

**PENUNTUN PRAKTIKUM
BAKTERIOLOGI II**



Disusun oleh:

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BINAWAN**

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Bahan Ajar : Penuntun Praktikum Bakteriologi II
Matakuliah : Bakteriologi II
Kode Matakuliah/SKS : TLM 2011429/4 SKS (1 T, 3 P)
Nama Penulis : Dian Rachma Wijayanti
NIP/ NIDN : 0321088304
Program Studi : **Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis**

Jakarta, 07-Februari-2023

Menyetujui,

Ka. Prodi DIV Teknologi Laboratorium Medis



Nicolaus Sri Widada, S.Pd., M.Kes
NIDN. 0315126603

Penyusun



Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.
NIDN. 0321088304

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Teknologi



Dr. Mia Srimati, S.Gz. M.Si.
NIDN. 309078903

SURAT TUGAS

No. 017c/ST/UBN.FIKT/II/2023

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Dr. Mia Srimati, S.Gz.,M.Si**
Jabatan : **Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan & Teknologi**

Memberikan tugas kepada :

Nama : Dian Rachma Wijayanti, S.Si ,M.Sc
Jabatan : Dosen Program Studi Teknologi Laboratorium Medis
Maksud Kegiatan : Membuat Penuntun Praktikum Bakteriologi II
Tanggal Kegiatan : Februari 2023

Surat Tugas ini diberikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya dan agar menyampaikan laporan hasil kegiatan secara tertulis.

Demikian agar menjadi maklum dan diharapkan dukungan seperlunya bagi pihak terkait.

Jakarta, 01 Februari 2023
Fakultas Ilmu Kesehatan dan Teknologi
Universitas Binawan



Dr. Mia Srimati, S.Gz.,M.Si
Dekan

Tembusan:

1. Human Capital Universitas Binawan
2. Ka.Prodi TLM
3. Yang bersangkutan
4. Arsip

DAFTAR ISI

1. PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM MIKROBIOLOGI.....	6
A. Pendahuluan	6
B. Alat dan Fungsinya.....	6
C. Tujuan Praktikum	15
D. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	16
2. STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA MIKROBIOLOGIS	18
A. Pendahuluan	18
B. Tujuan Praktikum.....	22
C. Alat dan Bahan.....	22
D. Prosedur Praktikum.....	23
E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	24
3. PEWARNAAN SEDERHANA DAN PEWARNAAN NEGATIF.....	27
A. Pendahuluan	27
B. Tujuan Praktikum.....	29
C. Alat dan Bahan.....	29
D. Prosedur Praktikum.....	30
E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	33
4. PEWARNAAN GRAM BAKTERI	37
A. Pendahuluan	37
B. Tujuan Praktikum.....	38
C. Alat dan Bahan.....	38
D. Prosedur Praktikum.....	38
E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	40
5. PEWARNAAN TAHAN ASAM	44
A. Pendahuluan	44
B. Tujuan Praktikum.....	45
C. Alat dan Bahan.....	45
D. Prosedur Praktikum.....	45
E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	48
6. PEWARNAAN SPORA BAKTERI (SchaefferFulton).....	51
A. Pendahuluan	51
B. Tujuan Praktikum.....	52

C.	Alat dan Bahan.....	52
D.	Prosedur Praktikum.....	53
E.	Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	55
7.	PEWARNAAN KAPSUL	57
A.	Pendahuluan.....	57
B.	Tujuan Praktikum.....	58
C.	Alat dan Bahan.....	58
D.	Prosedur Praktikum.....	58
E.	Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	60
8.	PENANAMAN BAKTERI : TEKNIK BIAKAN MURNI	62
A.	Pendahuluan.....	62
B.	Tujuan Praktikum.....	64
C.	Alat dan Bahan.....	65
D.	Prosedur Praktikum.....	65
E.	Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	67
9.	IDENTIFIKASI <i>Staphylococcus aureus</i>	70
A.	Pendahuluan.....	70
B.	Tujuan Praktikum.....	71
C.	Alat dan Bahan.....	71
D.	Prosedur Praktikum.....	71
E.	Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	73
10.	IDENTIFIKASI <i>Escherichia coli</i>	77
A.	Pendahuluan.....	77
B.	Tujuan Praktikum.....	77
C.	Alat dan Bahan.....	78
D.	Prosedur Praktikum.....	78
	Uji MR-VP, Uji Indol dan UJI TSIA	79
E.	Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum	80
11.	IDENTIFIKASI <i>Salmonella sp.</i>	85
A.	Pendahuluan.....	85
B.	Tujuan Praktikum.....	85
C.	Alat dan Bahan.....	86
D.	Prosedur Praktikum.....	86

Uji MR-VP, Uji Indol dan UJI TSIA	87
12. IDENTIFIKASI <i>Pseudomonas sp.</i>	92
A. Pendahuluan	92
B. Tujuan Praktikum.....	92
C. Alat dan Bahan.....	93
D. Prosedur Praktikum.....	93
Uji MR-VP, Uji Indol dan UJI TSIA	94

1.PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATRIUM MIKROBIOLOGI

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Laboratorium mikrobiologi memiliki berbagai macam peralatan, dari peralatan berbahan kaca, kayu dan *stainless steel*. Peralatan ini juga ada yang manual dan ada yang bersifat elektronik. Peralatan laboratorium tentunya berbeda-beda sesuai dengan kebutuhan laboratorium tersebut. Pada laboratorium mikrobiologi tentunya peralatan yang ada berhubungan dengan kerja mikrobiologis. Peralatan ini tentunya memiliki fungsi dan bentuk yang beraneka ragam.

Praktikan laboratorium mikrobiologi harus mengetahui jenis dan fungsi alat-alat laboratoriaum yang tersedia di laboratorium tersebut. Oleh karenanya pengenalan alat laboratorium mikrobiologi menjadi hal yang penting bagi praktikan. Dengan mengenal alat dan fungsinya maka para praktikan dapat praktikum dengan baik dan terhindar dari kecelakaan di laboratorium tersebut.

B. Alat dan Fungsinya

Beberapa alat pada laboratorium mikrobiologi beserta prinsip kerja dan fungsinya adalah sebagai berikut:

1. Inkubator

Alat inkubator adalah alat yang digunakan untuk menyimpan biakan mikroorganisme. Alat ini diatur pada suhu tertentu agar mikroorganisme dapat tumbuh dengan maksimal. Prinsip kerja inkubator yaitu suatu ruangan tertutup dengan kondisi suhu dan kelembapan terkontrol. Inkubator dapat digunakan untuk inkubasi organisme uniseluler maupun multiseluler .



Gambar Inkubator

2. Autoklaf

Autoklaf merupakan peralatan sterilisasi basah yang digunakan untuk mensterilisasi medium, reagen, larutan kimia dan bahan lainnya yang tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi 121°C, 1 atm selama 15-20 menit. Keuntungan menggunakan alat ini

adalah dapat membunuh seluruh mikroba dengan cepat, dapat membunuh virus dan tidak ada absorbs seperti pada umumnya yang terjadi pada penggunaan filter. Kerugiannya antara lain dapat menurunkan pH.



a

b.

Gambar a. Autoklaf manual; b. Autoklaf otomatis

3. Oven

Oven adalah alat untuk mensterilkan alat-alat dari kaca yang digunakan dalam mikrobiologi, Prinsip kerja oven adalah menggunakan udara kering. Suhu 170-180°C. Lama sterilisasi yang dibutuhkan berkisar antara 1,5-2 jam. Prinsip kerja oven adalah mensterilkan alat dengan udara panas kering pada suhu tinggi dan waktu lama. Sebelum disterilkan beberapa peralatan harus dibungkus dulu dengan kertas, contohnya cawan petri harus dibungkus terlebih dahulu dengan kertas sebelum masuk ke oven.



Gambar Oven

4. Mikroskop

Alat ini adalah alat bantu untuk melihat struktur yang tidak terlihat dengan mata telanjang. Mikroskop cahaya dapat melihat struktur mikroorganisme berupa jamur, alga dan bakteri. Adapun virus dapat dilihat dengan bantuan mikroskop electron.

Mikroskop tersedia dalam berbagai macam jenis, sesuai dengan kebutuhan pengamatan yang diinginkan.



Gambar Mikroskop

5. Timbangan (Neraca) Analitik

Neraca Analitik (*Analytical Balances*) adalah jenis timbangan modern yang dirancang khusus untuk mengukur massa bersatuan kecil dengan tingkat ketelitian sangat tinggi dalam rentang sub-miligram. Neraca jenis ini mempunyai ketelitian hingga 0,001 gram (3 digit) dan 0,0001 gram (4 digit). Agar maksimal dalam mendukung fungsinya, sebuah timbangan analitik biasanya dilengkapi dengan komponen kotak (ruang) tertutup dan berpintu transparan sebagai pelindung angin.

Prinsip kerja timbangan neraca analitik adalah mengukur tekanan (gaya tolak) yang dibutuhkan untuk menghitung massa, bukan mengukur massa *real*. Prinsip kerja ini didukung dengan penerapan teknologi elektromagnetik pada alat agar dapat menghasilkan gaya tolak pada bahan yang ditimbang. Oleh karenanya, neraca analitik akan mengeluarkan hasil akhir yang kita butuhkan dari proses mengukur besarnya gaya tolak untuk membuat kondisinya menjadi setimbang.



Gambar Neraca analitik digital

6. *Biological Safety Cabinet*

Biological safety cabinet (BSC) adalah suatu area kerja laboratorium didesain khusus dengan ventilasi udara dan telah direkayasa untuk keamanan pekerja yang menggunakan sampel material dari kemungkinan bahaya terkontaminasi atau menimbulkan penyebaran bakteri, jamur atau virus yang bersifat pathogen. BSC ini sekilas mirip dengan lemari asam, namun pada lemari asam tidak memiliki penyaring berupa HEPA filter yang merupakan singkatan dari *high efficiency particulate air* [filter].



Gambar *Biological safety cabinet*

7. *Laminar airflow cabinet*

Alat ini adalah perangkat berventilasi mekanis yang mengeluarkan aliran udara satu arah dengan kecepatan yang terkontrol di seluruh ruang kerja yang ditentukan. Perangkat ini menyediakan zona udara 'bersih' bebas partikel di mana pekerjaan sensitif dapat dilakukan. Laminar airflow biasa digunakan untuk pekerjaan yang membutuhkan area steril seperti penuangan media mikrobiologis dan inokulasi. Cara penggunaannya biasanya sinar UV dinyalakan terlebih dahulu untuk sterilisasi permukaan. Kemudian setelahnya alkohol 70% disemprotkan.



Gambar Laminar Airflow Cabinet

8. *Colony Counter*

Alat ini berfungsi untuk mempermudah penghitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan. Selain dengan bantuan kaca pembesar, alat ini juga dilengkapi dengan skala (kuadran) yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni yang sangat banyak. Jumlah koloni pada cawan Petri dapat ditandai, dihitung secara otomatis serta dapat di-*reset*.



Gambar *Colony Counter*

9. *Vortex (Vorteks)*

Vortex atau *Vortex mixer* berkeja dengan mengubah energi listrik menjadi energi gerak. Tersusun atas motor mesin yang dialiri listrik dan memiliki poros penggerak (*drive shaft*) yang bersilasi dengan potongan karet (*mixing cup*). Motor mesin menggerakkan *drive shaft* dalam gerakan vertikal melingkar yang sangat cepat, sehingga menciptakan pusaran pada cairan yang akan dihomogenkan.

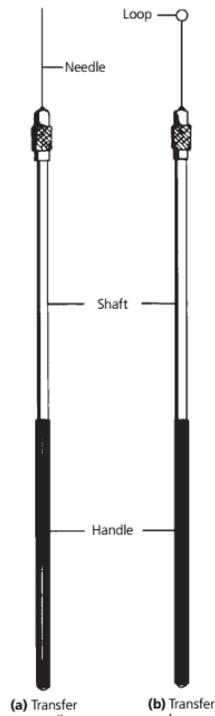


Gambar *Vortex mixer*

10. Jarum inokululum/ose

Merupakan alat untuk memindahkan biakan mikroba ke media tumbuh yang baru (Gambar). Jarum ose terdiri dari dua jenis jarum. Jarum ose tajam dan jarum ose bulat. Jarum ose tajam digunakan untuk menanam mikroba dengan cara tusuk

(*stabing inoculation*) pada agar tegak. Jarum ose bulat (*Loop*) digunakan untuk menanam mikroba dengan cara goresan (*streak*).



Gambar Jarum Ose

11. Cawan petri

Cawan Petri merupakan alat yang selalu berpasangan, bagian yang ukurannya agak kecil sebagai wadah dan yang lebih besar merupakan tutup. Keberadaan tutup dalam hal ini, untuk menghindari terjadinya kontaminasi terhadap mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam ruang cawan petri.

Cawan Petri memiliki warna bening transparan, sehingga memudahkan kita sebagai peneliti dalam melihat ataupun menghitung pertumbuhan mikroorganisme ataupun bakteri yang dibiakkan. Umumnya untuk menghitung kuantitatif jumlah koloni yang bakteri didalamnya, digunakan alat *Colony Counter*.



Gambar Cawan petri

12. Batang penyebar (*Spreader*)

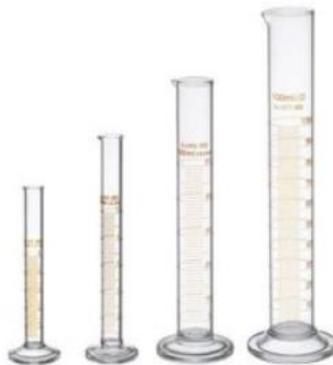
Batang penyebar atau dikenal juga dengan spreader dan Batang L merupakan alat untuk menyebarkan sel-sel mikroorganisme. Alat ini dapat digunakan pada sampel cair mikrobiologis saat akan disebar pada permukaan media di cawan petri.



Gambar Spreader

13. Gelas ukur (*Measuring cylinder*)

Gelas ukur berupa gelas tinggi, berdiameter besar dengan skala sepanjang dindingnya. Keberadaan skala berfungsi untuk mengetahui secara langsung jumlah volume larutan yang ditampung. Pada bagian bibir atas terdapat corot kecil atau paruh agar memudahkan dalam menuangkan atau memindahkan larutan dalam suatu gelas kimia ke wadah yang lain. Alat ini berfungsi sebagai alat ukur volume cairan yang tidak memerlukan ketelitian yang tinggi.



Gambar Gelas Ukur

14. Labu Erlenmeyer

Erlenmeyer atau dikenal juga dengan labu erlenmeyer adalah salah satu alat gelas laboratorium yang salah satu fungsinya untuk menjadi wadah dari bahan kimia cair. Gelas ini juga sering digunakan untuk proses titrasi untuk menampung larutan yang

akan digunakan. Pada laboratorium mikrobiologi erlenmeyer juga dapat digunakan untuk membuat media mikrobiologis dan untuk tempat pembiakan mikroba.



Gambar Erlenmeyer

15. *Beaker Glass*

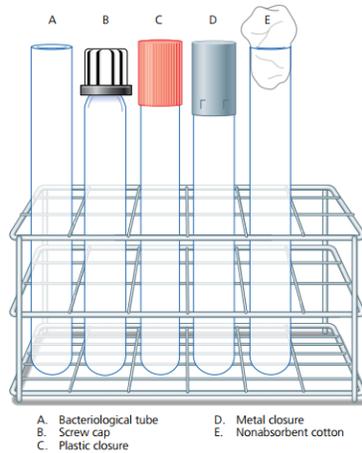
Beaker Glass atau dikenal juga dengan Gelas Kimia dan Gelas Piala berupa gelas tinggi, berdiameter besar dengan skala sepanjang dindingnya (Gambar). Skala bertujuan untuk mengetahui secara langsung jumlah volume larutan yang ditampung. Pada bagian bibir atas ditandai dengan keberadaan corot kecil atau paruh agar memudahkan dalam menuangkan atau memindahkan larutan dalam suatu gelas kimia ke wadah yang lain. Gelas kimia berfungsi sebagai wadah untuk menampung larutan sebelum atau setelah proses analisis dilakukan, Wadah untuk mencampur larutan untuk proses homogenisasi larutan, Serta wadah untuk memanaskan larutan, khususnya ketika menggunakan alat *Hotplate Stirrer*



Gambar *Beaker Glass* (Gelas Kimia)

16. Tabung reaksi

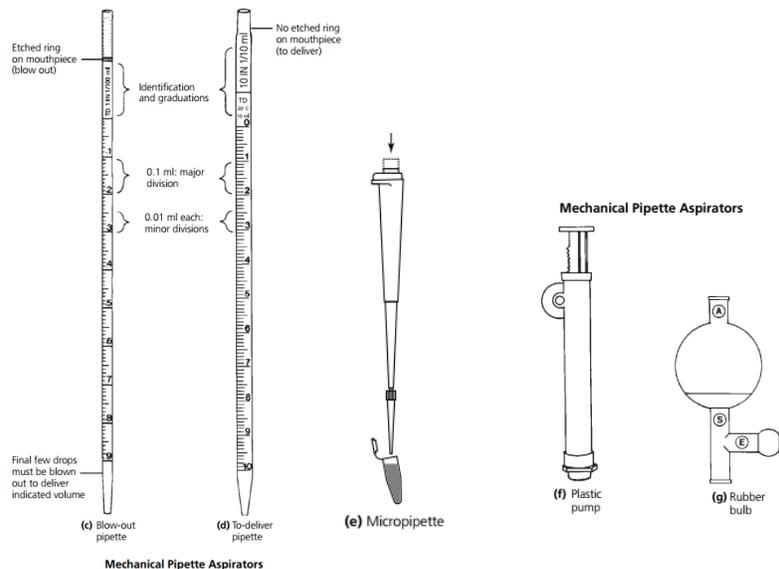
Tabung reaksi digunakan untuk mengkultur mikroba dan melakukan percobaan dengan berbagai medium serta uji-uji biokimiawi. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik, atau *aluminium foil*.



Gambar Tabung Reaksi

17. Pipet

Alat ini berfungsi untuk mentransfer suatu material secara aseptis. Pipet dapat terbuat dari kaca, gelas, maupun plastik. Pipet terdiri dari pipet makro dengan skala besar antara 1-10 mL dan pipet mikro yang berukuran 0.1 μL hingga 1000 μL . Dalam penggunaannya pipet makro harus dilengkapi dengan *rubber bulb*. Sedangkan untuk mikropipet dalam penggunaannya harus dilengkapi dengan tip.



Gambar Berbagai macam pipet dan aspirator

C. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui berbagai peralatan laboratorium mikrobiologi
2. Mahasiswa mengetahui fungsi peralatan laboratorium mikrobiologi
3. Mahasiswa dapat menggunakan berbagai peralatan laboratorium dengan baik dan benar

D. Alat dan Bahan

- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. Jarum ose bulat | 18. Gelas objek |
| 2. Jarum ose tajam | 19. Kaca penutup |
| 3. Cawan petri | 20. Timbangan analitik digital |
| 4. Batang penyebar (Spreader) | 21. Autoklaf |
| 5. Labu Erlenmeyer | 22. Inkubator |
| 6. <i>Beaker Glass</i> | 23. Oven |
| 7. Corong kaca | 24. <i>Hotplate Stirrer</i> |
| 8. Gelas ukur | 25. <i>Vortex</i> |
| 9. Gelar arloji | 26. Colony counter |
| 10. Tabung reaksi | 27. Gegep Kayu (Penjepit) Tabung Reaksi |
| 11. Rak tabung reaksi | 28. Lampu spiritus |
| 12. <i>Bulb</i> | 29. Kertas saring |
| 13. Pipet makro | 30. <i>Biosafety Cabinet (BSC)</i> |
| 14. Pipet mikro | 31. <i>Laminar Airflow Cabinet</i> |
| 15. Pipet tetes | 32. Lemari pendingin (<i>Refridgerator</i>) |
| 16. Pinset | |
| 17. Mikroskop | |

E. Prosedur Praktikum

1. Praktikan memperhatikan simulasi dan demonstrasi peralatan laboratorium mikrobiologi dan mencatat penjelasan mengenai cara kerja dan fungsi alat.
2. Praktikan mencoba menggunakan peralatan dengan benar sesuai dengan prinsip kerja dan fungsinya.

F. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

Nama : _____ Tanggal : _____

1. Tuliskan Prinsip Kerja Alat-alat pada Tabel di bawah ini

No	Alat	Prinsip Kerja
1	Inkubator	
2	Timbangan analitik	
3	Oven	
4	Autoklaf	
5	<i>Laminar Air Flow Cabinet</i>	

2. Gambar dan Tuliskan Lima Fungsi atau Prinsip Kerja Alat-alat Laboratorium Mikrobiologi

No	Alat	Prinsip Kerja
1		
2		
3		
4		
5		

2. STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA MIKROBIOLOGIS

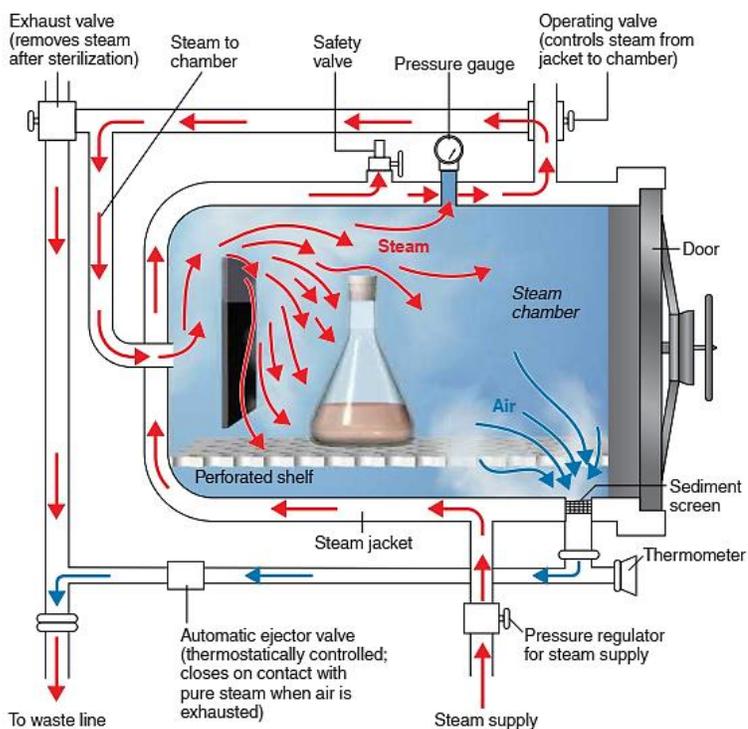
Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

A.1. Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu proses yang menghancurkan semua bentuk kehidupan. Hasil sterilisasi adalah keadaan “steril”. Keadaan steril adalah suatu keadaan bebas dari makhluk hidup¹. Pada laboratorium mikrobiologi saat melakukan praktikum ada kalanya kita membutuhkan kondisi steril. Agar suatu alat atau bahan yang akan kita gunakan steril maka kita harus melakukan sterilisasi pada alat atau bahan tersebut.

Terdapat beragam cara agar kita dapat mencapai kondisi steril. Sterilisasi berdasarkan caranya dibagi ke dalam metode fisik, metode kimia dan metode mekanik. Metode kimia menggunakan bahan kimia dalam proses sterilisasi. Metode mekanik menggunakan penyaringan (filtrasi). Bahan yang akan kita sterilkan berupa cairan atau gas yang dilalukan pada saringan. Sedangkan metode fisik menggunakan penyinaran dan pemanasan, yaitu panas lembab dan panas kering. Sterilisasi yang akan kita lakukan pada praktikum kali ini yaitu metode fisik dengan menggunakan pemanasan.



Gambar 18. Mekanisme sterilisasi panas lembab dengan autoklaf²



Gambar 19. Sterilisasi mekanik dengan filtrasi²

Sterilisasi dengan menggunakan pemanasan yang paling umum dilakukan adalah dengan langsung membakar, mengukus atau merebus objek yang akan kita sterilkan. Pada laboratorium mikrobiologi dan laboratorium dasar serta laboratorium kesehatan yang umumnya digunakan adalah metode panas kering dan panas lembab.

Sterilisasi panas kering

Sterilisasi panas kering dilakukan dengan memasukkan alat yang akan disterilkan ke dalam oven dengan suhu sekitar $\geq 170^{\circ}\text{C}$ selama minimal 2 jam atau disesuaikan dengan kebutuhan. Panas kering dapat digunakan pada alat dan bahan yang tahan panas. Peralatan dan bahan yang tidak tahan panas akan rusak jika disterilisasi dengan panas kering. Hal lainnya yang perlu diingat untuk sterilisasi panas kering tidak menggunakan air.

Sterilisasi panas lembab

Sterilisasi panas lembab dilakukan dengan memasukkan alat yang akan disterilkan ke dalam autoklaf. Autoklaf akan mensterilkan peralatan dan bahan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Dengan demikian maka dihasilkan panas dan uap air yang bertekanan. Pada sterilisasi panas lembab digunakan air, sehingga pada hasil akhir sterilisasi peralatan dan bahan akan menjadi basah karena adanya uap air. Sebelum memasukkan alat

dan bahan ke dalam autoklad biasanya dilakukan persiapan dengan membungkus atau menyumbat peralatan tersebut. Cawan biasanya dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas, Sedangkan wadah erlenmeyer dan tabung reaksi dapat disumbat dengan menggunakan kapas, kapas kemudian dibungkus lagi dengan plastik tahan panas atau *aluminium foil*.

A.2. Media mikrobiologis

Media mikrobiologis pada dasarnya mengandung air dan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme³. Nutrisi ini secara umum berupa sumber karbon, sumber mineral dan sumber gula dan lain sebagainya. Contoh zat nutrisi antara lain senyawa karbon, nitrogen, sulfur, fosfat dan lain-lain. Selain zat nutrisi media mikrobiologis apat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino dan vitamin. Apabila dibutuhkan maka media mikrobiologis dapat mengandung antibiotik dan antifungi.

Apabila kita ingin menumbuhkan kultur mikroorganisme tertentu, dari spesimen klinis tertentu. Kriteria apa yang harus dipenuhi media kultur?. Media yang digunakan hendaknya memenuhi persyaratan sebagai berikut: Pertama, harus mengandung nutrisi yang tepat untuk mikroorganisme tertentu yang kita inginkan untuk tumbuh. Kedua media juga mengandung kelembaban yang cukup, pH yang disesuaikan, serta tingkat oksigen yang sesuai. Ketiga media harus dalam keadaan sehingga yang dibiakkan hanya akan berisi mikroorganisme yang kita inokulasikan ke media. Keempat media yang diinokulasikan harus diinkubasi pada suhu yang tepat ².

- **Media berdasarkan bentuk**

Berdasarkan bentuknya media biakan yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme bisa berbentuk padat, semipadat dan cair. Media padat diperoleh dengan menambahkan agar. Agar yang digunakan sebagai pematat sebanyak 1,5-2%,

- **Media berdasarkan kandungan kimia**

Secara kimiawi, media biakan dibedakan menjadi media sintetis, nonsintetis (Alami) dan semi sintetis. Pada media sintetis kandungan dan isi bahan yang ditambahkan diketahui secara terperinci. Media sintetis digunakan untuk mempelajari sifat fisiologis dan genetik

mikroba. Senyawa anorganik dan organik yang ditambahkan dalam media harus murni, sehingga harganya seringkali mahal.

Media nonsintetis menggunakan bahan yang terdapat di alam yang biasanya tidak diketahui kandungan kimianya secara rinci. Contohnya media ekstrak daging (*beef extract*), ekstrak kentang, pepton, ekstrak ragi (*yeast extract*) dan kaldu daging. Terkadang ditambahkan darah, serum, vitamin, asam amino atau nukleosida. Media semi sintetis merupakan media yang mengandung bahan sintetis dan bahan alami. Contoh media jenis ini adalah *Blood agar plate* (Agar darah).

- **Media berdasarkan kegunaannya**

Media umum (universal)

Media ini digunakan secara umum artinya media ini dapat digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur misalnya *Nutrient agar* (NA). Sedangkan untuk jamur adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Media selektif

Media ini digunakan untuk memilih pertumbuhan mikroorganisme "terpilih" tertentu. Sebagai contoh jika mikroorganisme tertentu resisten terhadap antibiotik tertentu (misalnya, novobiocin), maka antibiotik tersebut dapat ditambahkan ke media untuk mencegah organisme lain yang tidak resisten tumbuh³. Media selektif sering kali juga berfungsi sebagai media diferensial. Contoh media selektif yaitu SSA (*Salmonella shigella agar*). SSA umumnya digunakan sebagai media khusus dalam isolasi cemaran bakteri *Salmonella* atau *Shigella* dari makanan maupun minuman yang tercemar. SSA merupakan media yang bersifat selektif dan diferensial.

Media diferensial

Media diferensial memungkinkan beberapa jenis bakteri yang berbeda untuk tumbuh, tetapi juga mengandung senyawa yang memungkinkan genera mikroorganisme pada level genus (atau bahkan spesies) dibedakan secara visual. Media diferensial memiliki senyawa tambahan. Mikroorganisme berinteraksi dengan senyawa tambahan (misalnya, darah, gula)

dan terjadi reaksi kimiawi sehingga bakteri dapat menjadi berbeda secara visual dengan bakteri lainnya pada cawan⁴.

Medium ini dapat ditumbuhi berbagai jenis mikroorganisme tetapi dapat memberikan salah satu ciri mikroorganisme tertentu yang khas sehingga dapat dibedakan dari yang lain dan dapat dipisahkan. Contoh media ini adalah *Eosine Methylene Blue Agar* (EMBA) merupakan media yang digunakan untuk membedakan *Escherichia coli* dengan bakteri gram negatif lain. Media *Pseudomonas Agar Base* (PAB) juga merupakan media yang bersifat selektif dan diferensial untuk *Pseudomonas aeruginosa*.

Media diperkaya (*enriched media*)

Media yang diperkaya, mengandung faktor pertumbuhan, vitamin, dan nutrisi penting lainnya untuk mendorong pertumbuhan organisme yang rumit (*fastidious*), organisme yang tidak dapat membuat nutrisi tertentu dan membutuhkannya untuk ditambahkan ke media⁵. Medium ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme untuk keperluan tertentu. Dibiakkan dalam medium ini supaya sel-sel mikroorganisme tertentu dapat berkembang dengan cepat sehingga diperoleh populasi yang tinggi. Contoh media ini adalah *Blood Agar* dan *Chocolate Agar*.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui dan mampu menjelaskan jenis-jenis sterilisasi serta konsep dan cara kerja sterilisasi
2. Mahasiswa mampu melakukan persiapan dan sterilisasi panas lembab dan panas kering
3. Mahasiswa mampu melakukan persiapan pembuatan media mikrobiologis
4. Mahasiswa mampu membuat media mikrobiologis

C. Alat dan Bahan

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Autoklaf | 8. Erlenmeyer |
| 2. Oven | 9. Cawan petri |
| 3. Media Bakteri (<i>Nutrient Agar</i>) | 10. Tabung reaksi |
| 4. Media Jamur (<i>Potato Dextrose Agar</i>) | 11. Gelas kimia |
| 5. Kertas HVS atau kertas sampul cokelat | 12. Plastik tahan panas |
| 6. Kapas | 13. Kapas |

7. Batang pengaduk

14. Karet gelang

D. Prosedur Praktikum

Prosedur Sterilisasi

1. Bungkus cawan petri dengan kertas HVS kemudian masukkan ke dalam plastik tahan panas. Alat gelas yang lain dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan atau plastik tahan panas.
2. Isilah autoklaf dengan aquades setinggi batas sarangan, masukkan alat dan bahan (media) yang akan disterilisasi.
3. Aturilah suhu sebesar 121°C, dengan tekanan 1 atm dan aturlah waktu yang akan digunakan sampai pada angka 15-20 menit.
4. Tutup autoklaf dan pastikan dalam kondisi terpasang rapat (LOCK).
5. Pastikan lubang uap dalam keadaan tertutup (EXHAUST CLOSE)
6. Tekan tombol power ke arah ON, lalu tekan tombol START (push) untuk memulai sterilisasi, apabila lampu merah menyala maka dapat dipastikan autoklaf dalam keadaan bekerja.
7. Setelah alarm berbunyi maka tarik tuas power hingga ke titik OFF kemudian bukalah lubang uap dengan cara memutarnya ke arah OPEN.
8. Diamkan autoklaf selama 15 menit atau lebih untuk memastikan bahwa uap telah keluar dan autoklaf dalam keadaan tidak panas.
9. Cek suhu dan tekanan sebelum membuka autoklaf, Setelah suhu dan tekanan turun (tekanan sudah 0 atm) bukalah tutup autoklaf dan keluarkan alat-alat yang telah steril

Prosedur Pembuatan Media

1. Timbang media sesuai kebutuhan (penghitungan jumlah mengacu pada takaran yang tertera pada kemasan)
2. Larutkan 20 gram (sesuaikan dengan hasil hitung) bubuk atau serbuk NA instan ke dalam 1000 ml akuades
3. Aduk hingga serbuk larut, panaskan diatas penangas ditunggu sampai mendidih (larutan terlihat jernih)
4. Dinginkan dan dituang pada cawan petri maupun tabung reaksi serta disterilisasi dengan autoklaf

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa yang dimaksud dengan sterilisasi?

2. Sebutkan jenis-jenis sterilisasi!

3. Mengapa suhu autoklaf harus mencapai 121°C?

4. Apa fungsi media mikrobiologis?

5. Mengapa mikroorganisme harus ditumbuhkan menggunakan media mikrobiologis?

6. Jelaskan tiga kriteria yang harus ada pada media mikrobiologis agar layak digunakan!

Referensi

1. Mahon, C. & Lehman, D. *A Textbook of Diagnostic Microbiology. American Speech* vol. 15 (2019).
2. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology an Introduction*. (Pearson Education, 2019). doi:LCCN 2017044147.
3. Prinzi, A. & Rohde, R. Why Differential & Selective Media Remain Invaluable Tools. <https://asm.org/Articles/2020/September/Why-Differential-Selective-Media-Are-Invaluable-To>.
4. Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D. & Khelaifia, S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* **34**, (2020).
5. Adrich, S. Types of Media in Microbiology. <https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/microbial-culture-media-preparation/types-of-media-in-microbiology>.

3. PEWARNAAN SEDERHANA DAN PEWARNAAN NEGATIF

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

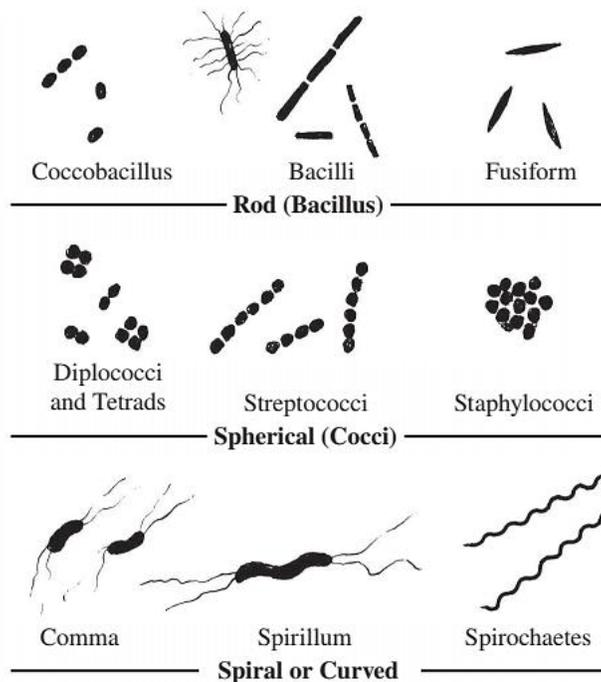
A. Pendahuluan

A.1. Pewarnaan Sederhana

Sebelum mikroorganisme diamati di bawah mikroskop maka perlu dilakukan pewarnaan. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memperjelas struktur yang akan diamati di bawah mikroskop. Karena umumnya mikroorganisme tidak berwarna ketika diamati dibawah mikroskop. Selain itu pewarnaan juga dapat berperan dalam mengamati struktur tertentu seperti flagel dan endospora pada bakteri.

Sel-sel bakteri terdiri dari kira-kira 80% air, sehingga hanya ada sedikit kontras antara sel dan lingkungan di sekitarnya. Kurangnya kontras ini menyebabkan sulitnya untuk memvisualisasikan sel atau bagian dalamnya rincian dalam suspensi berair menggunakan *brightfield* mikroskop (mikroskop medan terang). Agar dapat divisualisasikan dengan mikroskop *brightfield* maka kontras sel bakteri harus ditingkatkan, apusan sel disiapkan dengan fiksasi panas untuk melekatkan sel ke kaca objek. Fiksasi ini juga berfungsi untuk menjaga integritas struktural sel bakteri.¹

Apusan kemudian diwarnai menggunakan berbagai pewarna meningkatkan fitur sel dan struktur. Penggunaan pewarna tunggal untuk mewarnai sel bakteri disebut pewarnaan sederhana. Pewarna yang biasa digunakan untuk melakukan pewarnaan sederhana adalah biru metilen, fuchsin dasar, dan kristal violet. Pewarna ini dirujuk sebagai pewarna dasar karena memiliki kelompok ionik pembawa warna (kromofor) yang bermuatan positif (kationik). Mereka dapat mewarnai dengan baik sel bakteri yang memiliki gugus kimia pada permukaannya, sehingga memberikan muatan negatif ke sel. Sehingga, ada sebuah tarikan elektrostatik antara sel dan kromofor kationik dari zat pewarna, hasilnya adalah sel terwarnai¹. Berbeda dengan kromofor kationik, zat warna yang memiliki kromofor anionik (bermuatan negatif) disebut zat warna asam. Pewarna ini ditolak oleh sel bakteri dan mewarnai latar belakang kaca objek sebagai gantinya. Pewarnaan sederhana dapat digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri ¹.



Gambar 20. Berbagai bentuk sel bakteri ¹

Bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan morfologinya menjadi tiga jenis morfologi: basil (batang), kokus (bulat), dan spiral (*corkscrewshaped*). Batang atau basil dapat berbentuk bulat, pipih, atau ujung meruncing (Gambar 20). Bakteri fusiform adalah bakteri berbentuk batang dengan ujung meruncing. Kokus dapat tunggal, dalam rantai, dalam tetrad (empat), atau dalam kelompok yang tidak teratur. Kebanyakan streptokokus terjadi dalam rantai, sedangkan stafilokokus terjadi dalam kelompok yang menyerupai buah anggur. Bakteri berbentuk spiral dapat berupa sebagai *spirochaetes*, sebagai *spirilli*, atau berbentuk koma, batang melengkung. *Treponema pallidum*, agen penyebab sifilis, juga merupakan *spirochaeta* tipis, dapat diamati dengan mikroskop medan terang. *Vibrio cholerae*, bakteri yang bertanggung jawab untuk kolera, adalah bakteri berbentuk koma.

A.2. Pewarnaan Negatif

Pewarnaan negatif dapat berguna dalam mempelajari morfologi sel bakteri dan mengkarakterisasi struktur sel seperti: struktur eksternal, seperti kapsul, yang berhubungan dengan sel bakteri. Pewarna negatif bersifat asam dan dengan demikian memiliki kromofor bermuatan negatif. Pewarna ini tidak menembus sel melainkan ditolak oleh sel bakteri karena bermuatan sama, negatif. Latar belakang mengelilingi sel diwarnai

dengan pewarna negatif. Pewarnaan ini menghasilkan pewarnaan sel negatif atau tidak langsung. Biasanya sel muncul sebagai objek transparan terhadap latar belakang gelap (Gambar 21). Contoh zat pewarna negatif adalah tinta India dan nigrosin. Prosedur pewarnaan negatif terdiri dari pencampuran organisme dengan sedikit noda dan menyebarkan inokulum yang sangat tipis di atas permukaan kaca objek mikroskop. Pada pewarnaan negatif, sel biasanya tidak dipanaskan sebelum diberikan pewarna negatif.¹

Beberapa keunggulan pewarnaan negatif yaitu, Pertama, karena fiksasi panas tidak diperlukan dan sel tidak terkena efek distorsi bahan kimia dan panas, ukuran dan bentuk alaminya dapat dilihat. Kedua, dimungkinkan untuk mengamati bakteri yang sulit diwarnai, seperti beberapa spirilla. Adapun kekurangannya, karena fiksasi panas tidak dilakukan selama proses pewarnaan perlu diingat bahwa organisme tidak terbunuh dan kaca objek harus ditangani dengan hati-hati.²



Gambar 21. Hasil pewarnaan negatif *Bacillus* dan *Staphylococcus* menggunakan nigrosin ¹

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pewarnaan sederhana mikroorganisme
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat ulasan (apusan) bakteri
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan sederhana

C. Alat dan Bahan

1. Media padat berisi biakan bakteri
6. Spidol permanen

- | | |
|--|-------------------|
| 2. Kristal violet atau <i>Methylene blue</i> | 7. Gelas objek |
| 3. Nigrosin | 8. Lampu spirtus |
| 4. Ose | 9. Akuades steril |
| 5. Minyak imersi | 10. Mikroskop |

D. Prosedur Praktikum

D.1. Pembuatan ulasan bakteri

Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas (apusan bakteri atau preparat apus). Berikut ini cara membuat preparat ulas (Gambar 22):

- **Ulasan dari biakan cair**

1. Bersihkan kaca objek dengan kapas yang dibasahi alkohol
2. Beri label pada sudut kaca
3. Kocok tabung berisi suspensi bakteri kemudian ambil 2 mata ose suspensi dan ulaskan di bagian tengah kaca objek
4. Biarkan mengering di udara sebentar
5. Fiksasi di atas api (Gambar 22)

- **Ulasan dari biakan padat**

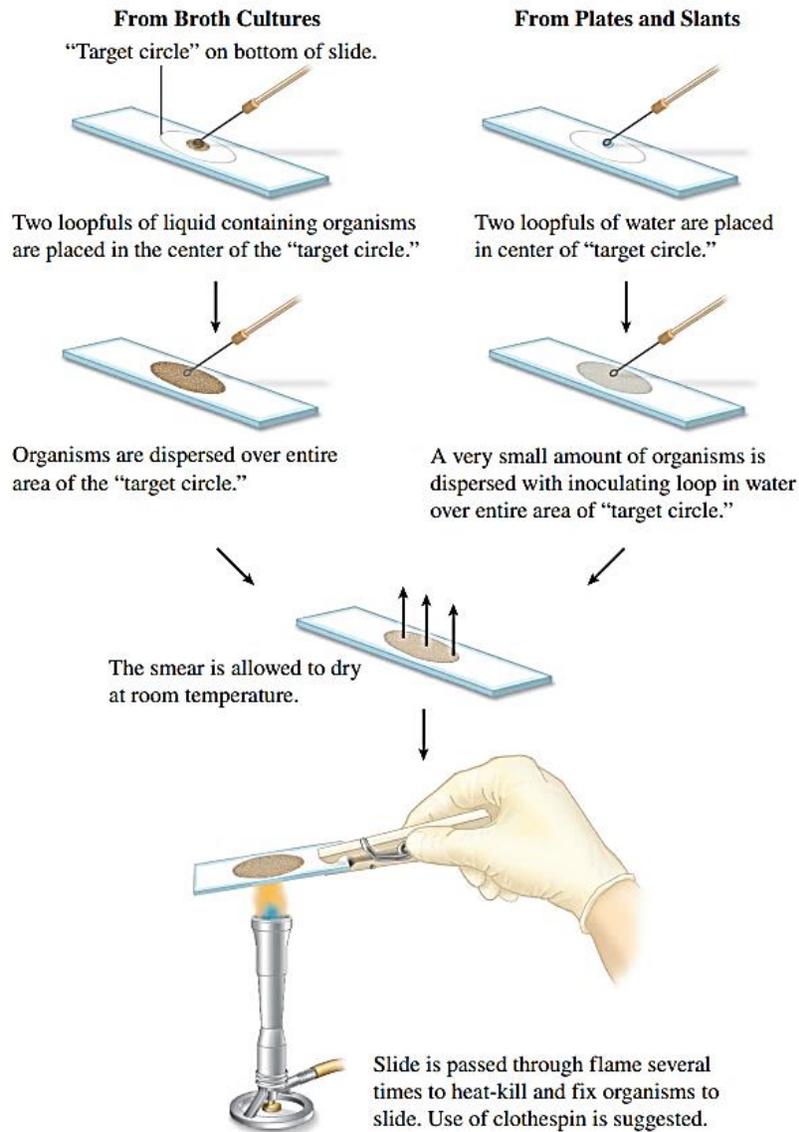
1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol
2. Beri label pada sudut kaca
3. Teteskan 2 mata ose garam fisiologis atau akuades steril di atas kaca objek
4. Lalu ambil satu ose biakan bakteri dari koloni di atas medium padat, campurkan dengan akuades steril secara merata. Ulaskan campuran ini di atas kaca objek
5. Keringkan di udara sebentar
6. Fiksasi di atas api (Gambar 22)

D.2. Pewarnaan Sederhana

Berikut ini cara membuat pewarnaan sederhana:

1. Buat preparat ulas.
2. Beri larutan zat warna, dapat menggunakan larutan biru metilen atau larutan karbol fukhsin basa ataupun safranin.
3. Biarkan zat warna selama 30 detik sampai 60 detik.
4. Cuci dan keringkan dengan hati-hati menggunakan kertas saring atau tisu.
5. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x, tambahkan minyak imersi
6. Bila menggunakan pewarna biru metilen mikroba akan tampak berwarna biru, dan bila menggunakan pewarna fukhsin dasar atau safranin akan tampak berwarna merah.

7. Laporkan hasil pengamatan

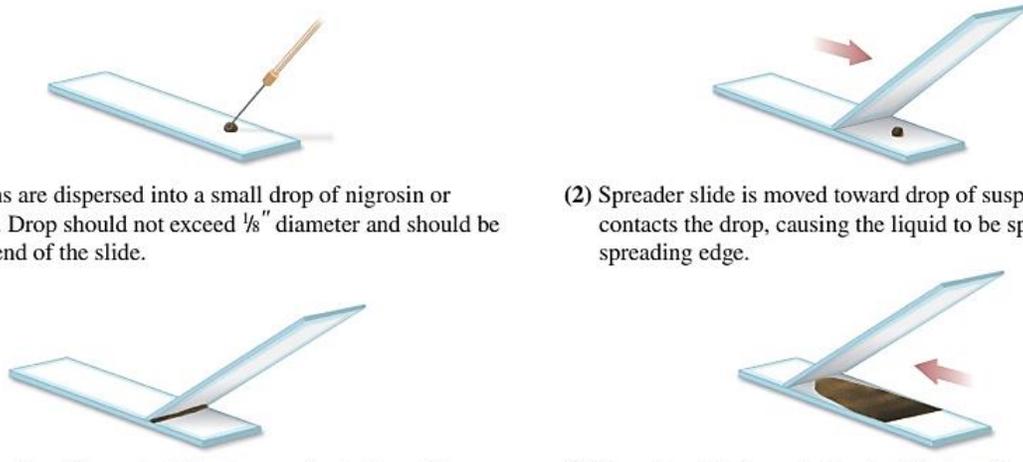


Gambar 22. Teknik membuat ulasan bakteri dari biakan cair dan padat ¹

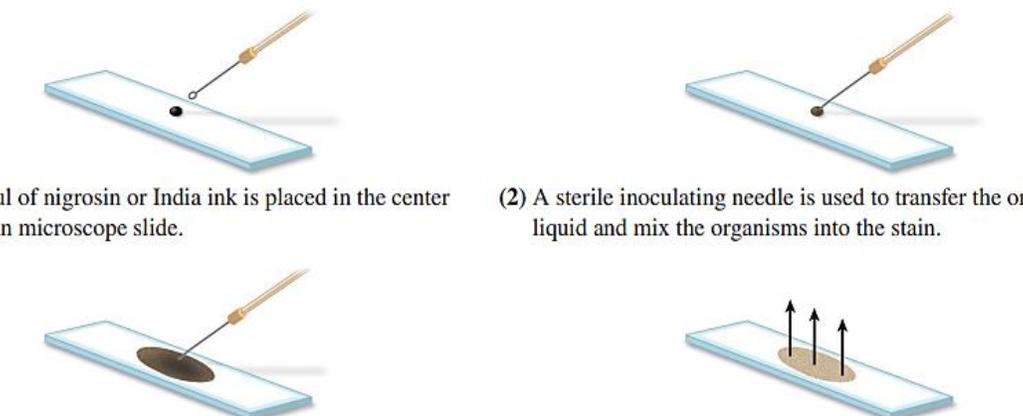
D.3. Pewarnaan Negatif

Pewarnaan negatif dapat dilakukan dengan dua cara seperti terlihat pada Gambar 23 dan Gambar 24. Cara melakukan pewarnaan negatif adalah sebagai berikut:

1. Buat preparat ulas tanpa fiksasi
2. Kering udarkan
3. Beri larutan zat pewarna negatif
4. Biarkan zat warna selama 30 detik sampai 60 detik.
5. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x, tambahkan minyak imersi
6. Laporkan hasil pengamatan

- 
- (1) Organisms are dispersed into a small drop of nigrosin or India ink. Drop should not exceed $\frac{1}{8}$ " diameter and should be near the end of the slide.
- (2) Spreader slide is moved toward drop of suspension until it contacts the drop, causing the liquid to be spread along its spreading edge.
- (3) Once spreader slide contacts the drop on the bottom slide, the suspension will spread out along the spreading edge as shown.
- (4) Spreader slide is pushed to the left, dragging the suspension over the bottom slide. After the slide has air-dried, it may be examined under oil immersion. *Remember: This slide should not be heat-fixed.*

Gambar 23. Teknik pewarnaan negatif menggunakan kaca objek sebagai penyebar¹

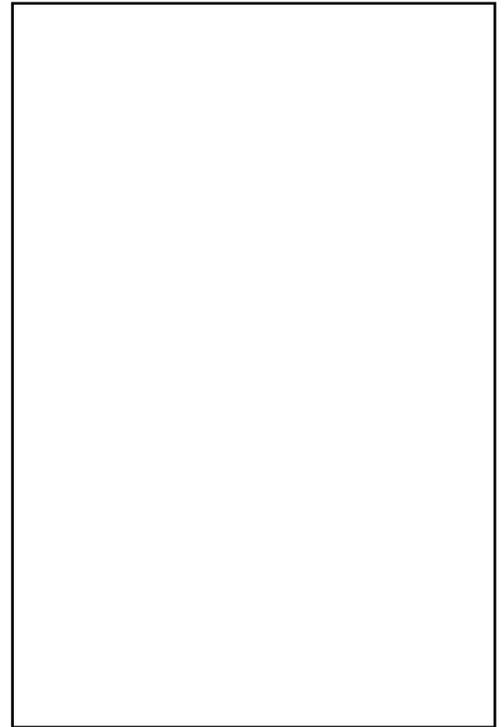
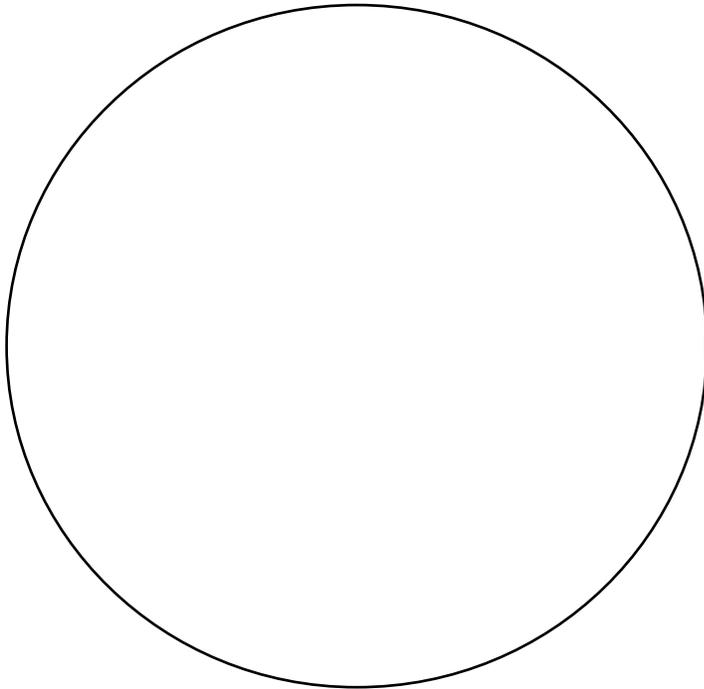
- 
- (1) A loopful of nigrosin or India ink is placed in the center of a clean microscope slide.
- (2) A sterile inoculating needle is used to transfer the organisms to the liquid and mix the organisms into the stain.
- (3) Suspension of bacteria is spread evenly over an area of one or two centimeters with the needle.
- (4) Once the preparation has completely air-dried, it can be examined under oil immersion. No heat should be used to hasten drying.

Gambar 24. Teknik pewarnaan negatif menggunakan ose sebagai penyebar¹

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

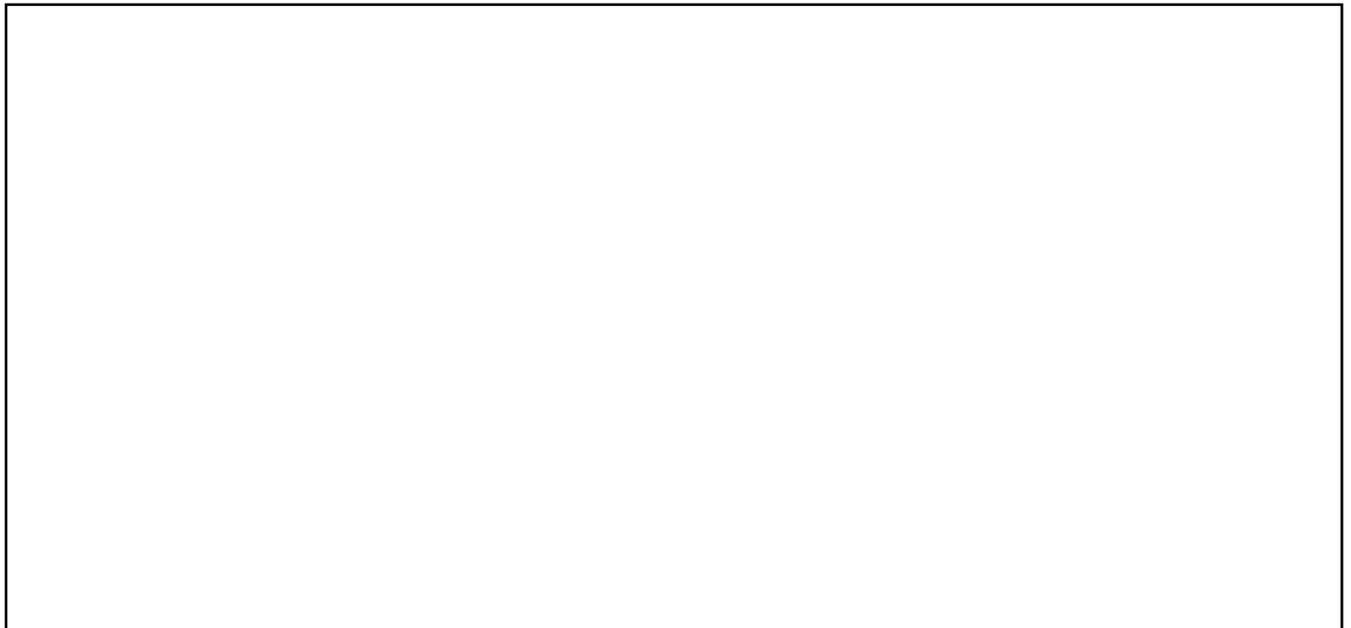
1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Sederhana

Penjelasan hasil pengamatan

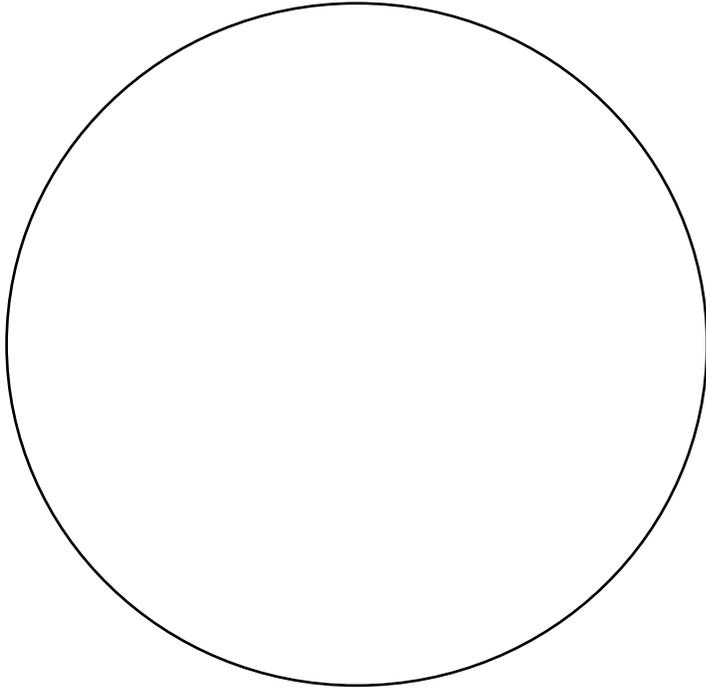


Perbesaran mikroskop : _____

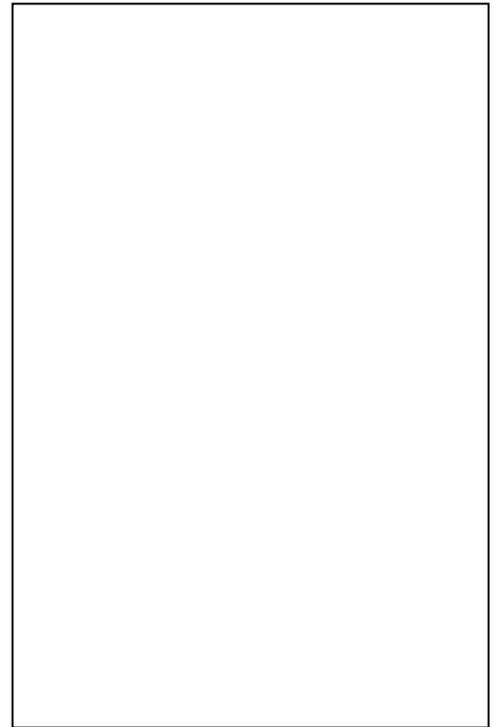
Kesimpulan :



2. Hasil Pengamatan Pewarnaan Negatif

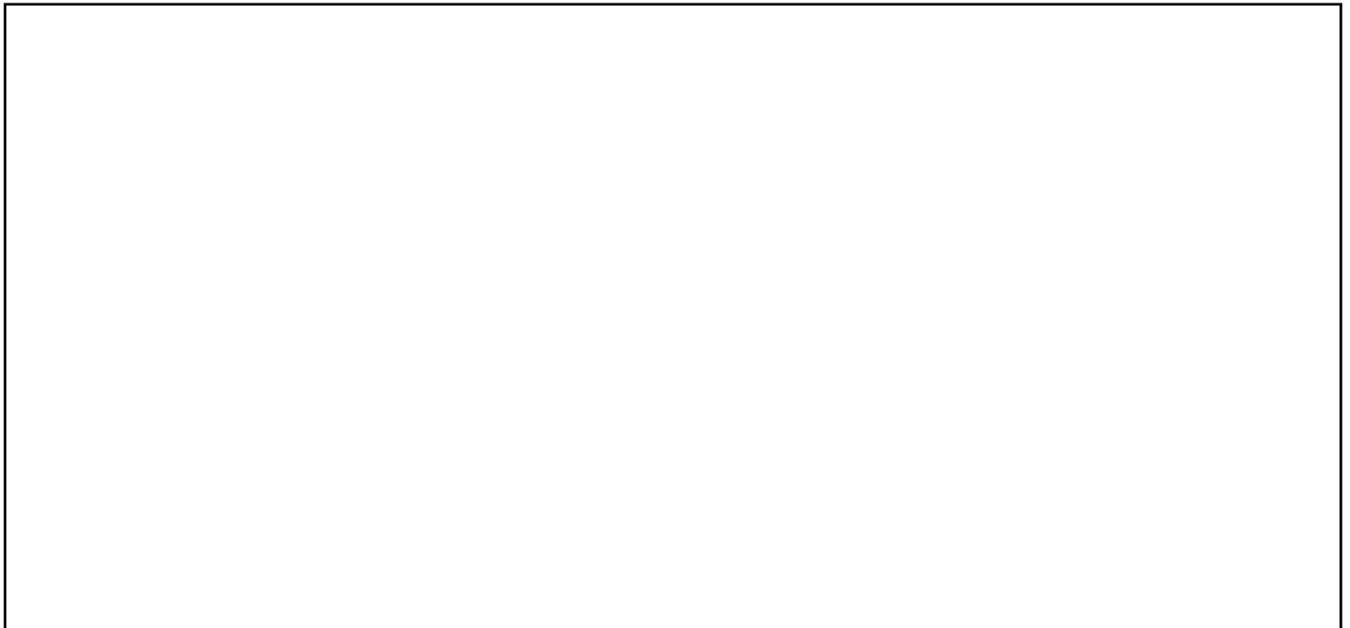


Penjelasan hasil pengamatan



Perbesaran mikroskop : _____

Kesimpulan :



Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan mikroorganismenya?

2. Apa saja contoh zat warna untuk pewarnaan sederhana?

3. Apa perbedaan pewarnaan sederhana dan pewarnaan negatif?

4. Apa saja zat warna yang digunakan pada pewarnaan negatif?

5. Mengapa harus dilakukan pembuatan apusan sebelum dilakukan pewarnaan?

Referensi

1. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
2. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. Pearson Education Limited (2017).

4. PEWARNAAN GRAM BAKTERI

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Pewarnaan Gram

Pewaranaan berikutnya selain pewarnaan sederhana adalah pewarnaan diferensial. Pewarnaan diferensial biasanya digunakan untuk membedakan struktur tertentu dengan struktur lainnya. Selain itu pewarnaan diferensial juga berfungsi dalam membedakan kelompok bakteri yang satu dengan bakteri lainnya. Contoh pewarnaan diferensial adalah pewarnaan Gram dan pewarnaan Bakteri Tahan Asam ¹.

Pewarnaan Gram adalah pewarnaan yang paling umum digunakan di klinik Laboratorium mikrobiologi. Hasil pewarnaan ini menempatkan bakteri ke dalam salah satu dari dua kelompok utama, yaitu kelompok Gram positif (hasil akhir biru ke ungu) atau Gram negatif (hasil akhir merah muda). Beberapa organisme bersifat Gram-variabel atau tidak terwarnai sama sekali. Seperti disebutkan sebelumnya, struktur dinding sel menentukan karakteristik pewarnaan Gram suatu spesies. Bakteri Gram positif adalah bakteri yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tebal. Sedangkan bakteri Gram negatif adalah bakteri yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan lebih tipis dari Gram positif. Karakteristik utama dinding sel bakteri Gram positif adalah tebalnya lapisan peptidoglikan pada dinding sel. Akibatnya, pada saat prosedur pewarnaan Gram, meninggalkan warna ungu. Tidak seperti dinding sel Gram positif, dinding sel Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis. Hal ini menyebabkan lunturnya warna ungu saat pembilasan dengan alkohol².

Pewarnaan Gram terdiri dari pembuatan apusan bakteri, fiksasi panas yang lembut dan penambahan empat komponen zat warna secara berurutan: kristal violet (pewarnaan primer, 1 menit), Iodium (mordan atau fiksatif, 1 menit), alkohol atau larutan alkohol aseton (penghilang warna, aktif dan bilas cepat), dan safranin (*counterstain*, 30 detik). Waktu yang digunakan dapat bervariasi sesuai dengan aturan pakai yang ada pada set pewarnaan Gram. setiap langkah pada pewarnaan Gram sangat penting. Kesalahan saat pewarnaan dapat menyebabkan hasil yang salah².

Bakteri awalnya berwarna ungu oleh kristal violet yang terikat pada dinding sel dengan bantuan Iodium. Ketika dekolorizer diterapkan pada bakteri dengan dinding sel Gram negatif, kristal violet akan keluar dari sel lalu ambil *counterstain* safranin (merah muda). Oleh karenanya bakteri Gram negatif tampak merah muda di bawah mikroskop cahaya. Bakteri dengan dinding sel Gram positif mempertahankan kristal violet selama proses penghilangan warna dan tampak ungu. Sel dalam apusan langsung dari spesimen pasien, seperti epitel sel, sel darah putih, dan sel darah merah, akan tampak merah muda jika pewarnaan Gram prosedur telah dilakukan dengan benar².

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pewarnaan diferensial mikroorganisme
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat ulasan (apusan) bakteri
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan diferensial : Pewarnaan Gram

C. Alat dan Bahan

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Media padat berisi biakan bakteri | 7. Minyak imersi |
| 2. Kristal violet | 8. Spidol permanen (atau label) |
| 3. Iodin | 9. Gelas objek |
| 4. Safranin | 10. Lampu spirtus |
| 5. Alkohol | 11. Akuades steril |
| 6. Ose | 12. Mikroskop |

D. Prosedur Praktikum

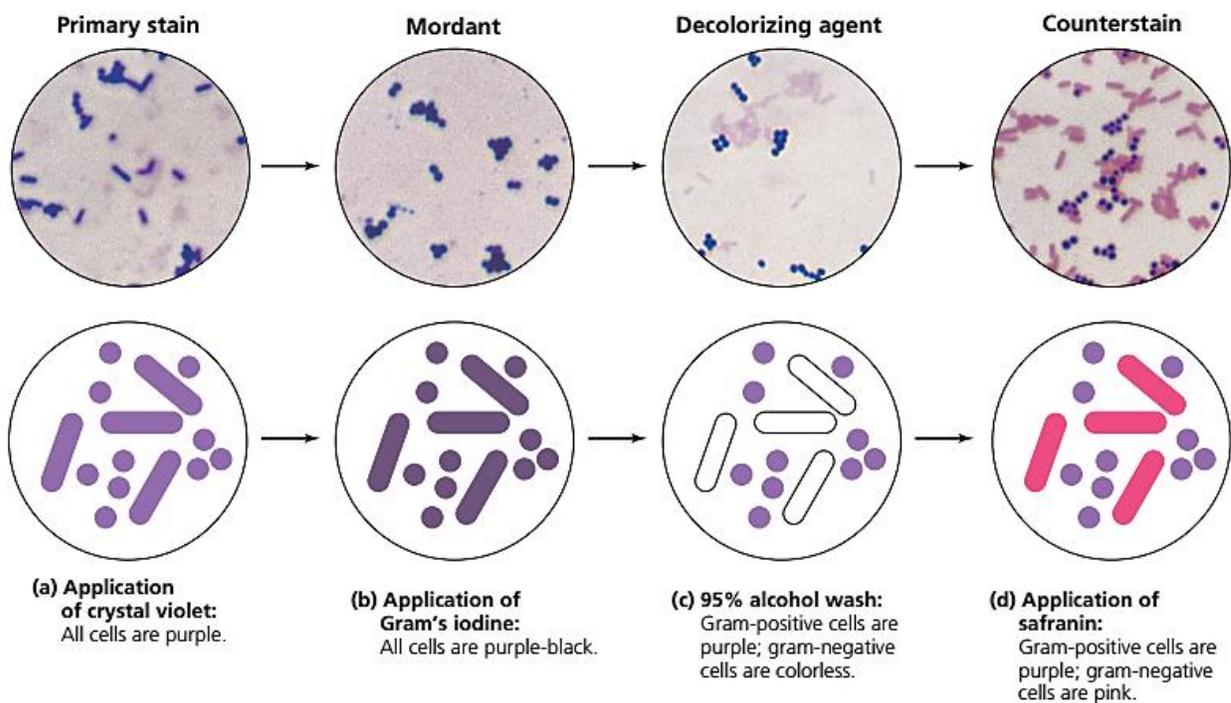
• Pembuatan ulasan bakteri

Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Lihat Bab 3.

• Pewarnaan Gram (Gambar 25)

1. Buat preparat ulas
2. Beri larutan kristal violet selama 90 detik.
3. Cuci dengan air mengalir.
4. Beri larutan lugol selama 1 menit

5. Beri larutan pemucat (aseton alkohol) selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena jika terlalu lama akan memberikan hasil yang menyimpang.
6. Cuci dengan air mengalir.
7. Beri larutan safranin selama 90 detik.
8. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan kertas saring atau tisu.
9. Amati dengan mikroskop perbesaran 10 x 100
10. Laporkan hasil pengamatan

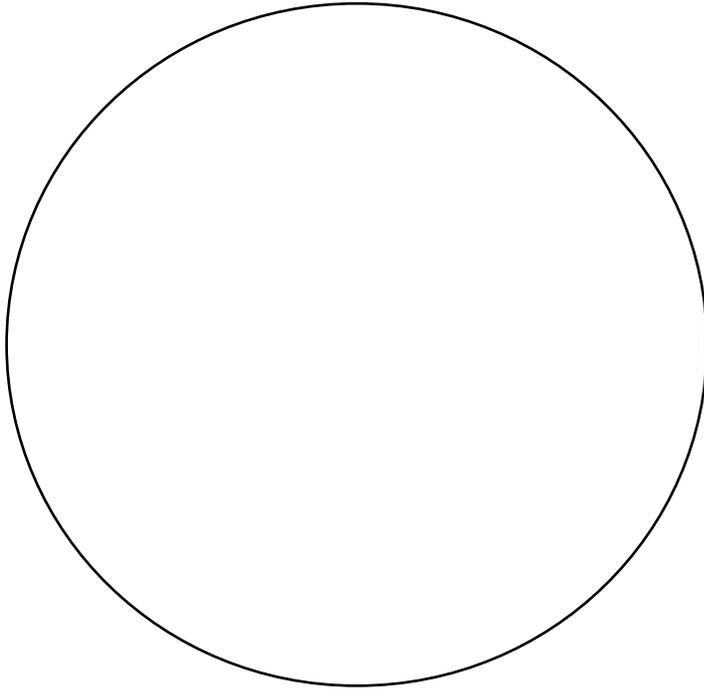


Gambar 25. Langkah pewarnaan Gram¹

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Gram Bakteri

Penjelasan hasil pengamatan

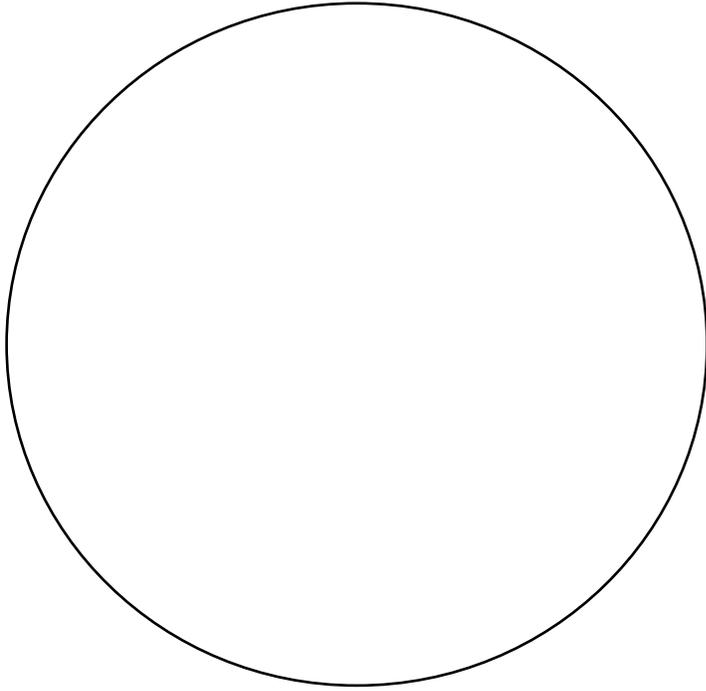


Perbesaran mikroskop : _____

Kesimpulan :

2. Hasil Pengamatan Pewarnaan Gram Bakteri

Penjelasan hasil pengamatan



Perbesaran mikroskop : _____

Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan diferensial?

2. Apa saja zat warna untuk pewarnaan Gram, sebutkan fungsinya?

3. Apa perbedaan pewarnaan sederhana dan pewarnaan diferensial?

4. Apa hasil akhir dari pewarnaan Gram? Jelaskan!

Referensi

1. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. *Microbiology, A Laboratory Manual. Pearson Education Limited* (2017).
2. Mahon, C. & Lehman, D. *A Textbook of Diagnostic Microbiology. American Speech* vol. 15 (2019).

5. PEWARNAAN TAHAN ASAM

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Sebagian besar bakteri dapat diwarnai dengan prosedur pewarnaan sederhana atau Gram, namun beberapa genera, terutama yang anggotanya dari genus *Mycobacterium*, hanya dapat teramati dengan jelas menggunakan pewarnaan tahan asam. Bakteri jenis ini memiliki dinding tebal seperti lilin. Lapisan lilin ini yang mempuat pewarna sulit untuk mewarnai dinding sel bakteri. Kelompok mikobakteria cenderung menggumpal, sehingga sulit untuk mengidentifikasi sel bakteri saat diwarnai. Oleh karenanya untuk menghindari ini perlu dilakukan pembuatan apusan¹.

Ciri khas lainnya dari kelompok bakteiri ini tidak mudah dihilangkan zat warnanya ketika sudah menyerap zat warna. Maka pada pewarnaan tahan asam digunakan asam alkohol sebagai agen dekolorasi, karena penggunaan alkohol biasa (seperti pada pewarnaan Gram) tidak mampu menghilangkan pewarna. Oleh sebab itu bakteri kelompok ini dinamakan bakteri tahan asam. Sedangkan bakteri yang tidak memiliki lapisan lipid dinamakan bakteri tidak tahan asam. Pewarnaan tahan asam terdiri dari pewarna primer, agen dekolorisasi, dan pewarna tandingan (*counterstain*).¹

Pewarna Primer

Pewarna primer atau utama pada pewarnaan tahan asam adalah Carbol Fuchsin. Sebagian besar spesies mikobakteri tidak ternoda dengan umum pewarna seperti biru metilen dan ungu kristal. Carbol fuchsin, berwarna merah gelap dalam fenol 5% larut dalam bahan lipoid yang merupakan penyusun sebagian besar dinding sel mikobakteri. Pewarnaan adalah lebih meresap ke dinding sel dengan penerapan panas, yang mendorong karbol fuchsin melalui dinding lipoid ke dalam sitoplasma. Setelah penerapan pewarnaan primer semua sel akan tampak merah¹.

Agen Dekolorisasi

Asam-Alkohol (3% HCl + 95% Etanol) adalah agen dekolorisasi pada pewarnaan tahan asam. Sebelum dekolorisasi, apusan didinginkan, hal ini memungkinkan zat sel lilin mengeras. Pada aplikasi asam-alkohol, sel tahan asam akan tahan terhadap dekolorisasi karena

pewarna primer lebih larut dalam lilin seluler daripada akibat penghilangan warna. Pewarna utama dipertahankan dan mikobakteri akan tetap merah. Mikroorganisme tidak tahan asam, yang kekurangan lilin seluler. Pewarna primer lebih mudah dihilangkan selama dekolorisasi, akibatnya sel-sel jenis mikroorganisme ini menjadi tidak berwarna.

Counterstain

Methylene Blue Ini digunakan sebagai reagen akhir untuk mewarnai sel yang sebelumnya tidak berwarna. Sel yang kehilangan warna setelah dibilas dengan asam alkohol (sel tidak tahan asam) mengalami dekolorisasi. Sel-sel ini akan menyerap *counterstain* dan menunjukkan warna biru, sementara sel tahan asam mempertahankan warna merah dari pewarna primer¹.

B. Tujuan Praktikum

4. Mahasiswa mengetahui prinsip pewarnaan mikroorganisme
5. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat ulasan (apusan) bakteri
6. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan tahan asam

C. Alat dan Bahan

- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 13. Media padat berisi biakan bakteri | 19. Minyak imersi |
| 14. Karbol Fuchsin | 20. Spidol permanen |
| 15. Asam Alkohol | 21. Gelas objek |
| 16. <i>Methylene blue</i> | 22. Tisu |
| 17. Ose | 23. Lampu spirtus |
| 18. Mikroskop | 24. Akuades steril |

D. Prosedur Praktikum

• Pembuatan ulasan bakteri

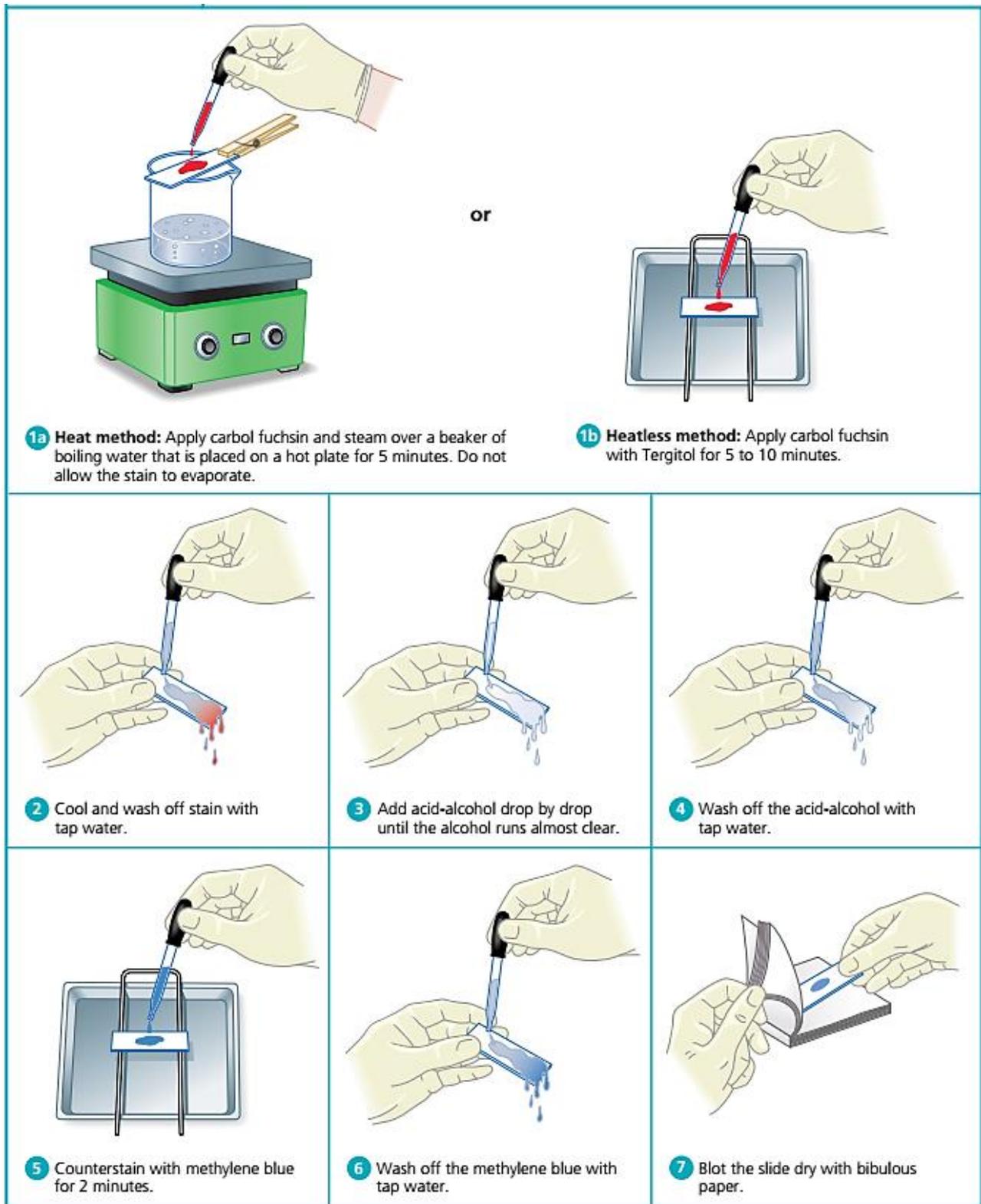
Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Pembuatan preapat ulas sudah dibahas pada Bab 3.

- **Pewarnaan Tahan Asam**

Ilustrasi pewarnaan tahan asam dapat dilihat pada Gambar 26. Adapun tahapannya adalah sebagai berikut:

1. Buat preparat ulas.
2. Beri larutan zat warna primer, larutan karbol fukhsin. Panaskan di atas api selama lima menit, jangan sampai mendidih atau terlalu kering. Setelah lima menit, dinginkan kaca objek. Kaca objek yang sudah dingin dapat dibilas dengan air mengalir, sampai air bilasan bersih.
3. Dekolorasi dengan alkohol asam, teteskan asam alkohol pada kaca objek. Lakukan sampai air bilasan mengandung sedikit warna merah karbol fukhsin.
4. Bilas dengan air mengalir.
5. Beri laurat zat warna tandingan, methylene blue, diamkan selama dua menit.
6. Bilas dengan air mengalir
7. Tiriskan dan keringkan kaca objek, setelah kering amati dengan mikroskop
8. Laporkan hasil pengamatan

Catatan : lama pewarnaan disesuaikan dengan panduan yang ada pada set pewarna

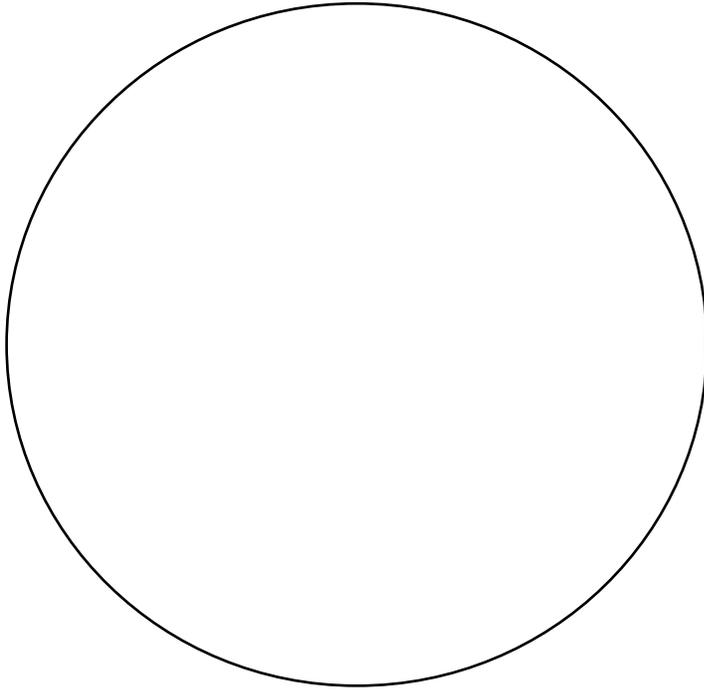


Gambar 26. Langkah-langkah pewarnaan tahan asam ¹

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Bakteri Tahan Asam

Penjelasan hasil pengamatan

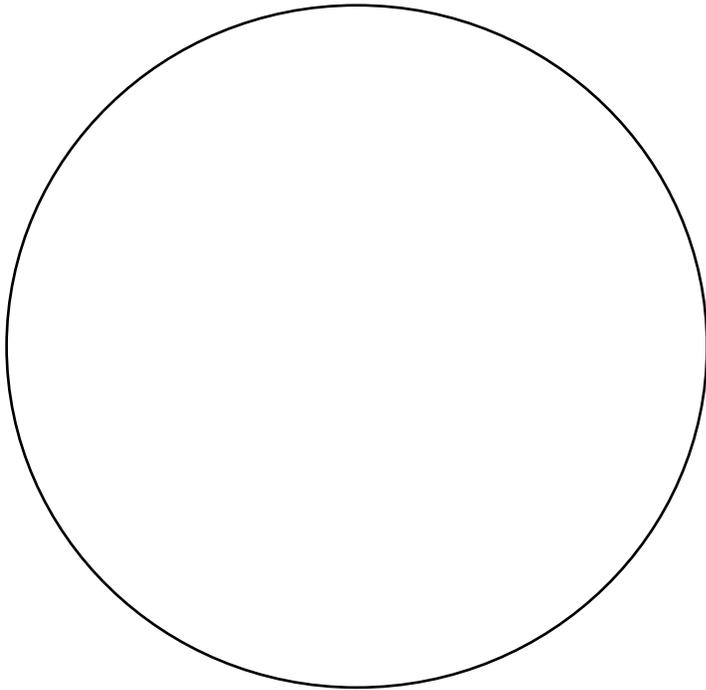


Perbesaran: _____

Kesimpulan:

2. Hasil Pengamatan Pewarnaan Bakteri Tahan Asam

Penjelasan hasil pengamatan



Perbesaran: _____

Kesimpulan:

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan tahan asam ?

2. Apa saja zat warna pada pewarnaan tahan asam?

3. Apa perbedaan pewarnaan Gram dan tahan asam?

4. Mengapa harus dilakukan pemanasan setelah diberikan pewarna primer?

Referensi

1. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. Pearson Education Limited (2017).

6. PEWARNAAN SPORA BAKTERI (SchaefferFulton)

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Ada beberapa anggota genera bakteri dapat membentuk endospora. Dua genera bakteri yang paling umum adalah batang Gram-positif genus *Bacillus* yang bersifat aerobik dan anaerob obligat genus *Clostridium*. Bakteri lain yang diketahui membentuk endospora adalah *Thermoactinomyces*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Sporotomaculum*, *Sporomusa*, dan *Sporohalobacter* spp. Organisme ini menjalani siklus diferensiasi dalam menanggapi kondisi lingkungan.

Proses, sporulasi, dipicu oleh berkurangnya hampir salah satu dari beberapa nutrisi (karbon, nitrogen, atau fosfor). Setiap sel terbentuk spora internal tunggal yang dibebaskan ketika sel induk mengalami autolisis. Spora adalah sel istirahat, sangat tahan terhadap pengeringan, panas, dan bahan kimia. Ketika kondisi lingkungan dan nutrisi menguntungkan maka spora akan diaktifkan. Spora berkecambah untuk menghasilkan sel vegetatif tunggal. Lokasi endospora dalam sel adalah spesies-spesifik dan dapat digunakan untuk menentukan identitas suatu bakteri¹.

Karena endospora tidak mudah dihancurkan oleh panas atau bahan kimia, endospora membutuhkan kondisi tertentu pada sterilisasi. Misalnya, untuk menghancurkan endospora dengan sterilisasi panas lembab, mereka harus dipaparkan selama 15-20 menit dengan uap bertekanan 1 ATM. Kondisi yang dapat diperoleh pada sterilisasi menggunakan autoklaf². Sifat endospora yang mampu bertahan pada kondisi yang tidak menguntungkan juga berarti struktur endospora tidak mudah ditembus oleh pewarna. Jika sel bakteri mengandung endospora, sel diwarnai oleh pewarna dasar seperti kristal violet, spora akan nampak muncul sebagai area yang tidak terwarnai di sel vegetatif. Namun, jika panas diterapkan saat pewarnaan hijau malasit, pewarna lebih mudah menembus dan terperangkap dalam endospora. Hijau malasit tidak hilang pada proses pembilasan dengan agen dekolorisasi atau air. Dalam hal ini, panas bertindak sebagai mordant untuk memfasilitasi penyerapan zat warna².

Pewarna Primer

Pewarna primer atau utama pada pewarnaan spora adalah Hijau malasit. Tidak seperti dinding sel bakteri pada umumnya, spora kedap air dan tidak akan menyerap pewarna primer dengan mudah. Pemanasan digunakan untuk membantu penetrasi warna hijau malasit. Setelah pewarna primer ditambahkan dan dipanasi maka sel bakteri dan endospora akan berwarna hijau malasit³.

Agen Dekolorisasi

Setelah spora mendapat pewarna primer hijau malasit, warna ini tidak dapat dihilangkan warnanya dengan air. Air hanya menghilangkan kelebihan pewarna primer. Pewarna tidak menunjukkan afinitas yang kuat untuk komponen sel vegetatif; yaitu sel bakteri. Maka sel-sel ini akan menjadi tidak berwarna ³.

Counterstain

Safranin digunakan sebagai reagen akhir untuk mewarnai sel yang sebelumnya tidak berwarna. Sel yang kehilangan warna setelah dibilas dengan air mengalami dekolorisasi. Sel-sel ini akan menyerap *counterstain* dan menunjukkan warna merah, sementara spora akan mempertahankan warna hijau dari pewarna primer³.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pewarnaan mikroorganisme
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat ulasan (apusan) bakteri
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan spora

C. Alat dan Bahan

- | | |
|--|--------------------|
| 1. Media berisi biakan <i>Bacillus</i> sp. | 7. Minyak imersi |
| 2. Hijau malasit | 8. Spidol permanen |
| 3. Safranin | 9. Gelas objek |
| 4. Ose | 10. Tisu |
| 5. Mikroskop | 11. Lampu spirtus |
| 6. Gegep | 12. Akuades steril |

D. Prosedur Praktikum

- **Pembuatan ulasan bakteri**

Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Pembuatan preapat ulas sudah dibahas pada Bab 3.

- **Pewarnaan Spora**

Ilustrasi pewarnaan spora dapat dilihat pada Gambar 27. Adapun tahapannya adalah sebagai berikut ²:

1. Buat preparat ulas.
2. Beri larutan zat warna primer, larutan hijau malasit. Panaskan di atas api selama lima menit, jangan sampai mendidih atau terlalu kering. Setelah lima menit, dinginkan kaca objek. Kaca objek yang sudah dingin dapat dibilas dengan air mengalir, sampai air bilasan bersih.
3. Dekolorasi dengan air, teteskan air pada kaca objek selama 30 detik. Lakukan sampai air bilasan mengandung sedikit warna hijau malasit.
4. Beri larutan zat warna tandingan, safranin, diamkan selama 30 detik.
5. Bilas dengan air mengalir
6. Tiriskan dan keringkan kaca objek, setelah kering amati dengan mikroskop
7. Laporkan hasil pengamatan

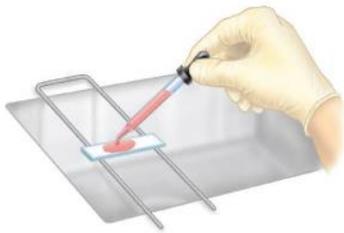
Catatan : lama pewarnaan disesuaikan dengan panduan yang ada pada set pewarna



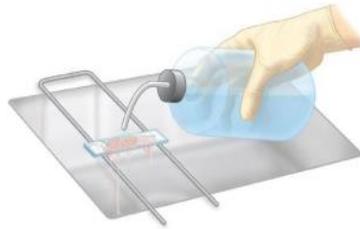
- (1) Cover smear with small piece of paper toweling and saturate it with malachite green. Steam over boiling water for 5 minutes. The paper toweling should be small enough that it does not hang over the edges of the slide, and additional stain should be added as needed to keep the toweling saturated.



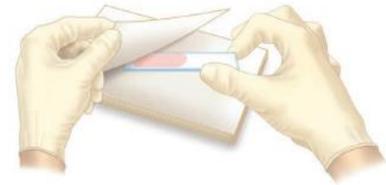
- (2) After the slide has cooled sufficiently, remove the paper toweling and rinse with water for 30 seconds.



- (3) Counterstain with safranin for about 30 seconds.



- (4) Rinse briefly with water to remove safranin.



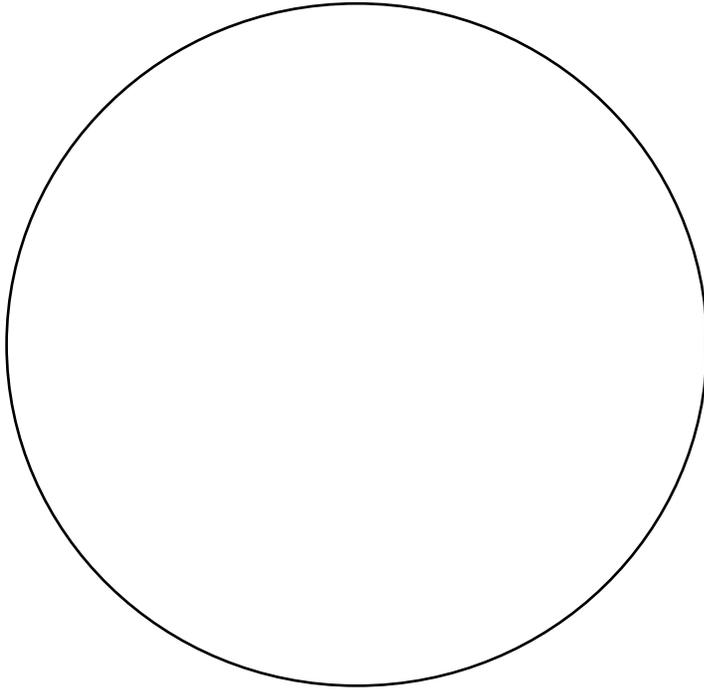
- (5) Blot dry with bibulous paper, and examine slide under oil immersion.

Gambar 27. Langkah-langkah pewarnaan spora ²

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Spora Bakteri

Penjelasan hasil pengamatan



Perbesaran: _____

Kesimpulan:

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan spora?

2. Apa saja zat warna pada pewarnaan spora?

3. Jelaskan hasil pewarnaan spora, apa warna spora dan sel bakteri?

4. Mengapa harus dilakukan pemanasan setelah diberikan pewarna primer?

Referensi

1. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology an Introduction*. (Pearson Education, 2019). doi:LCCN 2017044147.
2. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
3. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. Pearson Education Limited (2017).

7. PEWARNAAN KAPSUL

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Terdapat banyak sel bakteri yang dikelilingi oleh lapisan seperti gel ekstraseluler yang terletak di luar dinding sel. Jika lapisannya menyerupai agar-agar, itu disebut sebagai kapsul. Jika lapisannya menyebar dan tidak teratur, maka disebut lapisan lendir. Kapsul atau lapisan lendir bervariasi dalam komposisi kimianya. Jika terdiri dari polisakarida, maka disebut dengan glikokaliks, yang secara harfiah berarti "cangkang gula." Namun kapsul juga dapat mengandung zat lain yang berbeda. Kapsul pada *Bacillus anthracis* terdiri dari asam poliglutamat, yang membentuk matriks protein. Keberadaan kapsul menjadi salah satu penanda tingkat virulensi bakteri tersebut^{1,2}.

Kapsul atau lapisan lendir berfungsi sangat penting. Pada patogen seperti *Streptococcus pneumoniae*, berfungsi sebagai struktur pelindung karena mencegah fagosit sel darah putih yang dapat menghancurkan patogen, memungkinkan organisme untuk menyerang paru-paru dan menyebabkan pneumonia¹. Fungsi lainnya adalah membantu menempelnya sel bakteri pada permukaan padat di lingkungan. Contohnya, *Streptococcus mutans* menghasilkan kapsul yang memfasilitasi perlekatan organisme ke permukaan gigi, menghasilkan pembentukan plak gigi. Jika tidak dihilangkan, plak akan berkontribusi pada pembentukan karies gigi¹.

Pewarnaan kapsul umumnya lebih sulit daripada prosedur pewarnaan lainnya karena bahan kapsul lebih mudah larut dalam air. Selain itu kapsul rentan terlepas selama saat proses pembilasan². Pewarnaan kapsul bakteri tidak dapat dilakukan dengan prosedur pewarnaan biasa. Jika pewarna dipanaskan sebelum pewarnaan, kapsul menyusut atau hancur sehingga tidak dapat dilihat pada pengamatan. Pewarnaan kapsul metode Anthony (Gambar 28) menggunakan kristal ungu (0.5-1%) dan tembaga sulfat (20%). Preparat dikeringkan dengan udara tetapi tidak dipanaskan. Kemudian, preparat diwarnai dengan dengan kristal ungu selama dua menit. Setelah itu preparat dibilas dengan larutan air 20% tembaga sulfat. Reagen ini berfungsi sebagai penghilang warna, menghilangkan kristal violet dari kapsul. Selain itu reagen juga berfungsi sebagai counterstain, mewarnai kapsul dengan warna biru muda¹.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pewarnaan mikroorganisme
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat ulasan (apusan) bakteri
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan kapsul

C. Alat dan Bahan

- | | |
|---|--------------------|
| 1. Media berisi biakan <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6. Minyak imersi |
| 2. Kristal Ungu | 7. Spidol permanen |
| 3. Tembaga sulfat | 8. Gelas objek |
| 4. Ose | 9. Tisu |
| 5. Mikroskop | 10. Lampu spiritus |
| | 11. Akuades steril |

D. Prosedur Praktikum

• Pembuatan ulasan bakteri

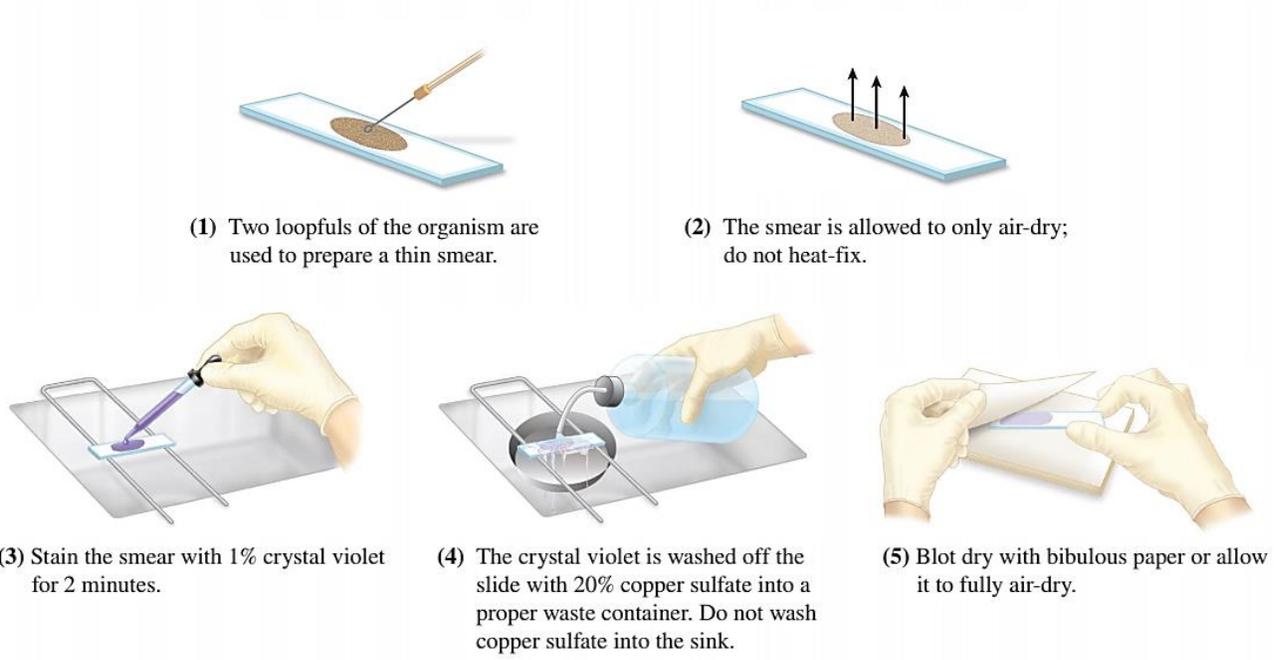
Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Pembuatan preparat ulas sudah dibahas pada Bab 3.

• Pewarnaan Kapsul

Ilustrasi pewarnaan kapsul dapat dilihat pada Gambar 28. Adapun tahapannya adalah sebagai berikut ¹:

1. Buat preparat ulas tanpa difiksasi panas, biarkan kering udara
2. Beri larutan zat warna primer, larutan kristal ungu selama dua menit.
3. Bilas preparat dengan larutan tembaga sulfat (20%).
4. Tiriskan dan keringkan kaca objek, setelah kering amati dengan mikroskop
5. Laporkan hasil pengamatan

Catatan : lama pewarnaan disesuaikan dengan panduan yang ada pada set pewarna

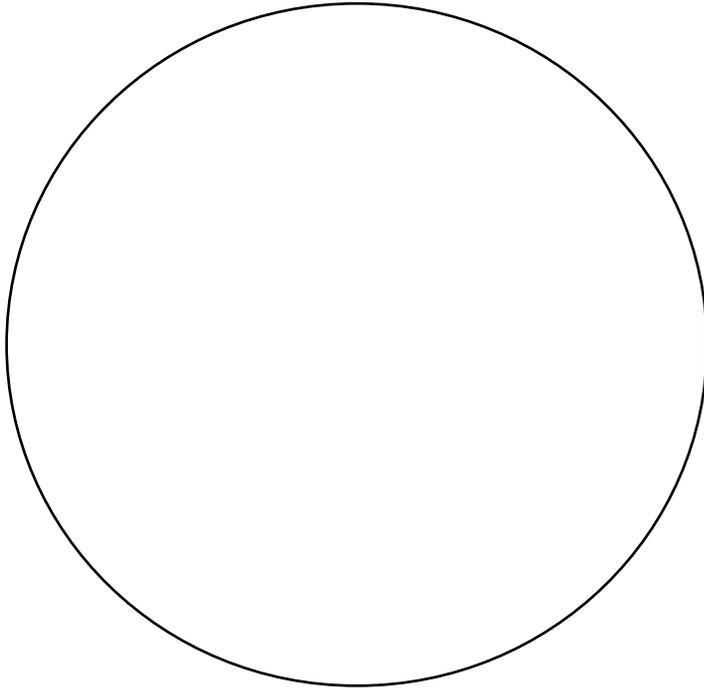


Gambar 28. Langkah-langkah pewarnaan kapsul ¹

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Kapsul Bakteri

Penjelasan hasil pengamatan



Perbesaran: _____

Kesimpulan:

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan kapsul?

2. Apa saja zat warna pada pewarnaan kapsul?

3. Jelaskan hasil pewarnaan kapsul!

4. Jelaskan perbedaan pewarnaan kapsul dengan pewarnaan spora!

Referensi

1. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
2. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology an Introduction*. (Pearson Education, 2019). doi:LCCN 2017044147.

8. PENANAMAN BAKTERI : TEKNIK BIAKAN MURNI

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Bakteri hidup di lingkungan sebagai populasi campuran. Bakteri yang terdapat sebagai spesies tunggal di lingkungan sangat jarang ditemukan. Robert Koch, ilmuwan mikrobiologi medis pertama, adalah salah satu ilmuwan yang pertama mengetahui bahwa untuk membuktikan bakteri tertentu menyebabkan penyakit tertentu, maka kita perlu mengisolasi agen patogen dari semua bakteri lain dan mengkarakterisasi patogen tersebut. Dari studinya pada bakteri patogen, laboratoriumnya berkontribusi banyak dalam mengembangkan teknik untuk ilmu mikrobiologi, termasuk metode isolasi untuk memperoleh biakan (kultur) murni bakteri ¹.

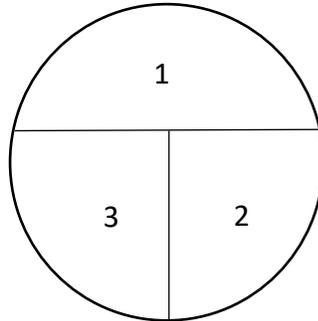
Biakan murni bakteri hanya berisi satu jenis bakteri, sedangkan kultur campuran mengandung lebih dari satu jenis organisme. Kultur yang terkontaminasi mengandung organisme yang diinginkan tetapi juga organisme yang tidak diinginkan. Dengan diperolehnya biakan murni, kita dapat mempelajari morfologi, dan karakteristik fisiologis mikroorganisme

Beberapa cara untuk memperoleh biakan murni ada dua. Keduanya biasa digunakan prosedur isolasi mikroorganisme: Metode cawan gores dan cawan tuang. Kedua prosedur melibatkan pengenceran bakteri. dalam sampel ke titik akhir di mana sel bakteri tunggal tersebar di permukaan agar atau di dalam agar pada cawan. Sehingga ketika setiap sel membelah, bakteri membentuk koloni murni yang terisolasi. Koloni tersebut dianggap sebagai keturunan identik dari sel satu jenis bakteri dan dapat diambil dan digunakan untuk selanjutnya mempelajari bakteri ¹.

Teknik goresan T

Teknik goresan T merupakan teknik memisahkan bakteri dari campuran dengan menyebarkan inokulum pada tiga tempat (Gambar 29). Teknik ini dilakukan dengan membaagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker. Inokulasi zona pertama dengan goresan zig-zag. Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan

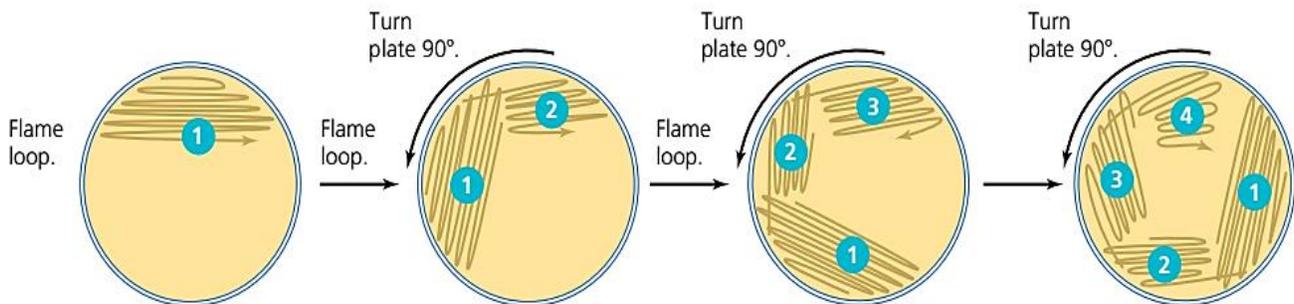
gores zig-zag pada zona ke-2 dengan menggores dari zona pertama. Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna. Lakukan hal yang sama pada zona ke-3.



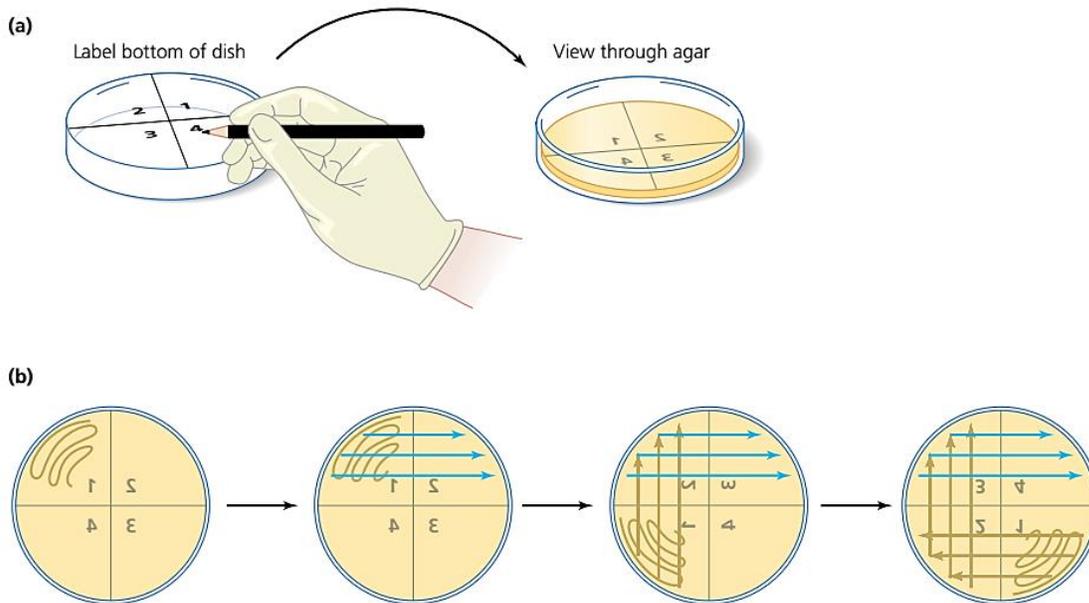
Gambar 29. Tiga zona goresan T

Teknik Goresan Kuadran (*Quadrant streak*)

Teknik goresan kuadran hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu cawan dibagi empat dengan ukuran yang berbeda. Zona pertama merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroba. Goresan selanjutnya dengan memutar cawan 90 ° dan mengambil dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal (Gambar 30). Teknik goresan kuadran lainnya menggunakan zona goresan yang sama besar. Cawan ditandai menjadi empat zona yang sama besar. Goresan dilakukan memutar 90° dimulai dari zona pertama (Gambar 31).



Gambar 30. Iustrasi goresan kuadran¹



Gambar 31. Goresan kuadran empat zona sama besar
(a). Pelabelan cawan, (b) Goresan kuadran¹

Teknik goresan pada agar miring

Goresan pada agar miring umumnya digunakan untuk mengoleksi biakan murni yang sudah diperoleh. Fungsi lainnya, goresan pada agar miring dapat juga digunakan saat uji biokimia. Teknik goresan pada agar miring ada dua. Teknik yang pertama dilakukan dengan menggores agar miring dari bagian bawah ke atas secara zig-zag. Sedangkan teknik yang kedua dengan menusuk agar pada tengah agar, diikuti dengan goresan zig-zag dari bagian bawah ke atas.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip biakan murni
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan teknik cawan gores
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan teknik gores pada agar miring
4. Mahasiswa mampu melakukan pengamatan makroskopik biakan yang tumbuh

C. Alat dan Bahan

1. Media berisi biakan bakteri
2. Media padat cawan
3. Media padat agar miring
4. Ose
5. Mikroskop
6. Spidol permanen
7. Tisu atau Lap
8. Alkohol
9. Lampu spirtus

D. Prosedur Praktikum

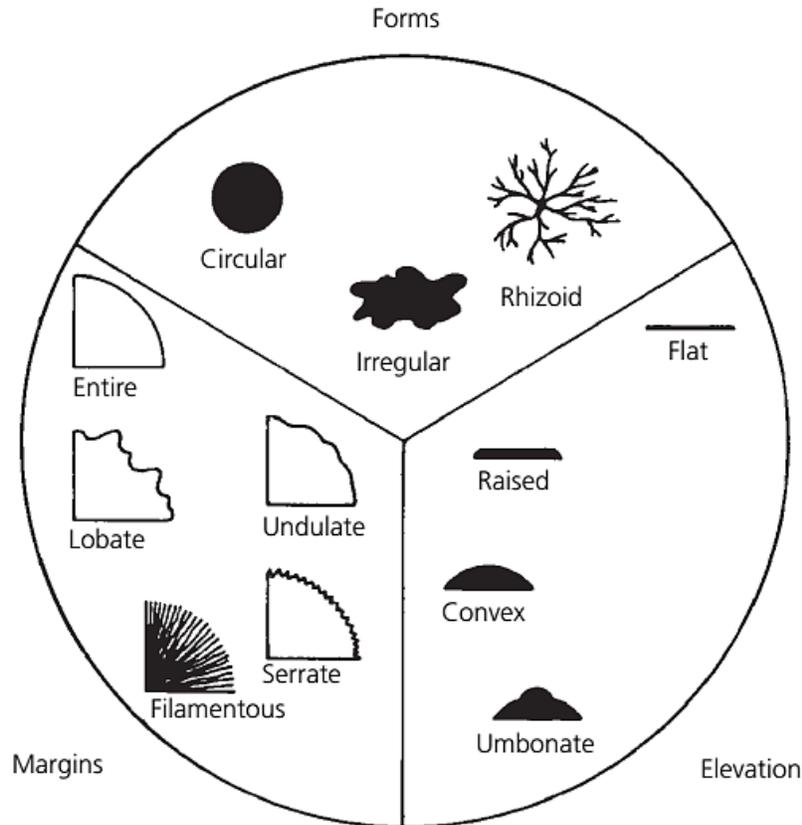
Teknik gores pada cawan

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Berikan label pada cawan dan buatlah garis untuk membedakan antar zona pada bagian belakang cawan
3. Bakar ose sampai membara, dinginkan
4. Ambil koloni menggunakan ose steril kemudian goreskan pada zona 1, goreskan dengan goresan yang rapat
5. Bakar ose sampai membara dinginkan
6. Mulai goresan pada zona 1 tarik goresan ke zona 2, goresan lebih renggang dari zona 1.
7. Bakar ose sampai membara dinginkan
8. Mulai goresan pada zona 2 tarik goresan ke zona 3, goresan lebih renggang dari zona 2
9. Putar cawan dan mulai goresan pada zona 3 tarik ke goresan ke zona 4, Goresan lebih renggang dari zona 3
10. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di inkubator
11. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33.

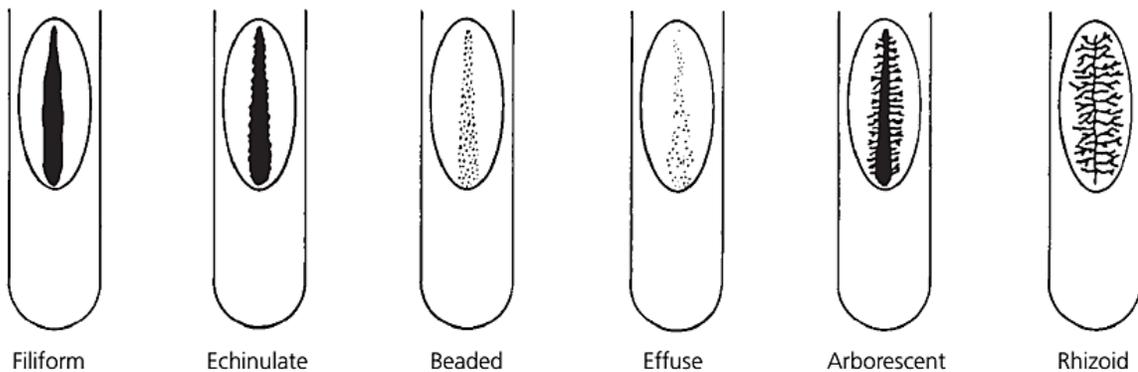
Teknik goresan agar miring

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, dinginkan

- Ambil koloni menggunakan Ose kemudian goreskan pada media agar miring secara zig-zag dari bagian bawah ke atas.
- Seal tabung dan Inkubasi di inkubator
- Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33.

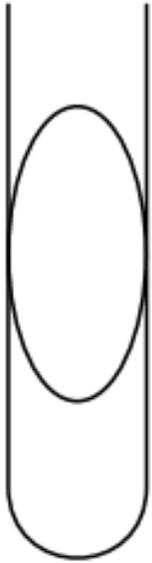


Gambar 32. Karakteristik koloni pada agar cawan¹



Gambar 33 . Karakteristik koloni pada agar miring¹

2. Hasil pengamatan bakteri pada agar miring

Gambarlah koloni yang tumbuh	Gambarlah koloni yang tumbuh
	
Spesies bakteri:	Spesies bakteri:
Tipe pertumbuhan:	Tipe pertumbuhan:
Pigmentasi (ada/tidak):	Pigmentasi (ada/tidak):

Kesimpulan:

F. **Pertanyaan Evaluasi Praktikum**

1. Apa fungsi teknik goresan?

2. Mengapa harus diperoleh biakan murni?

3. Apa saja pengamatan makroskopis yang dapat dilakukan pada koloni bakteri!

4. Apa fungsi menumbuhkan bakteri pada agar miring?

Referensi

1. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. *Microbiology, A Laboratory Manual*. Pearson Education Limited (2017).

9. IDENTIFIKASI *Staphylococcus aureus*

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Stafilokokus adalah kokus Gram positif. Sel berbentuk kokus yang muncul sebagai koloni tunggal, berpasangan dan berkelompok. Nama genus *Staphylococcus* berasal dari bahasa Yunani "*staphle*" yang berarti "sekumpulan anggur". Genus ini merupakan anggota famili *Staphylococcaceae*. Stafilokokus bersifat nonmotil, tidak membentuk spora dan aerobik atau fakultatif anaerobik (beberapa strain dapat bersifat anaerobik obligat). Koloni dapat terbentuk setelah 18-24 jam inkubasi, koloni berukuran sedang (4-8 mm) dan berwarna krem, putih atau emas samar, dan koloni yang nampak seperti mentega¹.

S. aureus, merupakan salah satu patogen stafilokokus yang penting, secara klinis, dapat menyebabkan infeksi kulit, infeksi pada luka, infeksi jaringan tulang, sindrom kulit melepuh, sindrom syok toksik, dan keracunan makanan. *S. aureus* memiliki berbagai macam faktor virulensi dan banyak karakteristik yang unik. Faktor virulensi yang paling menonjol yang dimiliki oleh *S. aureus* adalah produksi koagulase. Semua galur *S. aureus* bersifat koagulase-positif dan dapat membekukan serum. Peran koagulase dalam patogenesis penyakit tidak jelas, tetapi koagulase mungkin menyebabkan gumpalan terbentuk di sekitar infeksi stafilokokus, sehingga melindungi bakteri dari pertahanan inang². Selain koagulase, *S. aureus* juga memiliki enzim katalase. Enzim katalase adalah enzim yang dimiliki oleh bakteri aerob, mikroaerofilik dan anaerob fakultatif. Enzim ini berfungsi mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen³.

Enzim lain yang terkait dengan *S. aureus* adalah enzim DNase, enzim bersifat nuklease yang mencerna DNA. *S. aureus* juga menghasilkan hemolysin disebut α -toxin yang menyebabkan zona beta-hemolisis yang lebar dan jelas pada agar darah. Toksin memainkan peranan penting dalam virulensi karena toksin tersebut tidak hanya melisis sel darah merah tetapi juga merusak leukosit, otot jantung, dan jaringan ginjal. Selain itu, banyak strain *S. aureus* menghasilkan pigmen yang bisa bertindak sebagai faktor virulensi. Pigmen (staphyloxanthin) memiliki sifat antioksidan yang mencegah oksigen reaktif (superoksida) yang dihasilkan oleh kekebalan sistem inang saat membunuh bakteri¹.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip dasar identifikasi bakteri patogen
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan pengamatan mikroskopis
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan uji biokimia yang relevan dengan bakteri yang diidentifikasi

4. Alat dan Bahan

- | | |
|--|--------------------|
| 1. Biakan <i>Staphylococcus aureus</i> | 8. Pewarna Gram |
| 2. Biakan <i>Streptococcus mutans</i> | 9. Spidol permanen |
| 3. Media <i>Manitol Salt Agar</i> (MSA) | 10. Tisu atau Lap |
| 4. Media <i>Blood Agar Plate</i> (BAP) | 11. Alkohol |
| 5. Larutan uji koagulase, plasma sitrat | 12. Lampu spirtus |
| 6. Larutan uji katalase, hidrogen peroksida (H ₂ O ₂ 3%) | 13. Ose |
| 7. Kaca objek | 14. Mikroskop |
| | 15. Minyak Imersi |

5. Prosedur Praktikum

Inokulasi *S. aureus* pada media MSA dan BAP

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Berikan label pada cawan dan buatlah garis untuk membedakan antar zona pada bagian belakang cawan
3. Bakar ose sampai membara
4. Ambil koloni *S. aureus* menggunakan ose steril kemudian goreskan pada zona 1, goreskan dengan goresan yang rapat
5. Bakar ose sampai membara dinginkan
6. Mulai goresan pada zona 1 tarik goresan ke zona 2, goresan lebih renggang dari zona 1.
7. Bakar ose sampai membara dinginkan
8. Mulai goresan pada zona 2 tarik goresan ke zona 3, goresan lebih renggang dari zona 2
9. Putar cawan dan mulai goresan pada zona 3 tarik ke goresan ke zona 4, Goresan lebih renggang dari zona 3
10. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di inkubator

11. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33 pada Bab 9. Pada BAP amati adakah zona hemolisis..

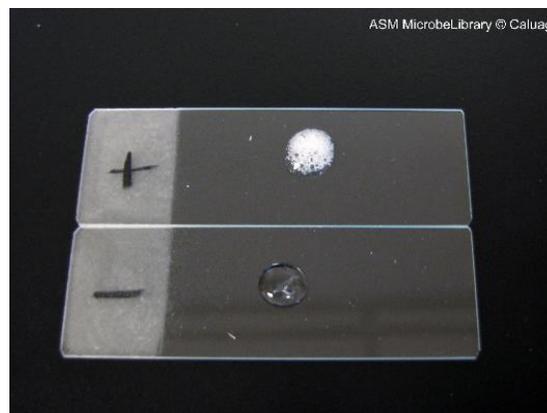
Pewarnaan Gram

6. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
7. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
8. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada kaca tengah.
9. Lakukan pewarnaan Gram
10. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Uji Biokimia ^{4,5}

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada bagian kanan kaca objek. Ulang kembali, letakkan koloni pada bagian kiri kaca objek, sampai terdapat dua titik apusan di kanan dan kiri.
4. Teteskan koloni dengan larutan untuk uji katalase
5. Ulangi untuk uji koagulase
6. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Catatan: Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung pada preparat. Uji koagulase positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan pada kaca objek



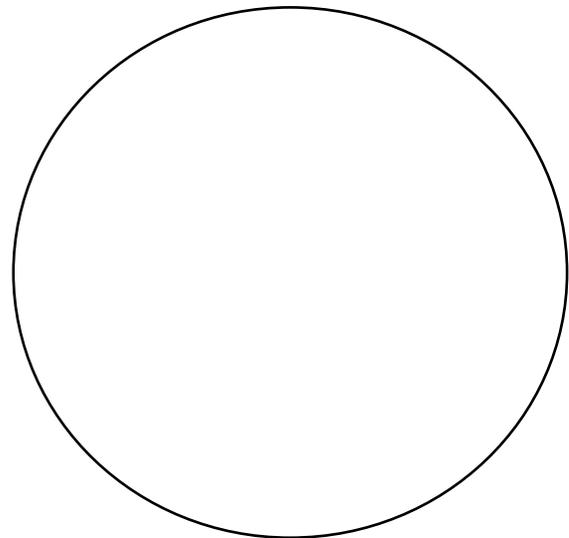
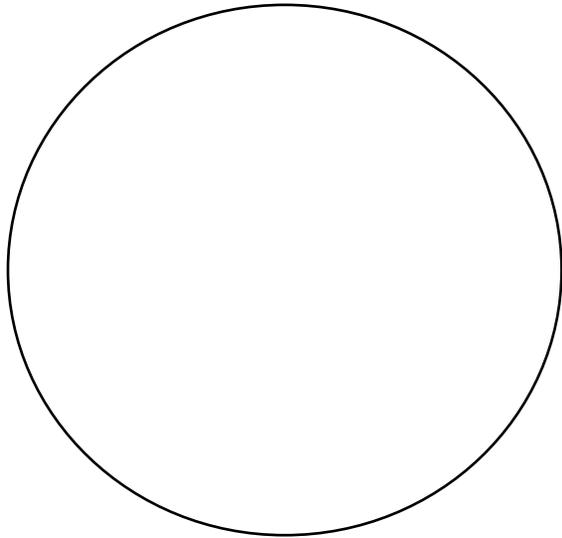
Gambar 34. Hasil uji katalase positif dan negatif⁴

Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil pengamatan bakteri pada cawan petri

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan



Media Blood Agar Plate

Media Manitol Salt Agar

Spesies bakteri: _____

Spesies bakteri: _____

Bentuk koloni, elevasi dan ukuran :

Bentuk koloni, elevasi dan ukuran :

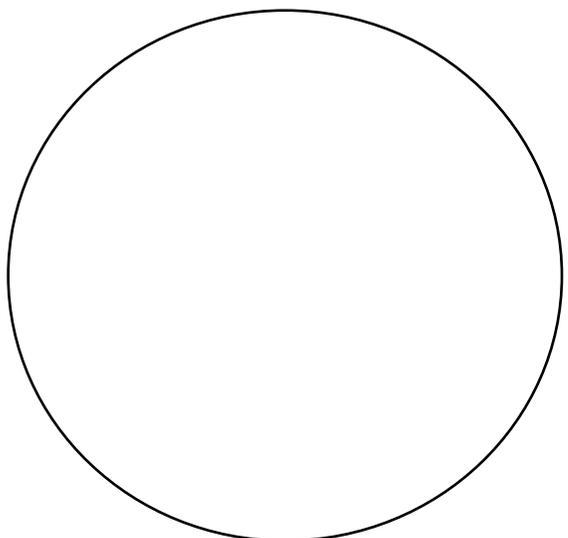
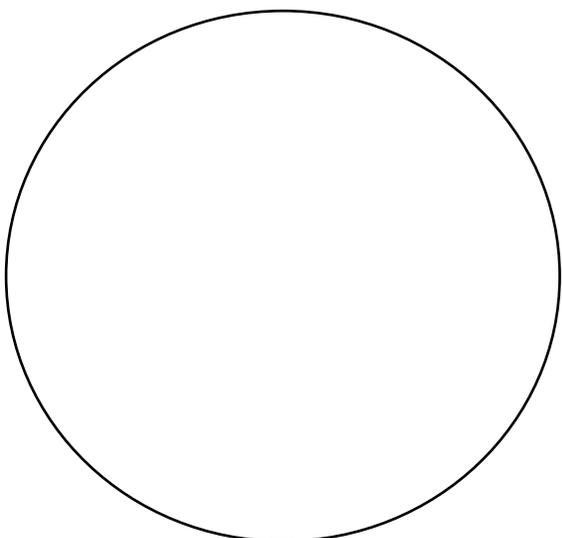
Pigmentasi (ada/tidak): _____

Pigmentasi (ada/tidak): _____

Hemolisis (ada/tidak): _____

Hasil Pewarnaan Gram : _____

Hasil Pewarnaan Gram : _____



Perbesaran :

Perbesaran :

2. Hasil pengamatan uji katalase dan koagulase

Gambarlah hasil uji katalase	Gambarlah hasil uji koagulase
Spesies bakteri yang diuji:	Spesies bakteri yang diuji:
Hasil Uji:	Hasil Uji:

Kesimpulan:

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Mengapa untuk identifikasi *S. aureus* digunakan media *Blood Agar Plate*?

2. Mengapa untuk identifikasi *S. aureus* digunakan media *Manitol Salt Agar*?

3. Apa fungsi uji katalase?

4. Apa fungsi uji koagulase?

5. Mengapa perlu dilakukan pewarnaan Gram?

Referensi

1. Mahon, C. & Lehman, D. *Textbook Diagnostic Microbiology*. (Elsevier, 2019). doi:LCCN 2017051723.
2. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
3. Leboffe, M. J. & Pierce, B. E. *A Photographic Atlas for the 4th Edition Microbiology Laboratory*. (Morton Publishing Company, 2011). doi:10.2174/187152008785133128.
4. Microbiology, A. S. for. Catalase Test. <https://asm.org/Image-Gallery/Catalase-Test> (2010).
5. American Society for Microbiology. Coagulase Test for *Staphylococcus aureus*. <https://asm.org/Image-Gallery/Coagulase-Test-for-Staphylococcus-Species> (2009).

10. IDENTIFIKASI *Escherichia coli*

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

E. coli adalah patogen oportunistik yang penting. Umumnya, *E. coli* ditemukan dalam jumlah besar hidup di usus besar; Namun, *E. coli* juga bisa tumbuh di luar situs tubuh dan menyebabkan infeksi saluran kemih, sepsis, infeksi luka, dan meningitis. Sebagian besar infeksi yang melibatkan *E. coli* bersifat endogen, artinya *E. coli* dari mikrobiota komensal membentuk infeksi ketika tumbuh di luar habitat alaminya. *E. coli* juga dapat menyebabkan penyakit klinis pada kekebalan tubuh pasien yang sudah lemah ¹.

Selain itu, spesies ini bisa memperoleh faktor virulensi yang dikodekan pada plasmid atau dalam DNA bakteriofag (konversi lisogenik), menyebabkan beberapa strain untuk meningkatkan virulensi. *E. coli* 0157:H7 adalah strain yang sangat mematikan berhubungan dengan berbagai jenis makanan yang terkontaminasi dan telah menyebabkan banyak kematian. Strain *E. coli* ini menghasilkan racun yang merusak pembuluh darah dan penyebabnya diare yang sangat parah ¹.

Bakteri *E. coli* menurut nomenklatur didefinisikan sebagai koliform karena merupakan organisme Gram negatif yang dapat memfermentasi laktosa. Karakteristik biokimia lain yang digunakan dalam identifikasi *E. coli* meliputi motilitasnya, kemampuannya untuk memproduksi indol, dan ketidakmampuannya untuk menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Koliform lainnya yang berpotensi menjadi patogen manusia termasuk *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, dan *Serratia*. Organisme ini dapat menyebabkan infeksi pada individu yang pertahanannya terganggu, tetapi jarang menyebabkan infeksi pada sistem kekebalan tubuh individu yang sehat¹.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip dasar identifikasi bakteri patogen *Escherichia coli*
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan pengamatan mikroskopis
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan uji biokimia yang relevan dengan bakteri yang diidentifikasi

C. Alat dan Bahan

1. Biakan *Escherichia coli*
2. Media *Mac Conkey Agar* (MAC)
3. Media *Blood Agar Plate* (BAP)
4. Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)
5. Media *Simon Citrate Agar* (SCA)
6. Larutan uji koagulase, plasma sitrat
7. Larutan uji katalase, hidrogen peroksida (H_2O_2 3%)
8. Media Urea
9. Media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)
10. Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
11. Larutan uji MR-VP, KOH
12. Larutan uji MR-VP, α -Naphthol
13. Media Indol
14. Pewarna Gram
15. Spidol permanen
16. Tisu atau Lap
17. Alkohol
18. Lampu spiritus
19. Ose
20. Mikroskop
21. Minyak Imersi

D. Prosedur Praktikum

Pewarnaan Gram

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada kaca tengah.
4. Lakukan pewarnaan Gram
5. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Inokulasi *E. coli* pada media padat cawan

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Berikan label pada cawan dan buatlah garis untuk membedakan antar zona pada bagian belakang cawan
3. Bakar ose sampai membara
4. Ambil koloni *E. coli* menggunakan ose steril kemudian goreskan pada zona 1, goreskan dengan goresan yang rapat
5. Bakar ose sampai membara dinginkan

6. Mulai goresan pada zona 1 tarik goresan ke zona 2, goresan lebih renggang dari zona 1.
7. Bakar ose sampai membara dinginkan
8. Mulai goresan pada zona 2 tarik goresan ke zona 3, goresan lebih renggang dari zona 2
9. Putar cawan dan mulai goresan pada zona 3 tarik ke goresan ke zona 4, Goresan lebih renggang dari zona 3
10. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di incubator. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
11. Amati biakan mikroorganismenya yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33 pada Bab 9. Pada BAP amati adakah zona hemolisis..

Uji Biokimia ^{2,3}

Uji Katalase dan Koagulase

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada bagian kanan kaca objek. Ulang kembali, letakkan koloni pada bagian kiri kaca objek, sampai terdapat dua titik apusan di kanan dan kiri.
4. Teteskan koloni dengan larutan untuk uji katalase
5. Ulangi untuk uji koagulase
6. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Catatan: Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung pada preparat. Uji koagulase positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan pada kaca objek

Uji MR-VP, Uji Indol dan Uji TSIA

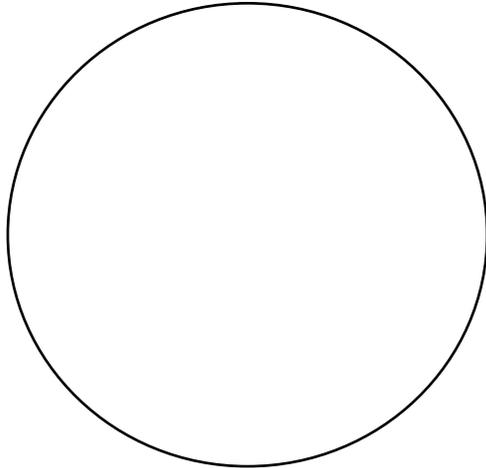
1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian inokulasikan koloni pada media. Khusus untuk media TSIA tusuk media tegak lurus kemudian gores pada bagian atas agar miring.
4. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Amati biakan mikroorganismenya yang tumbuh setelah 24 jam. Catat hasil pengamatan.

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil pengamatan bakteri pada cawan petri

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

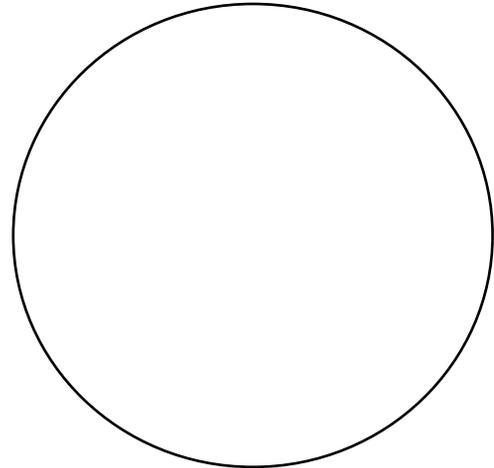
Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan



Media Blood Agar Plate

Spesies bakteri: _____

Keterangan:



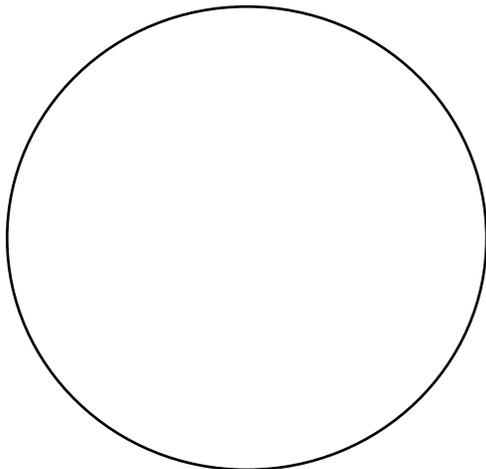
Media Mac Conkey Agar

Spesies bakteri: _____

Keterangan:

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

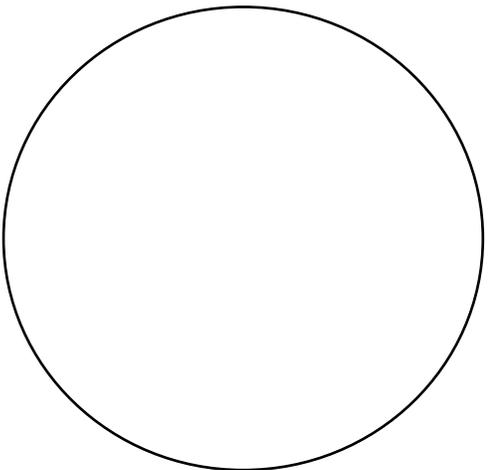
Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan



Media Salmonella Shigella Agar

Spesies bakteri: _____

Keterangan:



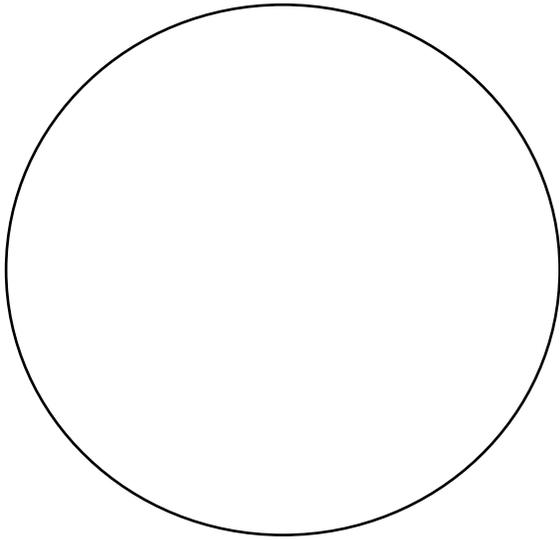
Media Eosine Methylene Blue Agar

Spesies bakteri: _____

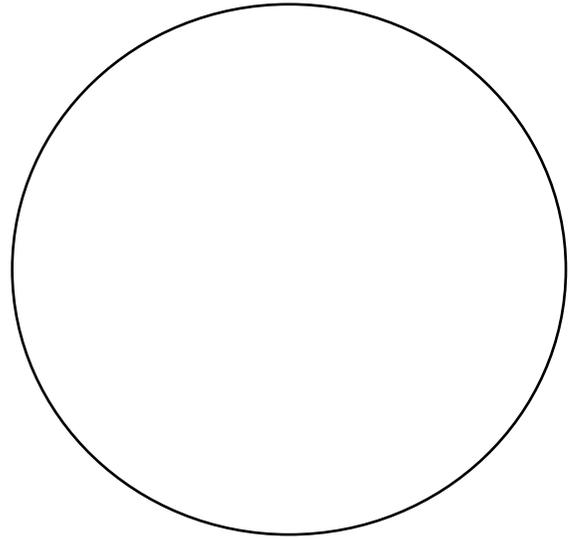
Keterangan:

Hasil Pewarnaan Gram : _____

Hasil Pewarnaan Gram : _____



Perbesaran :



Perbesaran :

2. Hasil pengamatan uji katalase dan koagulase

Gambarlah hasil uji katalase	Gambarlah hasil uji koagulase
Spesies bakteri:	Spesies bakteri:
Hasil Uji:	Hasil Uji:

3. Hasil uji biokimia lainnya

No	Nama Bakteri	Urease	Indol	MR-VP	TSIA	Sitrat
1						
2						

Kesimpulan:

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Mengapa untuk identifikasi *E. coli* digunakan media *Blood Agar Plate*?

2. Mengapa untuk identifikasi *E. coli* digunakan media *Mac Conkey Agar*?

3. Apa fungsi uji TSIA? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *E. coli* !

4. Apa fungsi uji Indol? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *E. coli* !

5. Mengapa perlu dilakukan pewarnaan Gram?

Referensi

1. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
2. Reiner, K. Catalase Test. <https://asm.org/Image-Gallery/Catalase-Test> (2010).
3. American Society for Microbiology. Coagulase Test for *Staphylococcus aureus*. <https://asm.org/Image-Gallery/Coagulase-Test-for-Staphylococcus-Species> (2009).

11. IDENTIFIKASI *Salmonella sp.*

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Anggota Enterobacteriaceae yang sering menjadi patogen dan hidup di usus adalah *Salmonella*, *Shigella*, dan *Yersinia*. Organisme ini berbeda dari patogen usus manusia karena tidak menjadi bagian dari mikrobiota normal manusia. Perbedaan lainnya mereka memiliki faktor virulensi yang berkembang dengan baik.

Anggota genus *Salmonella* menghasilkan infeksi yang signifikan pada manusia dan hewan tertentu. Banyak serotipe *Salmonella* biasanya ditemukan pada hewan berdarah dingin. *Salmonella* juga ditemukan pada hewan pengerat dan burung, yang merupakan inang alami mereka¹. Infeksi *Salmonella* melibatkan gastroenteritis, septikemia, dan demam tifoid. Beberapa strain *Salmonella*, seperti yang menyebabkan demam tifoid, bisa ada pada pasien selama lebih dari satu tahun. Keadaan ini setelah infeksi *Salmonella* ini merupakan sumber penting dari infeksi manusia.

Selain dari manusia, organisme ini juga ditularkan melalui unggas dan produk susu. *Salmonella* merupakan salah satu penyebab utama penyakit bawaan makanan dan sering menyebar pada unggas yang tidak disiapkan dengan benar. *Salmonella* merupakan bakteri Gram negatif dan bersifat anaerobik fakultatif¹. Ketika tumbuh pada media diferensial atau selektif, *Salmonella* menghasilkan koloni yang tidak memfermentasi laktosa dengan bagian tengah berwarna hitam (jika media mengandung indikator untuk hidrogen sulfida). Patogen ini memiliki flagela (bersifat motil). Hasil uji indol dan urease akan menunjukkan hasil negatif².

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip dasar identifikasi bakteri patogen *Salmonella sp.*
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan identifikasi dengan pengamatan mikroskopis
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan uji biokimia yang relevan dengan bakteri yang diidentifikasi

C. Alat dan Bahan

1. Biakan *Salmonella sp.*
2. Media *Mac Conkey Agar* (MAC)
3. Media *Blood Agar Plate* (BAP)
4. Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)
5. Media *Simon Citrate Agar* (SCA)
6. Larutan uji oksidase, 1% Gordon and Mcleod
7. Larutan uji katalase, hidrogen peroksida (H_2O_2 3%)
8. Media Urea
9. Media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)
10. Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
11. Larutan uji MR-VP, KOH
12. Larutan uji MR-VP, α -Naphthol
13. Media Indol
14. Pewarna Gram
15. Spidol permanen
16. Tisu atau Lap
17. Alkohol
18. Lampu spirtus
19. Ose
20. Mikroskop
21. Minyak Imersi

D. Prosedur Praktikum

Pewarnaan Gram

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada kaca tengah.
4. Lakukan pewarnaan Gram
5. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Inokulasi *Salmonella* pada media padat cawan

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Berikan label pada cawan dan buatlah garis untuk membedakan antar zona pada bagian belakang cawan
3. Bakar ose sampai membara
4. Ambil koloni menggunakan ose steril kemudian goreskan pada zona 1, goreskan dengan goresan yang rapat
5. Bakar ose sampai membara dinginkan

6. Mulai goresan pada zona 1 tarik goresan ke zona 2, goresan lebih renggang dari zona 1.
7. Bakar ose sampai membara dinginkan
8. Mulai goresan pada zona 2 tarik goresan ke zona 3, goresan lebih renggang dari zona 2
9. Putar cawan dan mulai goresan pada zona 3 tarik ke goresan ke zona 4, Goresan lebih renggang dari zona 3
10. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di incubator. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
11. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33 pada Bab 9. Pada BAP amati adakah zona hemolisis..

Uji Biokimia ^{3,456}

Uji Katalase dan Oksidase

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada bagian kanan kaca objek. Ulang kembali, letakkan koloni pada bagian kiri kaca objek, sampai terdapat dua titik apusan di kanan dan kiri.
4. Teteskan koloni dengan larutan untuk uji katalase
5. Ulangi untuk uji Oksidase, gunakan cotton bud untuk melihat ada tidaknya warna ungu pada hasil uji oksidase.
6. Alternatif lainnya, biakan bakteri dapat langsung digoreskan pada kertas saring, kemudian ditetaskan reagen 1% Gordon dan Mcleod
7. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Catatan: Uji Oksidase positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada bakteri uji

Uji MR-VP, Uji Indol dan UJI TSIA

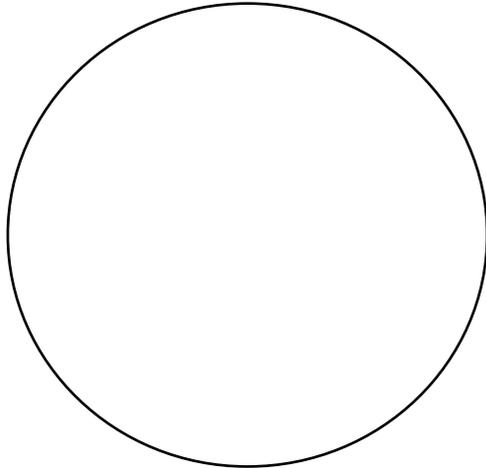
1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian inokulasikan koloni pada media. Khusus untuk media TSIA tusuk media tegak lurus (pada 3/4 bagian agar) kemudian gores pada bagian atas agar miring.
4. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat hasil pengamatan.

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil pengamatan bakteri pada cawan petri

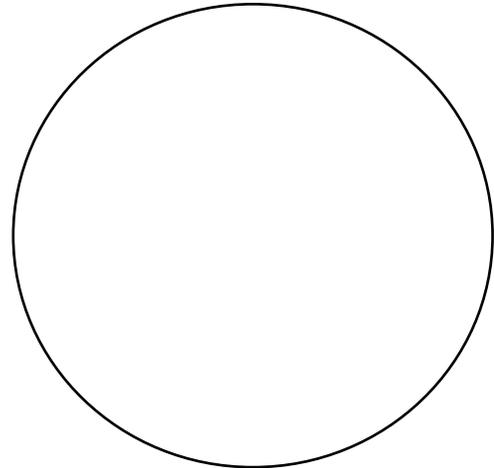
Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan



Media Blood Agar Plate

Spesies bakteri: _____
Keterangan:



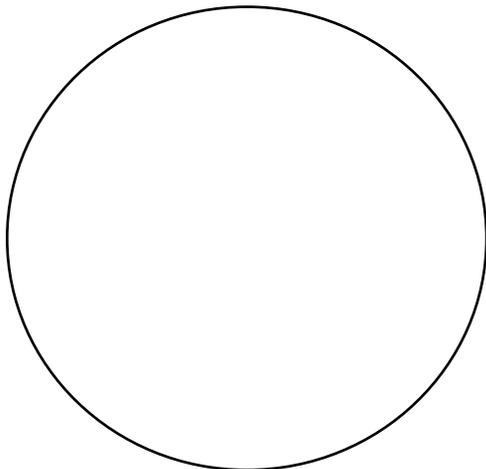
Media Mac Conkey Agar

Spesies bakteri: _____
Keterangan:

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

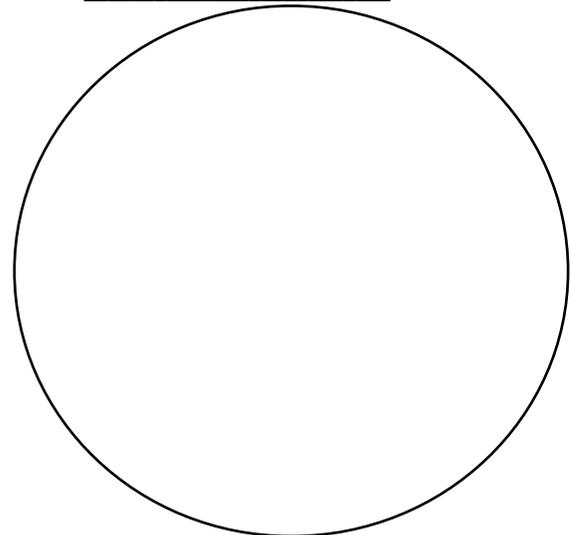
Hasil Pewarnaan Gram

: _____



Media Salmonella Shigella Agar

Spesies bakteri: _____
Keterangan:



Perbesaran :

2. Hasil pengamatan uji katalase dan oksidase

Gambarlah hasil uji katalase	Gambarlah hasil uji oksidase
Spesies bakteri:	Spesies bakteri:
Hasil Uji:	Hasil Uji:

3. Hasil uji biokimia lainnya

Nama Bakteri	Urease	Indol	<i>Methyl Red</i>	Voges Proskauer	Sitrat	TSIA

Kesimpulan:

--

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Mengapa untuk identifikasi *Salmonella* digunakan media *Mac Conkey Agar*?

2. Mengapa untuk identifikasi *Salmonella* digunakan media *Salmonella Shigella Agar*?

3. Apa fungsi uji TSIA? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *Salmonella* !

4. Apa fungsi uji Sitrat? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *Salmonella* !

5. Mengapa perlu dilakukan uji oksidase?

Referensi

1. Mahon, C. & Lehman, D. *Textbook Diagnostic Microbiology*. (Elsevier, 2019). doi:LCCN 2017051723.
2. Brown, A. E. & Smith, H. R. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. (2017).
3. Shields, P. & Cathcart, L. Oxidase Test Protocol - Library. *American Society for Microbiology, ASM MicrobeLibrary* 1-5
<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3229-oxidase-test-protocol> (2013).
4. Reiner, K. Catalase Test. <https://asm.org/Image-Gallery/Catalase-Test> (2010).
5. MacWilliams, M. P. Indole Test Protocol. *American Society for Microbiology for Microbiology* 1-9 (2009).
6. Mcdevitt, S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology* 1-9 www.asmscience.org (2009).

12. IDENTIFIKASI *Pseudomonas sp.*

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc.

A. Pendahuluan

Kelompok *Pseudomonas* adalah Gram-negatif, motil, berbentuk batang basil atau cocobasil, bersifat aerobik, beberapa di antaranya menghasilkan pigmen yang larut dalam air. *Pseudomonas* menghuni berbagai lingkungan yang beragam, seperti tanah, air, tumbuhan, dan hewan. Spesies *Pseudomonas* yang relevan secara klinis dibagi menjadi dua kelompok yang berbeda berdasarkan kemampuan mereka untuk menghasilkan pigmen fluoresen tertentu dan tidak.

Kelompok *Pseudomonas* yang menghasilkan fluoresen yaitu: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteilii*, *P. veronii*, dan *P. mosselii*. Organisme ini menghasilkan pigmen kuning-hijau yang larut dalam air (*pyoverdine*) yang berpendar biru-hijau di bawah sinar UV. *P. aeruginosa* menghasilkan pigmen *pyocyanin* (kebiruan) ¹. Kelompok bakteri yang tidak menghasilkan fluoresen adalah *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola*, dan *P. oryzihabitans*. Patogen utama dari kelompok *Pseudomonas* adalah *Pseudomonas aeruginosa* ¹.

Genus *Pseudomonas* menyumbang persentase terbesar semua nonfermentor diisolasi dari spesimen klinis. Karakteristik umum bakteri ini bersifat aerobik, oksidase dan katalase positif dan bersifat motil ². Patogen utama *P. aeruginosa* pada agar darah akan membentuk koloni berwarna abu-abu dan kehijauan, selain itu tidak ditemukan zona hemolisis ¹.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip dasar identifikasi bakteri patogen *Pseudomonas sp.*
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan identifikasi dengan pengamatan mikroskopis
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan uji biokimia yang relevan dengan bakteri yang diidentifikasi

C. Alat dan Bahan

1. Biakan *Pseudomonas aeruginosa*
2. Media *Mac Conkey Agar* (MAC)
3. Media *Blood Agar Plate* (BAP)
4. Media *Simon Citrate Agar* (SCA)
5. Larutan uji oksidase, 1% Gordon and Mcleod
6. Larutan uji katalase, hidrogen peroksida (H₂O₂ 3%)
7. Media Urea
8. Media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)
9. Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
10. Larutan uji MR-VP, KOH
11. Larutan uji MR-VP, α -Naphthol
12. Media Indol
13. Pewarna Gram
14. Spidol permanen
15. Tisu atau Lap
16. Alkohol
17. Lampu spiritus
18. Ose
19. Mikroskop
20. Minyak Imersi

D. Prosedur Praktikum

Pewarnaan Gram

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada kaca tengah
4. Lakukan pewarnaan Gram
5. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Inokulasi *Pseudomonas* pada media padat cawan

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Berikan label pada cawan dan buatlah garis untuk membedakan antar zona pada bagian belakang cawan
3. Bakar ose sampai membara
4. Ambil koloni menggunakan ose steril kemudian goreskan pada zona 1, goreskan dengan goresan yang rapat
5. Bakar ose sampai membara dinginkan
6. Mulai goresan pada zona 1 tarik goresan ke zona 2, goresan lebih renggang dari zona 1.
7. Bakar ose sampai membara dinginkan

8. Mulai goresan pada zona 2 tarik goresan ke zona 3, goresan lebih renggang dari zona 2
9. Putar cawan dan mulai goresan pada zona 3 tarik ke goresan ke zona 4, Goresan lebih renggang dari zona 3
10. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di incubator. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
11. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat pertumbuhan sesuai dengan arahan pada Gambar 32 dan Gambar 33 pada Bab 9. Pada BAP amati adakah zona hemolisis..

Uji Biokimia ^{3,456}

Uji Katalase dan Oksidase

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian letakkan pada bagian kanan kaca objek. Ulang kembali, letakkan koloni pada bagian kiri kaca objek, sampai terdapat dua titik apusan di kanan dan kiri.
4. Teteskan koloni dengan larutan untuk uji katalase
5. Ulangi untuk uji Oksidase, gunakan cotton bud untuk melihat ada tidaknya warna ungu pada hasil uji oksidase.
6. Alternatif lainnya, biakan bakteri dapat langsung digoreskan pada kertas saring, kemudian ditetaskan reagen 1% Gordon dan Mcleod
7. Amati hasil yang diperoleh dan catat pada hasil pengamatan

Catatan: Uji Oksidase positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada bakteri uji

Uji MR-VP, Uji Indol dan UJI TSIA

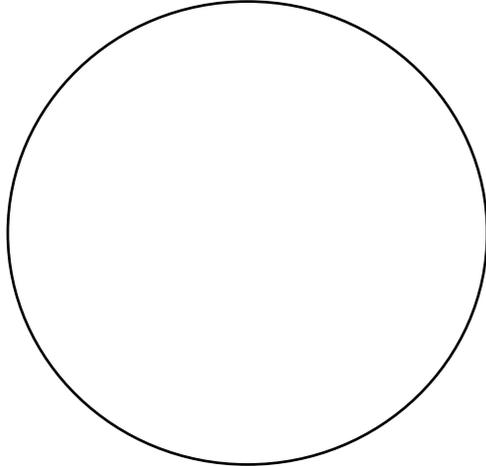
1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, kemudian dinginkan
3. Ambil koloni menggunakan ose kemudian inokulasikan koloni pada media. Khusus untuk media TSIA tusuk media tegak lurus (pada 3/4 bagian agar) kemudian gores pada bagian atas agar miring.
4. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam. Catat hasil pengamatan.

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil pengamatan bakteri pada cawan petri

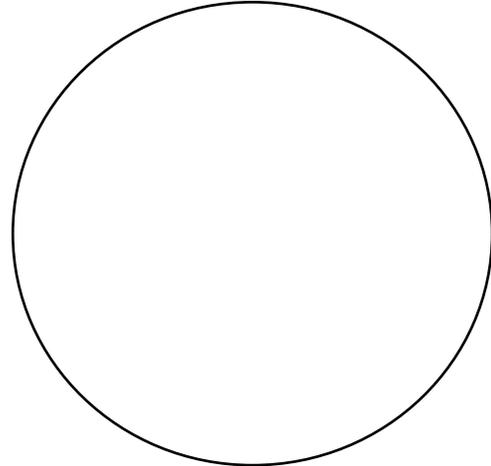
Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan



Media Blood Agar Plate

Spesies bakteri: _____
Keterangan:

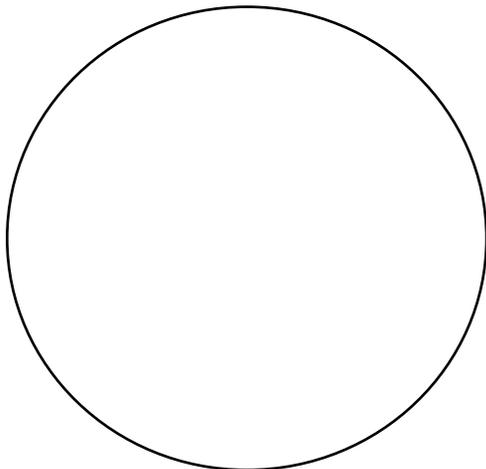


Media Mac Conkey Agar

Spesies bakteri: _____
Keterangan:

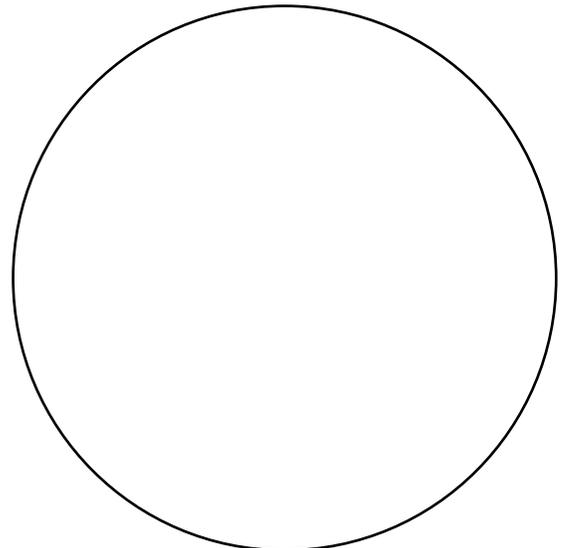
Gambarlah koloni yang tumbuh pada cawan

Hasil Pewarnaan Gram: _____



Media Pseudomonas Base Agar

Spesies bakteri: _____
Keterangan:



Perbesaran :

F. Hasil pengamatan uji katalase dan oksidase

Gambarlah hasil uji katalase	Gambarlah hasil uji oksidase
Spesies bakteri:	Spesies bakteri:
Hasil Uji:	Hasil Uji:

G. Hasil uji biokimia lainnya

Nama Bakteri	Urease	Indol	<i>Methyl Red</i>	Voges Proskauer	Sitrat	TSIA

Kesimpulan:

--

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Mengapa untuk identifikasi *Pseudomonas* digunakan media *Mac Conkey Agar*?

2. Mengapa untuk identifikasi *Pseudomonas* digunakan media *Blood Agar Plate*?

3. Apa fungsi uji TSIA? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *Pseudomonas*!

4. Apa fungsi uji Indol? Jelaskan hasilnya jika bakteri yang tumbuh *Pseudomonas* !

5. Mengapa perlu dilakukan uji oksidase?

Referensi

1. Carroll, K. C., Butel, J. & Morse, S. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E.* (2019).
2. Mahon, C. & Lehman, D. *Textbook Diagnostic Microbiology.* (Elsevier, 2019). doi:LCCN 2017051723.
3. Shields, P. & Cathcart, L. Oxidase Test Protocol - Library. *American Society for Microbiology, ASM MicrobeLibrary* 1-5 <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3229-oxidase-test-protocol> (2013).
4. Reiner, K. Catalase Test. <https://asm.org/Image-Gallery/Catalase-Test> (2010).
5. MacWilliams, M. P. Indole Test Protocol. *American Society for Microbiology for Microbiology* 1-9 (2009).
6. Mcdevitt, S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology* 1-9 www.asmscience.org (2009).