



BUKU PANDUAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI LINGKUNGAN



**Slamet Isworo
Eko Hartini**

**FAKULTAS KESEHATAN
PROGRAM STUDI KESEHATAN LINGKUNGAN
2 0 1 7**

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Ilahi Robbi, karena atas rahmat dan karunianya, Kami dapat menyelesaikan Modul Praktikum Mikrobiologi Lingkungan dengan lancar. Modul ini semoga dapat berguna dalam proses kegiatan praktikum bagi mahasiswa S1 Kesehatan Lingkungan. Dalam kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dekan Fakultas Kesehatan Universitas Dian Nuswantoro Semarang yang telah memberikan fasilitas dalam pembuatan modul ini.
2. Seluruh rekan rekan dosen yang turut memberikan masukan saran dan kritik sehingga modul Praktikum Mikrobiologi Lingkungan dapat selesai disusun.
3. Seluruh karyawan dan mahasiswa S1 Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Universitas Dian Nuswantoro Semarang yang telah turut berpartisipasi aktif dalam pelaksanaan penyusunan modul praktikum ini.

Akhir kata semoga Modul Praktikum Mikrobiologi Lingkungan ini dapat bermanfaat bagi kegiatan akademik di Universitas Dian Nuswantoro.

Penulis

DAFTAR ISI

Kata Pegnantar	2
Daftar Isi	3
Tata Tertib	4
<i>Standart Operating Procedure</i> (SOP) Praktikum Mikrobiologi	6
Panduan Penyusunan Laporan	8
Panduan Penilaian	16
A. MODUL PRAKTIKUM	
Acara I. Pengenalan Alat	18
Acara II. Dasar-dasar Teknik Mikrobiologi	21
1. Media dan Cara Pembuatan Media	21
2. Teknik Pemindahan Kultur Mikroorganisme	23
3. Teknik Isolasi Mikroorganisme	25
4. Dasar Pewarnaan Bakteri : Pembuatan Pulasan Bakteri	30
Acara III. Uji Potensi Senyawa Antimikroorganisme Secara Difusi	33
A. Difusi Sumuran	34
B. Difusi <i>Paper Disk</i>	36
Acara IV. Uji Cemar Mikroorganisme	39
A. Uji Angka Lempeng Total	40
B. Uji Angka Kapang Khamir	41
Acara V. Identifikasi dan Determinasi Bakteri	43
A. Morfologi sel	43
B. Uji Biokimiawi	45
C. Determinasi Bakteri	49
B. MODUL LANJUTAN (PENELITIAN)	
Acara VI. Uji Kepekaan Antibiotik : Penentuan KHM	50
Acara VII. Uji Kepekaan Antibiotik : Penentuan KHM	54
Acara VIII. Uji Biodegradasi Bakteri Pada Substrat Organophosphat ...	62
RESPONSI	77
Pustaka Acuan	78
Lampiran 1. Prosedur Perhitungan ALT	80
Lampiran 2. Prosedur Perhitungan AKK	81
Lampiran 3. Prosedur dan Cara Penentuan MIC dan MBC	85

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikan (mahasiswa peserta praktikum) wajib hadir 5 menit sebelum acara praktikum berlangsung. Keterlambatan lebih dari 5 menit tidak diperkenankan mengikuti *pretest*. Praktikan tidak diperkenankan mengikuti praktikum apabila keterlambatan lebih dari 15 menit.
2. Praktikan diharuskan memakai jas praktikum berwarna putih yang bersih (sebelum memasuki laboratorium), *nametag* (berisi nama panggilan dan tiga digit terakhir dari NIM), alat pelindung diri berupa sarung tangan (*handscoon*) dan masker (pada saat pengambilan dan penimbangan media, inokulasi mikroorganisme, isolasi mikroorganisme dan perlakuan yang berhubungan dengan mikroorganisme). Pemakaian jas praktikum dan masker juga diwajibkan saat melakukan pengamatan hasil di luar jam praktikum.
3. Setiap praktikan harus mempelajari dan memahami teori dan prosedur kerja sebelum praktek berlangsung. Sebelum praktikum dimulai, praktikan wajib mengumpulkan laporan sementara yang merupakan prasyarat mengikuti acara praktikum pada hari itu. Praktikan yang tidak mengumpulkan laporan sementara, tidak diperbolehkan mengikuti praktikum pada hari itu.
4. Praktikan bekerja secara berkelompok sesuai pengelompokan yang telah ditentukan dan diharapkan proaktif untuk belajar.
5. Praktikan diharuskan bekerja secara terencana, hati-hati dan teliti. Setelah selesai praktikum, alat-alat maupun bahan yang digunakan harus dikembalikan dalam kondisi bersih. Semua praktikan bertanggung jawab terhadap kebersihan dan keamanan ruang praktikum, serta alat-alat yang digunakan.
7. Praktikan yang memecahkan, merusakkan dan atau menghilangkan alat diharuskan melapor ke dosen/asisten jaga dan mengganti alat tersebut secepatnya. Praktikan yang merusakkan, memecahkan atau menghilangkan alat diwajibkan menuliskan pada blangko yang telah disediakan di laboratorium di bawah pengawasan dosen/assisten koordinator.
8. Praktikan diharuskan menjaga kemurnian bahan-bahan yang dipakai dan menjauhkan segala macam kontaminan yang dapat mengganggu kevalidan hasil praktikum.

9. Setelah selesai pelaksanaan dan pengamatan praktikum, praktikan wajib membuat data sementara dalam laporan sementara yang akan dikoreksi oleh asisten pendamping kelompok yang bersangkutan. Data sementara yang sudah disetujui asisten bisa langsung dibawa pulang untuk dibuat Laporan Resmi mata acara praktikum pada hari itu. Pengamatan dilakukan sesuai kebutuhan dan waktu yang telah ditentukan.
10. Untuk mengikuti praktikum minggu berikutnya diharuskan sudah menyerahkan Laporan Resmi dari acara praktikum minggu sebelumnya. Bila pada saat itu tidak menyerahkan laporan, nilai laporan sama dengan **NOL**.

SOP PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Setiap praktikan akan selalu berhubungan dengan mikroorganisme patogen selama menjalankan Praktikum Mikrobiologi. Untuk mencegah hal-hal yang tidak diinginkan, setiap praktikan diharuskan mentaati peraturan yang telah ditetapkan dan menjalankan petunjuk yang diberikan asisten/dosen jaga.

1. Semua alat tulis, tas dan benda-benda lain diletakkan pada tempat yang disediakan dan tidak meletakkan di meja laboratorium
2. Penggunaan antiseptic/desinfektan untuk membersihkan meja laboratorium sebelum dan sesudah praktikum.
3. Cucilah tangan dengan air dan sabun sebelum dan sesudah kegiatan di laboratorium.
4. Jangan merokok, makan atau minum di ruang laboratorium dan jauhkan tangan anda dari mulut, hidung, mata dan telinga selama Anda bekerja di laboratorium.
5. Perlakukan semua organisme yang Anda tangani sebagai patogen atau mampu menimbulkan penyakit.
6. Semua praktikan tidak diperkenankan membawa keluar biakan mikroorganisme apapun dari ruangan mikroorganisme/ruangan laboratorium.
7. Bila anda memecahkan tabung berisi mikroorganisme, tuangkan desinfektan ke atasnya, sapukan dan buang di tempat yang disediakan untuk pecahan kaca atau tuangkan spiritus dan kemudian bakar.
8. Jika praktikan terkontaminasi atau terluka segera hubungi asisten/dosen yang bertanggung jawab.
9. Jarum inokulasi dan ose harus disterilkan dengan cara memijarkan seluruh panjang kawatnya sebelum dan sesudah setiap penggunaan. Percikan biakan dapat dihindarkan dengan cara memulai pemanasan di dalam kerucut api sebelah dalam yang berwarna lebih biru.
10. Pipet yang digunakan lebih dari satu kali tidak diperkenankan meletakkannya di meja tetapi letakkanlah pada penyangga pipet yang telah tersedia.
11. Api pada pembakar bunsen harus dimatikan pada saat tidak digunakan.

12. Biakan yang tidak diperlukan lagi serta bahan-bahan bekas pakai yang mempunyai potensi bahaya harus diletakkan dalam tempatnya masing-masing, yang disediakan sebagai berikut :
 - a) Cawan petri, labu dan reaksi diletakkan di tempat yang disediakan.
 - b) Pipet harus diletakkan dalam wadah berisi desinfektan
 - c) Kaca obyek dan penutupnya harus diletakkan dalam tempat-tempat khusus yang telah diberi desinfektan.
13. Kurangi bercakap-cakap selama praktikum, agar tidak merugikan pekerjaan sendiri atau rekan lain.
14. Setiap pengerjaan praktikum dan pengamatan harus dicatat dengan cermat.
15. Setiap praktikan diwajibkan membersihkan alat-alat laboratorium dan mengembalikan ke tempat semula setelah digunakan, selain itu praktikan diharuskan untuk membersihkan meja kerja, memeriksa nyala api dan listrik dipadamkan, menutup kran air dan gas, mencuci tangan dengan desinfektan/lysol, kemudian melapor ke asisten/dosen jaga.
16. Menjaga kebersihan jas laboratorium Anda. Gunakanlah sarung tangan dan masker yang selalu baru di setiap praktikum mikrobiologi lingkungan.

PANDUAN PENYUSUNAN LAPORAN PRAKTIKUM

1. Masing-masing praktikan diwajibkan membuat dan membawa laporan sementara praktikum yang mencakup:
 - a) acara praktikum,
 - b) tujuan, dan
 - c) skema kerja.Laporan sementara ini menjadi syarat praktikan mengikuti praktikum pada hari itu. Data dan hasil pengamatan praktikum juga ditulis dan/atau digambar dalam laporan sementara yang telah disetujui oleh asisten pendamping praktikum.
2. Laporan sementara ditulis tangan.
3. Setelah pengamatan hasil, laporan sementara digunakan sebagai acuan pembuatan laporan resmi. Laporan resmi diketik pada kertas A4 dengan batas tepi 2 cm (atas, bawah, kanan, dan kiri), yang mencakup:
 - a. Halaman judul, yang berisi acara praktikum dan identitas praktikan (nama dan NIM).
 - b. Halaman isi yang berisi acara dan topik, tujuan praktikum, tinjauan pustaka, alat dan bahan, skema kerja, hasil pengamatan (berupa data yang telah diolah dan foto), pembahasan, kesimpulan, daftar pustaka, jawaban pertanyaan, dan lampiran (*fotocopy* pustaka yang digunakan).
4. Laporan resmi diketik dan dibuat secara berkelompok (kelompok kecil).
5. *Copy paste* laporan tidak diperbolehkan. Praktikan dikatakan *copy paste* apabila terdapat 2 buah kalimat berurutan yang sama persis. Praktikan yang melakukan *copy paste* akan dipanggil oleh tim asisten dan kemungkinan terburuk nilai laporan bersangkutan sama dengan **NOL**.

CONTOH FORMAT LAPORAN PRAKTIKUM :

ACARA

(diisi acara praktikum yang dilaksanakan sesuai panduan)

(topik acara praktikum yang dilaksanakan sesuai panduan)

A. TUJUAN:

(diisi tujuan mata acara praktikum)

B. TINJAUAN PUSTAKA (Bobot nilai ; 1)

(Teori-Teori Dari Pustaka Yang Mendasari Materi Mata Acara Praktikum Tersebut.)

Pustaka Yang Diacu Minimal Dari 5 Sumber, Berbahasa Asing (Buku Atau Jurnal Penelitian Terkait Praktikum), Tahun Sumber Pustaka Di Atas Tahun 2008)

Cara mengacu pustaka dalam uraian:

1. karya tulis yang diacu (a tinjauan pustaka atau pembahasan) maka nama akhir dari pengarang atau penyunting dan tahun publikasi harus dicantumkan. (Havard style)

Contoh:

- a) Menurut Rahmawati (2013) Bakteri adalah
 - b) Aryani (2013), Menyatakan bahwa...
 - c) Daya antibakteri terhadap *bacillus sp* (Maryani, 2018)
2. Pengarang kurang dari 6, dicantumkan seluruhnya nama akhir pengarang ketika referensi tersebut dirujuk pertama kali dalam uraian. Selanjutnya, cantumkan nama akhir pengarang pertama diikuti dengan dkk. Disertai tahun publikasi.

Contoh:

- a) Isworo, Slamet, Aryani Lenci, Wulandari, Fitri, Hartini Eko dan Mahawati Eni cukup ditulis Isworo, dkk (2008)...
3. Referensi yang ditulis oleh 6 pengarang atau lebih, cantumkan nama akhir pengarang pertama diikuti dengan dkk.
 4. Kutipan kedua dilakukan apabila penulis mengalami kesulitan dalam memperoleh artikel asli dari bahasan yang diacu. Kutipan kedua sebaiknya dibatasi untuk menghindari pengulangan kesalahan penulisan nama penulis, tahun publikasi ataupun materi tulisan.

Contoh:

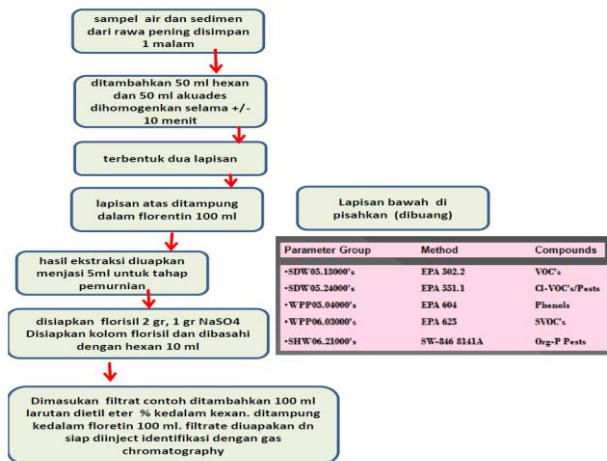
Menurut Isworo (*cit.* Aryani, 2000)

(artinya artikel asli ditulis oleh Isworo, kemudian dikutip oleh Aryani, pada tahun 2000)

C. SKEMA KERJA (Bobot nilai : 0,5):

(diisi alat & bahan dan skema kerja, skema kerja bukan cara kerja, ditulis (pasif) secara sistematis langkah-langkah penelitian dengan jelas dan lengkap)

Contoh :



Dapat juga bagan sebagai berikut :

Pengenceran suspensi bakteri *Bacillus sp*
konsentrasi $10^{-1} - 10^{-3}$



0,5 ml suspensi bakteri *bacillus sp* diambil dan dipindahkan ke cawan
Natrium Agar



Kultur bakteri di atas cawan natrium agar ditebarkan secara merata
menggunakan *spreader*



Diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar



pertumbuhan bakteri diamati dengan seksama

D. HASIL PENGAMATAN

(Data hasil pengamatan, disertai gambar, kurva, tabel dsb beserta
keterangannya)

(Setelah pengamatan harus disahkan asisten pendamping kelompok)

E. PEMBAHASAN: (pembahasan disesuaikan dengan data hasil
pengamatan)

F. KESIMPULAN

G. DAFTAR PUSTAKA

Contoh penulisan pustaka :

Daftar Pustaka hanya memuat pustaka yang diacu dan disusun menurut
sistem Harvard. Tata cara penulisan daftar pustaka diatur sebagai berikut:

1) Buku

Nama belakang penulis, singkatan Nama Depan., tahun terbit, *Judul Buku*, jilid, edisi, Nama Penerbit, Kota, nomor halaman yang diacu (kecuali seluruh buku).

Contoh:

- a) Buku yang dikarang oleh satu orang
Odum, J.H., 2008, *Basic of Environmental Microbiology*, 11th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Vancouver. pp. 282, 289.
 - b) Buku yang dikarang oleh sampai 2 sampai 3 orang.
Dunkin, M.J. dan Biddle, B.J. (1974). *The Study of Teaching*. New York: Holt Rinehart and Winston
Lyon, B., Rowen, H.H. and Homerow, T.S. (1969). *A History of the Western World*. Chicago: Rand Mc Nally. Williams.
David A. and Lemke, T.L., 2002, *Foye's Principals of Medicinal Chemistry*, 5th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 869-870, 875-879.
 - c) Bagian dari buku yang disunting oleh satu orang
Covikk, W.A., 1981, *Microbiology and Related Immunoassay Techniques*, In Munson, J.W., (Ed.), *Pharmaceutical Analysis, Part A*, Marcell Dekker Inc., New York, pp. 381-399.
 - d) Buku yang disunting oleh lebih dari satu orang
Das, K.G., dan Morgan, J.J., (Eds.), 1981, *Pesticide Analysis*, Marcell Dekker Inc., New York, PP. 425-456.
Philip, H.W.S. dan Simpson, G.L. (Eds) (1976). *Australia in the World of Education Today and Tomorrow*. Canberra: Australian National Commission.
 - e) Prosiding/Risalah pertama ilmiah
Zagory, D. D. and A.A. Kader, 1989. Long term Storage of Early Gold and Shinko Asian Pears in Low Oxygen Atmospheres in J.K., Fellman (ed.), *Proc. Fifth Intl. Controlled Atmospheres Res. Conf.*, Wenatchee, Wash. p. 44-47.
- 2) Artikel (Jurnal, Majalah dan lain-lain)
Nama belakang penulis, Singkatan Nama Depan., tahun terbit, *Judul Makalah*, Nama Majalah Dengan Singkatan Resminya, Jilid atau volume (nomor penerbitan), nomor halaman yang diacu.

Contoh:

- a) Saukah, A. & Waseso, M.G. (Eds.). 2012. Menulis Artikel untuk Jurnal Ilmiah (Edisi ke-4, cetakan ke-1). Malang: UM Press.
- b) Artikel disusun oleh satu penulis
Brock, J., 2008, Traditional Herbal Therapeutic; Ficus Insomnia, *The Pharmaceutical Journal*, 269, 219-221.
- c) Artikel disusun oleh 2-6 penulis
Eni, I., Nurjanah, Yulistia, I., and Asmafi, 2008, Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis (QSAR) of Impact Analysis Environmental Chloroquinosensible Strain, *Indo. J. Chem.*, 5 (3), 255-260.
- d) Artikel disusun oleh lebih dari 6 penulis
Bila mana penulis lebih dari 6 orang, tulis nama 6 orang pertama diikuti dkk atau *et al.*
Fery, Qioa, Q., Aryani T., Jaka, J., Isworo K., Fritia B., Aryani, Y., et al., 2000, The a Study Biomeedic on Behalf of the International Diabetes Epidemiology Group, Comparison of the fasting and the 2-h Glucose Criteria Different Asian Cohorts, *Diabetologia*, 43, 1470-1475.
- 3) Dokumen Lembaga Resmi Contoh:
United States of Deabetic Convention, 2005, *The United States Pharmacopia*, 28 th edition, United States of diabetic Convention Inc., Rockville, pp. 2748-2751.
Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1995, *Farmakope Indonesia*, Jilid IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jilid IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- 4) Terjemahan
Penulisan mengikuti cara penulisan daftar pustaka butir buku, menggunakan tahun penerbitan asli.
Contoh:
Michel, J.W., 1991, *Pharmaceutical Analysis Basic Method*, diterjemahkan oleh Harjana, Parwa B., Hal. 15, 33-34, Universitas Teknik Press, Surabaya.
- 5) Skripsi, Tesis, dan Disertasi
Juakuliana, 2005, Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Antimugen Senyawa Turunan Organophosphat Menggunakan

Pendekatan Principal Component Analysis, Tesis, 44, Universitas Teknik .

- 6) Karangan dalam surat kabar Contoh:
Lincenter G., 2012, Hospitalization pollution, *The Washington Post*, Jun 21; Set A:3 (col. 5)
- 7) Laporan Penelitian
Hanana, A.N.I., 2005, Analisis Organiklorin dalam Beral hasil Pertanian Organik dengan Metode *High Performance Liquid Chromatography*, Laporan Penelitian, Fakultas Farmasi Universitas Pharmaceuticals, Yogyakarta.
- 8) Artikel elektronik (internet)
Yustia, R.M., 2002, *Center for Research and Development of Disease Diabetic Control*, www.digilib.litbang.depkes.go.id , diakses tanggal 25 april 2016.

Secara umum penulisan nama pengarang atau penyunting diatur sebagai berikut

1. Nama dengan garis penghubung
Nama Penulis yang dalam sumber aslinya ditulis dengan garis penghubung Siantar dua suku kata dianggap sebagai sebagai satu suku kata.
Contoh: Aryani-Sutrisno ditulis: Aryani-Sutrisno
2. Nama yang diikuti dengan singkatan
Nama yang diikuti dengan singkatan dianggap bahwa singkatan itu menjadi satu suku kata yang ada di depannya.
Contoh: William D. Ross Jr. ditulis: Ross Jr., W.D.
3. Derajat Kesarjanaan
Derajat kesarjanaan tidak boleh dicantumkan.

H. JAWABAN PERTANYAAN (Bobot nilai : 1):

(contoh pertanyaan untuk evaluasi dan pemahaman ada di panduan praktikum, asisten bisa menambahkan bilamana perlu)

I. LAMPIRAN

(berisi fotocopy data sementara)

Catatan :

1. **Laporan sementara**

Harus mendapatkan pengesahan dari dosen/assisten pendamping.

2. **Laporan resmi:**

Point A-I (sebagai syarat mengikuti praktikum minggu berikutnya).

EVALUASI PRAKTIKUM	
a. Lima komponen yang dinilai :	
1) Rata2 Kerja & Diskusi unit I-VI	5
2) Rata2 Pretest/Posttest unit I-VI	3
3) Rata2 Laporan unit I-VI	6
4) Responsi Teori	10
5) Responsi Praktek	6

**LAPORAN PRAKTIKUM
MIKROBIOLOGI LINGKUNGAN**



Acara

Disusun oleh:

_____ NIM _____
_____ NIM _____
_____ NIM _____
_____ NIM _____
_____ NIM _____
_____ NIM _____

Kelompok Praktikum / Kelas:

Nilai Laporan	Tanggal dan Paraf Asisten

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI LINGKUNGAN

**FAKULTAS KESEHATAN
UNIVERSITAS DIAN NUSWANTORO
SEMARANG
2017**

PANDUAN PENILAIAN PRAKTIKUM

1. NILAI LAPORAN SEMENTARA, DISKUSI DAN KERJA

- a) Praktikan mengerjakan laporan sementara dengan benar dan mengumpulkannya tepat waktu (**bobot nilai : 1**)
- b) Praktikan aktif bertanya dan berdiskusi dengan asisten/dosen dalam memperdalam materi yang dikerjakan selama praktikum maupun pada saat Diskusi Umum. Praktikan aktif berdiskusi dengan teman kerjanya
- c) Praktikan mengerjakan sendiri semua acara/percobaan dan apakah aktivitasnya seimbang dengan patner dalam kelompok. Praktikan mengerjakan praktikum secara lengkap (persiapan; bon alat dan bahan; pengerjaan percobaan; merapikan, membersihkan dan memberesi bon alat dan bahan setelah praktikum berakhir. Hal-hal yang dapat mengurangi nilai kerja adalah sebagai berikut:
 - i. Tidak menggunakan sarung tangan, masker, dan *nametag* selama praktikum, masing-masing dikurangi 5 poin pada nilai kerja.
 - ii. Bekerja melebihi waktu praktikum yang telah ditetapkan dikurangi 5 pada nilai kerja.
 - iii. Bertanya kepada asisten atau dosen mengenai cara kerja praktikum pada saat praktikum berlangsung tanpa diminta asisten atau dosen, dikurangi 5 poin pada nilai kerja.
 - iv. Membuat keributan atau bermain ponsel selama praktikum dikurangi 5 poin pada nilai kerja.

2. NILAI PRETEST&POSTEST (SKOR MAKSIMAL

Praktikan mampu menjawab dengan benar pertanyaan yang diberikan

3. NILAI LAPORAN (SKOR MAKSIMAL

- a) Laporan kegiatan pengamatan dan gambar sudah selesai semua dalam satu acara (*masing-masing bobot nilai terinci di halaman 10-11*).
- b) Pembahasan disusun dengan lengkap dan tajam, dengan diperkuat literatur/teori, jurnal atau penelitian yang berkaitan Pembahasan dan pertanyaan diskusi sudah terjawab semua dan laporan dikerjakan tertulis dan diselesaikan dengan baik, bersih dan rapi

4. NILAI RESPONSI – Panduan penilaian tersendiri (Teori dan Praktik)

**PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI
LINGKUNGAN**

ACARA I PENGENALAN ALAT

A. TUJUAN :

Mengenal bermacam-macam alat dan cara penggunaannya secara benar pada praktikum mikrobiologi.

B. PROSEDUR KERJA :

1. Simulasi/demo alat dan penjelasan mengenai cara kerja dan fungsi alat.
2. Praktek penggunaan alat dengan benar sesuai dengan fungsinya.

C. ALAT DAN FUNGSINYA :

Beberapa alat yang perlu diketahui fungsinya adalah sebagai berikut :

1. *Jarum ose/ loop/sengkelit* digunakan untuk menanam mikroorganisme dengan cara goresan/*streak*



2. *Batang bengkok/spreader/batang Drigalsky* digunakan untuk menanam mikroorganisme dengan cara sebar/*pulasan/spread*
3. *Jarum enten* digunakan untuk mengambil mikroorganisme berupa biakan jamur/fungi
4. *Jarum inokulasi/needle* digunakan untuk menanam mikroorganisme dengan cara tusukan



5. *Microbiological Safety Cabinet (MSC)* adalah ruang/lemari tempat menanam mikroorganisme



6. *Autoklaf* digunakan untuk sterilisasi alat/bahan/media tertentu dengan menggunakan uap panas bertekanan (*moist heat*).
7. *Colony counter* untuk menghitung jumlah koloni mikroorganisme dan mungkin ukurannya.



8. *Mikroskop* digunakan untuk pemeriksaan suatu sediaan secara mikroskopis.
9. *Inkubator* digunakan untuk inkubasi media yang telah ditanami mikroorganisme dan untuk menyimpan bahan pemeriksaan di mana mikroorganisme yang terkandung akan mati bila disimpan dalam lemari es.
10. *Lemari pendingin/refrigerator* digunakan untuk menyimpan media steril yang siap pakai agar isi dan mutu media tersebut tidak berubah, menyimpan untuk sementara waktu bahan/spesimen yang belum sempat diperiksa agar tidak mengalami perubahan dan menyimpan cakram antibiotik/*antibiotic disk* yang belum dipakai agar tidak mengalami perubahan.
11. Alat-alat lain yang perlu diketahui di laboratorium mikrobiologi : mikropipet, pelobang sumuran, haemositometer, cawan petri, lampu bunsen, kaca obyek, kaca obyek cekung, oven, *shaker incubator*,

shakerresiprok, vortex, glass pin, kaca penutup, pinset, gelas arloji, disk blank, disk antibiotik, filter bakteri, tabung Durham.



Micropipete



Shaker Incubator

Gambar alat-alat :



Gambar alat-alat :

Keterangan Gambar:

-
-
-
-
-

Keterangan Gambar:



.....



Gambar alat-alat :

Keterangan Gambar:

.....



Gambar alat-alat :

Keterangan Gambar:

.....



D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Sebutkan nama dan fungsi dari alat-alat di atas!
2. Tuliskan prinsip kerja spektrophotometer!
3. Bagaimana aplikasi spectrophotometer yang digunakan dalam penelitian bidang Mikrobiologi lingkungan. Pada bidang penelitian apa saja

ACARA II

DASAR - DASAR TEKNIK MIKROBIOLOGI

A. TUJUAN :

1. Mempelajari cara pembuatan media dan syarat-syarat yang dibutuhkan oleh suatu media untuk pertumbuhan mikroorganisme.
2. Mempelajari teknik sterilisasi
3. Mempelajari cara-cara pemindahan mikroorganisme secara aseptis.
4. Mempelajari teknik-teknik isolasi dan penanaman mikroorganisme pada kultur media .
5. Mempelajari teknik pembuatan pulsan bakteri untuk pengamatan /pewarnaan bakteri.
6. Mengenal bermacam-macam mikroorganisme di alam.

B. DASAR TEORI DAN PROSEDUR KERJA :

1. Media dan Cara Pembuatan Media

Pembiakan mikroorganisme di laboratorium memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan yang diperlukan untuk pertumbuhan yang sesuai bagi mikroorganisme. Media adalah suatu bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang terdiri atas campuran nutrisi atau zat-zat makanan. Selain untuk menumbuhkan mikroorganisme, media dapat juga digunakan untuk isolasi, memperbanyak, pengujian sifat-sifat fisiologis dan perhitungan jumlah. Mikroorganisme memerlukan situasi dan suasana yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme. Syarat media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme adalah lingkungan kehidupannya harus sesuai dengan lingkungan pertumbuhan mikroorganisme tersebut, yaitu : nutrisi yang sesuai untuk pertumbuhan organisme. pH suhu mineral dan vitamin, tekanan air sehingga mikroorganisme dapat tumbuh dengan optimal.

(media harus mengandung air untuk menjaga kelembaban dan untuk pertukaran zat/metabolisme, juga mengandung sumber karbon, mineral, vitamin dan gas), tekanan osmose yaitu harus isotonik, derajat keasaman/pH umumnya netral tapi ada juga yang alkali, temperatur harus sesuai dan steril. Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroorganisme, yaitu: sumber energi

(contoh: gula), sumber nitrogen, juga ion inorganik esensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin (Jawetz dkk, 1996).

Berdasarkan komposisi kimianya, media dapat dibedakan menjadi media sintetis yaitu media yang susunan kimianya diketahui dengan pasti, medium ini biasanya digunakan untuk mempelajari kebutuhan makanan mikroorganisme. Media non sintetis (kompleks) yaitu media yang susunan kimianya tidak dapat diketahui dengan pasti, media ini digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari taksonomi mikroorganisme. Berdasarkan konsistensinya media dapat dibedakan menjadi : media cair, media padat, dan media padat yang dapat dicairkan (Lay, 1994).

Alat dan bahan:

1. Media Nutrien Agar (NA) (Oxoid)
2. Media Nutrien Broth (NB) (Oxoid)
3. Aquades
4. Cawan petri
5. Tabung reaksi
6. Batang pengaduk, pipet volume, erlenmeyer, penangas/elemen pemanas

Cara kerja:

1. Timbang media NA (Oxoid) dan NB (Oxoid) sesuai prosedur di kemasan. (*Catatan* : Buatlah 50 ml media NA untuk setiap kelompok kecil praktikum dan 50 ml media NB untuk satu golongan praktikum). Penimbangan media dilakukan secara teliti dan cepat, kemudian serbuk media dimasukkan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan aquades dan aduk sampai merata dan homogeny dengan batang pengaduk
3. Panaskan dengan hati-hati menggunakan penangas/elemen pemanas sampai media tercampur homogen (ditunjukkan dengan warna yang kuning jernih). *Perhatian :pada saat pemanasan jangan sampai terbentuk buih berlebihan sampai meluap!*
4. Sebelum diautoklaf, tuangkan media NA dengan volume tertentu menggunakan pipet volume : 5 ml ke dalam tabung reaksi untuk

NA miring, 10 ml ke dalam tabung reaksi untuk NA tegak, 15 ml untuk NA dalam cawan petri untuk **percobaan 4b** (metode isolasi *pour plate*), sisanya untuk NA dalam cawan petri untuk **percobaan 6** (pengenalan mikroorganisme di alam). Tutup tabung reaksi dengan penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat!)

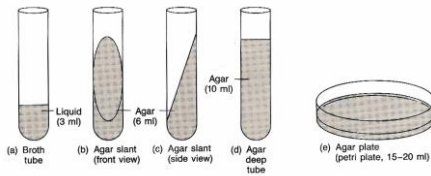
5. Sebelum diautoklaf, tuangkan NB ke dalam tabung reaksi untuk 6 kelompok praktikum dalam 1 golongan. Masing-masing tabung reaksi @ 8 ml. Tutup tabung reaksi dengan kapas atau penutup tabung (penutupan jangan terlalu rapat!)
6. Sterilkan seluruh media dalam tabung reaksi tersebut dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit, tekanan 1 atm 121°C.
Pelajari cara mengoperasikan autoklaf dengan benar!
7. Setelah diotoklaf : media NA 10 ml dalam tabung reaksi diletakkan tegak pada rak tabung dan biarkan memadat, media NA 5 ml inkubasikan miring dan biarkan memadat. Media sisa NA tuangkan dalam cawan petri dan biarkan memadat (**untuk percobaan 6 : pengenalan mikroorganisme di alam**). Media NA 15 ml dibiarkan sampai suhu 45-50°C (**untuk percobaan 4b : metode isolasi *pour plate***).
8. Media NB dalam tabung reaksi biarkan dingin. Seluruh media NA dan NB ini akan digunakan untuk percobaan selanjutnya.

Media cair NB (Nutrient Broth)



Nutrient Broth (NB) adalah medium yang berwarna coklat yang memiliki konsistensi yang cair

NB terbuat dari:
-ekstrak
beef
-pepton



2. Teknik - Teknik Pemindahan Kultur Mikroorganisme

Untuk mencegah tercemarnya biakan murni, perlu diadakan teknik aseptik pada waktu memindahkan mikroorganisme. Dalam percobaan-percobaan ini akan dipelajari cara-cara memindahkan biakan murni dengan cara aseptik.

Alat dan bahan:

1. Media NA miring dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
2. Media NA tegak dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
3. Media nutrien cair atau NB dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
4. Jarum ose
5. Jarum inokulasi
6. Kultur murni bakteri
7. Lampu bunsen
8. *Vortex mixer*

Cara kerja:

1. Siapkan media NA dan NB hasil percobaan 1 (media NA miring, media NA tegak dan media NB/cair). Pemindahan kultur mikroorganisme dilakukan satu persatu untuk masing-masing media.
2. Longgarkan tutup dari masing-masing tabung reaksi yang berisi media (*jangan di lepaskan!*).
3. Pegang tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri di tangan kiri.
4. Pegang jarum ose pada tangan kanan dan bakar di atas nyala lampu bunsen hingga kawat memijar. *Perhatian : pemanasan*

jarum ose dilakukan dari pangkal ke ujung sampai memijar, sebelum digunakan kawat didinginkan beberapa saat!

5. Pegang ose menggunakan ibu jari dan jari telunjuk, gunakan jari kelingking untuk membuka tutup tabung reaksi (tutup tabung reaksi tetap dipegang seperti posisi semula).
6. Bakar mulut tabung reaksi, masukkan jarum ose dan ambil 1 ose biakan bakteri.
7. Bakar kembali mulut tabung reaksi dan tutup tabung reaksi kembali.
8. Ambillah tabung reaksi yang akan diinokulasi dengan tangan kiri, dengan cara yang sama buka tutup tabung reaksi, dan bakar mulut tabung reaksi.
9. Inokulasikan biakan bakteri pada tabung reaksi inokulasi dengan cara goresan *zigzag* pada permukaan NA miring.
10. Bakar mulut tabung reaksi dan tutup tabung reaksi kembali, kemudian bakar ose.
11. Beri label : tanggal percobaan, nama bakteri, teknik pemindahan dan nama kelompok.
12. Lakukan dengan cara yang sama untuk media nutrien cair/NB menggunakan jarum ose dan media agar tegak secara tusukan tegak lurus menggunakan jarum inokulasi.
13. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.

3. Teknik-teknik Isolasi atau Penanaman Mikroorganisme

Untuk menanam suatu mikroorganisme perlu diperhatikan faktor-faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen (gas, O_2 atau udara). Cara menumbuhkan mikroorganisme yang anaerob sangat berbeda dengan yang aerob. Mengisolasi suatu mikroorganisme ialah memisahkan mikroorganisme tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Untuk isolasi harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroorganisme pada medium biakan serta syarat-syarat lain untuk pertumbuhannya (Jutono dkk, 1980).

Mikroorganisme jarang terdapat di alam dalam keadaan murni. Kebanyakan merupakan campuran bermacam-macam spesies

mikroorganisme. Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikroorganisme adalah : 1). *Spread plate method* (cara tebar/sebar), 2). *Streak platemethod* (cara gores), 3). *Pour plate method* (cara tabur).

a. *Spread PlateMethod* (Cara Tebar/Sebar)

Teknik *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroorganisme dengan cara menginokulasi kultur mikroorganisme secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat.

Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroorganisme. Karena konsentrasi sel-sel mikroorganisme pada umumnya tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikroorganisme yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung.

Alat dan bahan:

1. *Spreader*/batang bengkok/batang Drigalsky
2. Pipet volume, lampu bunsen
3. Media NA dalam cawan petri
4. Kultur murni bakteri
5. Larutan pengencer (BPW atau NaCl fisiologis 0,9%)

Cara kerja:

1. Buatlah pengenceran 10^{-1} – 10^{-6} dari kultur murni bakteri dengan larutan pengencer.
2. Ambil tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri, buka dan bakar leher tabung.
3. Pindahkan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media NA dalam cawan petri.
4. Bakar *spreader* yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol, biarkan dingin.

5. Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan *spreader* secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar 1).
6. Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya.
7. Bandingkan pertumbuhan dari tiap-tiap pengenceran dan bandingkan pertumbuhannya dengan hasil teknik *spread plate* pada **percobaan 2 (sterilisasi secara filtrasi)**.
- 8.



Gambar 1. Spread Plate Method

b. Pour Plate Method (Cara Tabur)

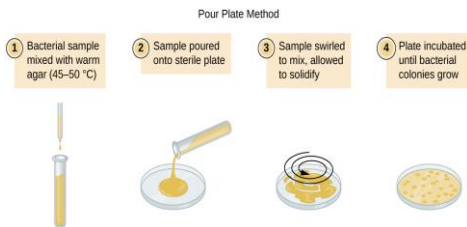
Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroorganisme, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980)

Alat dan bahan:

1. Media NA dalam tabung reaksi (**hasil percobaan 1**)
2. Cawan petri steril
3. Kultur murni bakteri
4. Pipet volume, lampu bunsen

Cara kerja:

1. Dinginkan media NA dalam tabung reaksi sampai suhu $\pm 45 - 50^{\circ}\text{C}$ (cirinya : terasa hangat di kulit/tidak 'kemranyas').
2. Buka tutup tabung yang mengandung kultur murni bakteri, dan bakar leher botol.
3. Pindahkan 1 ml kultur murni bakteri ke dalam tabung reaksi yang mengandung NA secara aseptis.
4. Bakar leher tabung di atas bunsen, dan tuangkan media NA yang telah mengandung kultur murni bakteri ke dalam cawan petri.
5. Goyangkan perlahan-lahan untuk mencampur kultur bakteri dengan NA sampai homogen. Penggoyangan petri jangan terlalu kuat. Pada saat penuangan media, petri bisa diletakkan dalam radius maksimal 20 cm dari sumber api (zona steril) (lihat Gambar 2).
6. Setelah agar memadat diinkubasi terbalik pada suhu kamar selama 24 jam. Inkubasi terbalik dilakukan setelah agar memadat. Amati pertumbuhannya.



Gambar 2. Pour Plate Method

c. *Streak Plate Method* (Cara Gores)

Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroorganisme pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroorganisme pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri.

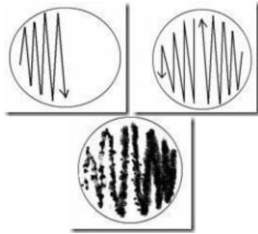
Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroorganisme, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980). Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994)

Alat dan bahan:

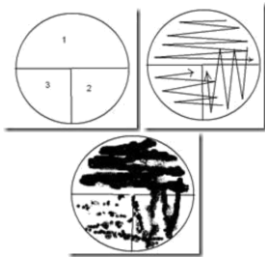
1. Media NA dalam cawan petri
2. Kultur murni bakteri
3. Jarum ose
4. Lampu bunsen

Cara kerja:

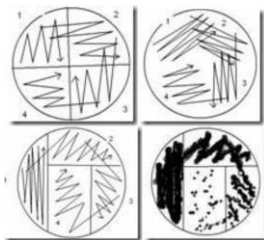
1. Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri.
2. Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada permukaan media agar dimulai pada satu ujung. *Perhatikan teknik penggoresan!* (lihat Gambar 3, 4, 5, 6). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar.
3. Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
4. Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar selama 24 jam dan amati pertumbuhannya.



Gambar 3. *Streak Plate Method* secara Goresan Sinambung



Gambar 4. *Streak Plate Method* secara Goresan T



Gambar 5. *Streak Plate Method* dengan lebih banyak Sektor



Gambar 6. Contoh Hasil Isolasi Streak Plate Method

4. Pembuatan Pulasan Bakteri

Bakteri atau mikroorganisme lainnya dapat dilihat dengan mikroskop cahaya tanpa pewarnaan/pengecatan atau dengan pewarnaan /pengecatan. Pengamatan tanpa pengecatan lebih sukar dan tidak dapat dipakai untuk melihat bagian-bagian sel dengan teliti karena sel bakteri atau mikroorganisme lainnya transparan atau semi transparan. Dengan pengecatan, dapat dilihat struktur sel mikroorganisme lebih seksama. Fungsi pengecatan adalah a). memberi warna pada sel atau bagian-bagiannya sehingga member kontras dan tampak lebih jelas, b). dapat untuk menunjukkan bagian-bagian struktur sel, c). membedakan mikroorganisme satu dengan yang lain, dan d). menentukan pH dan potensial oksidasi reduksi ekstraseluler dan intraseluler (Jutono dkk., 1980).

Pengecatan bakteri umumnya menggunakan lebih dari satu tingkat pengecatan. Hasil pengecatan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti : fiksasi, substrat, dekolorisator dan sebagainya. Dalam pembuatan pulasan bakteri yang siap diwarnai, perlu dilakukan fiksasi terlebih dahulu yang bertujuan antara lain : a). mencegah mengerutnya globula-globula protein sel, b). merubah afinitas cat, c). mencegah terjadinya otolisis sel, d). dapat membunuh mikroorganisme secara cepat dengan tidak menyebabkan perubahan-

perubahan bentuk atau strukturnya, e). melekatkan bakteri di atas gelas benda dan f). membuat sel-sel lebih kuat/keras.

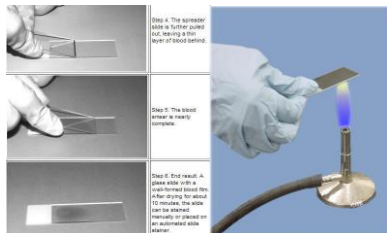
Cara fiksasi yang paling banyak digunakan dalam pengecatan bakteri adalah dengan membuat lapisan suspensi/pulasan bakteri di atas gelas benda, kemudian dikeringanginkan dan dilakukan beberapa kali di atas nyala lampu spiritus (Jutono dkk., 1980).

Alat dan bahan :

1. Gelas benda
2. Jarum ose
3. Lampu Bunsen
4. Label preparat
5. Aquades steril
6. Kultur murni bakteri
7. Penjepit gelas benda

Cara kerja :

1. Labellah gelas benda yang kering dan bersih. Sterilkan jarum ose dengan memijarkannya pada nyala bunsen dan dinginkan.
2. Jika kultur dalam bentuk cair (suspensi), ambillah 1 ose penuh dan letakkan di tengah-tengah gelas benda dan ratakan seluas $\pm 1 \text{ cm}^2$
3. Jika kultur dalam medium padat, ambillah dengan jarum ose satu bagian kecil kultur dan letakkan di tengah gelas benda yang sebelumnya telah diberi aquadest steril dan ratakan
4. Biarkan kering dengan mengangin-anginkan gelas benda
5. Fiksasi pulasan bakteri dengan melewati di atas nyala bunsen (*hati-hati, jangan sampai terlalu kering/gosong*), tergantung jenis pengecatannya.
6. Pulasan bakteri siap untuk diwarnai



Gambar 7. Teknik Pembuatan Pulasan Bakteri dan Fiksasi

C. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa yang dimaksud media NA dan NB, media tersebut cocok untuk jenis organisme apa ?
2. Apa fungsi agar pada media pertumbuhan?. Apa yang diketahui untuk media PDA, biasa digunakan untuk menumbuhkan organisme apa?
3. Mengapa pada waktu inkubasi cawan petri harus diletakkan terbalik?
4. Jelaskan prinsip dasar dan tujuan teknik isolasi mikroorganisme secara *streak plate*, *pour plate* dan *spread plate*!
5. Apa yang dimaksud dengan kultur murni/biakan murni?
6. Bagaimana teknik penggoresan yang benar pada teknik isolasi secara *streak plate* agar supaya didapatkan koloni bakteri terpisah?

7. Kapan fiksasi dilakukan dalam pengecatan bakteri? Apa tujuan dilakukannya fiksasi dalam tahapan pengecatan bakteri?
8. Jelaskan kurva pertumbuhan mikroorganisme

ACARA III
UJI POTENSI SENYAWA ANTIMIKROORGANISME
SECARA DIFUSI SUMURAN DAN DIFUSI PAPER DISK

A. TUJUAN :

Mengetahui ada tidaknya potensi antibakteri dari suatu senyawa antimikroorganisme, misalnya antibiotik, secara difusi sumuran dan difusi *paper disk*.

B. DASAR TEORI :

Uji potensi antimikroorganisme dapat dilakukan dengan 2 macam metode, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Cara pengujian potensi (daya atau kekuatan) senyawa antimikroorganisme ada bermacam-macam, tergantung pada sifat dan bentuk sediaan senyawa antimikroorganisme. Pada umumnya digunakan cara pengenceran, *cylinder diffusion plate method*, *paper disk diffusion method* dan *agar dillution plate method*.

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroorganisme (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroorganisme uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Metode difusi dapat dilakukan secara *paper disk* dan secara sumuran.

Pada metode difusi secara *paper disk*, kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan di atas permukaan media agar yang telah ditanam mikroorganisme uji, setelah itu hasilnya dibaca. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai zona jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Metode difusi secara sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme uji. Sumuran dibuat tegak lurus terhadap permukaan media. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran ini dan diinkubasikan, setelah itu hasilnya dibaca seperti pada difusi secara *paper disk*. Luasnya zona jernih merupakan petunjuk kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotik. Selain itu, luasnya zona jernih juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media (Lay, 1994; Jawetz dkk, 1986).

C. PROSEDUR KERJA :

1. Uji Potensi Senyawa Antibiotik Secara Difusi Sumuran

Alat dan Bahan :

- a. Alat gelas : petridish steril, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur
- b. Mikropipet, pelobang gabus no. 4, jangka sorong/penggaris, jarum ose, spidol, kertas label, *vortex mixer*, *spreader*
- c. Senyawa uji berupa antibiotik (misalnya Amoxycillin sirup kering) dengan variasi konsentrasi : 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml
- d. Kultur murni bakteri ujidalam media NB umur 24 jam
- e. Media nutrien agar (NA)
- f. Deret larutan standar Mac Farland
- g. Nutrient Broth (NB) untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- h. Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji
- i. Alkohol 70 %

Cara kerja :

- a. **Preparasi Senyawa Uji**
Preparasi senyawa uji dilakukan sesuai petunjuk dalam kemasan, kemudian buatlah berbagai variasi konsentrasi senyawa uji. Pada praktikum ini dibuat 4 variasi konsentrasi senyawa uji (konsentrasi 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml (*Perhatikan cara pembuatan konsentrasi senyawa uji!*))
- b. **Preparasi Mikroorganisme Uji**
 - 1) Siapkan kultur murni bakteri uji
 - 2) Siapkan deret larutan standard Mac Farland
 - 3) Buat sebanyak 2 tabung @10 ml suspensi bakteri Uji menggunakan media BPW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroorganisme $6 \cdot 10^8$ CFU/ml).
- c. **Pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran**
 - 1) Siapkan beberapa petri berisi 20 ml media nutrient agar (NA), 15 ml NA dan 5 ml NA steril
 - 2) Pembuatan kontrol kontaminasi media

- a) Buka petri berisi 20 media NA, secara aseptis buatlah sumuran pada petri 1) dengan pelobang gabus no. 4. Ambil bulatan NA pada sumur yang dibuat dengan jarum ose secara hati-hati sehingga NA di sekelilingnya tidak tergores/rusak. Masukkan bulatan NA tersebut dalam beker glass berisi alkohol.
- b) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan
- 3) Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji secara *double layer*
 - a) Tuang 5 ml NA steril ke dalam cawan petri steril, biarkan memadat sebagai *base layer agar*.
 - b) Ambil 1 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke dalam 15 ml media NA secara *pour plate*, kemudian tuangkan secara merata sebagai *seed layer agar* di atas *base layer agar*, biarkan memadat.
 - c) Buat 1 sumuran dengan menggunakan pelubang gabus No. 4. Pembuatan sumuran dilakukan sampai dasar *seed layer agar* dan tidak menembus *base layer agar* yang berfungsi sebagai dasar sumuran.
 - d) Beri label pada dasar petri: kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji
- 4) Pembuatan kontrol negatif dan pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran
 - a) Buatlah media *base layer agar* dan *seed layer agar* seperti pada tahanan 3). Bagian dasar petri dibuat garis dengan spidol untuk membaginya menjadi 4 bagian.
 - b) Buat sumuran pada bagian tengah ke-4 bidang petri tersebut dengan cara yang sama dengan no. 3). c).
 - c) Dengan menggunakan mikropipet, pada masing-masing sumuran tersebut diinokulasikan 50 μ l senyawa uji dengan kontrol negatif/pelarut dan 4 variasi konsentrasi senyawa uji.
 - d) Beri label pada dasar petri secara benar
 - e) Inkubasikan selama 24 jam. *Perhatian : inkubasi tidak dilakukan secara terbalik! Amati zona keruh dan jernih di setiap petri.*

- f) Amati, gambar pertumbuhannya. Ukur diameter zona jernih di sekitar sumuran dengan jangka sorong/penggaris. Hitung diameter zona hambat yang terbentuk.

2. Uji Potensi Senyawa Antibiotik Secara Difusi *Paper Disk*

Alat dan Bahan :

- Alat-alat : petridish , pinset, pipet volume steril
- Kultur murni bakteri uji dalam media NB umur 24 jam
- Disk antibiotik (*paper disk* yang mengandung antibiotik penisilin/ampisilin) sebagai kontrol positif
- Disk blank*
- Senyawa uji berupa antibiotik (misalnya Amoxycillin sirup kering) dengan variasi konsentrasi : 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 mg/ml
- Media nutrien agar (NA)
- Deret larutan standar Mac Farland
- Buffered Pepton Water (BPW) untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji
- Alkohol 70 %

Cara kerja :

- Preparasi Mikroorganisme Uji**
 - Siapkan kultur murni bakteri uji.
 - Siapkan deret larutan standar Mac Farland
 - Buat 10 ml suspensi bakteri uji menggunakan media BPW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroorganisme $6 \cdot 10^8$ CFU/ml).
- Pengujian potensi antibiotik secara difusi *paper disk***
 - Pembuatan kontrol kontaminasi media**
 - Siapkan 20 ml media NA dan tuang secara aseptis ke dalam petri steril, biarkan memadat
 - Beri label pada dasar petri: kel. prakt/tgl/perlakuan.
 - Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji**

- a) Ambil 0,2 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke dalam petri berisi media NA secara *spread plate* (harus merata di seluruh permukaan media) dan biarkan permukaan agar mengering.
 - b) Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji
- 3) Pengujian potensi antibiotik secara difusi *paper disk***
- a) Siapkan petri berisi 20 ml media nutrisi agar (NA)
 - b) Ambil 0,2 ml suspensi bakteri uji, inokulasikan ke media NA secara merata dengan cara *spread plate* dan biarkan permukaan agar mengering.
 - c) Secara aseptik, letakkan 1 disk antibiotik (*disk* yang mengandung penisilin/ampisilin) dan 4 *disk blank* (yang mengandung berbagai konsentrasi senyawa uji antibiotik sebanyak 20 µl), serta 1 *disk blank* kontrol negatif (*disk* yang mengandung pelarut) pada permukaan media NA.
 - d) Setiap *paper disk* diinokulasikan dengan jarak tertentu secara teratur, agar supaya tidak terjadi *overlapping* zona hambat yang terbentuk.
 - e) Beri label pada dasar petri secara benar
 - f) Inkubasikan selama 24 jam. Amati zona keruh dan jernih di setiap petri
 - g) Amati, gambar pertumbuhannya dan ukur diameter zona jernih yang terbentuk di sekitar *paper disk* dengan jangka sorong/penggaris.

D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa perbedaan metode difusi sumuran dan difusi *paper disk*?
2. Mengapa pada preparasi mikroorganisme uji diperlukan larutan standar?
3. Bagaimana membuat inoculum yang optimal untuk starter mikroorganisme ?
4. Bagaimana cara pembuatan larutan standar Mac Farland?
5. Apa fungsi dari : kontrol kontaminasi media, kontrol pertumbuhan mikroorganisme uji dan kontrol negatif/pelarut?
6. Mungkinkah digunakan pelarut senyawa uji yang memiliki potensi antimikroorganisme?
7. Bagaimanakah mengukur pertumbuhan mikroorganisme dengan menggunakan spectrophotometer

ACARA IV
UJI CEMARAN MIKROORGANISME:
ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DAN
ANGKA KAPANG KHAMIR (AKK)

A. TUJUAN

1. Menghitung jumlah mikroorganisme aerob mesofil yang terdapat dalam sampel
2. Menguji bahwa sampel yang diuji tidak boleh mengandung mikroorganisme melebihi batas yang ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan manusia

B. DASAR TEORI

Angka Lempeng Total (ALT) adalah pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 37°C (SNI, 1992). Uji ALT (Angka Lempeng Total) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pengujian dilakukan secara duplo. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total (ALT) dalam tiap gram contoh bahan (Anonim, 1992; Anonim, 2000).

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25° C dan dinyatakan dalam satuan koloni/mL (Soekarto, 2008). Uji AKK (Angka Kapang Khamir) mengandung prinsip yaitu pertumbuhan kapang dan khamir setelah cuplikan diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. (Anonim, 1992; Anonim, 2002).

C. PROSEDUR

1. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

Alat dan Bahan :

- Media Plate Count Agar (PCA)
- Buffered Pepton Water (BPW)
- Sampel uji (jamu gendong)
- Pipet volume
- Colony Counter (alat hitung koloni)

Cara Kerja :

- Penyiapan Sampel Uji
Kemasan jamu yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.
- Persiapan dan Homogenasi Sampel
- Secara aseptis diambil sebanyak 10 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan 90 ml BPW dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-1}
- Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*) (*hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan*)
- Pengenceran sampel untuk uji ALT
Sebanyak 5 buah labu ukur 10 ml disiapkan, masing-masing telah diisi dengan 9 ml pengencer BPW. Sebanyak 1 ml pengenceran 10^{-1} dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung pertama yang telah diisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} (homogenisasi dengan vortex). Selanjutnya dibuat pengenceran hingga 10^{-5} .
- Uji Angka Lempeng Total (ALT)
Dari tiap pengenceran dipipet 1 ml suspensi ke dalam cawan petri steril secara duplo. Dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 15 ml media PCA. Cawan petri digoyang dengan hati-hati agar sampel tersebar merata. Dilakukan pula uji kontrol untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam cawanpetri dan biarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dan 1 ml

pengencer BPW lalu dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 35°C selama 24 - 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung. Perhitungan Angka Lempeng total dalam 1 ml contoh dengan mengkalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.

2. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

Alat dan Bahan :

- a. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)
- b. Larutan pengencer *Pepton Dilution Fluid* (PDF)
- c. Sampel uji (jamu gendong)
- d. Kloramfenikol 100 mg/liter media
Pembuatan larutan kloramfenikol : 1 gram kloramfenikol dalam 100 ml air suling steril.
- e. Pipet volume
- f. *Colony counter* (alat hitung koloni)

Cara Kerja :

- a. Penyiapan Sampel Uji (sama dengan uji ALT)
- b. Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) (*hitung dan lihat cara pembuatan media pada kemasan*)
- c. Homogenisasi dan Pengenceran Sampel
 - 1) Perhitungan Angka Kapang Khamir (AKK) bertujuan untuk menghitung jumlah koloni kapang dan khamir yang terdapat dalam bahan. Pada prinsipnya pengujian ini menggunakan metode yang sama dengan penentuan Angka Lempeng Total (ALT).
 - 2) Media pertumbuhan yang digunakan adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*)
 - 3) Larutan pengencer yang digunakan adalah *Pepton Dilution Fluid* (PDF)
- d. Uji AKK
Dari masing-masing pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri steril secara duplo. Media PDA yang telah dicairkan sebanyak 20 ml dituangkan ke dalam cawan petri yang

sebelumnya telah ditambah dengan 1 ml larutan kloramfenikol dan digoyangkan sehingga campuran tersebut merata. Setelah agar membeku, cawan petri dibalik dan diinkubasikan pada suhu 25°C atau pada suhu kamar selama 5 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-5. Koloni kapang dan khamir dihitung setelah 5 hari. Uji sterilitas media dilakukan dengan menuangkan media PDA dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PDA dan 1 ml pengencer (PDF) lalu dibiarkan memadat.

D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI DAN TUGAS :

1. Interpretasikan hasil percobaan yang telah Anda lakukan dan simpulkan apakah sampel makanan yang telah Anda analisis mengandung jumlah mikroorganisme melebihi batas yang ditetapkan atau tidak! Jelaskan! (berdasarkan Peraturan Pemerintah/Keputusan Kepala Badan POM RI tentang persyaratan cemaran mikroorganisme pada makanan)
2. Apa fungsi dari uji sterilitas media dan uji kontrol pengencer!
3. Bagaimana cara perhitungan koloni untuk mendapatkan nilai ALT dan AKK?
4. Uji apa saja yang dilakukan selain uji ALT dan AKK sebagai parameter untuk mengukur cemaran mikroorganisme pada produk obat atau makanan? Jelaskan!
5. Pertanyaan lain diberikan asisten/dosen!

ACARA V
IDENTIFIKASI DAN DETERMINASI BAKTERI:
PENGECATAN GRAM DAN UJI BIOKIMIAWI

I. PENGECATAN GRAM

A. TUJUAN:

Melihat bentuk sel, rangkaian sel, sifat gram (gram negatif dan gram positif)

B. DASAR TEORI

Pengecatan ini dikembangkan pertama kali oleh Christian Gram (1884) dan termasuk pengecatan differensial, karena dapat membedakan bakteri yang bersifat gram positif dan gram negatif.

Dari segi pewarnaan perbedaan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat diamati dengan jelas. Bakteri Gram positif mengikat cat utama (crystal violet) dengan kuat sehingga tidak dapat dilunturkan oleh cat peluntur dan tidak diwarnai lagi oleh cat lawan (safranin), hal ini disebabkan karena sifat dinding sel dan sitoplasmanya, yang mempunyai afinitas kuat terhadap kompleks crystal violet dan iodine (jodium). Bakteri Gram negatif tidak mengikat cat utama secara kuat, sehingga dapat dilunturkan oleh peluntur dan dapat diwarnai oleh cat lawan.

Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan gram negatif tidak mutlak tegas dan spesifik, tetapi masih tergantung pada beberapa faktor yang dapat menyebabkan variasi dalam pengecatan Gram.

C. PROSEDUR KERJA

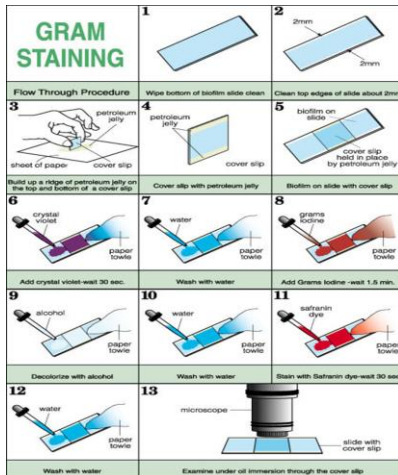
Alat dan bahan:

1. Mikroskop cahaya
2. Crystal violet (Gram A)
3. Larutan iodine (Gram B)
4. Alkohol 96% (Gram C)
5. Safranin (Gram D)
6. Minyak immersi
7. Isolat murni bakteri tanah (hasil percobaan Acara III)
8. Gelas benda

9. Jarum ose

Cara kerja: (Gambar 9)

1. Buatlah pulasan bakteri di atas objek gelas, keringkan dan fiksasi dengan api (Lihat Acara 1).
2. Teteskan cat crystal violet (Gram A) dan diamkan 30-60 detik.
3. Buanglah sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir.
4. Teteskan larutan iodine (Gram B) dan diamkan selama 1-2 menit.
5. Cuci dengan air mengalir, kemudian di decolorisasi (di beri larutan peluntur) dengan alkohol (Gram C) (kira-kira 20 detik, hati-hati jangan sampai berlebihan yang mengakibatkan kesalahan hasil).
6. Cuci dengan air mengalir, tambahkan larutan safranin (Gram D) selama 10-20 detik.
7. Cuci kembali dengan air mengalir, angin-anginkan dan amati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak immersi.
8. Gambar hasil-hasil pengecatan bakteri dengan diberi keterangan mengenai warna sel bakteri yang menunjukkan sifat gram dan bentuk sel.



Gambar 9. Teknik Pengecatan Bakteri

II. UJI BIOKIMIAWI

A. TUJUAN :

Mengidentifikasi dan mendeterminasi bakteri berdasarkan sifat-sifat biokimiawinya.

B. DASAR TEORI :

Mikroorganisme tumbuh dan berkembang biak dengan menggunakan berbagai bahan yang terdapat di lingkungannya. Nutrien yang terdapat di lingkungan sekelilingnya terdiri dari molekul sederhana seperti H_2S dan NH_4^+ atau molekul organik yang kompleks seperti protein dan polisakarida. Mikroorganisme mengoksidasi nutrien ini untuk memperoleh energi dan prekursor untuk sintesis dinding sel, membran

dan flagella. Penggunaan nutrien tergantung aktivitas metabolisme mikroorganisme. Percobaan-percobaan dalam uji biokimiawi mencakup berbagai uji untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroorganisme. Pengamatan aktivitas metabolisme diketahui dari kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan dan menguraikan molekul kompleks, seperti zat pati, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu pengamatan juga dilakukan pada molekul yang sederhana seperti asam amino dan sakarida. Hasil dari berbagai uji ini digunakan untuk pencirian dan identifikasi mikroorganisme (Lay, 1994). Pada identifikasi bakteri mula-mula diamati morfologi sel individual secara mikroskopik dan pertumbuhannya pada bermacam-macam medium. Karena suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, maka perlu diteliti pula sifat-sifat biokimiawi dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Bakteri-bakteri yang morfologinya sama mungkin berbeda dalam kebutuhan nutrisi dan persyaratan ekologi lainnya (temperatur, pH dsb) (Jutono dkk, 1980).

C. PROSEDUR KERJA :

Alat dan Bahan:

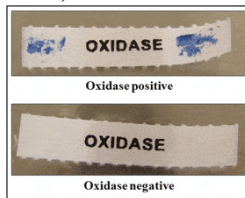
1. Isolat murni bakteri tanah (hasil percobaan Acara III) dalam NA miring dan NB (nutrien cair)
2. Reagen untuk test oksidase: tetramethyl-paraphenyldiamine
3. Reagen untuk test katalase: 10% atau 30% H_2O_2
4. Bahan untuk test O-F: media O-F yang mengandung 0,5-1% karbohidrat, paraffin cair
5. Bahan untuk test sitrat: Simmons Citrate Agar yang mengandung indikator Brom Thymol Blue-BTB
6. Bahan untuk test dekarboksilase lisin: media Lysin Iron Agar (LIA) yang mengandung Lisin dan indikator Brom Cresol Purple-BCP, media tanpa Lisin
7. Media Nutrien Agar (NA)
8. Gelatin
9. Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
10. Bahan untuk test pembentukan indol: media Tryptone Water, reagen Kovacs

11. Bahan untuk test MR-VP: media MR-VP, larutan 40% KOH, larutan 5% alpha-naphthol
11. Bahan untuk test Urease : media Urea Broth, indikator Phenol Red
12. Buku Panduan Determinasi Bakteri: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 2000)
13. Jarum ose
14. Pipet volume steril

Cara kerja:

1. Test Oksidase

Letakkan 2-3 tetes larutan tetramethyl-paraphenyldiamine pada kertas saring. Ambillah suspensi isolat murni bakteri dalam nutrien cair dan inokulasikan pada kertas saring yang telah ditetesi reagen. Amati dan laporkan hasil pengujian, reaksi positif terjadi jika timbul warna ungu tua atau hitam setelah didiamkan selama beberapa menit. Kadangkala perubahan warna memakan waktu lebih lama sampai 10-30 menit. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).



2. Test Katalase

Letakkan 1-2 tetes 10 % atau 30% H_2O_2 pada gelas benda dan tambahkan 1 ose atau 2-3 tetes suspensi isolat murni bakteri. Amati, katalase positif ditandai oleh pembentukan buih seketika. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).



3. Test O-F (Oksidasi-Fermentasi)

Inokulasikan secara hati-hati isolat murni bakteri ke dalam 4 tabung berisi media O-F yang mengandung 0,5-1% karbohidrat (glukosa, laktosa, manitol, maltosa atau sukrosa) secara tusukan. Tabung I ditutup dengan parafin lunak, tabung II tidak ditutup parafin, tabung III dan IV sebagai kontrol (ditutup paraffin dan tidak ditutup paraffin tanpa inokulasi bakteri). Amati setelah 24 jam pada suhu kamar. Bandingkan perlakuan dengan kontrol. Oksidasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang tidak ditutup paraffin) terjadi pada mikroorganisme aerobik dan fermentasi (terbentuk warna kuning pada media O-F yang ditutup paraffin) terjadi pada mikroorganisme anaerob. Bandingkan dengan kontrol. Perhatikan perubahan warna media yang terjadi dan indikator yang terkandung dalam media O-F.

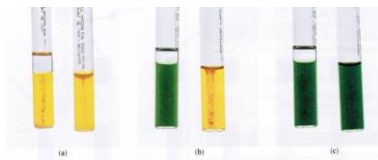
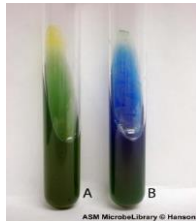


FIGURE 41.5 O-F glucose test. (a) Fermentative and oxidative; (b) oxidative; (c) glucose not metabolized or inert; (d) The McGraw-Hill Companies/Johnson University Photographic Service

4. Test Penggunaan Sitrat

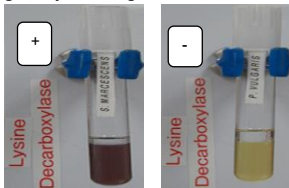
Isolat murni bakteri diinokulasikan secara goresan zig zag menggunakan ose dan secara tusukan menggunakan jarum

inokulasi pada media Simmons Citrat Agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Perhatikan perubahan warna dengan melihat perubahan warna dari hijau menjadi biru. Bandingkan dengan kontrol.



5. Test Dekarboksilase Lysin

Pada medium yang mengandung lysin dan kontrol (media tanpa lysin) diinokulasi secara tusukan dengan isolat murni bakteri, inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Positif jika terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan kembali ke ungu, sementara pada kontrol (media tanpa lysin) terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning.



6. Test Hidrolisis Gelatin

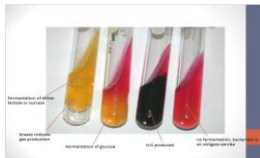
Dengan cara tusukan, inokulasikan isolat murni bakteri pada media yang mengandung gelatin sedalam $\frac{3}{4}$ bagian dari lapisan permukaan. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Pada saat pengamatan, masukkan tabung perlakuan dan kontrol (media

tanpa inokulasi bakteri) dalam almari es selama 30 menit. Positif berarti terjadi pencairan.



7. Test H₂S dan Fermentasi Gula-gula

Dengan menggunakan media TSIA, inokulasikan isolat murni bakteri secara goresan menggunakan jarum ose dan secara tusukan menggunakan jarum inokulasi. Inkubasikan selama 24 jam. Pembentukan H₂S ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna hitam. Perubahan warna media TSIA dari merah menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi gula (glukosa, sukrosa, laktosa). Amati juga apakah terbentuk gas yang ditandai dengan pecahnya media atau terangkatnya media ke atas. Bandingkan dengan kontrol (media tanpa inokulasi bakteri).



8. Test Indol

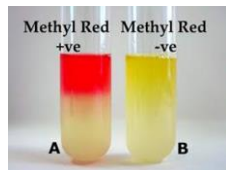
Inokulasikan 1 tabung media Tryptone Water dengan 2 tetes isolat murni bakteri dan 1 tabung media untuk kontrol (tanpa inokulasi bakteri). Inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam.

Setelah inkubasi, tiap-tiap tabung ditambah 10 tetes reagen Kovacs. Terbentuknya warna merah/merah muda pada lapisan larutan reagen menunjukkan terbentuknya indol. Bandingkan dengan kontrol.



9. Test MR (Methyl Red)

Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP (media Methyl Red-Voges Proskauer) dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Tambahkan 5 tetes reagen Methyl Red ke dalam tabung berisi media MR-VP. Kocoklah hati-hati. Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).



10. Test VP (Voges Proskauer)

Inokulasikan isolat murni bakteri pada media MR-VP dan inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Tambahkan 0,6 ml larutan alpha-naphtol 5% dilanjutkan 0,2 ml KOH 40%. Kocoklah hati-hati, longgarkan tutupnya, kocok kembali, ulangi setiap 5 menit, bacalah perubahan warnanya setelah 30 menit. Hasil tes positif jika terjadi warna merah dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen. Bandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).



11. Test Urease

Inokulasikan media Urea Broth yang mengandung indikator fenol merah dengan 1 tetes kultur muni bakteri. Amatilah perubahan warna menjadi merah (phenol red) setelah 24 jam pada suhu kamar. Bandingkan dengan kontrol.



D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Mengapa untuk identifikasi bakteri pengecatan gram perlu dilakukan?
2. Pengamatan apa saja yang bisa digunakan sebagai parameter untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi bakteri tak dikenal?
3. Jelaskan mekanisme reaksi biokimiawi yang Anda uji dalam praktikum ini!
4. Pertanyaan lain diberikan dosen/assisten

III. DETERMINASI BAKTERI

Pada pengujian yang lengkap untuk determinasi bakteri, hasil-hasil pengujian dimasukkan dalam daftar pengamatan yang disebut *Descriptive Chart*. Untuk determinasi bakteri digunakan buku panduan determinasi bakteri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 2000;

Karakter-karakter hasil pengujian (meliputi : morfologi sel individual dan uji biokimiawi), masing-masing digambar, ditabulasikan dan dicocokkan dengan buku panduan determinasi bakteri yang memuat deskripsi bakteri yang telah dikenal sehingga dapat dideterminasi identitas bakteri pada tingkat genus. Contoh tabulasi data karakter-karakter hasil pengujian disajikan di bawah ini

Tabel 1. Hasil pengamatan morfologi sel isolat murni bakteri

Uji morfologi sel bakteri	Hasil pengamatan	Kesimpulan
Pengecatan Gram		

Tabel 2. Hasil pengamatan uji biokimiawi isolat murni bakteri

Uji biokimiawi bakteri	Hasil pengamatan	Kesimpulan
1) Uji Oksidase		
2) Uji Katalase		
3) dst		

ACARA VI
UJI KEPEKAAN ANTIBIOTIK :
PENENTUAN KADAR HAMBAT MINIMAL (KHM)
ANTIBIOTIK SECARA DILUSI PADAT

A. TUJUAN:

Menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari suatu antibiotik secara dilusi padat.

B. DASAR TEORI :

Kadar Hambat Minimal (KHM) suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Kadar Bunuh Minimal suatu antibiotik adalah konsentrasi antibiotik terendah yang dapat membunuh pertumbuhan mikroorganisme tertentu. KHM dan KBM dapat ditentukan dengan prosedur tabung dilusi. Prosedur ini digunakan untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif dalam mengontrol infeksi pada pasien (Radji, 2004).

Metode dilusi disebut metode pengenceran. Pada metode ini obat (misalnya antibiotik) dibuat dalam berbagai konsentrasi, kemudian ditambahkan pada media yang mengandung mikroorganisme uji. Hasil yang dibaca adalah kekeruhan. Kekeruhan menandakan adanya potensi hambat obat pada konsentrasi tersebut. Keuntungan metode ini dibandingkan dengan metode difusi adalah dapat menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari obat tersebut. Ada 3 macam cara dalam metode dilusi yaitu metode *Macro Broth Dilution*, metode *Micro Broth Dilution* dan metode agar dilusi (dilusi padat). Pada metode agar dilusi digunakan satu seri plate agar, masing-masing mengandung konsentrasi obat yang berbeda yang berkisar pada dosis terapeutik. Setelah inkubasi dapat dilihat hasilnya dengan membaca kekeruhan pada masing-masing konsentrasi sehingga bisa ditentukan MIC .

Metode dilusi (*dilution method*) menggunakan senyawa antimikroorganisme dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Pada media yang diinokulasi mikroorganisme uji, dilarutkan senyawa antimikroorganisme dengan menggunakan beberapa

tingkatan konsentrasi senyawa antimikroorganisme, dan kemudian diamati pada konsentrasi berapakah senyawa antimikroorganisme tersebut bersifat menghambat atau mematikan. Pada uji mikrodilusi cair dapat memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroorganisme yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz dkk, 2001). Metode ini dapat digunakan untuk penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

C. PROSEDUR KERJA :

Alat dan Bahan :

- Kultur murni bakteri uji dalam media NB umur 24 jam
- Senyawa uji berupa antibiotik (misalnya Amoxycillin sirup kering). Variasi konsentrasi ditentukan berdasarkan hasil percobaan VI. (variasi konsentrasi, 6,25; 3,125; dan 1,5625 mg/ml)
- Alat-alat : petridish steril, pipet volume steril
- Media nutrien agar (NA)
- Deret larutan standar Mac Farland
- NB untuk pembuatan suspensi bakteri uji
- Alkohol 70 % dan aquadest steril

Cara kerja :

- Buatlah seri pengenceran/variasi konsentrasi larutan antibiotik dalam aquades steril. Seri pengenceran ditentukan berdasarkan hasil percobaan acara VI
- Siapkan media NA (siap dituang ke petri secara *pour plate*). Bila media dalam keadaan memadat, cairkan terlebih dahulu
- dengan pemanasan sampai menjadi cair dan buat hingga suhunya sekitar 45 – 50°C sehingga siap untuk dicampur dengan bakteri uji.
- Buatlah suspensi bakteri uji dengan kepadatan yang setara dengan larutan standar Mac Farland II.

Pembuatan kontrol kontaminasi media (per meja)

- Ambil 15 ml media NA, tuang ke dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat.
- Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan. Inkubasi selama 24 jam. Bandingkan dengan perlakuan.

Pembuatan kontrol pertumbuhan bakteri uji (per meja)

- a. Ambil 15 ml media NA dalam tabung. Masukkan 1 ml suspensi bakteri uji ke dalam tabung tersebut.
- b. Tuang dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji. Inkubasi selama 24 jam. Bandingkan dengan perlakuan.

Pembuatan kontrol negatif (pengujian potensi antibakteri pelarut) (per kelompok kecil)

- a. Ambil 15 ml media NA dalam tabung. Masukkan 1 ml suspensi bakteri uji dan 1 ml aquades steril pelarut senyawa antibiotik ke dalam tabung tersebut.
- b. Tuang dalam petri steril secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri : kel. prakt/tgl/perlakuan/nama bakteri uji. Inkubasi selama 24 jam. Bandingkan dengan perlakuan.

Pengujian potensi antibiotik secara dilusi padat (per kelompok kecil)

- a. Ambil 3 tabung yang masing-masing berisi 15 ml media NA suhu 45 – 50°C, tambahkan 1 ml suspensi bakteri uji pada masing-masing tabung tersebut. Tambahkan pula larutan antibiotik dengan konsentrasi yang telah ditetapkan pada langkah 1.
- b. Siapkan 3 petri steril untuk menuang ketiga preparat di atas secara *pour plate*. Biarkan memadat. Beri label pada dasar petri.
- c. Inkubasi selama 24 jam. Amati dan bandingkan kekeruhan dari masing-masing petri. Bandingkan antara kontrol dan perlakuan.

Pembacaan Hasil

- a. Setelah masa inkubasi, kekeruhan media yang menunjukkan kepadatan pertumbuhan bakteri uji diamati dan diberi penilaian menggunakan notasi (+) untuk media yang tampak keruh dan (-) jika tidak ada kekeruhan yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri uji dalam media agar tersebut.
- b. Hasil pengamatan dianalisis untuk mendapatkan konsentrasi atau kadar hambat minimal senyawa antibiotik. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi minimal senyawa antibiotik yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

Penegasan Hasil

1. Dari pengamatan kekeruhan, pilih perlakuan dengan tingkat kekeruhan (-) dan perlakuan dengan tingkat kekeruhan (+).
2. Dengan menggunakan jarum ose, ambil 1 ose dari tabung perlakuan tersebut dan tanamlah di atas permukaan cawan agar dengan metode goresan sederhana.
3. Dari hasil goresan pada cawan agar, tentukan harga KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal). KHM : kadar antibiotik terendah yang masih menunjukkan pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar dengan metode gores. KBM : kadar antibiotik terendah yang sama sekali tidak menunjukkan pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar dengan metode gores.

(lihat lampiran 2 : Penentuan KHM dan KBM)

D. PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa prinsip kerja dari prosedur dilusi pada praktikum mikrobiologi?
2. Apakah perbedaan dilusi padat dan dilusi cair?
3. Bagaimana cara menentukan harga KHM dan KBM?

**PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI
LINGKUNGAN
LANJUTAN (PENELITIAN)**

ACARA VII
UJI KEPEKAAN ANTIBIOTIK :
PENENTUAN KADAR HAMBAT MINIMAL (KHM)
ANTIBIOTIK SECARA DILUSI PADAT

A. Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Ekstraksi adalah suatu proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut yang digunakan daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi⁽³²⁾.

Ekstraksi dibedakan menjadi tiga cara menurut penggolongannya, yaitu :

1. Ekstraksi dengan penekanan yang sering disebut penekanan mekanik,
2. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut (solvent extraction), dan
3. Ekstraksi dengan pemanasan (*rendering*).

Berdasarkan jenis pelarutnya, solvent extractin dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*.

- 1) Cara ***Aqueous phase*** dilakukan dengan menggunakan air
 - 2) Cara ***Organic phase*** dilakukan dengan menggunakan pelarut organik
- Prinsip metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu (maserasi), kemudian diikuti dengan melakukan pemisahan bahan yang telah diekstrak (*filtrasi*). Pada proses maserasi, pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk ke dalam rongga sehingga komponen bioaktif akan larut⁽²⁹⁾. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan komponen bioaktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan antara larutan di luar dengan di dalam sel⁽³³⁾. Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka akan semakin besar polar pelarut tersebut. Prinsip pelarutan yang dipakai pada

metode ini adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar⁽³³⁾. Tingkat polaritas suatu pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya⁽³³⁾

Pelarut	Titik didih (°C)	Titik Beku (°C)	Konstanta dielektrik
Dietileter	35	-116	4,3
Aseton	56	-95	20,7
Kloroform	61	-64	4,8
Heksana	68	-94	1,8
Etil Asetat	77	-84	6,0
Etanol	78	-117	24,3
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2

Hasil ekstrak yang diperoleh akan tergantung pada beberapa faktor, yaitu kondisi alamiah senyawa tersebut, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran parikel sampel, lama waktu ekstrak, kondisi dan waktu penyimpanan, serta perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel⁽²⁷⁾. Ekstraksi beberapa kali dengan pelarut yang lebih sedikit akan lebih efektif dibanding ekstraksi satu kali dengan semua pelarut sekaligus⁽³³⁾. Komponen aktif yang dapat diekstrak dari suatu bahan tergantung pada kepolaran pelarut yang digunakan⁽³⁴⁾. Senyawa yang terikat pada pelarut polar antara lain alkaloid, asam amino, polihidrosisteroid, dan saponin, sedangkan senyawa yang terikat pada pelarut semi polar antara lain peptida dan depsipeptida serta senyawa yang terikat pada pelarut non polar (misalnya heksana) antara lain hidrokarbon, asam lemak, dan terpen.

Prinsip metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu (maserasi), kemudian diikuti dengan melakukan pemisahan bahan yang telah diekstrak (filtrasi). Pada proses maserasi, pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk ke dalam rongga sehingga komponen bioaktif akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan komponen bioaktif di dalam sel dengan di luar sel menyebabkan larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan antara larutan di luar dengan

di dalam sel⁽³³⁾. Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka akan semakin besar polar pelarut tersebut. Prinsip pelarutan yang dipakai pada metode ini adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar⁽³²⁾.

Produk senyawa organik karang lunak *Sarcophyton* yang memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif mencakup lebih dari 50% penemuan senyawa organik potensial dari laut. Pengisolasian senyawa organik potensial ini dilakukan dengan mengekstrak organisme karang lunak *Sarcophyton* dengan pelarut yang dipilih berdasarkan kesamaan tingkat polaritas senyawa yang diinginkan. Pada saat ekstraksi, senyawa ekstrak kasar (campuran) dari organisme karang lunak *Sarcophyton* akan tertarik keluar oleh pelarut pengekstrak, sehingga dapat dilakukan pengujian untuk melihat potensi bioaktif senyawa tersebut⁽³⁵⁾. Hasil ekstraksi tersebut kemudian dapat difraksinasi untuk mendapatkan senyawa organik yang terpisah dari fraksi air yang mengandung ion. Cara ini merupakan awal dari pemurnian senyawa organik yang diinginkan⁽³⁵⁾. Proses ini menggunakan dua pelarut yang berbeda berdasarkan teori *like dislike polarity*, sehingga didapatkan dua fraksi terpisah yang berbeda, yaitu fraksi organik dan ionik dari ekstrak.

Isolasi dan identifikasi komponen-komponen senyawa organik yang memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif dapat dilakukan dengan cara kromatografi. Kromatografi merupakan metode pemisahan senyawa untuk memurnikan dan mengidentifikasi komponen-komponennya.

B. Metoda Identifikasi Awal Metabolit Sekunder

1. Kromatografi Lapis Tipis

Metode ini berdasarkan distribusi komponen yang berbeda dari suatu campuran antara fase bergerak dan fase diam pada suatu lempengan tipis. Pada kromatografi lapis tipis (*Thin Layer Chromatography /TLC*), fase diamnya berupa lapisan tipis yang melekat pada suatu material (dapat berupa gelas, plastik atau lembaran metal), yang memungkinkan fase bergerak dapat bergerak ke atas secara kapilari. Proses pemisahan senyawa berdasarkan prinsip bahwa tiap komponen dalam campuran senyawa memiliki perbedaan polaritas dan akan

terserap oleh fase diamnya (misalnya gel silika), demikian pula pelarut (*adsorbent*) dan zat terlarut (*dissolve*) yang berada pada fase gerak, akan bergerak pada tingkatan yang berbeda. Oleh karena itu, tiap komponen dalam campuran senyawa akan tertarik oleh pelarut fase gerak pada tingkatan yang berbeda di sepanjang plat kromatografi. Hasil pemisahan senyawa akan menunjukkan spot-spot yang terpisah sepanjang plat TLC berdasarkan tingkat polaritasnya. Spot-spot ini kemudian dilihat dan ditandai di bawah sinar UV. Faktor retardasi (*R_f*) dari tiap spot komponen yang terpisah dapat dikalkulasi dengan mengukur jarak dari titik awal sampel ke tengah spot yang sudah terpisah. *R_f* ini dapat merupakan langkah awal untuk memperkirakan jenis (identifikasi awal) komponen senyawa organik yang telah terpisah

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan campuran senyawa dengan menggunakan fase diam dan fase gerak lewat lapisan tipis. Lapisan tipis terdiri atas bahan berbutir-butir (*fase diam*) di tempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan, berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah itu, pelat atau lapisan tipis di taruh ke dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (*fase gerak*), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan. Fase diam yang banyak digunakan adalah silika gel, tetapi lapisan dapat juga dibuat dari aluminium oksida, kalsium hidroksida, pertukaran ion, magnesium phosphat, poliakrilamida, polivinil pirolidon dan sellulose. Fase gerak merupakan medium angkut dan terdiri atas satu atau lebih pelarut, ia bergerak dalam fase diam yang merupakan suatu lapisan berpori, karena adanya gaya kapiler. Pemilihan fase gerak ditinjau dari kemampuan mengelusi. Kerja elusi ini bertambah secara paralel dengan bertambahnya tetapan dielektrik pelarut. Pemilihan fase gerak tergantung pada faktor-faktor yang sama seperti dalam pemisahan kromatografi kolom serapan. Sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin. Salah satu alasan daripada penggunaan itu adalah mengurangi serapan dari setiap komponen dari campuran pelarut. Jika komponen – komponen yang mempunyai sifat polar yang

tinggi (terutama air) dalam campuran cukup akan merubah sistem menjadi partisi. Campuran yang baik memberikan fase gerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang, tetapi sebaiknya dicegah sejauh mungkin mencampur lebih dari dua komponen, terutama karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan fasa- fasa terhadap perubahan suhu. Kemurnian dari pelarut adalah lebih penting dalam lapisan tipis daripada bentuk – bentuk kromatografi lain, karena disini digunakan sejumlah materi yang sedikit

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat

Pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya merupakan masalah penting dari pekerjaan di laboratorium kimia. Untuk itu, kemurnian bahan atau komposisi campuran dengan kandungan yang berbeda dapat dianalisis dengan benar. Kontrol kualitas, analisis bahan makanan dan lingkungan, tetapi juga kontrol dan optimasi reaksi kimia dan proses berdasarkan penentuan analitik dari kuantitas material. Teknologi yang penting untuk analisis dan pemisahan preparatif pada campuran bahan adalah kromatografi. Prinsip dasar kromatografi, seperti yang digunakan saat ini pertama kali dikembangkan oleh ahli biologi Michael Tswett mempublikasikan prosedur yang berhubungan dengan pemisahan dan isolasi pigment tanaman yang berwarna hijau dan kuning melalui kromatografi adsorpsi

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya yang menggunakan. Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa – senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida–lipida dan

hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas. KLT juga dapat berguna untuk mencari eluen untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni skala kecil. Pemisahan senyawa biasanya menggunakan beberapa teknik kromatografi. Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada sifat kelarutan senyawa yang akan dipisahkan. Semua kromatografi memiliki fase diam (*dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan*) dan fase gerak (*berupa cairan atau gas*). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Dan komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda. Pelaksanaan kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Gel silika (atau alumina) merupakan fase diam. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendar flour dalam sinar ultra violet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Pelaksanaan ini biasanya dalam pemisahan warna yang merupakan gabungan dari beberapa zat pewarna atau pemisahan dan isolasi pigmen tanaman yang berwarna hijau dan kuning.

2. Kromatogram

Pelaksanaan kromatografi biasanya digunakan dalam pemisahan warna yang merupakan sebuah campuran dari beberapa zat pewarna. Contoh pelaksanaan kromatografi lapis tipis : Sebuah garis menggunakan pensil digambar dekat bagian bawah lempengan dan setetes pelarut dari campuran pewarna ditempatkan pada garis itu. Diberikan penandaan pada garis di lempengan untuk menunjukkan posisi awal dari tetesan. Jika ini dilakukan menggunakan tinta, pewarna dari tinta akan bergerak selayaknya kromatogram dibentuk / tinta ikut naik ke atas. Ketika bercak dari campuran itu mengering, lempengan ditempatkan pada sebuah gelas kimia bertutup berisi pelarut dalam jumlah yang tidak terlalu banyak. Perlu diperhatikan bahwa batas pelarut berada dibawah garis dimana posisi bercak berada. Alasan untuk menutup gelas kimia adalah untuk

meyakinkan bahwa kondisi dalam gelas kimia terjenuhkan oleh uap dari pelarut. Untuk mendapatkan kondisi ini, dalam gelas kimia biasanya ditempatkan beberapa kertas saring yang terbasahi oleh pelarut. Kondisi jenuh dalam gelas kimia dengan uap mencegah penguapan pelarut

Karena pelarut bergerak lambat pada lempengan, komponen-komponen yang berbeda dari campuran pewarna akan bergerak pada kecepatan yang berbeda dan akan tampak dari perbedaan bercak warna.

3. Perhitungan nilai R_f

Jumlah perbedaan warna yang telah terbentuk dari campuran, pengukuran diperoleh dari lempengan untuk memudahkan identifikasi senyawa-senyawa yang muncul. Pengukuran ini berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna masing-masing. Ketika pelarut mendekati bagian atas lempengan, lempengan dipindahkan dari gelas kimia dan posisi pelarut ditandai dengan sebuah garis, sebelum mengalami proses penguapan.

Pengukuran berlangsung sebagai berikut :

1. Nilai R_f untuk setiap warna yang telah terbentuk dari campuran, pengukuran diperoleh dari lempengan untuk memudahkan identifikasi senyawa-senyawa yang muncul.
2. Pengukuran ini didasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna masing - masing.
3. Ketika pelarut mendekati bagian atas lempengan, lempengan dipindahkan dari gelas kimia dan posisi pelarut ditandai dengan sebuah garis, sebelum mengalami proses penguapan.

4. Mengidentifikasi senyawa-senyawa

- 1) Identifikasi senyawa bioaktif dengan metode Kromatografi sebagai berikut . Setetes campuran ditempatkan pada garis dasar lempengan lapis tipis dan bercak-bercak kecil yang serupa dari asam amino yang telah diketahui juga ditempatkan pada disamping tetesan yang akan diidentifikasi.

- 2) Lempengan lalu ditempatkan pada posisi berdiri dalam pelarut yang sesuai dan dibiarkan seperti sebelumnya. Dalam gambar, campuran adalah M dan asam amino yang telah diketahui ditandai 1-5.
- 3) Pengembangan adalah proses pemisahan cuplikan akibat pelarut mengembang naik dalam lapisan. Pengembangan dilakukan dalam bejana yang ruangnya jenuh dengan pelarut pengembangan yang dituangkan sehingga kertas saring basah, dan tinggi pelarut pengembangan tersebut dalam bejana mencapai 1 cm dari dasarnya.
- 4) Hasil pemeriksaan yang diperoleh setelah pengembangan diidentifikasi dibawah lampu UV (254 dan 366 nm), ditandai ada atau tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas maka dilakukan dengan penyemprotan atau diuapi dengan pereaksi yang sesuai⁽³⁸⁾.
- 5) Jarak pengembangan pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf.

$$Rf = \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal penotolan}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}}$$

Nilai Rf untuk setiap warna dihitung dengan rumus sebagai berikut :

Rf = jarak yang ditempuh oleh komponen / jarak yang ditempuh oleh pelarut berjangka antara 0.00-1.00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hRf adalah angka Rf dikalikan faktor seratus (h), menghasilkan nilai berjarak 1 sampai 100

ACARA VIII
UJI BIODEGRADASI BAKTERI PADA SUBSTRAT
ORGANOPHOSPHAT

A. Metode dan Cara Kerja

Commented [F1]: Belum dicantumkan tujuan,

1. Pembuatan Media Biakan

Media yang digunakan pada tahap isolasi dan identifikasi adalah minimal Zobell agar dan minimal zobell broth sebagai berikut. Bahan-bahan pembentuk medium zobell terdiri dari NaCl (3 gram), KCl (0,7 gram), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10,8 gram), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,4 gram), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1 gram), aquadest, $PbNO_3$ 0,1 ppm, $Pb(CH_3COO)_2$ 0,1 ppm, MR-VP Broth, pewarnaan metylen blue, hidrogen peroksida 3%, larutan naftol (1 gram per 100 ml etil alkohol) dan larutan phenilendiamin (1 gram per 100 ml air destilasi), minimal yeast ekstrak (0,25 gram) dan minimal Bakto pepton (1 gram), (Whitman, 2010).

2. Isolasi Bakteri

a. Metode Isolasi Bakteri Dari Air Organophosphat

- 1) Sampel air diambil dari perairan dimasukkan kedalam botol sampel, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box*, dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakterinya.
- 2) Sebanyak 1 ml sampel air danau Organophosphat dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , sampel digojog/divortex hingga homogen.
- 3) Sebanyak 1 ml hasil pengenceran 10^{-1} dipindahkan ke dalam 9 ml akuades steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} , sampel digojog/divortex hingga homogen.
- 4) Langkah nomor 6 diulangi hingga didapatkan pengenceran 10^{-5} .
- 5) Dari masing – masing hasil pengenceran diambil 35 µl kemudian ditanam ke permukaan medium agar Zobell 2216 E.
- 6) Hasil Isolasi diinkubasi pada suhu $35^{\circ}C$ selama 2x24 Jam.

- 7) Koloni yang tumbuh diamati berdasarkan morfologinya (Bentuk, Warna dan Tekstur).
- 8) Koloni yang tumbuh dimurnikan menggunakan metode *streak plates* hingga didapatkan koloni murni/koloni tunggal (Radjasa *et al.*, 2007).

b. Metode Isolasi Bakteri Dari Sedimen Organophosphat

- 1) Sampel Sedimen diambil dari perairan dimasukkan ke dalam botol sampel, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box*, dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakterinya.
- 2) Sebanyak 1 gram sampel sedimen dari danau Organophosphat dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , sampel digojog/divortex hingga homogen.
- 3) Sebanyak 1 ml hasil pengenceran 10^{-1} dipindahkan ke dalam 9 ml akuades steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} , sampel digojog/divortex hingga homogen.
- 4) Langkah nomor 6 diulangi hingga didapatkan pengenceran 10^{-5} .
- 5) Dari masing – masing hasil pengenceran diambil 35 μ l kemudian ditanam ke permukaan medium agar Zobell 2216 E.
- 6) Hasil Isolasi diinkubasi pada suhu 35 °C selama 2x24 Jam.
- 7) Koloni yang tumbuh diamati berdasarkan morfologinya (Bentuk, Warna dan Tekstur).
- 8) Koloni yang tumbuh dimurnikan menggunakan metode *streak plates* hingga didapatkan koloni murni/koloni tunggal (Colwell and Grigorova, 1987).
- 9) Isolat murni terseleksi tersebut dilakukan uji potensi bakteri pendegradasi Pestisida Organophosphat *Profenofos*, demikian pula untuk uji *Malathion*

3. Metode Uji Aktivitas Degradasi Pestisida/Kualitatif

a. Menggunakan Medium Agar :

- 1) Medium agar Zobell 2216 E ditambahkan *Brom Thymol Blue* (BTB) yang digunakan sebagai indikator disterilkan menggunakan *autoclave*.

- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida dibuat dengan variasi konsentrasi 25, 50, 75, 100 ppm.
- 3) Bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen Organophosphat diinokulasikan (digoreskan melingkar) pada permukaan medium agar Zobell 2216E menggunakan metode goresan.
- 4) Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C.
- 5) Amati perubahan warna yang terjadi, apabila warna medium di sekitar bakteri berubah menjadi kuning menunjukkan isolat bakteri tersebut dapat mendegradasi pestisida.

b. Menggunakan Medium Cair :

- 1) Medium cari Zobell 2216E ditambahkan *Brom Thymol Blue* (BTB) yang digunakan sebagai indikator disterilkan menggunakan *autoclave*.
- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida dibuat dengan variasi konsentrasi 25, 50, 75, 100 ppm.
- 3) Satu ose bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen Organophosphat diinokulasikan ke dalam medium cair menggunakan jarum ose.
- 4) Sampel dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam.
- 5) Amati perubahan warna yang terjadi, apabila warna medium cair berubah dari biru menjadi kuning menunjukkan isolat bakteri tersebut dapat mendegradasi pestisida.

4. Uji Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Pestisida

a. Metode Kinetika Pertumbuhan Bakteri

- 1) 200 ml medium cair Zobell 2216E sebagai medium pertumbuhan ditempatkan di dalam botol dan disterilkan menggunakan *autoclave*.
- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida di dalam medium sebesar 75 ppm.
- 3) 3% (v/v) kultur cair bakteri bakteri terpilih (tunggal dan konsorsium) dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan

- kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 3x24 jam.
- 4) Pengamatan untuk fase Lag dilakukan setiap 2 jam sampai jam ke – 6, setelah jam ke – 6 pengamatan fase Log, Stasioner dan Death dilakukan setiap 6 jam sekali.
 - 5) Sampling dilakukan dengan cara mengambil 5 ml kultur cair dari botol perlakuan secara aseptis.
 - 6) Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
 - 7) Natan dan supernatan dipisahkan kemudian masing – masing diukur nilai absorbansinya.
 - 8) Natan (pelet) dilarutkan ke dalam akuades steril, kemudian divortex.
 - 9) Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm, nilai kepadatan bakteri dihitung menggunakan persamaan standar Mc Farland.
 - 10) Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan pajang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*. Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.
 - 11) Langkah 5 – 10 diulangi pada jam – jam pengamatan.

5. Penentuan Volume/konsentrasi Isolat Terbaik :

- a. Medium cair Zobell 2216E sebagai medium pertumbuhan disterilkan menggunakan *autoclave*.
- b. Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida di dalam medium sebesar 75 ppm.
- c. Kultur cair bakteri bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen danau Organophosphat dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan dengan variasi volume 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (v/v) kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam.
- d. Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.

- e. Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*.
- f. Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.
- g. Pilih konsentrasi isolat yang mempunyai kemampuan degradasi pestisida terbaik.

6. Metode Uji Resistensi

a. Menggunakan Medium Cair (Kualitatif) :

- 1) Medium cari Zobell 2216E ditambahkan *Brom Thymol Blue* (BTB) yang digunakan sebagai indikator disterilkan menggunakan *autoclave*.
- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida dibuat dengan variasi konsentrasi 25, 50, 75, 100 ppm.
- 3) Satu ose bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen Organophosphat diinokulasikan ke dalam medium cair menggunakan jarum ose.
- 4) Sampel dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam.
- 5) Amati perubahan warna yang terjadi, apabila warna medium cair berubah dari biru menjadi kuning menunjukkan isolat bakteri tersebut dapat mendegradasi pestisida.

b. Metode Difusi Agar :

- 1) 100 µl kultur cair bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen danau Organophosphat dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan ke media agar Zobell 2216E tawar, ratakan ke seluruh permukaan media agar menggunakan spreader.
- 2) Diamkan selama $\pm$ 30 menit supaya bakteri berdifusi ke medium agar.
- 3) Paper disk diletakkan dipermukaan agar yang sudah ditanami bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen danau Organophosphat.
- 4) Larutan pestisida dengan variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm disiapkan sebagai larutan uji.

- 5) 30 µl ditetaskan dengan variasi konsentrasi yang sudah masing – masing ditetaskan pada paper disk.
- 6) Inkubasi selama 2x24 Jam pada suhu ruangan.
- 7) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur. Bakteri digolongkan resisten terhadap pestisida apabila tidak terbentuk zona hambat di sekitar paper disk.

7. Metode Uji Aktivitas Konsorsium Bakteri Pendegradasi Pestisida (Kuantitatif)

a. Metode Uji Aktivitas Degradasi Pestisida (Kuantitatif)

Menggunakan Medium Cair (Kuantitatif) :

- 1) Medium cair Zobell 2216E sebagai medium pertumbuhan disterilkan menggunakan *autoclave*.
- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida di dalam medium sebesar 75 ppm.
- 3) Satu ose bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen Organophosphat diinokulasikan ke dalam medium cair menggunakan jarum ose.
- 4) Sampel dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam.
- 5) Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
- 6) Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*.
- 7) Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.

8. Metode Uji Aktivitas Konsorsium Bakteri Pendegradasi Pestisida (Kuantitatif)

a. Menggunakan Medium Cair (Kuantitatif) :

- 1) Medium cair Zobell 2216E sebagai medium pertumbuhan disterilkan menggunakan *autoclave*.

- 2) Medium yang telah disterilkan diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida di dalam medium sebesar 75 ppm.
- 3) 3% (v/v) konsorsium bakteri terpilih diinokulasikan ke dalam medium cair yang telah diperkaya dengan pestisida.
- 4) Sampel dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam.
- 5) Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
- 6) Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*.
- 7) Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.
- 8) Pilih konsorsium pendegradasi pestisida terbaik.

9. Identifikasi Mikroorganisme berdasarkan Analisis Gen 16S-rRNA

a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan Kit Chelex 100.

- 1) Sel bakteri yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi 100 µl aquabides, kemudian ditambahkan saponin 0,5% dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit kemudian supernatan hasil sentrifugasi dibuang.
- 2) Sebanyak 1 ml *Phospate Buffer Saline* (PBS 1x) ditambahkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, supernatan hasil sentrifugasi dibuang, selanjutnya sebanyak 100 µl akuabides dan 50 µl Chelex 100 ditambahkan ke dalam tabung.
- 3) Sampel direbus selama 10 menit (sampel divortex pada 5 menit pertama). Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang mengandung

Commented [F2]: Apa materi tidak terlalu berat...???

DNA dipindahkan ke dalam tabung eppendorf yang baru dan siap untuk proses Amplifikasi DNA.

b. Amplifikasi DNA

Amplifikasi merupakan penanda molekular dengan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) 16s rDNA.

- 1) Perlakuan temperatur yang digunakan pada proses Amplifikasi DNA adalah : denaturasi awal pada 95 °C selama 3 menit, kemudian 30 siklus (denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, annealing pada suhu 55 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit), kemudian ekstensi pada suhu 72 °C selama 7 menit dan terakhir 4 °C ~ (Lee, 2006). Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal untuk bakteri 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik eubacteria 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Isnansetyo dan Kamei, 2003).
- 2) Campuran bahan-bahan yang digunakan yaitu kit Promega (25 µl) primer 27^o F (2,5 µl), primer 1492 R (2,5 µl), DNA *template* (2,5 µl) dan aquabides (17,5 µl) sehingga total volume 50 µl. Bahan-bahan tersebut dicampur dalam tabung PCR 0,2 ml.

c. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA

- 1) Visualisasi hasil amplifikasi DNA dilakukan melalui elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µl produk PCR ke dalam sumur gel agarose 1 %. Pembuatan gel agarose 1 % dilakukan dengan melarutkan 1 gram agarose dalam 100 ml larutan TAE buffer 1x, lalu dipanaskan menggunakan oven sampai homogen (jernih). Sebanyak 5,33 µl *Ethidium Bromide* dimasukkan ke dalam larutan gel, kemudian digoyang – goyang supaya homogen.
- 2) Larutan gel dituang dalam cetakan dengan sisir cetakan yang dipasang dengan posisi tegak hingga melewati sisir sesuai dengan ketebalan yang diinginkan. Gel dibiarkan beberapa saat sampai mengeras. Langkah selanjutnya gel direndam dalam larutan buffer TAE 1x, gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama ± 30 menit.

- 3) *Band* DNA hasil amplifikasi diamati dengan menggunakan alat *Gel Documentation*.

d. Purifikasi Hasil Amplifikasi DNA

- 1) Purifikasi dilakukan untuk mendapatkan DNA murni hasil amplifikasi PCR 16S rDNA. Metode yang digunakan adalah metode konvensional.
- 2) Hasil PCR disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 7 menit. Supernatan dibuang dengan menggunakan *micropipet*, pastikan DNA benar – benar murni (tidak ada primer yang tertinggal).
- 3) Sebanyak 50 µl akuabides steril ditambahkan pada pelet DNA, diamkan selama 5 menit. Hasil DNA murni dapat disekuensing untuk mengetahui urutan basa DNAny.

e. Sekuensing DNA

- 1) Sekuensing dilakukan menurut siklus PCR sekuensing menggunakan *Big Dye Terminator v.3.1*. Formula untuk reaksi PCR sekuensing yaitu: 2 µl *big dye*, 2 µl *buffer* 10x, 4 µl templet DNA, 1 µl primer dengan konsentrasi 3,2 pmol, ddH₂O hingga volume akhir 10 µl.
- 2) Amplifikasi DNA dilakukan dengan siklus sebagai berikut: denaturasi awal (96 °C selama 2 menit), kemudian denaturasi (96 °C selama 10 detik); annealing (50 °C selama 5 detik); dan ekstensi (60 °C selama 4 menit) sebanyak 25 siklus.
- 3) Hasil PCR dipurifikasi dan disekuen menggunakan primer 27F. Sekuen dianalisis secara otomatis (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

f. Konstruksi Pohon Filogenetika

- 1) Bakteri pendegradatif pestisida yang telah berhasil diamplifikasi gen 16S rRNA-nya dapat dilihat kekerabatannya dengan prokariota lain yang ada di basis data berdasarkan sekuens gen 16S-rRNA-nya.
- 2) Sekuen dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Dipenogoro. Sekuen parsial yang diperoleh akan melalui proses pengeditan dengan menggunakan program Bioedit.
- 3) Setelah diperoleh data hasil contiq urutan nukleotida berdasarkan amplifikasi dengan universal, maka

homologinya akan dibandingkan dengan prokariota lain yang ada pada basis data di Gene Bank. Analisis kluster dilakukan menggunakan data base dari situs web RDP (Ribosomal Database Project) dengan situs (<http://www.rdp.com>). sedangkan pembuatan pohon filogenetik menggunakan program MEGA 5

10. Pembuatan Larutan Pestisida

- 1) Pestisida komersial dengan konsentrasi 500.000 ppm dipersiapkan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi yang diperlukan dalam penelitian
- 2) Dibuatl larutan pestisida stok 100 ppm dengan cara mengencerkan pestisida komersil menggunakan akuades steril.
- 3) Sebanyak 0,2 ml pestisida komersil 500.000 ppm ditambah dengan 99,8 ml akuades di shaker hingga homogen (didapatkan 100 ml larutan pestisida konsentrasi 1.000 ppm).
- 4) Dari larutan stock 1.000 ppm diencerkan hingga mencapai konsentrasi pestisida yang digunakan untuk saat perlakuan.

11. Pembuatan Larutan Standar

- 1) Pestisida komersil dengan konsentrasi 500.000 ppm dipersiapkan
- 2) Buat larutan pestisida stok 100 ppm dengan cara mengencerkan pestisida komersil menggunakan akuades steril.
- 3) Sebanyak 0,2 ml pestisida komersil 500.000 ppm ditambah dengan 99,8 ml akuades, gojog hingga homogen (didapatkan 100 ml larutan pestisida konsentrasi 1.000 ppm).
- 4) Dari larutan stock 1.000 ppm diencerkan kembali menggunakan akuades steril sehingga didapatkan variasi konsentrasi 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 dan 75 ppm.
- 5) Masing – masing larutan diukur nilai absorbansinya menggunakan Spectrofotometer.
- 6) Nilai absorbansi yang didapatkan dibuat kurva standar larutan.
 - a) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 1.000 ppm :
 - $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$
 - $V_1 \times 500.000 = 100 \times 1.000$
 - $V_1 = 100 \times 1.000/500.000$

- $V1 = 0,2 \text{ ml}$
- Untuk membuat larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dengan cara 0,2 ml pestisida komersil 500.000 ppm dilarutkan dalam 99,8 ml akuades steril.
- b) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 75 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 75$
 $V1 = 10 \times 75 / 1.000$
 $V1 = 0,75 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 75 ppm dengan cara 0,75 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,25 ml akuades steril.
- c) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 65 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 65$
 $V1 = 10 \times 65 / 1.000$
 $V1 = 0,65 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 65 ppm dengan cara 0,65 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,35 ml akuades steril.
- d) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 55 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 55$
 $V1 = 10 \times 55 / 1.000$
 $V1 = 0,55 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 55 ppm dengan cara 0,55 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,45 ml akuades steril.
- e) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 45 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 45$
 $V1 = 10 \times 45 / 1.000$
 $V1 = 0,45 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 45 ppm dengan cara 0,45 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,55 ml akuades steril.

- f) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 35 ppm:
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 35$
 $V1 = 10 \times 35 / 1.000$
 $V1 = 0,35 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 35 ppm dengan cara 0,35 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,65 ml akuades steril.
- g) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 25 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 25$
 $V1 = 10 \times 25 / 1.000$
 $V1 = 0,25 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 25 ppm dengan cara 0,25 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,75 ml akuades steril.
- h) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 15 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 15$
 $V1 = 10 \times 15 / 1.000$
 $V1 = 0,15 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan pestisida 15 ppm dengan cara 0,15 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,85 ml akuades steril.
- i) Perhitungan Pembuatan Larutan Pestisida 5 ppm :
- $V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $V1 \times 1.000 = 10 \times 5$
 $V1 = 10 \times 5 / 1.000$
 $V1 = 0,05 \text{ ml}$
 - Untuk membuat larutan *stock* pestisida 5 ppm dengan cara 0,05 ml larutan *stock* pestisida 1.000 ppm dilarutkan dalam 9,95 ml akuades steril.

12. Uji Bioremediasi Sampel Air dan Sedimen Organophosphat Dengan Bakteri Indigenous

Metode Aplikasi Pada Air Organophosphat :

- 1) 200 ml air Organophosphat sebagai medium pertumbuhan ditempatkan di dalam botol steril kemudian diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos*, konsentrasi pestisida sebesar 75 ppm.
- 2) 3% (v/v) kultur cair bakteri bakteri terpilih (tunggal dan konsorsium) dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm.
- 3) Sampling dilakukan setiap 24 jam sekali dengan cara mengambil 5 ml sampel dari botol perlakuan secara aseptis.
- 4) Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
- 5) Supernatan diambil dan diukur nilai absorbansinya untuk mengetahui kandungan konsentrasi pestisida yang tersisa.
- 6) Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*. Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.
- 7) Langkah 3 – 7 diulangi pada jam – jam pengamatan.

Metode Aplikasi Pada Sedimen Organophosphat:

- 1) 100 gram sedimen yang diambil dari danau Organophosphat digunakan sebagai medium pertumbuhan ditempatkan di dalam tempat steril.
- 2) Sedimen diperkaya dengan pestisida jenis *Malathion* dan *Profenofos* hingga konsentrasi pestisida di dalam sedimen sebesar 75 ppm.
- 3) 3% (v/v) kultur cair bakteri bakteri terpilih (tunggal dan konsorsium) dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm.
- 4) Sampling dilakukan setiap 24 jam sekali dengan cara mengambil ± 1 gram sedimen dari botol perlakuan secara aseptis.

- 5) Sampel dicentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
- 6) Supernatan diambil dan diukur nilai absorbansinya untuk mengetahui kandungan konsentrasi pestisida yang tersisa.
- 7) Nilai absorbansi supernatan (cairan) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 730 nm untuk *Malathion* dan 400 nm untuk *Profenofos*. Nilai absorbansi dimasukkan ke persamaan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi pestisida yang tersisa.
- 8) Langkah 4 – 8 diulangi pada jam – jam pengamatan.

Analisis dengan GC MS

- 1) Untuk mengetahui hasil degradasi sampel yang sudah disentrifugasi dianalisis dengan menggunakan GC MS pada pengamatan 1, 4 dan 8
- 2) Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit.
- 3) Supernatan (Cairan) diambil dan ditempatkan pada gelas baker.
- 4) Larutan heksan ditambahkan ke dalam baker gelas yang berisi sampel dengan perbandingan sampel : heksan (1 : 3).
- 5) Sampel diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit.
- 6) Sampel dan heksan dipisahkan menggunakan *separatory funnel*.
- 7) Larutan heksan diambil dan dianalisa kandungan pestisidannya menggunakan GCMS.

B. Teknik Analisis Data

- 1) Teknik analisis data identifikasi residu pestisida golongan *Organophosphat* dari perairan dan sedimen *Organophosphat* secara kuantitatif dengan menggunakan Gas Chromatography sebagai *base line* Penelitian Bioremediasi Pestisida *Organophosphat Profenofos* dan *Malathion* dengan memanfaatkan bakteri *Indigenous Organophosphat*
- 2) Teknik analisis data bioremediasi dengan perlakuan konsentrasi oleh isolat bakteri *Indigenous* dan konsorsium bakteri *Indigenous* pada sampel air dan sedimen. Uji degradasi dilakukan dengan melihat pertumbuhan dan kemampuan degradatif bakteri *Indigenous* pada

media air dan sedimen Organophosphat diperkaya *Malathion* dan *Profenofos* pada skala laboratorium dan skala aplikasi dengan menggunakan metode spektrophotometri.

- 3) Teknik analisis data untuk mengetahui senyawa hasil degradasi menggunakan metode *GC Mass Spectrometry*.
- 4) Teknik analisis data identifikasi bakteri *Indigenous* dari perairan Organophosphat dengan metoda eksploratif secara eksperimental laboratorium dengan uji morfologi, biokimia, uji degradasi dan biologi molekuler untuk dapat melakukan identifikasi dan mendapatkan informasi filogenetika dari bakteri *Indigenous* terseleksi.

RESPONSI

A. RESPONSI TERTULIS

Jadwal pelaksanaan responsi tertulis bersamaan dengan responsi praktek. Responsi tertulis berupa uraian singkat.

B. RESPONSI PRAKTEK

Responsi praktek berupa simulasi Acara II hingga Acara VI secara individu oleh masing-masing praktikan kepada asisten praktikum. Setiap praktikan mendapatkan kesempatan yang sama untuk mensimulasikan acara-acara tersebut. Pengundian simulasi acara praktikum dilakukan pada saat pratikan memasuki ruangan responsi.

PUSTAKA

- APHA 1995. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. 19th Edition. American Public Health Association/ American Water Work Association/ Water Environment Federation Washington. Dc. USA: 1100 pp. Abel, P. D. 2002. Water Pollution Biology. The Northumbrian Water Ecology Centre, University of Sunderland. Taylor & Francis Ltd. Sunderland, UK.
- Atlas, R. M., 1997, *Principles of Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers. Iowa
- Bonang, G., dan Koeswardono, E.A., 1982, *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*, 45-46, P.T. Gramedia, Jakarta
- Holt, et.al, 2000, *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Ed., Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, USA.
- Harley- Prescott:, 2002, *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. Front Matter Summary of Universal Precautions and Laboratory Safety. Procedures. The McGraw-Hill Companies,
- Hugo, W.B. and Russel, A.D., 1999, *Pharmaceutical Microbiology*, 5th Ed. Blackwell Science, Oxford
- Jawetz, and Melnick, 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., Suhadi D., 1980, *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta
- Lay, B., 1994, *Analisis Mikroorganisme di Laboratorium*, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, Brock, 2000, *Biology of Microorganisms*, 9th ed, Prentice Hall International Inc., Upper Saddle River, New York
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap and D.P. Clark, 2009, *Brock Biology and Microorganisms*, 12th ed, Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco

- McKane, L., Kandel, J., 1996, *Microbiology : Essentials and Application*, Mc Graw Hill Inc., New York
- Murray P.R., 1999, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington
- Pelczar, M.J., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta
- Prescott, L.M., Habley, J.P., and Klein, D.A., 1999, *Microbiology*, Fourth ed., Mc Graw-Hill, New York
- Radji, M. 2004, *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*, Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia, Jakarta
- Volk, W. A., dan M. F. Wheeler, 1988, *Mikrobiologi Dasar*, Penerbit Erlangga, Jakarta

Lampiran 2. Prosedur Perhitungan ALT

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai Prosedur baku pengujian mikrobiologi, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan DepKes RI (1992)

- 1) Cawan petri dipilih dari satu pengenceran yang menunjukkan Jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan petri. Hitung rata-rata Jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengencer. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.
- 2) Jika cawan duplo dari pengenceran terendah terdapat jumlah koloninya lebih kecil dari 25, hitung jumlah koloni yang ada pada cawan dari setiap pengenceran, rerata jumlah koloni per cawan dan kalikan dengan faktor pengencerannya untuk menentukan nilai Total Plate Count (TPC). Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram (Tabel 1 nomor 3)
- 3) Jika hasil dari cawan duplo, cawan yang satu dengan 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan cawan yang lain lebih dari 250 koloni, hitung kedua cawan dalam penghitungan TPC (Tabel 1 nomor 7)
- 4) Jika hasil dari cawan duplo, cawan yang satu dengan koloni 25-250 dan cawan yang lain kurang dari 25 atau menghasilkan lebih dari 250 koloni, hitung keempat cawan dalam penghitungan TPC (tabel 1 nomor 8)
- 5) Jika kedua cawan dari satu pengenceran menghasilkan 25-250 koloni hitung keempat cawan termasuk cawan yang kurang dari 25 atau yang lebih dari 250 koloni dalam penghitungan TPC (tabel 1 nomor 9)
- 6) Jika jumlah koloni dari semua lebih dari 250 koloni :
 - i. Maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2,4, atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih, untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran.
 - ii. Jika 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni maka jumlah koloni yang didapat $8 \times 200 = 1600$, kemudian dikalikan dengan faktor pengencer dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari $1600 \times \text{faktor pengencer}$) (table 1 nomor 4)

- 7) Jika tidak koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan faktor pengencer terendah (<10) (Tabel 1 nomor 6)
- 8) Menghitung koloni merambat (spreader). Ada tiga macam perambat pada koloni, yaitu :
 - i.) Merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah,
 - ii.) Perambat yang terjadi di antara dasar cawan petri dan perbenihan, dan
 - iii.) Perambat yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan Maka cara menghitungnya adalah sebagai berikut:
 - i. Apabila cawan yang disiapkan untuk contoh lebih banyak yang ditumbuhi oleh spreader seperti pada butir pertama dan total area yang melebihi 25% dan 50% pertumbuhannya dilaporkan sebagai cawan spreader .
 - ii. Apabila terjadi hanya satu perambatan seperti rantai, maka koloni dianggap satu. Tetapi apabila satu atau lebih rantai yang terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.
 - iii. Rerata jumlah koloni dari setiap pengenceran, dilaporkan jumlahnya sebagai TPC (Tabel 1 nomor 5)
 - iv. Gabungkan perhitungan koloni dan perhitungan spreader untuk menghitung TPC
 - v. Apabila butir kedua dan ketiga yang terjadi, sebaiknya pemeriksaan diulang, karena koloni dalam keadaan sulit dihitung.

Tabel 1. Petunjuk penghitungan *Total Plate Count* (TPC)

No	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	TPC per ml atau gram	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	∞ ∞	175 208	16 17	190.000	Bila hanya satu pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung jumlah rerata dari pengenceran tersebut
2	∞ ∞	224 225	25 30	250.000	Bila ada dua pengenceran yang berada dalam batas yang sesuai, hitung dalam batas yang sesuai,

					hitung jumlah masing-masing dari pengenceran sebelum merata-rata jumlah yang sebenarnya
3	18 14	2 0	0 0	1.600*	Jumlah koloni kurang dari 25 koloni pada pengenceran terendah, hitung jumlahnya dan kalikan dengan factor pengencerannya dan beri tanda*
4	∞ ∞	∞ ∞	523 487	5.100.000*	Jumlah koloni lebih dari 250 koloni, hitung koloni yang dapat dihitung atau yang mewakili, beri tanda*
5	∞ ∞	245 230	35 presader	290.000	Bila ada dua pengenceran diantara jumlah koloni 25 sampai dengan 250, tetapi ada spreader, hitung jumlahnya dan kalikan dengan factor pengenceran, namun untuk spreader tidak dihitung
6	0 0	0 0	0 0	100*	Bila cawan tanpa koloni jumlah TPC adalah kurang dari 1 kali pengenceran terendah yang digunakan dan diberi tanda*
7	∞ ∞	245 278	23 20	260.000	Jumlah koloni 25 sampai 250 dan yang lain lebih dari 250, hitung kedua cawan petri, termasuk yang lebih dari 250, dan rerata jumlahnya
8	∞ ∞	225 225	21 40	270.000	Bila salah satu cawan dengan jumlah 25 koloni sampai dengan 250 koloni dari tiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk yang kurang dari 25 koloni, lalu rerata jumlahnya yang sebenarnya

9	∞	220	18	260.000	Bila hanya satu cawan yang menyimpang dari setiap pengenceran, hitung jumlah dari tiap pengenceran termasuk dari yang kurang dari 25 koloni atau lebih dari 250 koloni, kemudian rerata jumlahnya sebenarnya
	∞	240	48		
	∞	260	30		
	∞	230	28		

Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua (di mulai dari kiri), sedangkan angka ketiga diganti dengan 0, apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambah pada angka yang ke dua. Contoh: 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 (5.2×10^5), 85.700 dilaporkan sebagai 86.000 (8.6×10^4).

Lampiran 3. Prosedur Perhitungan AKK

Cara menghitung dan menyatakan hasil AKK sesuai dengan MA PPOMN nomor 96/mik/00. Cawan petri dipilih dari suatu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari 2 tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dinyatakan sebagai angka kapang/khamir dalam tiap ml atau gram contoh. Untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut.

- a. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- b. Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya,
- c. maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran 10-2 diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10-3 diperoleh 20 koloni, makadipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran 10-2 yaitu 20 koloni).
- d. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai angka kapang/khamir perkiraan
- e. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka angka kapang/khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.