing cawan petri saudara. Catat koloni yang tumbuh pada masing-masing cawan petri. Selanjutnya gambarkan koloni yang didapat tersebut dan catat jumlah, warna, diameter, bentuk permukaan dan tepi koloni.

Pengamatan Jasad Renik di Tanah

Bahan dan alat yang diperlukan adalah 3 agar pinggan, aquadest, tanah, jarum ose serta tabung reaksi.

Cara Kerja

Ambil tanah sedikit lalu masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan aquadest sedikit lalu kocok sampai homogen. Ambil suspensi dengan menggunakan jarum ose dan goreskan pada agar pinggan atau media yang telah disediakan lalu inkubasikan selama 2 x 24 jam.

Pengamatan meliputi: bentuk koloni yang tumbuh, jumlah koloni, warna dan diameter koloni, bentuk permukaan koloni, bentuk tepi koloni. Gambar dan beri keterangan hasil pengamatan saudara.

Pengamatan Jasad Renik di Anggota Tubuh Manusia

Bahan dan alat yang diperlukan antara lain: agar pinggan, kuku, rambut, Bunsen, penjepit dll

Cara Kerja:

Masukkan potongan rambut dan kuku ke dalam media agar pinggan yang telah disiapkan pada bagian tepi dengan arah yang berlawanan. Pekerjaan ini dilakukan secara aseptik didekat Bunsen untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Inkubasikan media tersebut selama 2 x 24 jam.

Amati mikrobia yang tumbuh pada media serta catat semua hal yang sama dengan pengamatan-pengamatan terhadap jasad renik di tanah ataupun di udara. Gambar dan tuliskan hasil pengamatan saudara dengan jelas.

Diskusi Hasil

1. Dari ke tiga pengamatan yang telah saudara lakukan adakah perbedan antara satu dengan lainnya. Jelaskan dengan singkat.
2. Setelah saudara melakukan tiga pengamatan yaitu jasad renik di udara, tanah dan anggota tubuh manusia. Apa yang dapat saudara simpulkan. Tuliskan dengan singkat dan jelas.

Lembar Pembahasan

Dotted lines for writing the discussion.

VI. TAMAN MIKROBIA

Mikroorganisme atau jasad renik atau mikrobial terdiri dari beberapa golongan yang pertumbuhan dan morfologinya beragam. Kita telah mengetahui bahwa di sekitar kita banyak mikrobial tersebut. Untuk mempelajari keberadaan mikroorganisme ini lebih lanjut tentu banyak cara yang dapat dilakukan dari yang sangat sederhana sampai dengan cara yang lebih maju atau modern.

Tujuan: Agar mahasiswa dapat mempelajari dan memahami serta mengamati mikroorganisme yang umum terdapat pada beberapa media baik secara makroskopis ataupun secara mikroskopis.

Bahan dan Alat. Bahan dan alat yang digunakan dalam percobaan ini antara lain adalah pisang ambon, kacang-kacangan, bayam, roti yang telah rusak, biji pepaya, dan aquadest serta mangkok plastik dan label. Masing-masing kelompok mengambil sebanyak 5 mangkok.

Cara Kerja:

1. Beri label pada masing-masing mangkok di setiap kelompok praktikan.
2. Mangkok 1, masukkan potongan pisang ambon yang tidak di kupas, lalu beri aquadest sampai permukaan pisang tersebut.
3. Mangkok ke 2, masukkan sobekan daun bayam atau kangkung lalu perciki dengan air aquadest.
4. Mangkok ke 3 masukkan biji kacang-kacangan dan beri air aquadest sampai permukaan biji terendam
5. Mangkok ke 4, masukkan biji pepaya atau lada lalu beri air aquadest
6. Mangkok ke 5, masukkan potongan roti yang telah rusak lalu perciki dengan air aquadest.

Selanjutnya inkubasikan ke lima mangkok tersebut dan lakukan pengamatan setiap hari. Pelajari dan catat serta gambarkan apa-apa yang saudara dapatkan. Dalam pengamatan ini saudara dapat menggunakan istilah-istilah untuk setiap mikroorganisme yang saudara amati seperti: bubuk, berlendir, licin, mengkilat, kasar, padat dan lainnya. Apabila mikrobia yang ada tersebut sudah jelas sekali, amatilah dengan menggunakan mikroskop. Gambarkan apa-apa yang saudara peroleh disertai dengan keterangan gambar yang jelas. Selanjutnya cobalah untuk menggolongkan mikrobia yang saudara amati.

Diskusi Hasil:

1. Dari hasil pengamatan saudara apakah saudara menemukan microorganism yang sama pada setiap mangkok? Jika ada, pada media yang mana mikrobia atau mikroorganisme tersebut tumbuh dengan baik.
2. Golongan mikroorganisme apa yang paling dominan yang saudara dapatkan pada mangkok-mangkok percobaan saudara? Kenapa?

Lembar Pembahasan

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

VII. PEMINDAHAN MIKROORGANISME

Tujuan: mempelajari cara pemindahan satu koloni bakteri ke media agar tegak dan miring.

Bahan dan alat yang diperlukan antara lain: agar tegak, agar miring, biakan bakteri, aquadest, tabung reaksi, lampu Bunsen, jarum ose, jarum preparat.

Pemindahan mikrobia ke agar miring dan agar tegak.

1. Panaskan jarum ose dengan menggunakan lampu Bunsen, dinginkan sebentar.
2. Ambil biakan bakteri yang telah disiapkan
3. Goreskan jarum ose yang mengandung biakan bakteri tersebut ke dalam agar miring dengan cara zig-zag. Tutup tabung reaksi dan inkubasikan.
4. Panaskan jarum preparat seperti pada no. 1, dinginkan
5. Ambil biakan bakteri, lalu tusukkan jarum preparat yang mengandung biakan bakteri ke dalam tabung reaksi agar tegak. Tutup tabung dan beri label. Selanjutnya inkubasikan biakan tersebut.
6. Amati dan gambarkan pertumbuhan bakteri pada ke dua media tersebut. Jelaskan bentuk pertumbuhan bakteri dengan menggunakan petunjuk pada

VIII. PENGHITUNGAN DAN PENGUKURAN MIKROBIA

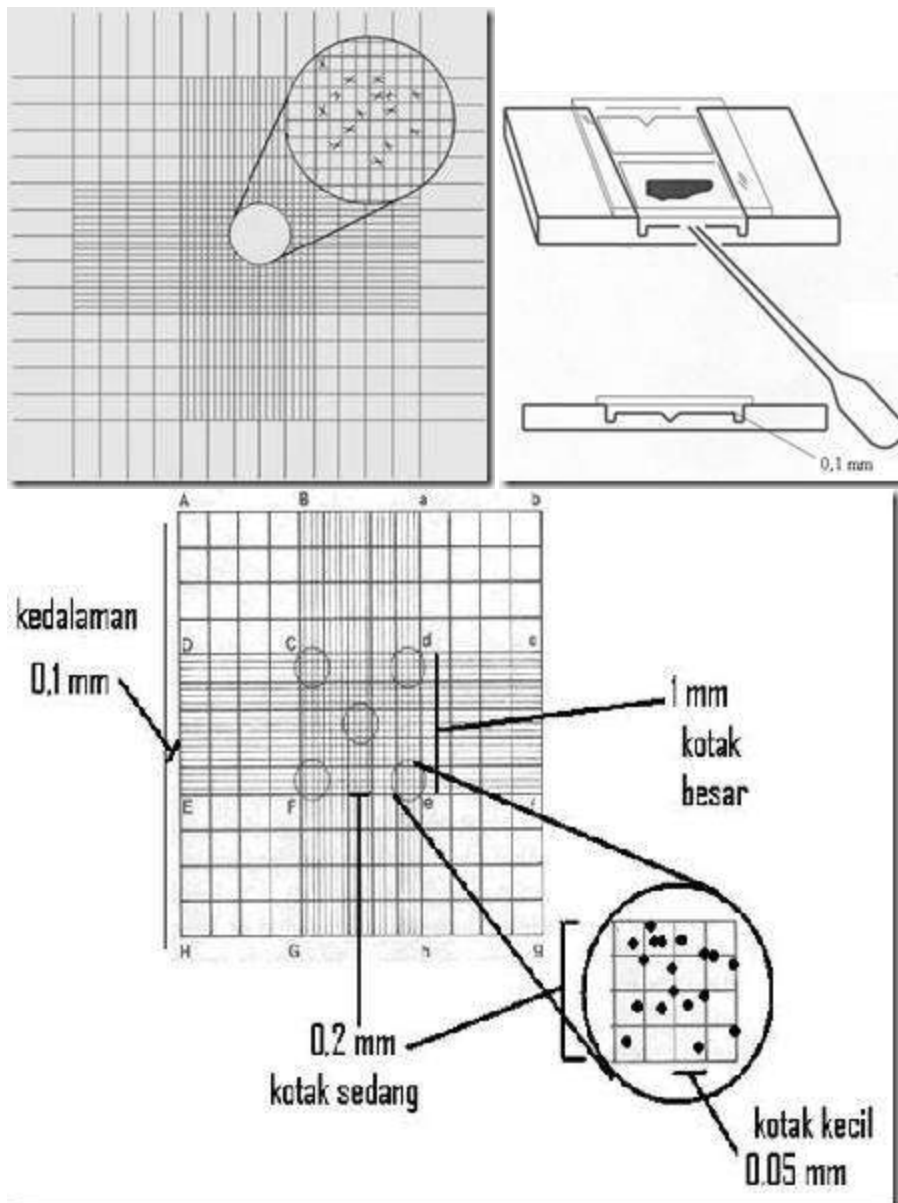
Tujuan: untuk mempelajari cara penghitungan dan pengukuran mikrobia tertentu dengan menggunakan haemocytometer dan mikrometer

Bahan dan alat yang digunakan adalah biakan murni bakteri atau jamur (yeast) yang telah mengandung spora, mikroskop, haemocytometer dan micrometer.

Penghitungan menggunakan haemocytometer.

Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah Haemocytometer. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu.

Pada haemocytometer ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel bakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.



Gambar 7 . Kotak-kotak pada haemocytometer

Cara Penghitungan:

Luas kotak sedang

$$\begin{aligned}\text{Luas kotak sedang} &= p \times l \\ &= 0,2 \times 0,2 = 0,04 \text{ mm}^2\end{aligned}$$

Misalnya diperoleh:

Volume kotak sedang : 20 sel dalam satu kotak sedang
 $= 0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$

maka jumlah sel keseluruhan :

$$= 0,004 \text{ mm}^3 = 20 \times (1/4) \times 10^6$$

Karena $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 10^6 \text{ mm}^3$ sel/ml

Maka :

$$\begin{aligned}&= 0,004 \text{ mm}^3 \\ &= 0,000004 \text{ cm}^3 \\ &= 4 \times 10^{-6} \text{ ml}\end{aligned}$$

Sel/ml :

$$\begin{aligned}&= \text{jumlah sel} / 4 \times 10^{-6} \text{ ml} \\ &= (\text{jumlah sel} / 4) \times 10^6 \\ &= \text{jumlah sel} \times (1/4) \times 10^6 \\ &= \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5\end{aligned}$$

Kotak sedang :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5$$

Dengan perhitungan yang sama maka diperoleh rumus untuk

kotak kecil :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{jumlah sel} \times 4 \times 10^6$$

Cara Kerja.

1. Bersihkan Haemocytometer dengan alkohol 70 %
2. keringkan dengan tissue.
3. Letakkan cover glass di atas alat hitung.
4. Tambahkan $\pm 50 \mu\text{l}$ suspensi sel yeast (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
5. Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
6. Letakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40×10 .
7. Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10.
8. Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

Penggunaan mikrometer

Mikroba berukuran sangat kecil dan untuk mengetahuinya digunakan mikrometer. Mikrometer merupakan kaca berskala dan dikenal 2 jenis mikrometer yaitu mikrometer okuler dan mikrometer objektif. Mikrometer okuler dipasang pada lensa okuler mikroskop, sedangkan mikrometer objektif berbentuk slide yang ditempatkan pada meja preparat mikroskop. Jarak antar garis skala pada mikrometer okuler tergantung pada perbesaran lensa objektif yang digunakan yang menentukan lapang pandang mikroskop. Jarak ini dapat ditentukan dengan mengkalibrasi antara mikrometer okuler dan objektif. Mikrometer objektif memiliki skala yang telah diketahui, menjadi tolak ukur untuk menentukan ukuran skala mikrometer okuler. 1 skala micrometer objektif = 0,01 mm / 10 μ m.

Kalibrasi dilakukan dengan menghimpitkan skala mikrometer objektif dan okuler pada perbesaran yang diinginkan. Skala ke nol (garis pertama) kedua mikrometer disimpulkan menjadi 1 garis kemudian dilihat pada skala ke berapa kedua jenis mikrometer tersebut bertemu/berhimpit kembali. Dari hasil tersebut dapat diketahui satu satuan panjang pada skala mikrometer okuler itu berdasarkan beberapa jumlah skala kecil mikrometer objektif yang berada di antara garis yang berhimpit tadi.

$$\begin{aligned}
 1 \text{ skala okuler (O.D = Okuler Division)} &= \frac{\text{Jarak yang diketahui antara 2 garis pada mik. Objektif}}{\text{Jarak skala pada mikrometer okuler}} \\
 &= 0,01 \times \frac{\text{Skala Objektif}}{\text{Skala Okuler}} \quad (\text{mm}) \\
 &= 10 \times \frac{\text{Skala Ob}}{\text{Skala Ok}} \quad (\mu\text{m})
 \end{aligned}$$

Misal : jika skala ke 0 mikrometer okuler berhimpit dengan skala ke 0 mikrometer objektif lalu skala ke 13 mikrometer okuler berhimpit dengan skala ke 2 mikrometer objektif maka beberapa 1 skala okuler.

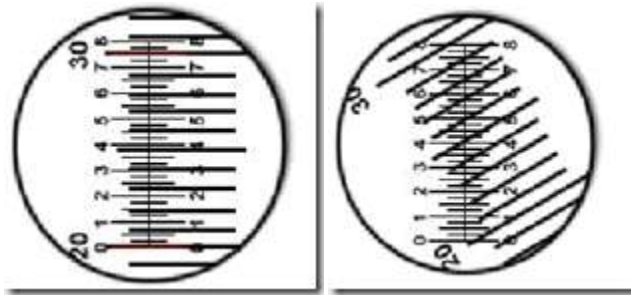
Faktor kalibrasi

$$\begin{aligned}
 1 \text{ Skala Okuler} &= 0,01 \times \frac{2}{13} \\
 &= \frac{0,02}{13} = 0,00154 \text{ mm} = 1,54 \mu\text{m}
 \end{aligned}$$

Cara Kerja :

Kalibrasi :

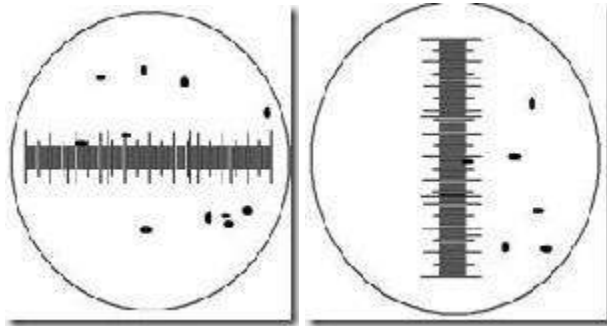
1. Letakkan micrometer objektif pada meja benda dan pasang Micrometer okuler pada tabung lensa okuler.
2. Tentukan perbesaran yang digunakan (missal 40 x 10), kemudian cari gambar perbesaran dari skala micrometer objektif.
3. Setelah fokus didapat, kemudian selanjutnya himpitkan skala ke nol mikrometer objektif dan okuler.
4. Cari dengan teliti skala ke berapa antara mikrometer objektif dan okuler yang berhimpit lagi.
5. Hitung besarnya skala okuler dengan rumus di atas.



Gambar 8. Cara kalibrasi pengukuran mikrobia

Penentuan ukuran mikroba

1. Lepaskan mikrometer objektif dari meja benda.
2. Ganti dengan preparat ulas yang telah disiapkan
3. Cari fokus dari preparat tersebut dengan perbesaran yang sama.
4. Hitung berapa panjang sel dengan menghitung skala mikrometer okuler.
5. Jika diperlukan hitung lebar sel dengan cara yang sama.
Tabung lensa okuler dapat diputar dan dicari posisi yang pas.
6. Hitung panjang dan lebar sel sebenarnya :



Gambar 9. Skala mikrometer untuk mengukur panjang dan lebar mikrobia

Hitung panjang dan lebar sel sebenarnya :

x skala okuler X hasil kalibrasi
y skala okuler X hasil kalibrasi

misal : $5 \times 1,54 = 7,7 \mu\text{m}$
 $2 \times 1,54 = 3,08 \mu\text{m}$

IX. PENGAMATAN GERAKAN PROTOZOA

Tujuan percobaan adalah untuk mengenalkan adanya protozoa dan gerakannya.

Bahan dan alat meliputi air selokan, vaselin. Gelas objek cekung, cover glass, pipet, Bunsen dan mikroskop

Cara Kerja:

1. Bersihkan dan bebaskan cover glass dari lemak dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak kurang lebih 20 x
2. Teteskan air selokan pada cover glass tersebut
3. Letakkan vaselin pada tepi cekungan gelas objek cekung
4. Letakkan gelas objek tersebut sehingga menutupi cover glass. Balik preparat tersebut dan amati dibawah mikroskop
5. Amati bentuk, warna dan gerakan protozoa yang terlihat. Gambar dan jelaskan secara rinci

