

PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Oleh :

Tim Penyusun

Program Studi Agroteknologi
Fakultas Pertanian
Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur
Semester Genap TA 2016/2017

TIM DOSEN PENGAMPU PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

NO	NAMA	KETERANGAN
1	Dr.Ir. Arika Purnawati, MP.	Koordinator Praktikum
2	Dr.Ir. Yenny Wuryandari, MP.	
3	Dr.Ir. Penta Suryaminarsih, MP.	
4	Dr.Ir. Sri Wiyatiningsih, MP.	
5	Dr.ir. Herry Nirwanto, MP.	
6	Dr.Ir. Tri Mujoko, MP.	

JADUAL PRAKTIKUM

WAKTU	ACARA
13-17 Pebruari 2017	Bon Alat dan Pengenalan Alat
20-24 Pebruari 2017	Sterilisasi Alat
27 Pebruari-3 Maret 2017	Media Pertumbuhan Mikroba
13 -17 Maret 2017	Ujian Tengah Semester (UTS)
3-7 April 2017	Isolasi Mikroba
10-14 April 2017	Pemurnian dan Pengenalan Koloni
17-21 April 2017	Morfologi Jamur dan Khamir
24-28 April 2017	Morfologi Bakteri
1-5 Mei 2017	Pengujian Sifat Fisiologi dan Biokimia Mikroba
8-12 Mei 2017	Pengaruh Lingkungan terhadap Mikroba
15-19 Mei 2017	Pengamatan <i>Rhizobium</i> sp.
22-26 Mei 2017	UAS dan Pengumpulan Laporan Resmi

FORMAT LAPORAN RESMI

I. PENDAHULUAN	}	dibuat sesuai dengan materi yang dilaksanakan
1.1. Latar belakang		
1.2. Tujuan		
II. TINJAUAN PUSTAKA		
III. PELAKSANAAN PRAKTIKUM		
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		
V. KESIMPULAN		
VI. DAFTAR PUSTAKA (d disesuaikan dengan pustaka yang digunakan pada latar belakang)		

LEMBAR PENGESAHAN

Nama Mahasiswa :

N P M :

Semester/ ProgdI :

Tahun Ajaran :

Gol / Kelompok:

Nilai Akhir :

NO	MATERI	PEMBIMBING / ASISTEN PRAKTIKUM	LAPORAN		NILAI	KETERANGAN
			Tanggal Diserahkan	Tanggal Disetujui		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Pembimbing / Asisten Praktikum

.....

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya petunjuk praktikum mikrobiologi ini dapat diselesaikan. Petunjuk praktikum mikrobiologi ini disusun dengan harapan dapat membantu para mahasiswa (praktikan) untuk lebih mudah mempelajari mikrobiologi, dan sebagai pedoman dalam melaksanakan praktikum mikrobiologi. Materi-materi praktikum di dalam petunjuk praktikum ini disusun dengan memperhatikan fasilitas yang tersedia di dalam laboratorium juga pengetahuan dan keterampilan dalam bidang mikrobiologi yang perlu dikuasai oleh mahasiswa (praktikan). Materi-materi praktikum dalam petunjuk praktikum ini meliputi pengenalan terhadap mikroba secara umum dan teknik-teknik yang berhubungan dengan mikroba yang dilengkapi dengan gambar sehingga memudahkan mahasiswa (praktikan)

Semoga buku petunjuk praktikum mikrobiologi ini bermanfaat bagi pemakai dan pembaca.

Surabaya, Pebruari 2017

Tim Penyusun

TATA TERTIB PRAKTIKUM

a. Untuk menjaga keamanan

1. Praktikan harus telah mengenakan jas lab saat memasuki laboratorium dan bekerja dengan peralatan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi dan bahan kimia
2. Dilarang keras makan, merokok dan minum di laboratorium
3. Sebelum dan sesudah bekerja, meja praktikum dibersihkan dengan desinfektan
4. Praktikan berambut panjang harus mengikat rambutnya sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu kerja dan menghindari dari hal-hal yang tidak diinginkan
5. Pengambilan bahan kimia harus menggunakan sendok atau pipet atau mikropipet bila cair
6. Dilarang membuang biakan sisa atau habis pakai dan pewarna sisa disembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan
7. Laporkan segera jika terjadi kecelakaan seperti kebakaran, biakan tumpah, ada yang menelan bahan kimia, atau biakan kepada asisten/pembimbing praktikum
8. Jika menggunakan jarum inokulum, ujung jarum dibakar sampai memijar sesudah dan sebelum bekerja menggunakan alat ini (teknik aseptik)
9. Sebelum meninggalkan laboratorium disarankan untuk mencuci tangan dengan seksama.

b. Untuk kelancaran praktikum

1. Praktikan diwajibkan memakai jas laboratorium sebelum memasuki laboratorium dan dilepas di luar laboratorium
2. Praktikan wajib memakai sepatu pada saat praktikum.
3. Praktikan dilarang berbicara yang tidak perlu dan membuat gaduh
4. Memakai pakaian yang sopan pada saat praktikum (baju berkrah untuk laki-laki)
5. Kuis akan dilaksanakan pada awal acara sebelum memulai praktikum untuk mengetahui sejauh mana kompetensi yang dicapai
6. Bagi praktikan yang akan berpindah jadwal praktikum harus seizin asisten/pembimbing praktikum dengan menyerahkan surat pengantar paling lambat dua hari berikutnya
7. Toleransi keterlambatan bagi praktikan adalah 10 menit
8. Praktikan yang tidak hadir praktikum (absen), maka disarankan membuat surat izin, dengan surat dokter atau orangtua bila sakit dan diserahkan ke asisten/pembimbing praktikum
9. Praktikan yang tidak hadir praktikum (absen) atau terlambat lebih dari 10 menit tidak diizinkan mengikuti praktikum dan harus mengikuti praktikum pengganti pada jadwal yang ditentukan kemudian
10. Laporan harus dibawa saat masuk praktikum sebagai syarat mengikuti praktikum
11. Praktikan yang tidak membawa laporan karena tertinggal, tetap diizinkan mengikuti praktikum tetapi laporan harus diserahkan satu hari setelah pelaksanaan praktikum dan nilainya akan berbeda bila mentaati tata tertib no 10.

DAFTAR ISI

Halaman

Kata Pengantar	i
Tata Tertib Praktikum	ii
Daftar Isi	iii
Materi I Pengenalan Alat	1
Materi II Sterilisasi Alat	12
Materi III Media Pertumbuhan Mikroba.....	14
Materi IV Isolasi Mikroba	17
Materi V Pemurnian dan Pengenalan Koloni.....	23
Materi VI Morfologi Jamur dan Khamir	26
Materi VII Morfologi Bakteri	28
Materi VIII Pengujian Sifat Fisiologi dan Biokimia Mikroba	30
Materi IX Pengaruh Lingkungan Terhadap Mikroba	33
Materi X Pengamatan <i>Rhizobium</i> sp.	35
Pustaka.....	36

MATERI I

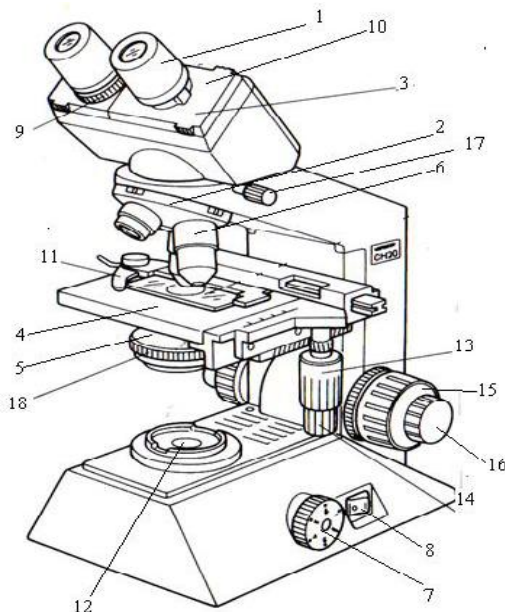
PENGENALAN ALAT

Kompetensi : mahasiswa mengenal dan mengetahui fungsi alat-alat yang umum digunakan pada praktikum mikrobiologi

Pendahuluan

Praktikum mikrobiologi merupakan praktikum yang berhubungan dengan mikroba sehingga memerlukan beberapa alat yang mendukung pelaksanaannya seperti autoclave, mikroskop, dll. Berikut beberapa alat-alat mikrobiologi yang perlu dikenal : mikroskop, autoclave, laminar air flow (LAF), cawan Petri, tabung reaksi, gelas Beaker, Erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, lampu Bunsen, batang L, jarum inokulum, pinset, skalpel, pH indikator universal

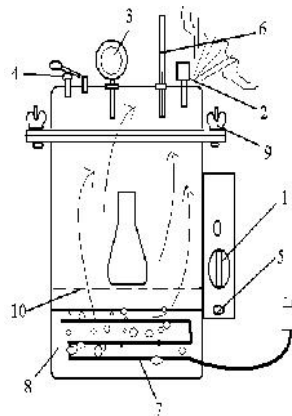
Mikroskop



Keterangan :

1. lensa okuler, untuk memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif
2. *revolving* (pemutar lensa objektif), untuk memutar lensa objektif sehingga mengubah perbesaran
3. tabung pengamatan/tabung okuler
4. *stage* (meja benda), spesimen diletakkan di sini
5. condenser untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. lensa objektif, untuk memperbesar spesimen
7. *Brightness adjustment knob* (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
8. tombol *on-off*
9. *Diopter adjustmet ring* (cincin pengatur diopter) Untuk menyamakan focus antara mata kanan dan kiri
10. *Interpupillar distance adjustment knob* (pengatur jarak interpupillar)
11. *Specimen holder* (penjepit spesimen)
12. *Illuminator* (sumber cahaya)
13. *Vertical feed knob* (sekrup pengatur vertikal) Untuk menaikkan atau menurunkan *object glass*
14. *Horizontal feed knob* (sekrup pengatur horizontal) Untuk menggeser ke kanan / kiri objek glas
15. *Coarse focus knob* (sekrup fokus kasar) Menaik turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat
16. *Fine focus knob* (sekrup fokus halus) Menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat
17. *Observation tube securing knob* (sekrup pengencang tabung okuler)
18. *Condenser adjustment knob* (sekrup pengatur kondenser) untuk menaik-turunkan kondenser

Autoclave



Keterangan :

1. Tombol pengatur waktu (*timer*)
2. Katup pengeluaran uap
3. pengukur tekanan
4. klep pengaman
5. Tombol *on-off*
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas
8. Aquades (H_2O)
9. Sekrup pengaman
10. Batas penambahan air

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi, menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 1,5 atm- 2 atm dengan suhu $121^{\circ}C$ dan lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15-20 menit.

Cara Pemakaian :

1. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoclave, jika air dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi/steril untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
2. Masukkan alat dan bahan.
3. Tutup dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoclave dan nyalakan.
4. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi seluruh bagian autoclave, klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15-20 menit dimulai sejak tekanan mencapai 1,5-2 atm dan nyalakan timer.
5. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada pressure gauge/penunjuk tekanan menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isinya dengan hati-hati.

Oven (hot air sterilizer)



Oven adalah alat untuk mensterilkan alat-alat dari kaca yang digunakan dalam mikrobiologi, menggunakan udara kering. Suhu 170-180°C dan lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 1,5-2 jam.

Cara Pemakaian :

1. Masukkan alat-alat yang telah siap ke dalam oven
2. Tutup oven dan tutup tombol pengatur tekanan dan nyalakan tombol
3. Atur suhu pada termometer dengan cara memutar pengatur suhu sesuai suhu oven
4. Hitung waktu sterilisasi selama 1,5-2 jam dan dimulai ketika suhu sudah mencapai 170-180°C
5. Matikan tombol setelah 1,5-2 jam, tunggu sampai suhu turun dan oven dingin selanjutnya alat-alat dapat dikeluarkan

Timbangan/Neraca analitik



Alat untuk mengukur berat (terutama yang berukuran kecil) atau alat untuk menimbang suatu zat. alat ini biasanya diletakkan di laboratorium sebagai alat ukur dalam kegiatan penelitian. Alat penghitung satuan massa suatu benda dengan teknik digital dan tingkat ketelitian yang cukup tinggi. Prinsip kerjanya yaitu dengan penggunaan sumber tegangan listrik yaitu stavolt dan dilakukan peneraan terlebih dahulu sebelum digunakan kemudian bahan diletakkan pada neraca lalu dilihat angka yang tertera pada layar, angka itu merupakan berat dari bahan yang ditimbang

Manfaat neraca analitik

Alat ini berfungsi untuk menimbang bahan yang akan digunakan pada pembuatan media untuk bakteri, jamur atau media tanam kultur jaringan dan mikrobiologi dalam praktikum dengan tingkat ketelitian yang tinggi. Komposisi penyusun media yang tidak tepat akan berpengaruh terhadap konsentrasi zat dalam media sehingga dapat menyebabkan terjadinya kekeliruan dalam hasil praktikum

Kekurangan neraca analitik

Alat ini memiliki batas maksimal yaitu 1 mg, jika melewati batas tersebut maka ketelitian perhitungan akan berkurang, tidak dapat menggunakan sumber tegangan listrik yang besar, sehingga harus menggunakan stavolt. Jika tidak, maka benang di bawah pan akan putus, harga yang mahal.

Kelebihan neraca analitik

Memiliki tingkat ketelitian yang cukup tinggi dan dapat menimbang zat atau benda sampai batas 0,0001 g atau 0,1 mg, penggunaannya tidak begitu rumit jika dibandingkan dengan timbangan manual

Laminar Air Flow (LAF)



LAF adalah alat yang berguna untuk bekerja secara aseptis karena mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga menjadi steril dan aplikasi sinar UV beberapa jam sebelum digunakan.

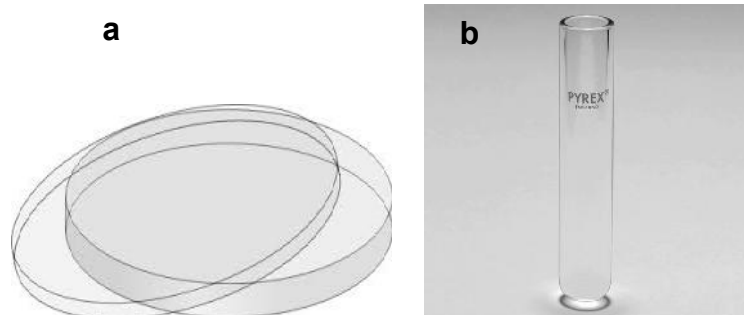
Cara Pemakaian :

1. Hidupkan lampu UV selama 2 jam, selanjutnya matikan segera sebelum mulai bekerja
2. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah
3. Nyalakan lampu neon dan blower, biarkan selama 5 menit.
4. Cuci tangan dan lengan dengan alkohol 70 %.
6. Usap permukaan LAF dengan alkohol 70 % atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap
7. masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (overload) karena memperbesar resiko kontaminan.
8. Atur alat dan bahan yang telah dimasukkan sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril
9. Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tapi gunakan yang berbahan bakar gas.

10. Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja

11. Setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan keluar dari LAF.

Cawan Petri (Petri Dish) dan Tabung reaksi (Reaction Tube / Test Tube)



Cawan Petri **(a)** berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroba. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.

Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi **(b)** digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi.

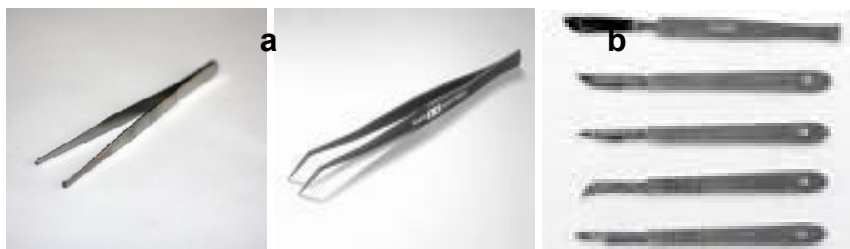
Lampu Bunsen (Pembakar Spiritus) dan pH indikator universal



Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar Bunsen **(a)**. Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk

sterilisasi jarum Ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Lampu Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas, alkohol, spiritus. pH Indikator Universal (**b**) berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada medium berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.

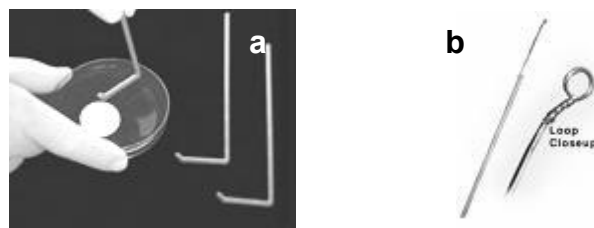
Pinset dan Skalpel



Pinset (**a**) memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit, menjepit bahan yang akan diisolasi mikroba. Skalpel (**b**) berfungsi untuk mengiris, memotong, menyayat inang, bagian inang yang akan diisolasi mikroba.

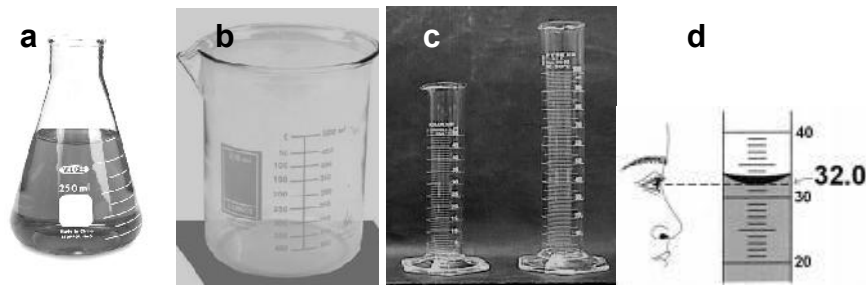
Jarum Inokulum dan Batang L (*L Rod*)

Batang L (**a**) bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut spreader.



Jarum inokulum (**b**) berfungsi untuk memindahkan biakan yang akan ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nikrom atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (loop) dan disebut ose atau inoculating loop/transfer loop, dan yang berbentuk lurus disebut inoculating needle/Transfer needle. Inoculating loop cocok untuk melakukan streak di permukaan agar, sedangkan inoculating needle cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (stab inoculating).

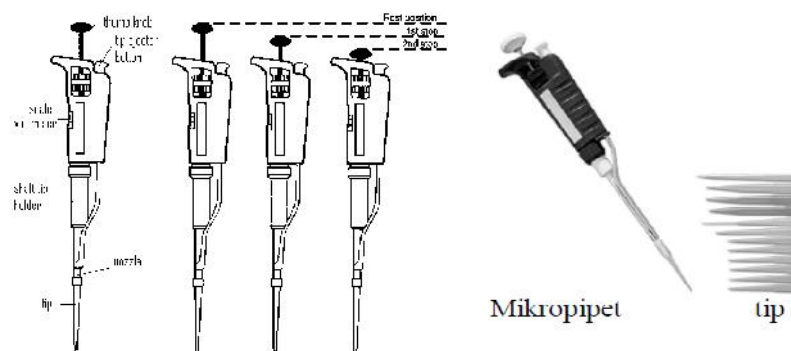
Erlenmeyer, gelas Beaker dan gelas ukur



Erlenmeyer (a) berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan yang. Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Gelas Beaker (b) merupakan alat yang memiliki banyak fungsi, pada mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media, menampung akuades dll. Gelas ukur (c) berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan (d).

Mikropipet dan Tip

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan/mengambil cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μl . Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1 μl sampai 20 μl , atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (*fixed volume pipette*) misalnya mikropipet 5 μl . dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip



Cara Pemakaian :

1. Sebelum digunakan, thumb knob sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
2. Masukkan tip bersih ke dalam nozzle / ujung mikropipet.

3. Tekan thumb knob sampai hambatan pertama / *first stop*, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
4. Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
5. Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari thumb knob maka cairan akan masuk ke tip.
6. Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
7. Tekan thumb knob sampai hambatan kedua / *second stop* atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
8. Jika ingin melepas tip putar thumb knob searah jarum jam dan ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.

Mortar dan Penumbuk / Pastle



Mortar dan penumbuk (pastle) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal : daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.

Tulis fungsi alat-alat yang telah anda kenal pada Tabel 1 berikut :

Hasil Pengamatan

Tabel 1. Hasil pengenalan fungsi alat-alat

No	Gambar Alat	Nama Alat	Fungsi
1			
2			
3			
4			

Lanjutan

No	Gambar Alat	Nama Alat	Fungsi
5			
6			
7			
8			
9			
10			

lanjutan

No	Gambar Alat	Nama Alat	Fungsi
11			
12			
13			
14			
15			

MATERI II

STERILISASI ALAT

Kompetensi : mahasiswa mengetahui dan memahami prinsip kerja sterilisasi alat, medium dan dapat melakukan sterilisasi alat, media dan melakukan kerja aseptis.

Pendahuluan

Perlakuan mikroba di laboratorium memerlukan laboratorium memerlukan suatu persiapan yaitu sterilisasi alat dan media tumbuh. Sterilisasi yaitu proses atau kegiatan membebaskan alat atau benda dari semua mikroba. Sterilisasi dibedakan menjadi 3 cara yaitu : secara mekanik, fisik dan kimiawi. Sterilisasi secara mekanik (filtrasi) menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil ($0.22\ \mu$ atau $0.45\ \mu$) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik. Sterilisasi secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran.

1. Pemanasan

- a. Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat pada api secara langsung, contoh : jarum inokulum, pinset, batang L.
- b. Panas kering : sterilisasi menggunakan oven ($170-180^{\circ}\text{C}$) selama 1,5-2 jam. Proses sterilisasi panas kering terjadi melalui mekanisme konduksi panas. Panas akan diabsorpsi oleh permukaan luar alat yang disterilkan, lalu merambat ke bagian dalam permukaan sampai akhirnya suhu untuk sterilisasi tercapai. Pada sterilisasi panas kering, pembunuhan mikroba terjadi melalui mekanisme oksidasi sampai terjadi koagulasi protein sel. Sterilisasi menggunakan cara ini kurang efektif dalam untuk membunuh mikroba sehingga memerlukan suhu yang lebih tinggi dan waktu yang lebih panjang. Sterilisasi panas kering umumnya digunakan untuk alat yang terbuat dari kaca misal : Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan Petri
- c. Uap air panas bertekanan : sterilisasi menggunakan autoclave (121°C , tekanan 1,5-2 atm, 15-20 menit). Pada saat melakukan sterilisasi uap bertekanan, sebenarnya dari uap jenuh pada tekanan tertentu selama waktu dan suhu tertentu pada suatu objek terjadi pelepasan energi uap yang mengakibatkan denaturasi atau koagulasi protein sel mikroba sehingga melemahkan aktivitas mikroba. Selain itu, sterilisasi menggunakan autoclave merupakan cara yang paling baik karena uap air panas dengan tekanan tinggi menyebabkan penetrasi uap air ke dalam sel-sel mikroba menjadi optimal sehingga langsung mematikan mikroba. Sterilisasi ini digunakan

untuk alat yang terbuat dari kaca dan bahan/media misal : Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan Petri, PDA, NA.

2. Penyinaran dengan UV

Sinar Ultra Violet juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan LAF. disterilkan dengan cara disinari lampu UV.

3. Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan antara lain alkohol.

STERILISASI ALAT

Cara kerja :

1. Semua alat dari kaca yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun dan dibilas air mengalir sampai bersih selanjutnya dikeringkan.
2. Setelah kering, untuk cawan Petri dibungkus kertas sampul coklat, tabung reaksi dan Erlenmeyer disumbat kapas / aluminium foil / tutup karet. Tahapan ini dilakukan dengan tujuan mengurangi kontaminan yang masuk ke cawan Petri, tabung reaksi dan Erlenmeyer.
3. Semua alat yang telah siap disterilkan menggunakan autoclave dan oven dengan cara kerja seperti diuraikan pada materi I yaitu cara pemakaian autoclave dan oven.

Selain sterilisasi alat dan media, pada prosedur kerja mikrobiologi dikenal teknik aseptik yang bertujuan untuk mengurangi keberadaan mikroba kontaminan. Teknik aseptik digunakan setiap akan melakukan pekerjaan yang berhubungan dengan mikroba seperti menyemprot seluruh bagian dalam LAF menggunakan alkohol 70%, memijarkan jarum Ose ketika akan digunakan di atas lampu Bunsen, memutar cawan Petri saat dibuka dan mulut tabung reaksi saat dibuka sebelum atau sesudah digunakan di dekat lampu Bunsen.

MATERI III

MEDIA PERTUMBUHAN MIKROBA

Kompetensi : mahasiswa mengetahui komposisi media dan cara membuat media Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dekstrosa, Nutrient Agar (NA)

Pendahuluan

Media pertumbuhan mikroba adalah suatu bahan yang mengandung komponen atau nutrisi yang diperlukan mikroba untuk pertumbuhannya. Mikroba memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Dengan media pertumbuhan dapat dilakukan isolasi mikroba menjadi kultur murni. Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P; unsur mikro seperti Fe, Mg, juga mengandung sumber karbon, protein dan vitamin. Sumber karbon dan energi yang diperoleh antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik. Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain, vitamin.

Selain itu, media tumbuh mikroba juga dibedakan berdasar sifat fisik yaitu media padat, setengah padat dan cair. Media padat yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat, media setengah padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, media cair yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (Nutrient Broth), LB (Lactose Broth). Media tumbuh mikroba juga dibedakan menjadi media sintesis yaitu media yang komposisinya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya Glucose Agar, Mac Conkey Agar. Media semi sintesis yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya PDA. Media non sintesis yaitu media komposisinya tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya Tomato Juice Agar.

Pembuatan Media

Media Potato Dekstrosa Agar (PDA)

Bahan : 250 g kentang (potato), 20 g dekstrosa, 15-18 g agar-agar, 1000 ml aquades, label

Alat : gelas Beaker, Erlenmeyer, timbangan analitik, autoclave

Cara membuat :

1. Kupas kentang dan iris menjadi bentuk dadu kecil-kecil dan timbang sebanyak 250 g.
2. Tuang 1000 ml aquades ke gelas Beaker selanjutnya masukkan irisan kentang dan rebus sampai lunak.

3. Saring ekstrak menggunakan kertas saring/saringan dan tampung menggunakan gelas Beaker.
4. Tambahkan aquades sampai volume mencapai 1000 ml kembali.
5. Masukkan 15 g agar-agar, aduk dan larutkan sampai homogen.
6. Tambahkan 20 g dekstrosa, aduk dan larutkan sampai homogen lagi.
7. Atur pHnya menjadi 6-7 dengan menambahkan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N dan ukur dengan pH indikator universal.
8. Tuang media ke Erlenmeyer dan sterilkan menggunakan autoclave dengan cara kerja seperti diuraikan pada materi I.

Media Nutrient Agar (NA)

Bahan : 20 g nutrient agar, 1000 ml aquades, label

Alat : gelas Beaker, Erlenmeyer, timbangan analitik, autoclave

Cara membuat :

1. Tmbang 23 g NA, larutkan dalam 1000 ml aquades dan aduk sampai homogen,
2. Tuang ke Erlenmeyer dan atur pHnya menjadi 6-7 dengan menambahkan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N dan ukur dengan pH indikator universal.
3. Sterilkan mediua menggunakan autoclave dengan cara kerja seperti diuraikan pada materi I.

Media Potato Dekstrosa

Bahan : 250 g kentang (potato), 20 g dekstrosa, 1000 ml aquades, label

Alat : gelas Beaker, Erlenmeyer, timbangan analitik, autoclave

Cara membuat :

1. Kupas kentang iris menjadi bentuk dadu kecil-kecil dan timbang sebanyak 250 g.
2. Tuang 1000 ml aquades selanjutnya masukkan irisan kentang dan rebus sampai lunak.
3. Saring ekstrak menggunakan kertas saring/saringan dan tampung menggunakan gelas Beaker.
4. Tambahkan aquades sampai volume mencapai 1000 ml kembali.
5. Tambahkan dekstrosa, aduk dan homogenkan lagi.
6. Atur pHnya menjadi 6-7 dengan menambahkan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N dan ukur dengan pH indikator universal.
7. Tuang media ke Erlenmeyer dan sterilkan menggunakan autoclave dengan cara kerja seperti diuraikan pada materi I.

Amati keadaan semua media pada hari ke-1, 2 dan 3 setelah sterilisasi media, tulis datanya pada Tabel 2 dengan memberi tanda (+) pada kolom keadaan.

Hasil Pengamatan

Tabel 2. Hasil pengamatan sterilisasi media

No	Media	Pengamatan Hari Ke-	Keadaan (+)	
			Kontaminasi	Tidak Kontaminasi
1	PDA	1		
		2		
		3		
2	NA	1		
		2		
		3		
3	Potato Dekstrosa	1		
		2		
		3		

MATERI IV

ISOLASI MIKROBA

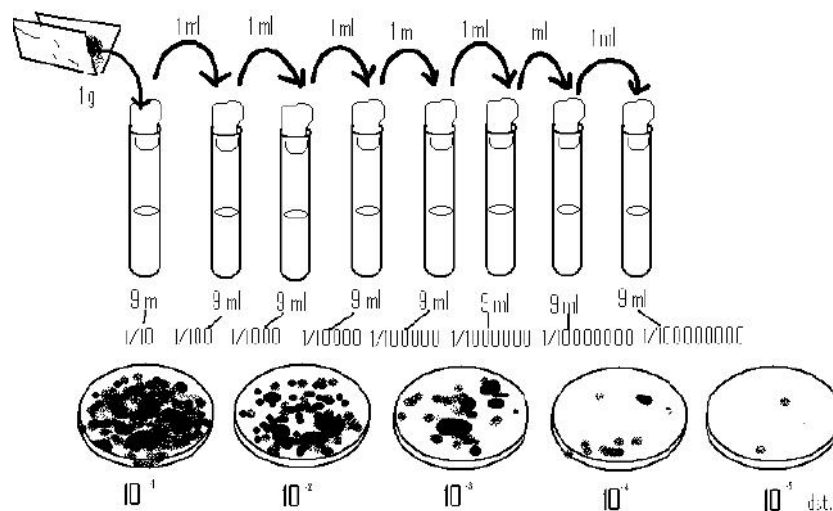
Kompetensi : mahasiswa dapat memisahkan mikroba dari biakan campuran sehingga diperoleh biakan murni

Pendahuluan

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai jenis. Di dalam laboratorium, populasi mikroba dapat diisolasi dari sumber / habitat seperti udara, tanah, air, makanan dan lainnya. Hasil isolasi umumnya merupakan biakan mikroba campuran dan perlu dimurnikan untuk memperoleh biakan murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat fisiologi dan biokimiawinya. Isolasi dapat dilakukan menggunakan beberapa teknik berikut :

1. 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 dari pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung $1/10$ sel mikroba dari pengenceran sebelumnya. Cara kerjanya sebagai berikut :

Sampel yang mengandung bakteri dimasukan 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. Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya sampai homogen. Pengocokan dilakukan dengan cara membenturkan tabung

ke telapak tangan sampai homogen. Diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan mikropipet kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa tip mikropipet yang digunakan harus selalu diganti.

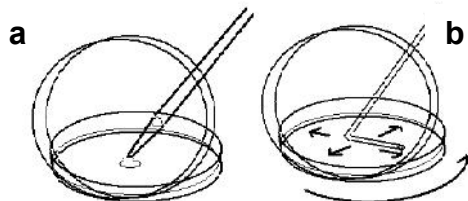
2. Teknik Penanaman

a. Teknik penanaman dari suspensi

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

a.1. Spread Plate (agar tabur ulas)

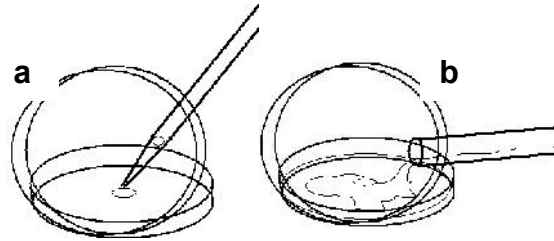
Teknik ini adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi (terutama bakteri) di permukaan media untuk memperoleh biakan murni. Adapun cara kerjanya sebagai berikut : ambil 0,1 ml suspensi menggunakan mikropipet kemudian teteskan di atas permukaan media yang telah memadat. Batang L diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik. Suspensi diratakan menggunakan batang L pada permukaan media supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar (**b**).



Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas menyebabkan sel mikroba mati karena panas.

a.2. Pour Plate (agar tuang)

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi (terutama bakteri) ke dalam cawan petri kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan pertumbuhan bakteri di permukaan dan di dalam agar media sehingga terdapat sel yang tumbuh. Adapun prosedur kerja yang dilakukan sebagai berikut : Siapkan cawan steril, suspensi yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ($\pm 45^{\circ}\text{C}$). Teteskan 1 ml secara aseptis suspensi sel ke dalam cawan kosong (**a**).



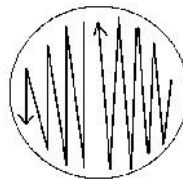
Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media (**b**), kemudian diinkubasi.

b. Teknik penanaman dengan goresan / streak

Teknik goresan ini mempunyai banyak variasi dan tujuannya untuk memperoleh biakan murni dari biakan campuran dan memperoleh koloni tunggal (terutama bakteri). Adapun beberapa teknik goresan ini sebagai berikut :

b.1. Goresan Sinambung

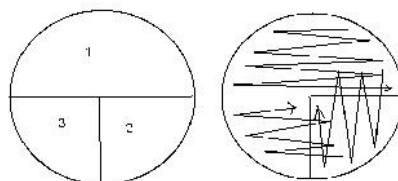
Cara kerja : sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar.



Jangan pijarkan loop, lalu putar cawan 180° lanjutkan goresan sampai habis.

b.2. Goresan T

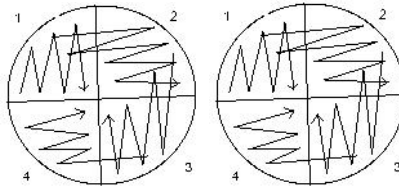
Cara kerja : bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker. Inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag. Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2. Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna.



Lakukan hal yang sama pada daerah 3.

b.3. Goresan Kuadran (streak quadran)

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 mikroba.



Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

Isolasi Mikroba

Sebelum melakukan isolasi dilakukan pengambilan sampel dengan cara berikut :

I. Sampel dari udara

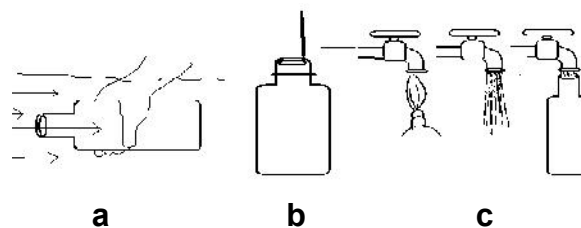
Buka cawan Petri yang telah berisi media PDA dan letakkan di kebun selama 5 menit. Tutup dan bungkus serta berli label. Inkubasikan pada suhu kamar/ruang.

II. Sampel dari tanah

Jika mikroorganisme yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah, maka cara pengambilannya bisa di sekitar rhizosfer (perakaran) yaitu dekat permukaan sampai ujung perakaran tanaman dengan kedalaman ± 10 cm.

III. Sampel air kolam

Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air (**a**). Bila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan menggunakan tali (**b**), jika ingin mengambil sampel dari air keran maka kran diaseptiskan menggunakan api Bunsen beberapa saat, air dialirkan beberapa saat kemudian ditampung dalam botol (**c**)



Bahan : mikroba hasil penangkapan mikroba dari udara, sampel dari tanah, sampel dari air kolam, media PDA (dalam cawan Petri), alkohol 70%, spiritus

Alat : LAF, jarum Ose, lampu Bunsen

I. Hasil penangkapan dari udara

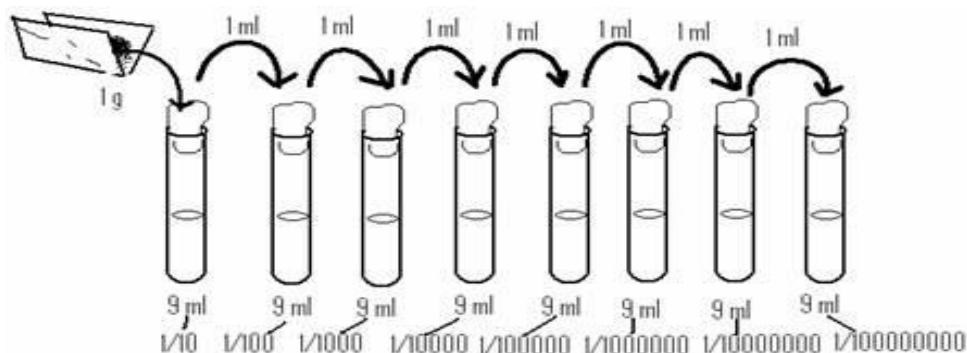
Cara kerja :

1. Siapkan media PDA dalam cawan Petri dengan menuang / plating 10 ml media ke cawan Petri, diamkan media memadat dan ulang dua (2) kali.
2. Pisahkan koloni jamur dan bakteri menggunakan tehnik aseptik di dalam LAF. Untuk koloni jamur, ambil 1 loop koloni menggunakan jarum Ose, inokulasikan pada media PDA baru, inkubasikan selama 3-5 hari pada suhu kamar (28°C). Untuk koloni bakteri, ambil 1 loop koloni menggunakan jarum Ose, inokulasikan pada media NA menggunakan teknik goresan / streak, inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar (28°C). Pada teknik goresan, pengambilan koloni dilakukan 1 kali dan selanjutnya setiap akan menggores jarum Ose diaseptiskan hingga pijar pada lampu Bunsen, didinginkan sejenak dengan tujuan mikroba yang menempel pada jarum Ose tidak mati.

II. Sampel dari tanah dan air kolam

Cara kerja :

1. Siapkan media PDA dalam cawan Petri dengan menuang / plating 10 ml media ke cawan Petri, diamkan media memadat dan ulang masing-masing dua (2) kali untuk isolasi mikroba dari tanah dan dua (2) kali untuk isolasi mikroba dari air.
2. Timbang 1 g tanah dan ambil 1 ml air kemudian lakukan pengenceran bertingkat sebagai berikut :



3. Masukkan sampel tanah ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis. Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9.
4. Larutkan dengan mengocoknya sampai homogen. Pengocokan dilakukan dengan cara membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Ambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan mikropipet kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama.

5. Ambil 1 ml suspensi dari tabung 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , inokulasikan pada media PDA menggunakan tehnik spread plate (agar tabur ulas) yaitu ambil 0,1 ml suspensi menggunakan mikropipet kemudian teteskan di atas permukaan media yang telah memadat.
6. Ambil batang L kemudian disemprot alkohol dan dibakar di atas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
7. Ratakan suspensi menggunakan batang L pada permukaan media supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.
8. Inkubasikan pada suhu kamar (28°C). Amati jenis mikroba yang tumbuh dengan memberi tanda (+) pada jenis mikroba yang tumbuh dan isi Tabel 3.

Hasil Pengamatan

Tabel 3. Hasil isolasi mikroba

No	Sumber Isolasi	Ul	Jumlah koloni mikroba yang tumbuh			Keterangan
			Jamur	Bakteri	Lainnya	
1	Penangkapan dari udara	1				
		2				
2	Sampel dari tanah	1				
		2				
3	Sampel dari air kolam	1				
		2				

MATERI V

PEMURNIAN DAN PENGENALAN KOLONI

Kompetensi : mahasiswa dapat melakukan pemurnian mikroba dan mengenal perbedaan bentuk koloni jamur dan bakteri

Pendahuluan

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai jenis. Di dalam mikroba dari berbagai habitat dapat diisolasi dan dimurnikan menjadi biakan murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat fisiologi, biokimiawi dan dapat diidentifikasi jenisnya. Pemurnian mikroba umumnya dilakukan dengan memindahkan mikroba dari biakan campuran ke media tumbuh yang baru.

Pemurnian mikroba

Bahan : biakan campuran mikroba hasil isolasi, media PDA (dalam cawan Petri), media NA (dalam cawan Petri dan dalam tabung reaksi), alkohol 70%, spiritus

Alat : LAF, jarum Ose, lampu Bunsen

Cara kerja :

1. Siapkan media PDA dengan menuang / plating 10 ml media dalam cawan Petri, 10 ml media NA dalam cawan Petri dan 5 ml dalam tabung reaksi untuk bentuk media miring dengan kemiringan $\pm 45^0$, masing-masing diulang dua (2) kali.
2. Lakukan pemurnian secara aseptik di dalam LAF

Pemurnian jamur :

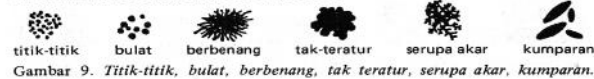
1. Ambil koloni menggunakan jarum Ose kemudian inokulasikan ke media PDA dalam cawan Petri.
2. Inkubasikan selama 3-5 hari pada suhu kamar (28^0C).
3. Amati warna jamur yang tumbuh dengan memberi tanda (+/-), warna koloninya dan isi Tabel 4.

Pemurnian bakteri :

1. Ambil koloni menggunakan jarum Ose kemudian goreskan pada media NA dalam cawan Petri menggunakan goresan sinambung atau T seperti dijelaskan pada materi IV.

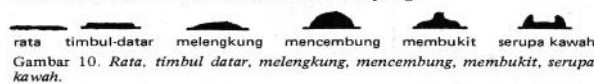
2. Goreskan pula pada media miring dengan cara menggerakkan jarum Ose yang telah membawa koloni bakteri dari arah bawah tabung ke arah mulut tabung.
3. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar (28°C).
4. Amati hasil pemurnian yaitu bentuk, permukaan, tepi koloni, menggunakan panduan berikut dan isi Tabel 4.

1. Bentuk koloni; dilihat dari atas.



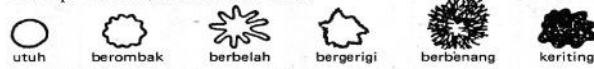
Gambar 9. Titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, kumparan.

2. Permukaan koloni, dilihat dari samping.



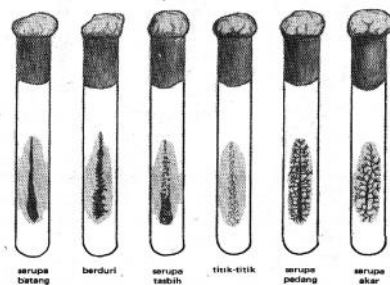
Gambar 10. Rata, timbul datar, melengkung, mencembung, membukit, serupa kawah.

3. Tepi koloni, dilihat dari atas.



Gambar 11. Utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.

4. Bentuk koloni pada agar-agar miring:



Gambar 12. Bentuk koloni serupa pedang, berduri, serupa tasbih, titik-titik, serupa batang, serupa akar.

Hasil Pengamatan

Tabel 4. Hasil pemurnian mikroba

No	Biakan pada media	Ul	Jenis mikroba				Keterangan
			Bakteri		Jamur		
			bentuk	Permukaan	tepi	warna	warna
1	PDA (cawan Petri)	1					
		2					
2	NA (cawan Petri)	1					
		2					
3	NA (tabung reaksi)	1					
		2					

MATERI VI

MORFOLOGI JAMUR DAN KHAMIR

Kompetensi : mahasiswa mengetahui morfologi jamur

Pendahuluan

Jamur merupakan salah satu kelompok mikroba yang mempunyai perkembangbiakan seksual dan aseksual, mempunyai miselium, mempunyai variasi bentuk spora dan konidia. Morfologi jamur seperti miselium, spora, konidia dapat diamati secara mikroskopis. Morfologi jamur juga menjadi salah satu karakteristik atau ciri yang dapat digunakan untuk identifikasi jamur.

Morfologi jamur dan khamir

Bahan : biakan murni jamur umur 3-5 hari, alkohol 70%, spiritus

Alat : jarum Ose, lampu Bunsen, gelas benda (obyek glass), gelas penutup (cover glass), mikroskop

Cara kerja :

1. Siapkan mikroskop, biakan murni jamur dan khamir umur 3-5 hari, gelas benda, gelas penutup.
2. Tetesi gelas benda dengan metilen blue atau lactophenol blue, ambil sedikit koloni dan letakkan pada gelas benda tersebut, tutup menggunakan gelas penutup, dijaga supaya tidak terbentuk gelembung udara.
3. Lakukan semua cara kerja secara aseptik.
4. Amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kecil bila telah tampak amati dengan perbesaran besar.
5. Foto hasil pengamatan dan tempel pada Tabel 5.

Hasil Pengamatan

Tabel 5. Hasil pengamatan morfologi jamur dan khamir

No	Gambar dan keterangan
1	

MATERI VII

MORFOLOGI BAKTERI

Kompetensi : mahasiswa mengetahui morfologi bakteri

Pendahuluan

Bakteri merupakan salah satu kelompok mikroba yang memperbanyak diri secara biner atau binary fussion, mempunyai bentuk dasar basil, kokus, spiral dengan bentuk variasinya seperti diplobasil, streptobasil, diplokokus, streptokokus dan lainnya. Morfologi bakteri juga menjadi salah satu karakteristik atau ciri yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri.

Morfologi bakteri

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus

Alat : LAF, jarum Ose, lampu Bunsen, gelas benda cekung (concave obyek glass), gelas penutup (cover glass), mikroskop

Cara kerja :

1. Siapkan mikroskop, biakan murni bakteri umur 24 jam, gelas benda cekung, gelas penutup.
2. Tetesi gelas benda dengan air steril, ambil sedikit koloni dan letakkan pada gelas benda tersebut, tutup menggunakan gelas penutup.
3. Lakukan semua cara kerja secara aseptik.
4. Amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kecil bila telah tampak amati dengan perbesaran 10x100 (1000x).
5. Foto hasil pengamatan dan tempel pada Tabel 6.

Hasil Pengamatan

Tabel 6. Hasil pengamatan morfologi bakteri

No	Gambar dan keterangan
1	

MATERI VIII

PENGUJIAN SIFAT FISILOGI DAN BIOKIMIA MIKROBA

Kompetensi : mahasiswa mengetahui sifat fisiologi dan biokimia mikroba, mampu melakukan beberapa uji fisiologi dan biokimia mikroba

Pendahuluan

Mikroba merupakan organisme yang mempunyai sifat fisiologi dan biokimia tertentu di dalam metabolismenya. Kedua sifat tersebut dapat digunakan untuk identifikasi mikroba. Adapun beberapa sifat fisiologi dan biokimia yang umum dilakukan ialah uji Gram yang dilakukan menggunakan pewarnaan Gram dan KOH 3%, uji katalase, uji oksidase, uji oksidatif fermentatif, uji hidrolisa pati, uji hidrolisa gelatin, uji motilitas dan masih banyak yang lainnya.

Pewarnaan Gram

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus, larutan pewarna kristal violet (Gram A), larutan yodium (Gram B), larutan alkohol 96% (larutan pencuci/Gram C), larutan safranin (pewarna D), air steril

Alat : jarum Ose, lampu Bunsen, gelas benda (obyek glass), gelas penutup (cover glass), mikroskop, botol semprot

Cara kerja :

1. Siapkan mikroskop, biakan murni bakteri umur 24 jam, gelas benda, gelas penutup.
2. Buat suspensi bakteri dari biakan murni bakteri umur 24 jam.
3. Cuci gelas benda dengan alkohol 70%. Ambil 1 loop jarum Ose suspensi bakteri dan ratakan pada gelas benda kemudian fiksasi di atas lampu Bunsen.
4. Teteskan 2-3 tetes Gram A, diamkan selama 1 menit. Cuci menggunakan air steril mengalir dan keringkan.
5. Teteskan 2-3 tetes Gram B, diamkan selama 1 menit. Cuci menggunakan air steril mengalir dan keringkan.
6. Teteskan 2-3 tetes Gram C diamkan selama 30 detik. Cuci menggunakan air steril mengalir dan keringkan.
7. Teteskan 2-3 tetes Gram D, diamkan selama 1 menit. Cuci menggunakan air steril mengalir dan keringkan.

8. Amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 (1000x).
9. Lakukan cara kerja secara aseptik. Foto hasil pengamatan dan tempel pada Tabel 7 atau catat hasilnya (bakteri berwarna ungu termasuk Gram positif, bakteri berwarna merah termasuk Gram negatif).

Uji KOH 3%

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus, larutan KOH 3%

Alat : jarum Ose, lampu Bunsen, gelas benda (obyek glass)

Cara kerja : siapkan biakan murni bakteri umur 24 jam, gelas benda. Cuci gelas benda dengan alkohol 70%. Teteskan 2 tetes larutan KOH 3% pada gelas benda dan ambil 1 loop jarum Ose koloni bakteri. Aduk secara merata dengan jarum Ose dan angkat jarum Ose untuk mengamati terbentuknya lendir). Lakukan cara kerja secara aseptik. Bila terbentuk lendir mengindikasikan bakteri Gram negatif, bila tidak terbentuk lendir mengindikasikan bakteri Gram positif. Foto hasil pengamatan dan tempel pada Tabel 7 atau catat hasilnya.

Uji Katalase

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus, H₂O₂ 3%

Alat : jarum Ose, lampu Bunsen, gelas benda (obyek glass)

Cara kerja : siapkan biakan murni bakteri umur 24 jam, gelas benda. Cuci gelas benda dengan alkohol 70%. Teteskan 2 tetes H₂O₂ 3% pada gelas benda yang bersih. Ambil 1 loop jarum Ose biakan bakteri, oleskan pada gelas benda yang sudah ditetesi H₂O₂ 3%. Campur suspensi secara perlahan menggunakan jarum Ose. Lakukan cara kerja secara aseptik. Hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung. Foto hasil pengamatan dan tempel pada Tabel 7 atau catat hasilnya.

Hasil Pengamatan

Tabel 7. Hasil pengamatan fisiologi dan biokimia mikroba

No	Gambar dan Keterangan
1	Pewarnaan Gram
2	Uji KOH 3%
3	Uji Katalase

MATERI IX

PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP MIKROBA

Kompetensi : mahasiswa mengetahui pengaruh lingkungan terhadap pertumbuhan mikroba

Pendahuluan

Mikroba dalam aktivitasnya dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan, salah satunya adalah faktor abiotik yang meliputi : suhu, kelembapan, cahaya, pH dan nutrisi. Suhu berpengaruh terhadap pertumbuhan dan mikroba dibedakan menjadi tiga kelompok berdasar suhu yang mempengaruhi pertumbuhan yaitu psikrofil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 0-30⁰C, mesofil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 15-45⁰C, termofil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 40-75⁰C. Selain suhu, faktor pH juga mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan mikroba dibedakan menjadi tiga kelompok berdasar pH yaitu mikroba asidofil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada pH 2,0-5,0, mikroba mesofil (neutrofil) adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada pH 5,5-8,0 dan mikroba alkalifil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada pH 8,4-9,5.

Pengaruh suhu

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, media potato dekstrosa (tabung reaksi), alkohol 70%, spiritus

Alat : LAF, jarum Ose, lampu Bunsen, termometer

Cara kerja :

1. Siapkan media potato dekstrosa (tabung reaksi).
2. Inokulasikan 1 loop jarum Ose biakan murni bakteri, lakukan inokulasi secara aseptik dalam LAF.
3. Perlakukan biakan tersebut pada suhu kamar/ruang, suhu rendah (dalam almari es), suhu tinggi (dalam oven/inkubator). Ukur suhu pada masing-masing tempat perlakuan menggunakan thermometer dan catat suhu masing-masing tempat perlakuan.
4. Amati pertumbuhan bakteri pada jam ke-24 setelah perlakuan dengan indikator kekeruhan media. Catat hasilnya dengan memberi tanda (+) dan tulis pada Tabel 8.

Pengaruh pH

Bahan : biakan murni bakteri umur 24 jam, media potato dekstroza (tabung reaksi), alkohol 70%, spiritus, larutan HCl 1 N, larutan NaOH 1 N

Alat : LAF, jarum Ose, lampu Bunsen, pH indikator universal

Cara kerja :

1. Siapkan media potato dekstroza (tabung reaksi).
2. Atur pH media dengan menambahkan larutan HCl 1 N untuk memperoleh pH 5,0; larutan NaOH 1 N untuk memperoleh pH 8,0; untuk pH 7,0 media tidak ditambah larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N dan ukur pH menggunakan pH indikator universal.
3. Inokulasikan 1 loop jarum Ose biakan murni bakteri, lakukan inokulasi secara aseptik dalam LAF.
4. Amati pertumbuhan bakteri pada jam ke-24 setelah perlakuan dengan indikator kekeruhan media. Catat hasilnya dengan memberi tanda (+) dan tulis pada Tabel 8.

Hasil Pengamatan

Tabel 8. Hasil perlakuan suhu dan pH terhadap mikroba

No	Perlakuan suhu	Pertumbuhan Mikroba	Perlakuan pH	Pertumbuhan mikroba	Keterangan
1	Ruang/kamar (.....)		5,0		
2	Almari es (.....)		7,0		
3	Inkubator/oven (.....)		8,0		

MATERI X

PENGAMATAN *Rhizobium* sp.

Kompetensi : mahasiswa mengetahui bentuk-bentuk *Rhizobium* sp.

Pendahuluan

Rhizobium sp. adalah bakteri berbentuk basil, Gram negatif, dan penghuni tanah, bersifat aerob, koloninya berwarna putih, merupakan penambat nitrogen yang hidup di dalam tanah dan berasosiasi simbiotik dengan sel akar tanaman legume. Bakteri ini masuk melalui bulu-bulu akar tanaman. Bakteri ini hidup dalam sel-sel akar dan memperoleh makanannya dari sel-sel tersebut. Biasanya hidup bersama dengan beberapa spesies *Actinomycetes*.

Rhizobium sp. tidak dapat menghidrolisis selulose, tumbuh dalam bintil akar, mengambil nitrogen langsung dari udara, Baik bakteri maupun legum tidak dapat menambat nitrogen secara mandiri, bila *Rhizobium* tidak ada dan nitrogen tidak terdapat dalam tanah legum tersebut akan mati. Bakteri *Rhizobium* hidup dengan menginfeksi akar tanaman legum dan berasosiasi dengan tanaman tersebut, dengan menambat nitrogen.

Bahan : bintil akar tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris*) atau kacang hijau (*Vigna radiata*) atau kacang tanah (*Arachis hypogaea*), alkohol 70%, H₂O₂, aquades, pewarna karbol fauchsin..

Alat : gelas benda, mikroskop, lampu Bunsen, silet, pinset, cawan Petri, botol semprot.

Cara kerja :

1. Sterilkan bintil akar dengan merendamnya ke dalam alkohol 70% selama 10 detik, H₂O₂ selama 3 menit, dan aquades selama 5 menit.
2. Sayat tipis, letakkan pada gelas benda, tekan perlahan, dan dikeringanginkan.
3. Fiksasi dengan melewati di atas api Bunsen.
4. Warnai dengan karbon Fuchsin selama 5 detik, kemudian cuci dengan aquades mengalir secara perlahan dan keringkan.
5. Amati menggunakan mikroskop dan gambar pada Tabel 8 berikut :

Tabel 8. Hasil pengamatan morfologi bakteri

No	Gambar dan keterangan
1	

PUSTAKA

- Cappuccino, J.G., Sherman, N. 1987. Microbiology : A Laboratory Manual. The Benjamin Cummings Publ. Comp., Inc. California.
- Case, C.L., Johnson, T.R. 1984. Laboratory Experiments in Microbiology. The Benjamin Cummings Publ. Comp., Inc. California.
- Harley, J.P. and L.M. Prescott. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Ed. The McGraw Hill Companies. New York.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, Suhadi, D., Soesanto. 1980. Pedoman Mikrobiologi Umum. Depart. Mikrobiologi. Fak. Pertanian. UGM. Yogyakarta.
- Moat, A.G., Foster, J.W. 1979. Microbial Physiology. John Wiley & Sons
- Rusmiati, D., Sulistianingsih, T. Milanda, S. Agung. 2009. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi. Unpad. Bandung.
- Tim Asisten. 2008. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar. Laboratorium Mikrobiologi Fak. Biologi. Unsoed. Purwokerto
- Tim Asisten. 2014. Modul Praktikum Mikrobiologi Lingkungan. Lab. Teknik Sumberdaya Alam dan Lingkungan. Progd. Teknik Sumberdaya Alam dan Lingkungan. Jur. Keteknikan Pertanian. Fak. Teknologi Pertanian. UB. Malang.
- Tortora, G. J. 1992. Microbiology an Introduction. 4th Ed. The Benjamin Cummings Publ. Comp., Inc. California.
- Suriani, S., Soemarno, Suharjono. 2013. Pengaruh suhu dan pH terhadap laju pertumbuhan lima isolat bakteri anggota genus *Pseudomonas* yang diisolasi dari ekosistem sungai tercemar deterjen di sekitar kampus Universitas Brawijaya. J-PAL. 3 (2) : 58-62.