

# **BUKU PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DASAR**

Oleh :

Mia Miranti

Ratu Safitri

Nia Rossiana

Asri Peni Wulandari

Keukeu Kaniawati

Febri Doni

Yolani Syaputri

Rena Erlianisyah Putri



**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PADJADJARAN  
2021**

# Kata Pengantar

Diktat praktikum Mikrobiologi Dasar ini dimaksudkan sebagai penuntun praktikum bagi mahasiswa biologi dalam melakukan praktikum mikrobiologi dasar. Tujuan utamanya adalah membantu praktikan dalam mempelajari teknik dan prosedur dasar laboratorium di bidang mikrobiologi.

Materi praktikum ini mencakup *biosafety* yang merupakan dasar untuk bekerja di laboratorium mikrobiologi, materi tentang pengenalan alat-alat dan media pertumbuhan mikroba yang biasa digunakan dalam kerja laboratorium mikrobiologi. Teknik pengamatan mikroba akan diberikan untuk mengamati bakteri, jamur, mikroalga, dan virus. Teknik identifikasi bakteri akan secara berurutan ditampilkan dalam modul paraktikum ini. Materi praktikum akan dilengkapi dengan percobaan terapan mikroba terutama untuk mikrobiologi lingkungan, industri, dan tanah.

Diktat praktikum dengan tampilan seperti buku ini merupakan cetakan ke-5, setelah dilakukan berbagai revisi dari diktat sebelumnya. Kami mengucapkan terima kasih kepada editor (Aufa Aulia Kanza) yang telah membantu dalam penyempurnaan diktat praktikum ini. Untuk peningkatan kualitas diktat praktikum ini, kami mengharapkan koreksi dan kritikan untuk dapat lebih dapat disempurnakan pada tahun mendatang.

Jatinangor, Januari 2021

Tim Penyusun

## DAFTAR ISI

Kata Pengantar.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
TEKNIK ENUMERASI KOLONI SEL BAKTERI.....	4
TEKNIK PEWARNAAN (UNTUK IDENTIFIKASI STRUKTUR SEL) .....	19
TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI (GRAM NEGATIF): UJI BIOKIMIAWI.....	26
UJI RESISTENSI MIKROBA TERHADAP ANTIBIOTIK DAN ZAT METABOLIT ANTIMIKROORGANISME DARI TANAMAN RIMPANG .....	37

# TEKNIK ENUMERASI KOLONI SEL BAKTERI

---

## 1. Tujuan

- Mahasiswa dapat mengetahui metoda-metoda perhitungan koloni sel mikroba.
- Mahasiswa dapat melakukan metoda Plate count dan teknik pengenceran sampel.
- Mahasiswa dapat mahir menghitung jumlah koloni sel bakteri dengan metoda *Plate Count*
- Mahasiswa dapat mengetahui cara menghitung pengukuran sel mikroorganisme dari hasil belajar mandiri.

## 2. Menentukan Jumlah Mikroorganisme (Enumerasi)

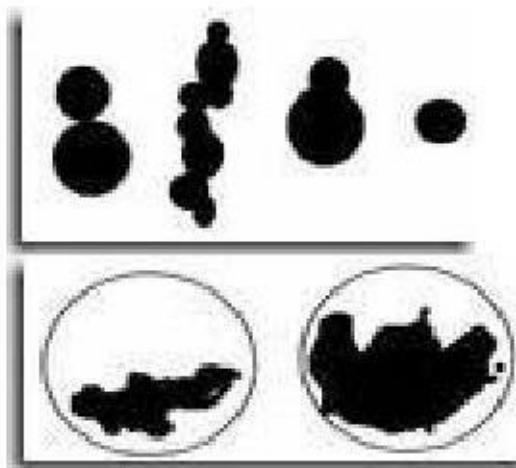
### 2.1. Penghitungan Jumlah Bakteri Hidup (Tidak Langsung)

#### ○ *Plate Count* (Hitungan Cawan)

*Plate count/viable count* didasarkan pada asumsi bahwa setiap sel mikroorganisme hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan lingkungan yang sesuai. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan merupakan perkiraan atau dugaan dari jumlah mikroorganisme dalam suspensi tersebut.

Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung membentuk kelompok atau berantai. Berdasarkan hal tersebut digunakan istilah *Collony Forming Units* (CFU's) per ml. Koloni yang tumbuh berasal dari suspensi yang diperoleh menggunakan pengenceran bertingkat dari sebuah sampel yang ingin diketahui jumlahnya. Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung adalah sebagai berikut:

- Satu koloni dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni.
- Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni.
- Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah luas cawan) tidak dihitung.
- Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni.



Gambar 7.1 Pertumbuhan koloni pada media padat

Cara menghitung sel relatif / CFU's per ml berdasarkan formula di bawah ini:

**CFU's/ml = Jumlah Koloni x Faktor Pengenceran**

Beberapa kasus perhitungan koloni dalam cawan petri:

**Contoh (1):**

Diketahui dari hasil penanaman dengan metode *Spread Plate* dan *Pour Plate* dari tabung pengenceran  $10^{-6}$  dengan volume sampel 0,1 ml.

**HASIL:**

Koloni yang tumbuh pada cawan petri : 50 koloni

Faktor pengenceran :  $1/10^{-6} = 10^6$

Jadi koloni yang sebenarnya dalam volume 0,1 ml adalah:  $10^6 \times 50 \text{ koloni} = 5 \times 10^7 \text{ CFU}/0,1 \text{ ml}$

Jadi, dalam 1 ml sampel, diketahui mengandung  $5 \times 10^6 \times 1/0,1 \text{ ml} = 5 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$

Koloni yang dipilih untuk dihitung menggunakan memiliki syarat khusus berdasarkan statistik untuk memperkecil kesalahan dalam perhitungan. Perhitungan mengacu kepada standar atau peraturan yang telah ditentukan. Syarat-syaratnya sebagai berikut :

- Pilih cawan yang ditumbuhi koloni dengan jumlah 30-300
- Koloni > 300 = TNTC (*Too Numerous To Count*) atau TBUD (Terlalu Banyak Untuk Dihitung)
- Koloni < 30 = TFTC (*Too Few To Count*) atau TSUD (Terlalu Sedikit Untuk Dihitung)

**Contoh (2).** Dari hasil pengamatan dan perhitungan koloni dalam cawan petri :

10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	SPC	Keterangan
234	20	5	$2,3 \times 10^4$	20 dan 5 kurang dari 30
650	127	10	$1,3 \times 10^5$	650 lebih dari 300
TNTC	TNTC	195	$2 \times 10^6$	TNTC lebih dari 300

**PERHATIKAN:**

Jumlah koloni yang dilaporkan terdiri dari 2 digit yaitu angka satuan dan angka sepersepuluh yang dikalikan dengan kelipatan 10 (eksponensial), misal  $2,3 \times 10^4$ , bukan  $2,34 \times 10^4$ . Pembulatan ke atas dilakukan pada angka seperseratus yang sama atau lebih besar dari lima, misal  $2,35 \times 10^4$  menjadi  $2,4 \times 10^4$ , atau  $2,34 \times 10^4$  menjadi  $2,3 \times 10^4$ .

**Contoh (3).** Dari semua cawan petri, koloni yang tumbuh <30 koloni seperti contoh data berikut:

10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	SPC	Keterangan
15	1	0	$1,5 \times 10^3$	semua kurang dari 30

**PERHATIKAN:**

Jumlah koloni yang dilaporkan hanya dari pengenceran terendah.

**Contoh (4).** Bila diperoleh perhitungan >300 dari semua pengenceran, maka hanya dari pengenceran tertinggi yang dilaporkan. Misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada  $\frac{1}{4}$  bagian (transek) cawan kemudian hasilnya dikalikan empat. Hasil tersebut dilaporkan sebagai

5

lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya faktor pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	SPC	Keterangan
TNTC	TNTC	358	$>3,0 \times 10^6$ ( $>3,0 \times 10^6$ )	Pengenceran tertinggi ( $10^{-4}$ )
TNTC	325	18	$>3,0 \times 10^5$ ( $>3,0 \times 10^5$ )	Pengenceran tertinggi ( $10^{-4}$ )

**Contoh (5).** Bila ada 2 cawan, masing-masing dari pengenceran rendah dan tinggi yang berurutan dengan jumlah koloni 30-300.

10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	SPC	Keterangan
295	40	5	$3,5 \times 10^4$	$40.00/29.500 < 2$
140	35	1	$1,4 \times 10^4$	$35.000/14.000 > 2$

**PERHATIKAN:**

Lakukan hasil bagi dari jumlah koloni pengenceran tertinggi dan terendah 2, maka jumlah yang dilaporkan adalah nilai rata-rata. Jika hasil bagi dari pengenceran tertinggi dan terendah  $> 2$  maka jumlah yang dilaporkan adalah dari cawan dengan pengenceran terendah.

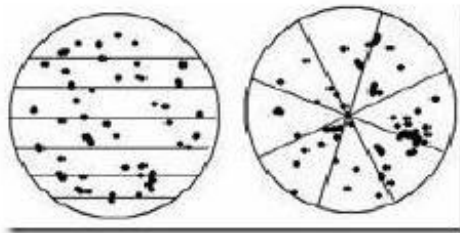
**Contoh (6).** Apabila setiap pengenceran digunakan dua cawan petri (duplo),

10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	SPC	Keterangan
175 208	15 20	5 2	$(17.500+20.800)/2$ $= 1,9 \times 10^4$	15 dan 20 kurang dari 30
135 165	45 45	5 8	$= 1,5 \times 10^4$	$(135+165)/2 = 150$ $(45+45)/2 = 45$ maka $45.000/15.000 = 3, > 2$ dilap. pengenceran terendah
275 285	35 40	5 7	$(28.500+37.500)/2$ $= 65.600$ $= 6,6 \times 10^4$	$(275+285)/2 = 280$ $(35+40)/2 = 37,5$ maka $37.500/28.000 = 1,34, < 2$ dilap. hasil rata-rata
290 305	25 28	5 0	$(29.000+30.000)/2$ $= 29.750$ $= 3 \times 10^4$	Rata-rata dari $10^{-2}$ meskipun $305 > 300$

**PERHATIKAN:**

Jumlah angka yang digunakan adalah data dari kedua cawan, tidak boleh diambil salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat di antara 30-300. Data yang dilaporkan adalah rata-rata dari kedua cawan duplo tersebut.

Penghitungan koloni pada cawan sebaiknya dibuat transek atau dibagi-bagi jika koloni yang tumbuh terlalu banyak. Transek dibuat dengan spidol/marker di bagian bawah cawan petri. Pola transek dapat dibuat bervariasi, tergantung kebutuhan. Penghitungan akan lebih mudah bila memakai *Colony Counter*.



**Gambar 7.2** Metoda transek untuk memudahkan penghitungan koloni

## PRAKTIKUM

**Alat dan Bahan:**

- 6 tabung reaksi steril berisi NaCl fisiologis steril masing-masing 9 ml
- Suspensi bakteri dari sampel (air, tanah, atau makanan)
- Pipet ukur steril dan *bulb pipet*
- Cawan petri steril
- Bunsen
- Agar nutrisi steril
- Inkubator

Teknik perhitungan terhadap jumlah koloni bakteri dilakukan dengan menggunakan lempeng pembiakan (*Plate count*).

**Cara kerja :**

1. Buat suspensi, kemudian lakukan pengenceran. Tinggi rendahnya pengenceran bahan biakan ini bergantung pada banyaknya bakteri dalam bahan pemeriksaan. Tahapannya adalah sebagai berikut :
  - Sediakan beberapa tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis steril sebanyak 9 ml.



- Bahan yang akan diperiksa dikocok hingga homogen, lalu diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis steril.
- Kemudian larutan tersebut dihomogenkan dengan cara menyedot dan mengeluarkannya dengan pipet. Pengenceran tersebut adalah  $10^{-1}$ .
- Diambil 1 ml dari pengenceran tadi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua yang juga berisi NaCl fisiologis steril. Pengenceran tersebut adalah  $10^{-2}$ . Lakukan proses tadi hingga didapat pengenceran yang diinginkan.

2. Tiga pengenceran terakhir kemudian dipilih, misalnya  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$ . Masing-masing kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
3. Ke dalam cawan petri kemudian dituangkan agar nutrisi cair sebanyak 20 ml (pada suhu kurang lebih  $40^{\circ}\text{C}$ ) dan medium dicampurkan hingga homogen dengan cara memutar cawan petri secara hati-hati di atas meja. Sesudah agar beku, cawan petri kemudian dibalik agar air kondensasi tidak jatuh ke atas agar (permukaan agar harus kering).
4. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Kemudian koloni yang tumbuh pada media dihitung.

**Contoh Hasil Pengamatan :**

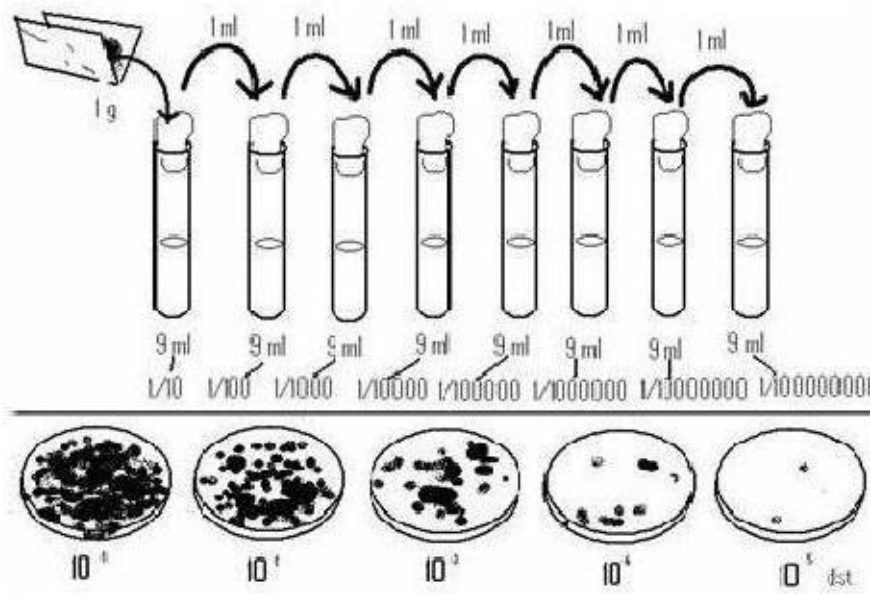
Misalnya pada pengenceran  $10^{-3}$  terdapat 280 koloni, kemudian pada pengenceran  $10^{-4}$  terdapat

96 koloni, dan pada pengenceran  $10^{-5}$  terdapat 32 koloni, maka perhitungannya adalah sebagai

berikut:

Determinasi Jumlah bakteri/ml bahan yang diperiksa:

$$= (280 \times 10^3) + (96 \times 10^4) + (32 \times 10^5) : 3$$



**Gambar 7.5** Cara pengenceran pada metoda *Plate count*

## DISKUSI

1. Tulis hasil yang saudara peroleh!
2. Mengapa untuk penentuan jumlah bakteri diambil dari tiga pengenceran terakhir yang kita perkirakan?
3. Mengapa penambahan agar pada cairan yang akan ditentukan jumlah bakterinya dilakukan pada suhu agar 40°C?
4. Dapatkan informasinya dari referensi lain (buku/internet) tentang metoda untuk menentukan ukuran sel mikroba!

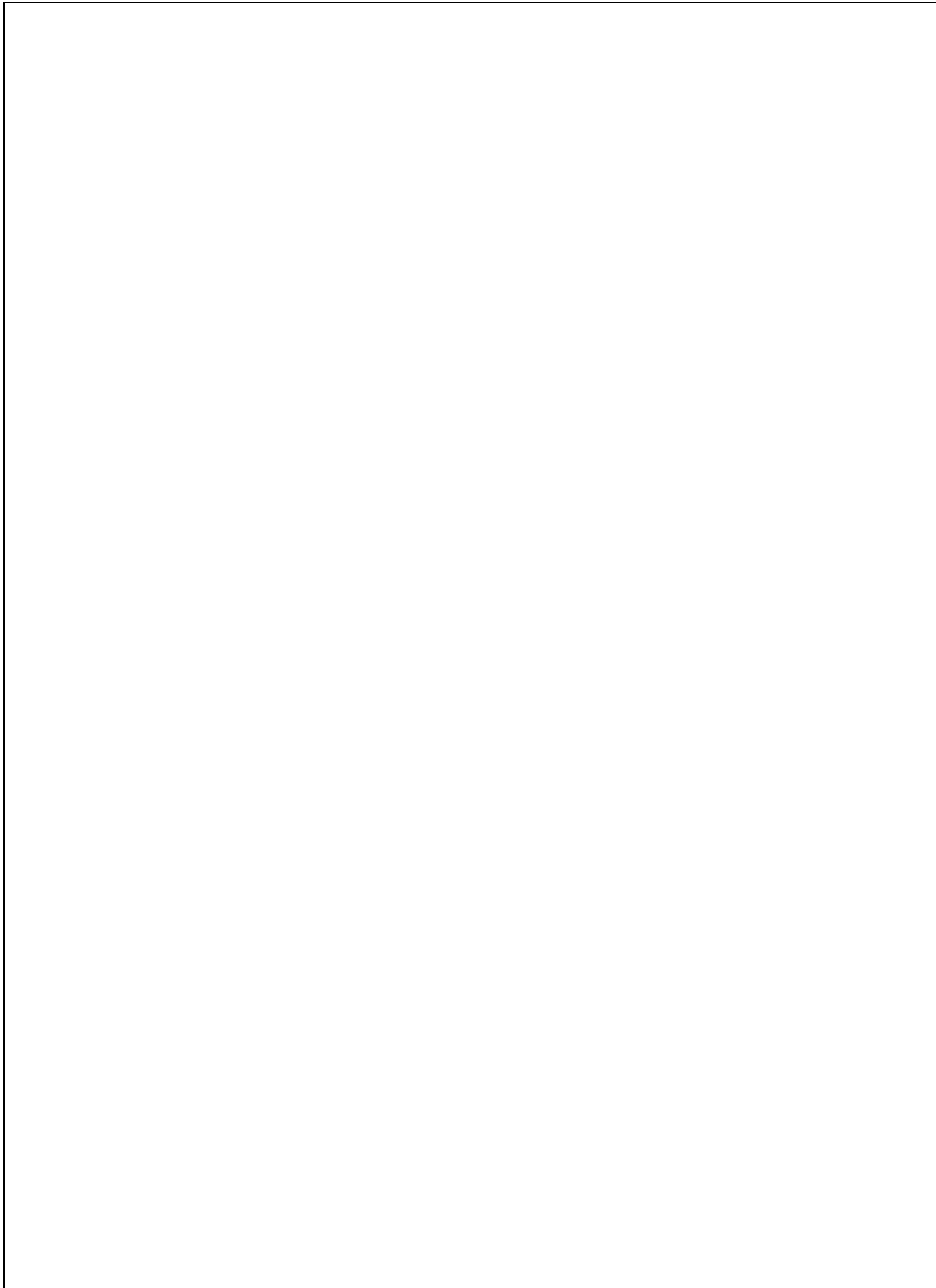
### DAFTAR PUSTAKA

- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 1983. *Microbiology: a Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Company.
- Standard Method for the Examination of water and Wastewater, 14th ed. American Public health Association, American Water Works association. Water pollution control Federation, Washington, DC. 1975.
- Harley and Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.

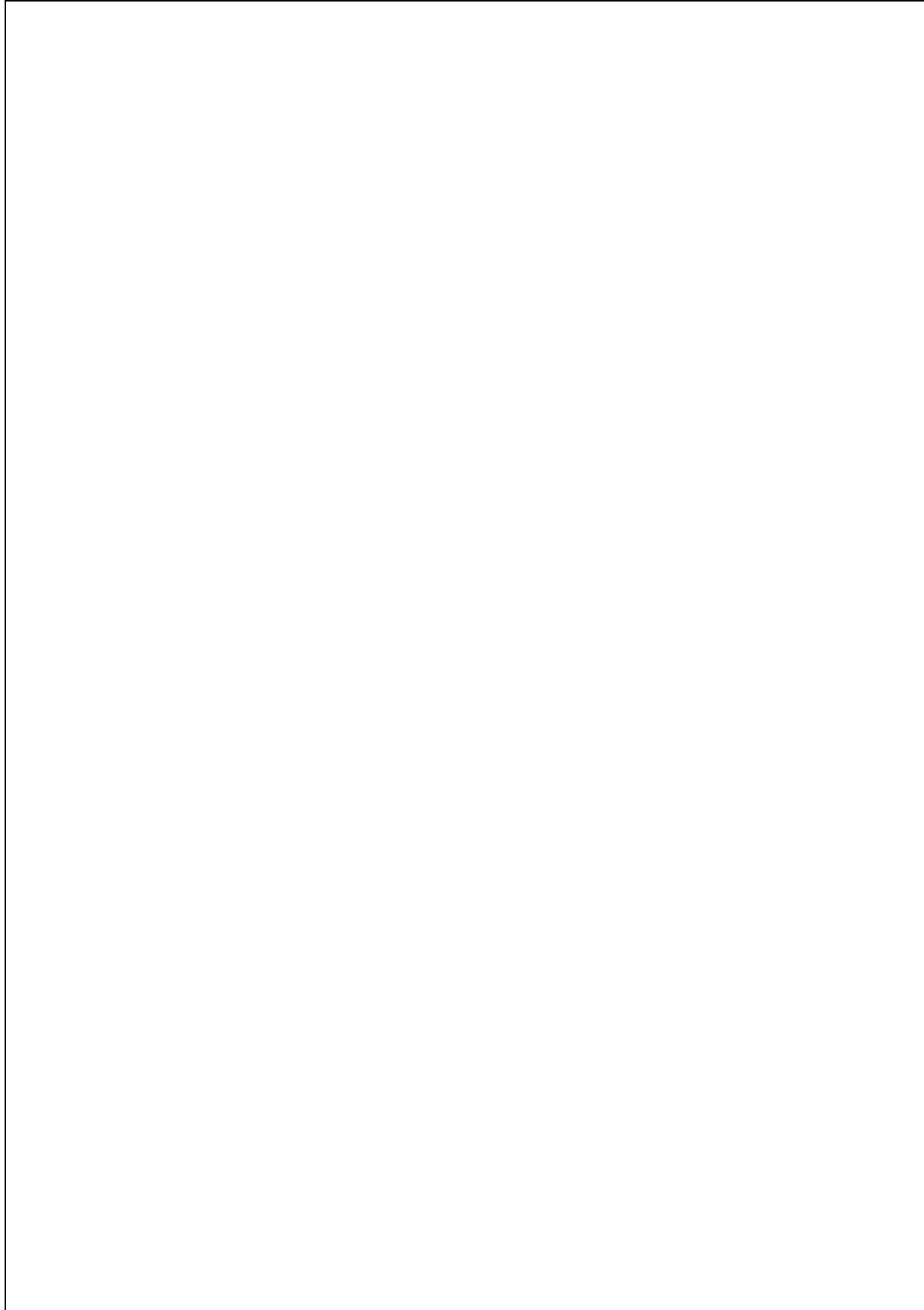


--	--	--	--

## Hasil dan Pembahasan

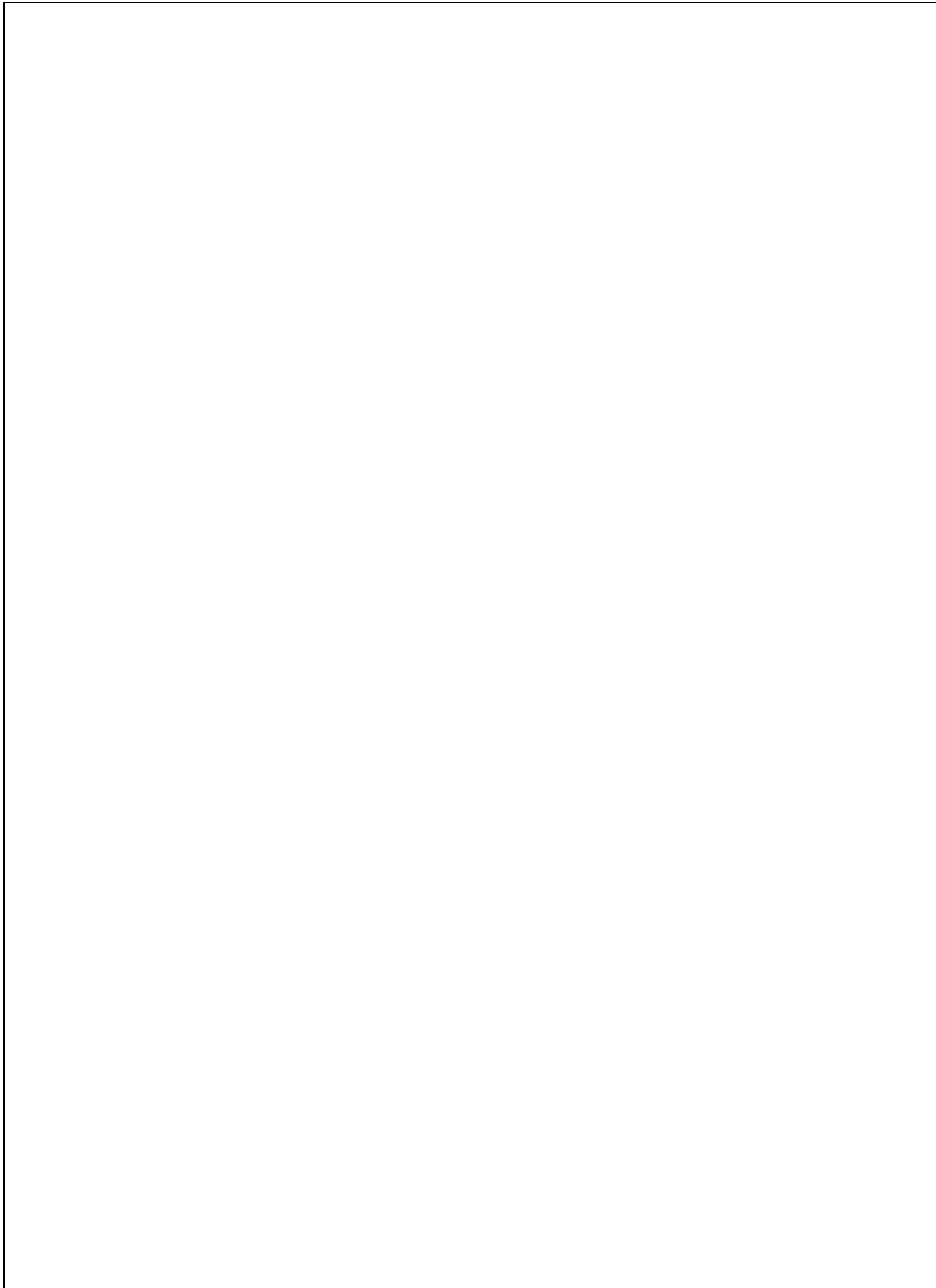




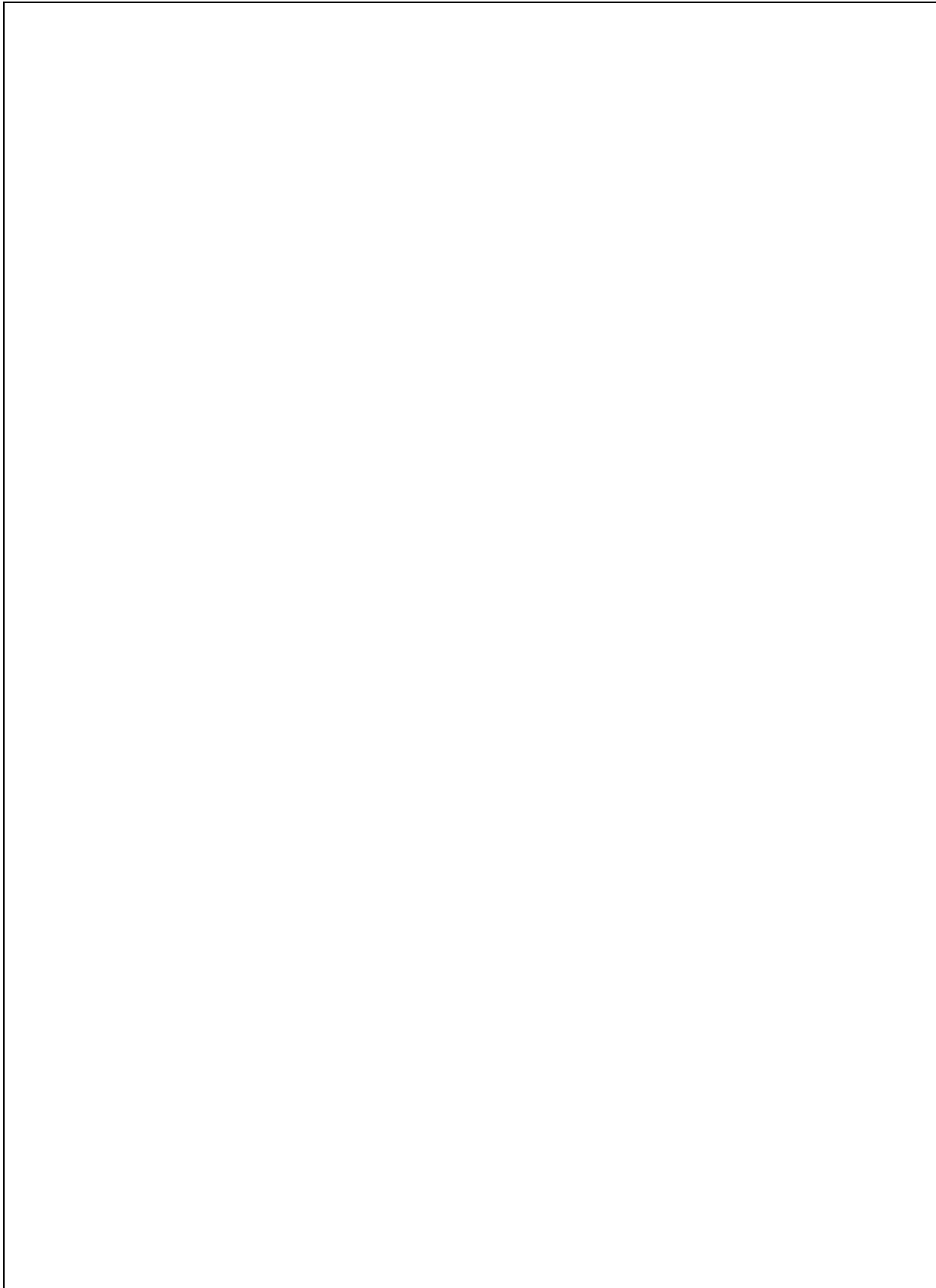




## Kesimpulan



## Tugas Praktikum



# TEKNIK PEWARNAAN (UNTUK IDENTIFIKASI STRUKTUR SEL)

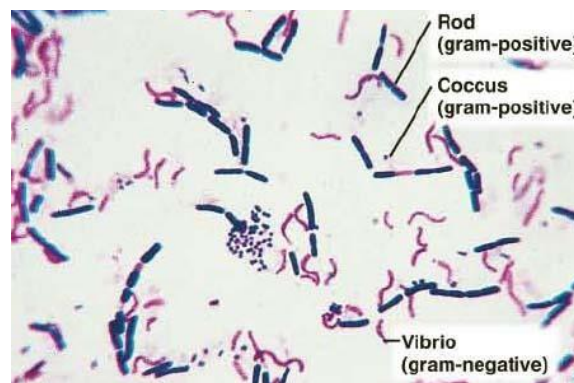
## 1. Tujuan

- Mahasiswa mampu mempelajari bentuk struktur (morfologi) bakteri dengan jelas dengan aplikasi teknik pewarnaan sel dan mikroskop.
- Mahasiswa mampu mengetahui sifat-sifat bakteri terhadap suatu jenis pewarnaan.
- Mahasiswa dapat mempunyai kemampuan untuk mengidentifikasi bakteri teknik pewarnaan.

## 2. Pendahuluan

### ○ Pewarnaan Gram

Perbedaan dua kelompok bakteri ini didasarkan pada kemampuan sel menahan (mengikat) warna ungu dari kristal violet selama proses dekolorisasi oleh alkohol (Gambar 9). Bakteri gram positif tidak mengalami dekolorisasi karena tetap mengikat warna ungu kristal violet dan pada tahap akhir pengecatan tidak terwarnai safranin. Bakteri gram negatif mengalami dekolorisasi oleh alkohol dan pada tahap akhir pengecatan terwarnai menjadi merah oleh safranin.



Gambar 9. Sel bakteri berdasarkan pewarnaan gram

Bakteri gram negatif memiliki 3 lapisan dinding sel. Lapisan terluar yaitu lipoposakarida (lipid) kemungkinan tercuci oleh alkohol, sehingga pada saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah. Bakteri gram positif memiliki selapis dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah pewarnaan dengan kristal violet, pori-pori dinding sel menyempit akibat dekolorisasi oleh alkohol sehingga dinding sel tetap menahan warna biru. Sel bakteri gram positif mungkin akan tampak merah jika waktu dekolorisasi terlalu lama. Sedangkan bakteri gram negatif akan tampak ungu bila waktu dekolorisasi terlalu pendek.

## PRAKTIKUM

### Alat dan Bahan:

- Biakan bakteri
- Untuk Pewarnaan sederhana: metilen blue, karbol violet, atau air fucshin
- Untuk Pewarnaan Gram : larutan kristal violet dan larutan iodin
- Larutan alkohol (etil alkohol 95%)
- Kaca objek dan kaca penutup
- Mikroskop
- Jarum ose
- Bunsen (lampu spiritus)
- Aquadest

#### Tahap Kerja Pewarnaan:

1. Kaca objek dibersihkan dengan alkohol sampai bersih dan bebas dari lemak.
2. Kemudian panaskan di atas lampu spiritus. Bahan preparat yang berbentuk padatan dibuat suspsi dengan penambahan NaCl fisiologis.
3. Pijarkan ose lalu dinginkan. Celupkan ose ke dalam suspensi bakteri dan goreskan pada kaca objek. Jika bakteri yang akan diperiksa terdapat pada medium padat (media agar), maka teteskan NaCl Fisiologis terlebih dahulu pada kaca preparat kemudian goreskan bakteri tersebut dengan ose.
4. Preparat dikeringkan pada suhu udara atau dekat hawa hangat api, kemudian setelah kering difiksasi diatas nyala api sebanyak 3 kali.
5. Preparat didinginkan, lalu setelah dingin ditetesi salah satu larutan zat warna di atasnya dan diamkan selama satu atau dua menit, bergantung dari zat warnanya.
6. Preparat dibuat dan dikeringkan.
7. Kemudian tetesi preparat tersebut dengan zat warna Karbol Gentian Violet. Diamkan selama 30 detik. Zat warna yang berlebih dicuci dan dibuang dengan air.
8. Tambahkan Lugol (Iodium : Kalium Iodium : Aquades = 1 : 2 : 300) sebagai zat pemantek, selama 30 detik. Kemudian cuci dengan air.
9. Preparat dicuci dengan alkohol 96% selama 2 detik sampai zat warna larut, kemudian dicuci dengan air.
10. Tetesi preparat dengan zat warna pembanding Air Fucshin selama 30 detik, lalu cuci dengan air.
11. Preparat dikeringkan dan diatasnya diberi satu tetes minyak imersi untuk menghindarkan perbedaan indek bias.

#### Hasil Pewarnaan:

Bakteri gram positif berwarna ungu dan  
Bakteri gram negatif berwarna merah

#### Catatan Tambahan:

Kandungan Mg ribonukleat	Ada	Tidak ada
Sensitifitas terhadap zat warna trifenilmetan	Sangat sensitif	Kurang sensitif

Sensitifitas terhadap antibiotik	Sensitif penisilin	Sensitif streptomisin
Ketahanan kebasaan	Tahan basa, tidak larut dalam KOH1%	Sensitif basa, larut dalam KOH1%
Kisaran isoelektrik	pH 2,5 - 4	pH 4,5 - 5,5
Bentuk sel	Biasanya bentuk kokus, batang berspora, kecuali: <i>Lactobacillus</i> dan <i>Cyanobacterium</i>	Biasanya berbentuk batang non spora kecuali <i>Neisser</i>
Ketahan keasaman	Tahan asam	Sensitif asam
Contoh	<i>Staphylococcus albus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella thypii</i> <i>Escherichia coli</i>

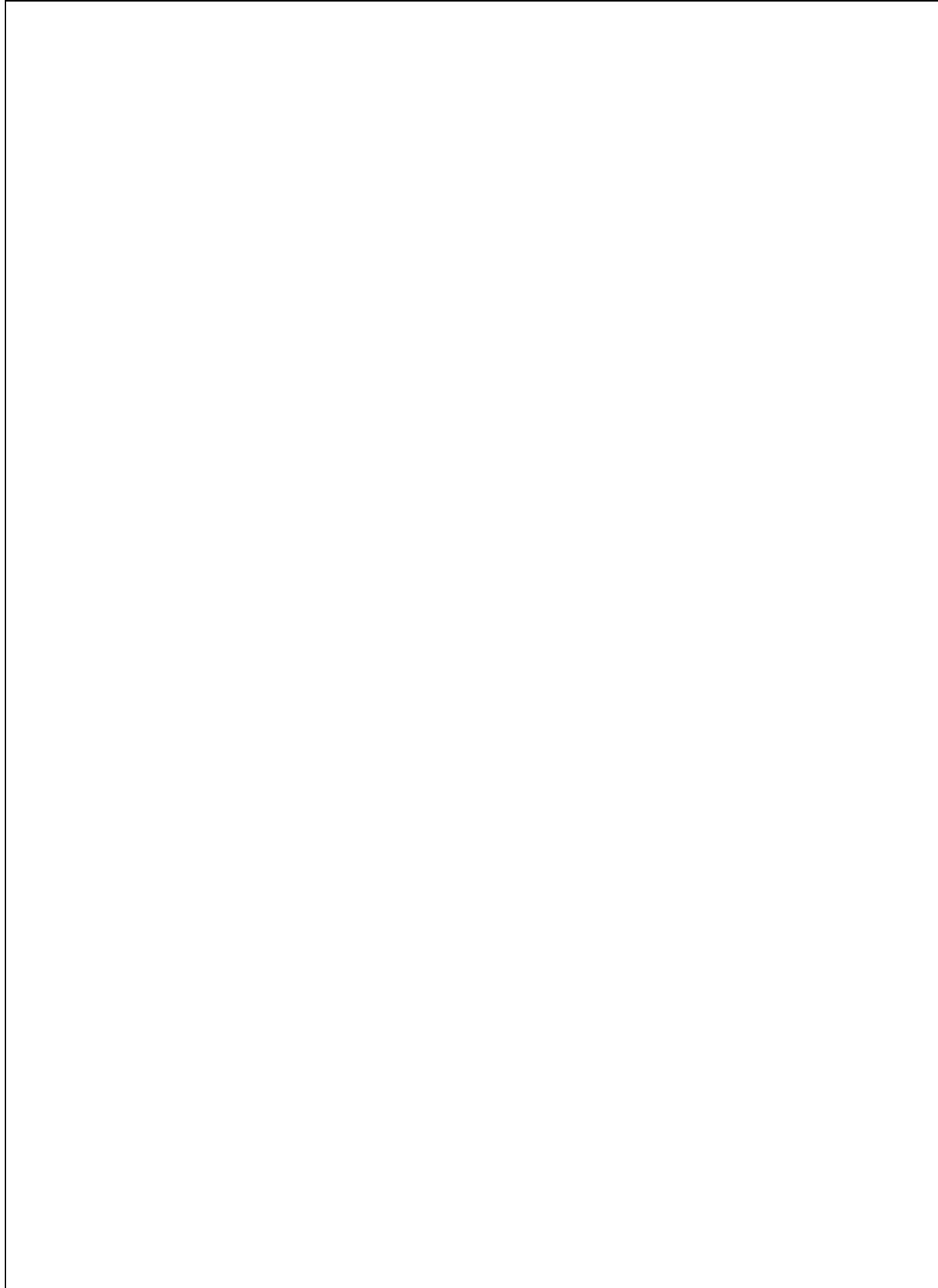
## DISKUSI

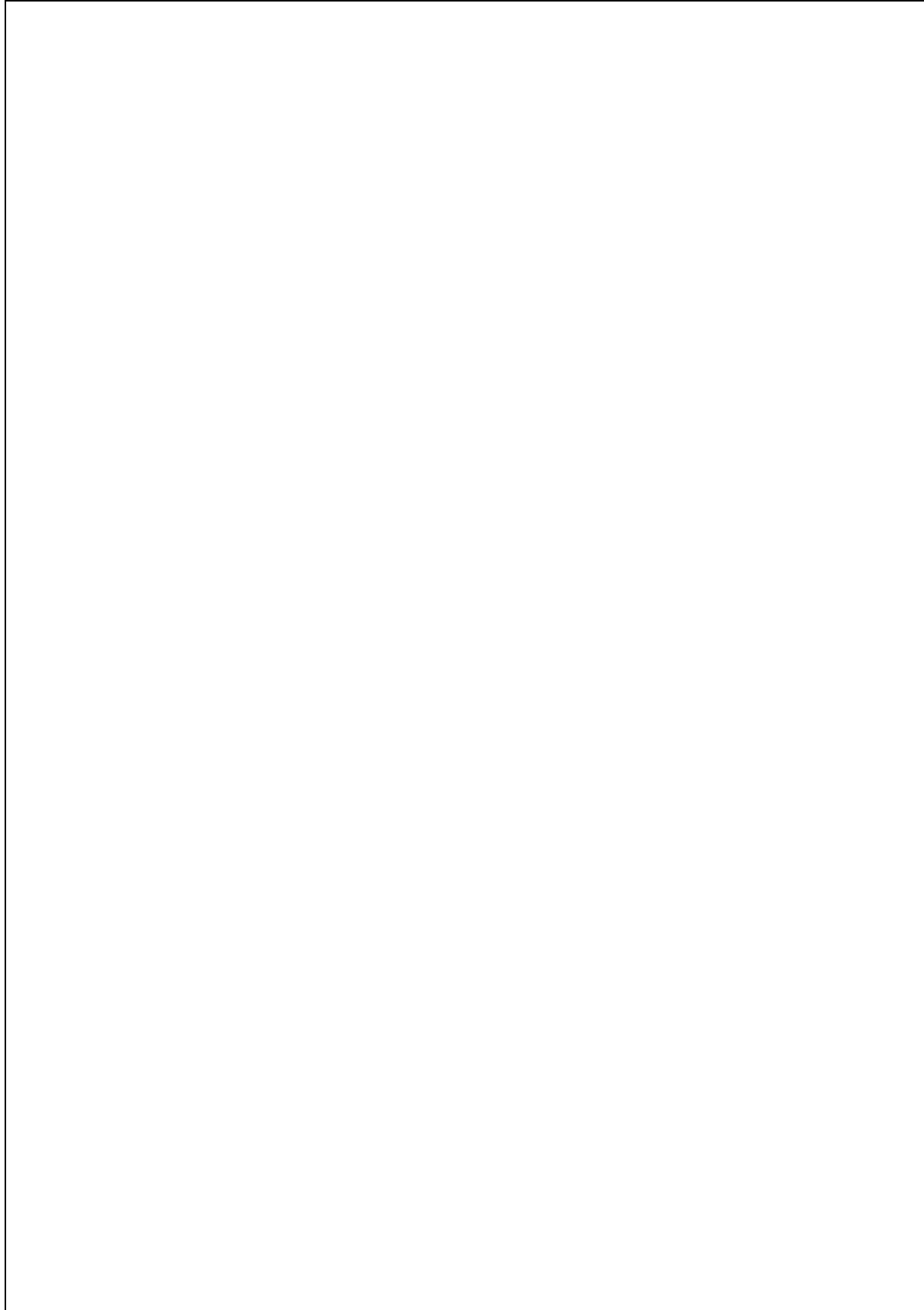
1. Apa keuntungan pewarnaan diferensial dibandingkan pewarnaan tunggal?
2. Bagaimana hasil pengamatan dari bakteri setelah dilakukan pewarnaan Gram?
3. Mengapa sel bakteri ada yang berwarna biru/ungu dan merah pada pewarnaan Gram?
4. Apakah sel yang berwarna merah selalu bakteri gram negatif pada pewarnaan Gram?
5. Apa kegunaan asam alkohol dalam pewarnaan Ziehl Neelsen?
6. Pewarnaan ZN dapat digunakan untuk pemeriksaan penyakit apa saja?

### DAFTAR PUSTAKA

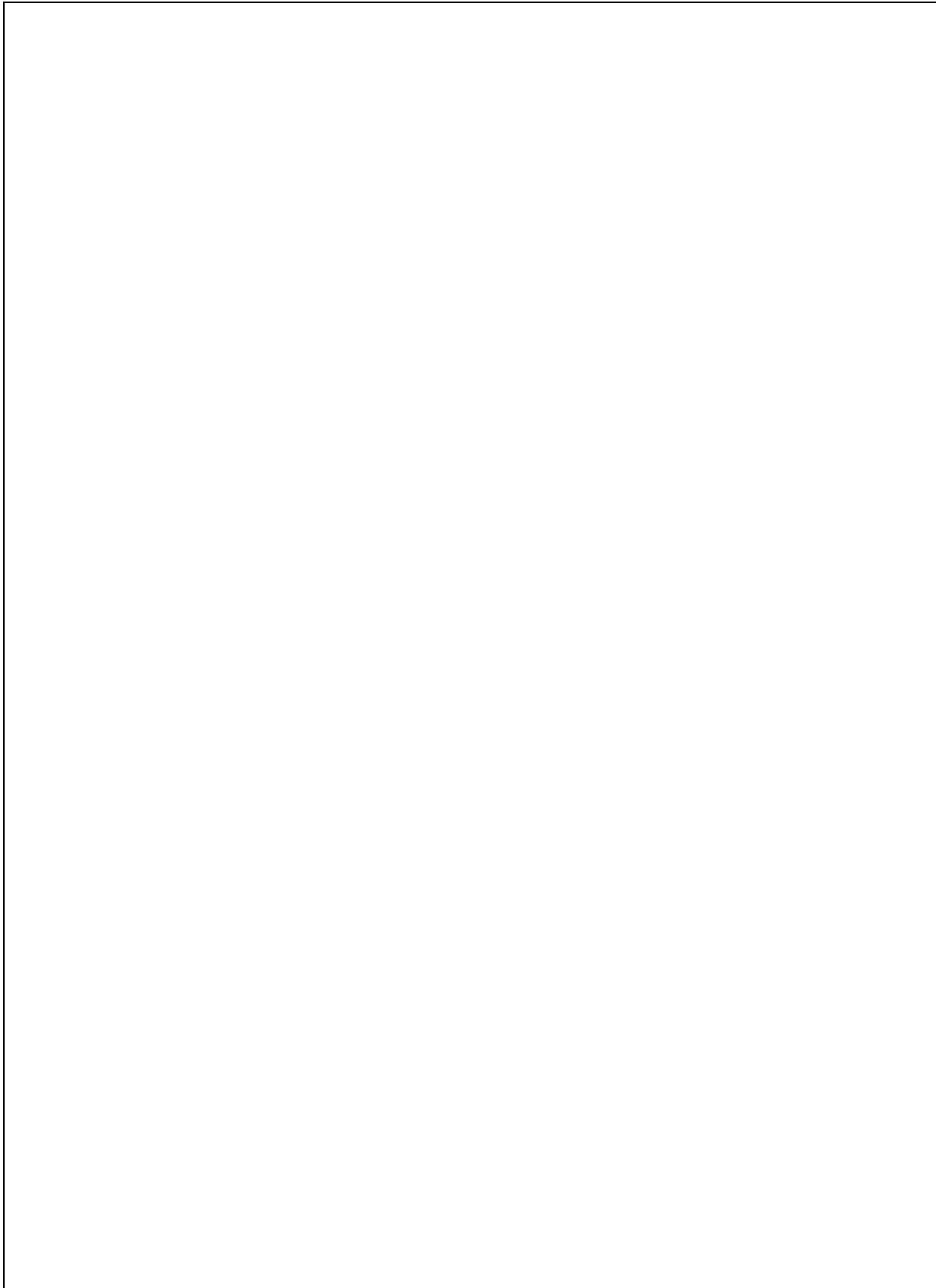
- Dwidjoseputro, D. 1989. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Malang : Djambatan.
- Filzahazny. 2008. *Pengantar Tentang Bakteri*. <http://wordpress.com/Pengantar-tentangbakteri.htm>. Diakses pada tanggal 08 maret 2009, Makassar.
- Hadiotomo, Ratna Siri. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Jakarta : PT Gramedia.
- Rizki. 2008. <http://ngecat-bakterimakul-rizki.blogspot.com/2008/02/materi-kuliah.html>. Diakses pada tanggal 04 April 2009, Makassar.
- Volk, Wesley A dan Margareth F. Wheeler. 1998. *Mikrobiologi Dasar Jilid I*. Jakarta : Erlangga.
- Yulneriwanti. 2008. *Bakteri*. <http://01-bakteri.html>. Diakses pada tanggal 08 Maret 2009. Makasar.

### Hasil dan Pembahasan





## Kesimpulan





## Tugas Praktikum

# TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI (GRAM NEGATIF): UJI BIODIAGNOSTIK

---

## 1. Tujuan

- Mahasiswa mengetahui prinsip penyiapan dan pengerjaan uji biokimiawi untuk identifikasi bakteri.
- Mahasiswa dapat mengidentifikasi bakteri Gram negatif dari hasil uji biokimiawi.
- Mahasiswa dapat mengerti mekanisme perubahan reaksi yang terjadi pada uji biokimiawi tersebut.

## 2. Prinsip Identifikasi Mikroba Hasil Pewarnaan Bakteri Gram Negatif

### 2.1. Uji Biokimiawi

#### 2.1.1. Uji Gula sebagai Substrat Sumber-C untuk Metabolisme Mikroba

Maksud dari penanaman ini adalah untuk mempelajari reaksi-reaksi biokimia dari bakteri-bakteri yang kita identifikasi. Akan ditambahkan jenis gula yang berbeda pada setiap tabung reaksi yang berbeda. Jenis gula yang banyak digunakan adalah: Glukosa, Laktosa, Mannit, Maltosa, dan Sakarosa.

Maksud penanaman ke dalam media gula-gula adalah untuk mengetahui apakah jenis bakteri dapat menguraikan suatu jenis gula atau tidak. Bila dapat maka akan terbentuk asam dan adakalanya disertai dengan pembentukan gas. Bila terjadi penguraian tanpa adanya indikator hal tersebut tidak dapat terdeteksi. Oleh karena itu dipakai suatu indikator misalnya warna merah fenol, lakmus dan lain sebagainya. Perubahan pH karena terbentuknya asam dapat terlihat dengan adanya perubahan warna pada indikator. Untuk mengetahui adanya pembentukan gas digunakan tabung Durham, yaitu tabung kecil yang dimasukkan terbalik. Bila terjadi pembentukan gas, maka gas akan ditampung di dalam tabung tersebut dan mendesak keluar cairan yang ada di dalamnya.

#### TES REAKSI:

Indikator yang digunakan adalah merah fenol, untuk mengetahui apakah terjadi pembentukan asam atau tidak sebagai hasil penguraian gula pada medium. Sebelum diinokulasi, medium berwarna merah dan bila telah terbentuk asam akan berubah berwarna kuning. Selain itu, digunakan Tabung Durham untuk mengetahui ada tidaknya pembentukan gas sebagai hasil penguraian gula dalam medium. Tabung Durham ini diletakkan terbalik di dalam tabung gula, sehingga gas yang terbentuk akan tertampung di dalam tabung tersebut.

Sifat penguraian terhadap gula dari setiap mikroba adalah berlainan, dengan demikian hasil penguraian (reaksi) ini dapat dipakai untuk determinasi suatu bakteri sehingga dapat ditemukan spesiesnya.

#### 2.1.2. Uji Biokimiawi dengan Metoda IMViC

IMViC adalah singkatan dari Indol, Methyl Red, Voges Proskauer dan Citrat. Maksud penanaman ke dalam media ini adalah juga untuk melihat dan mempelajari reaksi biokimia dari bakteri.

#### a. Tes Indol

Indol adalah suatu metabolit yang dibentuk oleh bakteri dengan menggunakan tryptophan yang ada dalam pepton. Untuk mengetahui pembentukan indol maka dalam air pepton yang telah ditanami ditambahkan *Reagen Kovac's* atau *Reagen Erlich*.

#### TES REAKSI:

Ke dalam medium air pepton (untuk melihat reaksi indol), ditambahkan ½ ml reagen, dibiarkan selama 5 menit. Bila tidak terjadi perubahan warna, ditulis sebagai reaksi indol negatif (-). Bila terjadi warna merah atau kecoklatan ditulis indol positif (+).

#### b. Tes Methyl-Red

Tes methyl red ini adalah untuk mengetahui adanya pembentukan asam dengan pH di bawah 4. Methyl red adalah suatu indikator yang akan menunjukkan warna merah bila pH ada di bawah 4. Tes ini digunakan untuk pemeriksaan bakteri *Coli*. Bakteri *Coli* sangat penting pada pemeriksaan air minum dan harus dapat dibedakan terdapat *Aerobacter aerogenes* (Aa). Jadi tes ini adalah untuk DD (*Differential Diagnose*) antara bakteri *Coli* dengan bakteri *Aerobacter aerogenes* (Aa). *Aerobacter aerogenes* adalah suatu bakteri yang mempunyai beberapa kesamaan sifat dengan bakteri *Coli*. Hal ini yang membedakan antara lain pada tes methyl red. Hasil tes methyl red pada bakteri *Coli* positif (+) dan pada *Aerobacter aerogenes* negatif (-). *Differential Diagnosa* antara bakteri *Coli* dengan bakteri *Aerobacter aerogenes* dengan uji IMViC menunjukkan hasil sebagai berikut:

Bakteri	I (Indol)	M (Methyl Red)	VP (Voges-Proskauer)	C (citrat)
<i>Coli</i>	+	+	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	-	-	+	+

#### TES REAKSI:

Ke dalam medium methyl red ditambahkan 1-2 tetes reagen MR (0,4% dalam alkohol 96%). Bila terjadi warna merah disebut MR positif (+), sedangkan bila berwarna kuning disebut MR negatif (-).

#### c. Tes Voges Proskauer

Pada reaksi akan diselidiki apakah bakteri dapat membentuk *Acethyl Methyl Carbinol* atau tidak. Untuk melihat reaksi yang positif (*Acethyl Methyl Carbinol* positif), maka ke dalam medium yang telah ditanami ditambahkan KOH kemudian dipanaskan sebentar. Dalam hal

ini akan terbentuk *diacethyl*. *Diacethyl* ini dengan sisa-sisa guanidin yang ada dalam pepton akan membentuk warna merah kecoklatan bila ditambah alfa naftol. Komposisi medium untuk tes MR dan VP adalah sama.

**TES REAKSI:**

**d. Tes Citrat**

Ke dalam medium *Voges Proskauer* ditambah ½ ml KOH 40% dan 5 tetes Alfa Naftol (5% ke dalam

Dengan menggunakan medium citrat menurut Simmon. Medium ini merupakan medium alkohol 96%) kemudian dipanaskan sebentar. Bila terjadi warna merah kecoklatan yang berupa padat yang terdiri dari Mono amonium fosfat, Na Citrat, NaCl, air, agar-agar, dan indikator cincin di permukaan tabung, yang akhirnya warna merah tersebut menjalar ke bawah ditulis *Bromthymol blue*. Medium ini juga digunakan untuk *Differential Diagnose* (DD), antara bakteri sebagai VP positif (+), dan bila tidak terjadi perubahan apa-apa ditulis VP negatif (-). *Coli* dan *Aerobacter aerogenes*. *Aerobacter aerogenes* dapat hidup dengan citrat sebagai

sumber C. Maka mono-amonium fosfat akan digunakan sampai terurai, dari penguraian ini diantaranya adalah dihasilkan NH<sub>3</sub>. NH<sub>3</sub> ini akan mengakibatkan suasana alkalis dan timbul warna biru tua terang karena adanya indikator *bromthymol blue* tadi.

**TES REAKSI:**

Ke dalam medium citrat tidak ditambahkan reagen, sebab ke dalam medium ini telah terdapat indikator *bromthymol blue*. Bila perubahan warna yang terjadi menjadi biru tua cerah, ditulis positif (+). Bila tidak terjadi perubahan warna, dan warna medium tetap hijau kebiruan ditulis citrat negatif (-).

**Catatan :**

Media sebelum ditanami harus berwarna jernih dan medium citrat harus berwarna kehijauan dan tidak terdapat adanya koloni. Media jangan sampai tertukar satu sama lain misalnya media untuk melihat indol jangan tertukar dengan media untuk melihat reaksi methyl red.

**Tabel 9.1** Prinsip tes dan reaksi positif uji IMViC

Uji Biokimia	Prinsip Tes	Reaksi Positif
Indol (tryptophane sebagai sumber C)	Setelah inkubasi 24 jam, tambahkan 0,5 ml reagen selama 5 menit	Warna merah atau kecoklatan lapisan cincin pada permukaan medium
Methyl Red (gula sebagai sumber C)	Setelah inkubasi 24 jam, tambahkan 1 - 2 tetes reagen MR	Perubahan warna menjadi merah

VP (terbentuk asetolin)	Setelah inkubasi 24 jam, tambahkan 0,5 ml KOH 40% dan 5 tetes Alfa Naftol, panaskan	Warna merah kecoklatan berupa cincin di permukaan tabung
Simon Citrate (adanya enzim sitrat permiase)	Setelah inkubasi 24 jam, amati perubahan warna (medium sudah mengandung indikator <i>bromthymol blue</i> )	Warna hijau menjadi biru tua

### 2.1.3. Uji TSIA

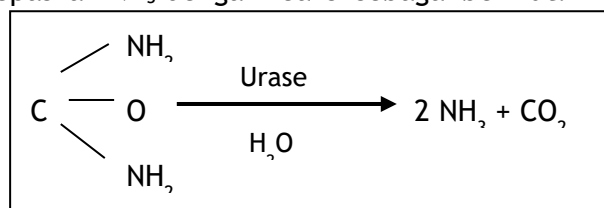
Uji ini dilakukan untuk pengamatan pola-pola penggunaan karbohidrat. TSIA agar mengandung laktosa dan sukrosa dalam konsentrasi 1%, glukosa 0,1% dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah orange menjadi kuning dalam suasana asam. TSIA juga mengandung natrium trisulfat, yaitu suatu substrat untuk penghasil H<sub>2</sub>S, ferro sulfat menghasilkan FeS (precipitat), bewarna hitam untuk membedakan bakteri H<sub>2</sub>S dengan bakteri-bakterinya.

#### HASIL:

Pembentukan gas positif ini hasil dari fermentasi H<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> dapat dilihat dari pecahnya dan terangkatnya agar. Pembentukan H<sub>2</sub>S positif ditandai dengan adanya endapan berwarna hitam, endapan ini terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>++</sup> yang terdapat pada media dan menghasilkan endapan hitam.

### 2.1.4. Uji Hidrolisis Urea

Genus *Proteus* dapat dibedakan dari garam negatif berbentuk batang lainnya, dengan kemampuannya dalam memproduksi enzim urease dalam jumlah yang banyak. Hidrolisis urea dengan urease akan melepaskan NH<sub>3</sub> dengan reaksi sebagai berikut:



Gambar 9.1 Reaksi hidrolisis urea menjadi produk NH<sub>3</sub>

#### HASIL:

Jika urea telah diproduksi, pH medium akan naik, aktifitas urea dapat dideteksi dengan perubahan indikator phenol-red menjadi ungu-pink.

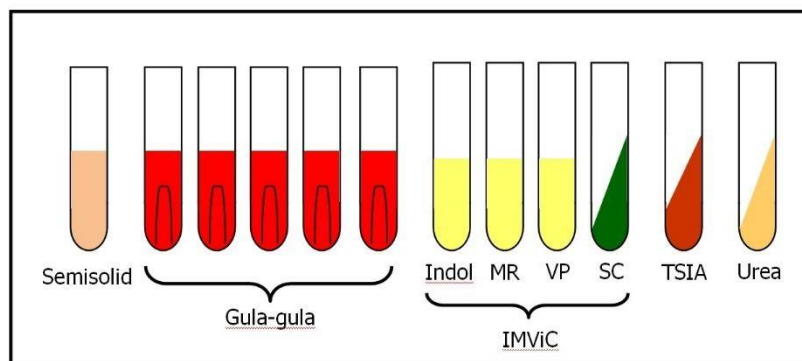
## PRAKTIKUM

### Alat dan Bahan:

- Satu set tabung uji yang terdiri dari 12 tabung reaksi yang berisi medium dengan komposisi berbeda
- Ose
- Kultur bakteri hasil isolasi pada percobaan sebelumnya
- Bunsen

### Cara kerja :

1. Set medium ini sudah disusun berurutan seperti gambar di bawah ini.



**Gambar 9.2** Set medium percobaan uji biokimiawi

2. Susunan tabung reaksi tersebut adalah:
  - Tabung no. 1 adalah medium semisolid untuk mengamati motilitas bakteri.
  - Tabung no. 2 s/d no.6 adalah medium yang berisi berbagai jenis gula, yaitu:
    - Glukosa dengan tanda kuning pada tabung.
    - Laktosa dengan tanda biru pada tabung.
    - Mannit dengan tanda hijau pada tabung.
    - Maltosa dengan tanda putih pada tabung.
    - Sakarosa dengan tanda merah pada tabung.
  - Tabung no.7 s.d 10 adalah medium: Indol, Methyl Red, Voges Proskauer dan Citrat (IMViC).
  - Tabung no. 11. Adalah TSIA
  - Tabung no 12. Adalah urea.
3. Koloni tersangka dalam biakkan agar lempeng diberi tanda lingkaran dengan spidol pada dasar cawan petri.
4. Jarum ose dibakar sampai pijar, kemudian didinginkan.
5. Koloni tersangka yang telah diperiksa bersifat gram negatif diambil dengan ose tusuk tadi (agarnya jangan dicungkil). Pada waktu mengambil koloni tersebut, jangan sampai menyentuh koloni lain.

6. Bakteri yang terdapat pada ujung ose ditanam pada media gula-gula secara berturut-turut mulai dari medium glukosa sampai medium terakhir. Setelah itu ose tusuk dipijarkan kembali.
7. Nama dan tanggal penanaman ditulis pada setiap tabung atau pada tabung pertama urutan sebelah kiri (jangan menulis pada rak tabung).
8. Media diinkubasikan pada suhu 37°C.
9. Hasilnya dapat dibaca setelah diinkubasikan selama 24 jam.

## TUGAS MANDIRI

Carilah prinsip identifikasi bakteri gram positif!

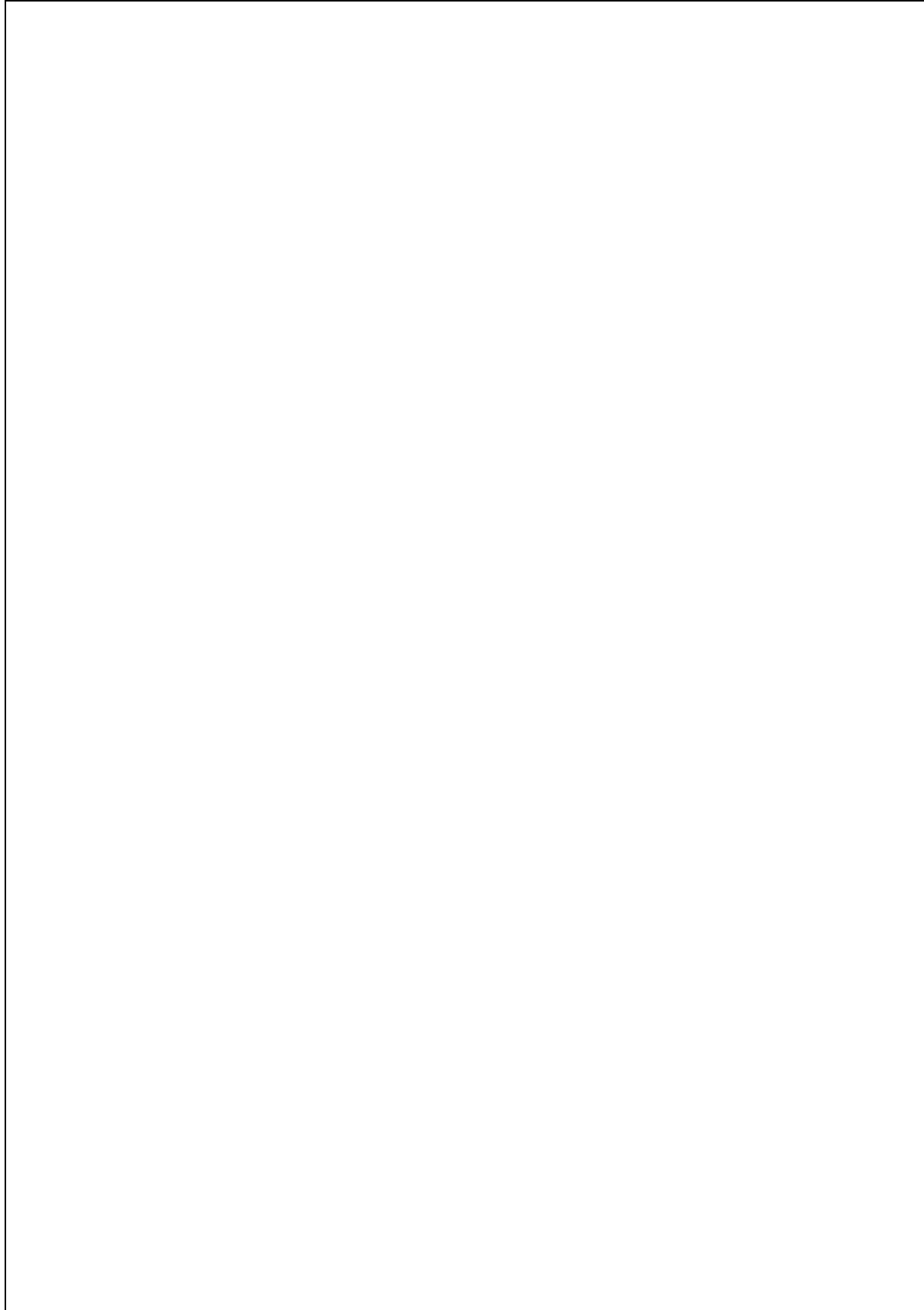
### DAFTAR PUSTAKA

- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 1983. *Microbiology: a Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Company.
- Harley and Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.

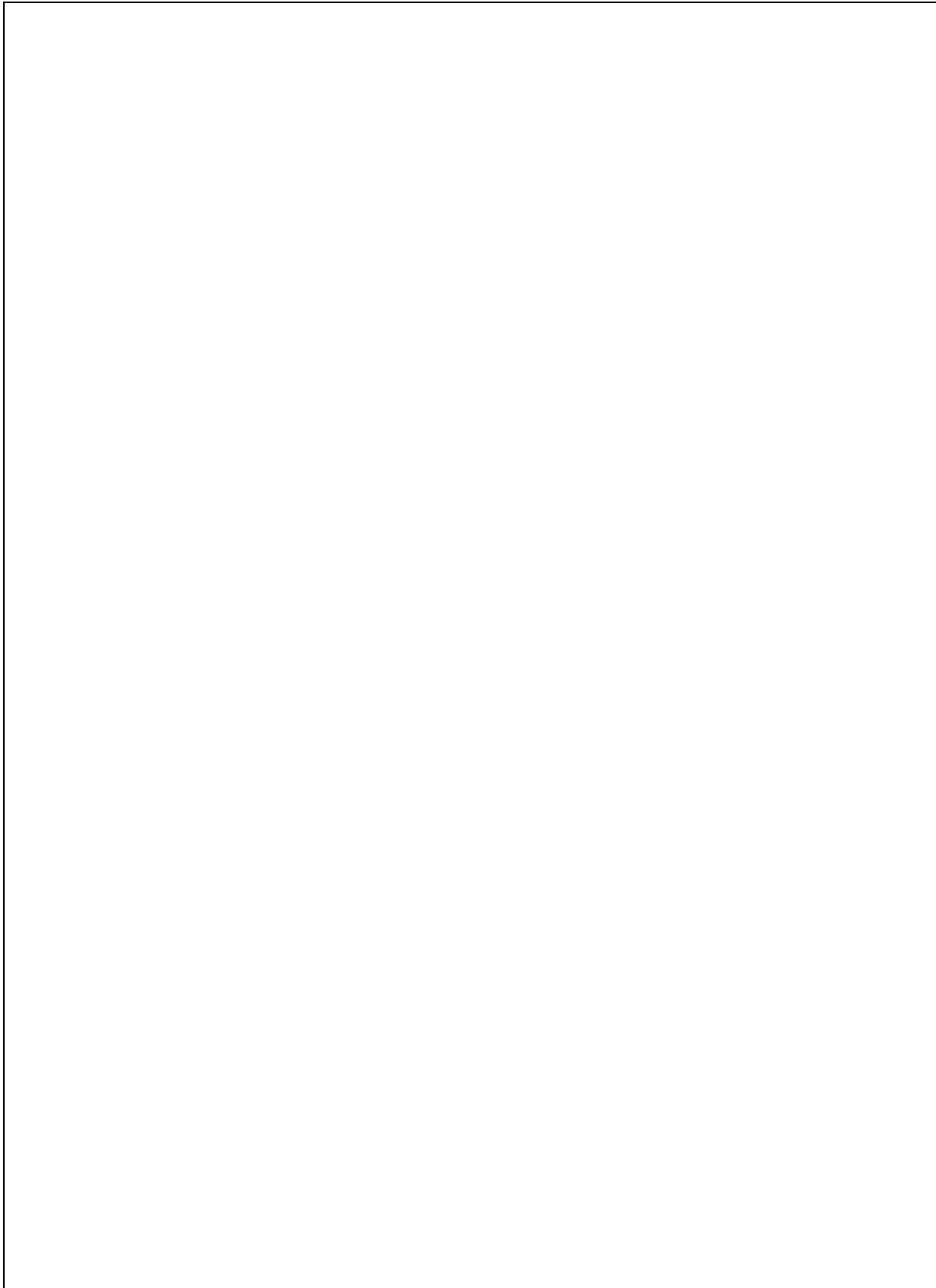
## Hasil dan Pembahasan







## Kesimpulan



## Tugas Praktikum

# UJI RESISTENSI MIKROBA TERHADAP ANTIBIOTIK DAN ZAT METABOLIT ANTIMIKROORGANISME DARI TANAMAN RIMPANG

---

## 1. Tujuan

- Mahasiswa mampu melakukan pengujian kepekaan bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik.
- Mahasiswa mampu mengukur daerah hambat yang terbentuk di sekeliling kertas yang mengandung antibiotik sebagai hasil tingkat kepekaan bakteri terhadap antibiotik.
- Mahasiswa mampu melakukan pengujian zat metabolit antimikroorganisme dari tanaman rimpang terhadap tingkat kepekaan bakteri terhadap zat yang dihasilkan tersebut.

## 2. Pendahuluan

Pertumbuhan mikroorganisme seringkali menimbulkan masalah dalam kehidupan manusia. Mikroorganisme memerlukan nutrisi yang sama dengan manusia yaitu dalam bentuk karbohidrat, protein dan lemak. Adanya cemaran mikroorganisme dapat menyebabkan kerusakan pada produk dan juga menyebabkan penyakit bila menginfeksi organisme lain seperti manusia, hewan dan tumbuhan. Untuk mengendalikan pertumbuhan mikroorganisme dalam produk dan membunuh mikroorganisme penyebab penyakit, sering digunakan antibiotik dan zat metabolit anti mikroorganisme yang dihasilkan dari tanaman maupun senyawa-senyawa kimia sintetik. Namun demikian, mikroorganisme juga mengembangkan mekanisme resistensi terhadap paparan antibiotic maupun zat anti mikroorganisme lainnya bila penggunaan zat tersebut dilakukan tidak sesuai dengan aturan.

Mekanisme kerja dari antibiotik dan zat metabolite anti pertumbuhan mikroorganisme yang berasal dari tumbuhan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme dapat dilihat dengan menggunakan Resistent Test atau Uji Kepekaan. Mikroorganisme yang peka terhadap zat tersebut akan menunjukkan terbentuknya daerah hambat (halozone/zona bening) di sekitar cakram kertas yang mengandung zat anti mikroorganisme atau antibiotik tertentu. Daerah hambat tersebut adalah lingkaran bening dalam medium pertumbuhan yang terjadi karena tidak ada sel bakteri yang tumbuh akibat paparan zat aktif dari antibiotic atau metabolit tersebut. Luas daerah hambat yang terbentuk menentukan nilai kepekaan mikroorganisme terhadap zat tersebut, yaitu:

1. Daerah hambat dengan diameter lebih dari 30 mm menunjukkan bahwa bakteri tersebut peka terhadap antibiotika/ zat metabolit
2. Daerah hambat dengan diameter antara 20-30 mm menunjukkan bahwa bakteri tersebut agak resisten terhadap antibiotika/ zat metabolit.
3. Daerah hambat dengan diameter kurang dari 20 mm menunjukkan bahwa bakteri tersebut resisten terhadap antibiotika/ zat metabolit.

## 2.1. Antibiotika

Antibiotika adalah senyawa kimia yang aktif bersifat sebagai penghambat pertumbuhan mikroorganisme baik bakteri maupun jamur. Antibiotika merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang, seperti misalnya: *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, dan *Streptomyces* spp. Antibiotik yang dihasilkan dari *Penicillium* spp. Dan *Streptomyces* spp, dikenal sebagai Penisilin dan Streptomisin. Untuk mengetahui kepekaan dan resistensi bakteri terhadap beberapa jenis antibiotika tersebut maka uji resistensi ini dilakukan.

Suspensi bakteri dari biakan berumur 24 jam dengan jumlah sel setara Mc Farland 0,5 ( $1 \times 10^3$  sel/ ml) ditumbuhkan pada lempeng agar nutrisi dan antibiotik yang berbentuk kertas (*antibiotik disk paper*) diletakkan pada lempeng agar tersebut. Media kemudian dieramkan selama 24 jam pada suhu 37°C. Ketahanan bakteri terhadap antibiotika dilihat berdasarkan luas daerah hambat yang terbentuk disekeliling kertas antibiotik tersebut. Semakin kecil ukuran diameter hambat yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri telah resisten terhadap antibiotik tersebut. Telah diketahui bahwa antibiotik merupakan obat yang cukup representatif untuk membunuh bakteri. Penggunaan antibiotik yang tidak terkendali telah menyebabkan terjadinya efek samping yang sangat membahayakan yaitu menyebabkan bakteri-bakteri tertentu menjadi tahan atau resisten terhadap antibiotik.

## 2.2. Zat Metabolit Anti Penghambat Pertumbuhan Mikroorganisma

Berbagai senyawa kimia baik yang organik maupun anorganik dapat menghambat pertumbuhan bahkan mematikan mikroorganisma. Senyawa tersebut adalah senyawa metabolit toksin atau zat metabolit anti mikroorganisme yang dapat dihasilkan baik dari mikroorganisme ataupun organisme lain seperti tumbuhan dan hewan. Senyawa ini merupakan analog dari senyawa metabolit dalam sel sehingga apabila bergabung dengan enzim metabolisme dapat menghambat fungsi sebenarnya dari enzim tersebut. Zat anti mikroorganisme dapat berasal dari senyawa anorganik seperti:

- a. Garam-garam logam berat: Mercurichlorida ( $\text{HgCl}_2$ ), Mercurochrom, senyawa perak  
(Argysol, Protogol), garam-garam Cu (Bubur Bordeaux)
- b. Senyawa Arsen : Salvarsa
- c. Senyawa Halogen: Calcium hypochlorite, Natrium hypochlorite, Iodium, Iodoform ( $\text{CHI}_3$ ), Chloramin.
- d. Asam-asam/Basa-basa: Asam laktat
- e. Senyawa organik : Formaldehid, Alkohol, Gliserol, Phenol, Cresol/Lisol
- f. Sabun dan detergen
- g. Sulfonamid, Sulfopiridin, Sulfotiazol.

Senyawa organik yang bersifat zat antimikroorganisme yang berasal dari senyawa organik dari tumbuhan misalnya:

- a. Flavonoid
- b. Tanin
- c. Saponin

## PRAKTIKUM

### LANGKAH KERJA

#### I. Uji

#### Antimetabolit Alat dan Bahan :

- *Nutrient Agar* steril
- 4 cawan petri steril
- Biakan murni bakteri
- Macam-macam zat antimetabolit/antiseptik/desinfektan
- Kertas saring
- Pinset
- Bunsen
- Inkubator

#### Cara Kerja :

1. Biakan murni bakteri 24 jam disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril.
2. Biakan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
3. NA cair dengan suhu 40°C sebanyak 20 ml dimasukkan dalam cawan petri tersebut dan diaduk perlahan-lahan dengan cara memutar cawan petri hingga medium dan suspensi bakteri menjadi homogen, dan tunggu hingga medium membeku.
4. Letakkan kertas saring yang telah terlebih dulu direndam dalam larutan desinfektan pada permukaan medium dalam cawan petri.
5. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Amati pertumbuhan mikroorganisme sekitar kertas saring.

#### Hasil:

Terbentuk daerah hambat (zona bening) di sekeliling kertas antimetabolit.

#### II. Uji Antibiotik

#### Alat dan Bahan :

- *Nutrient Agar* steril
- NaCl fisiologis steril
- 4 cawan petri steril
- Biakan murni bakteri

- Macam-macam zat antimetabolit/antiseptik/desinfektan
- Kertas antibiotik
- Pinset

#### Cara Kerja:

1. Biakan murni bakteri 24 jam disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril.
2. Biakan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
3. NA cair dengan suhu 40°C sebanyak 20 ml dimasukkan dalam cawan petri tersebut dan diaduk perlahan-lahan dengan cara memutar cawan petri hingga medium dan suspensi bakteri menjadi homogen, dan tunggu hingga medium membeku.
4. Kertas antibiotik diletakan pada permukaan agar beku.
5. Lempeng agar tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### Hasil:

Terbentuk daerah hambat (zona bening) disekeliling kertas antibiotika menunjukkan resistensi bakteri terhadap antibiotika.

## HASIL DAN DISKUSI

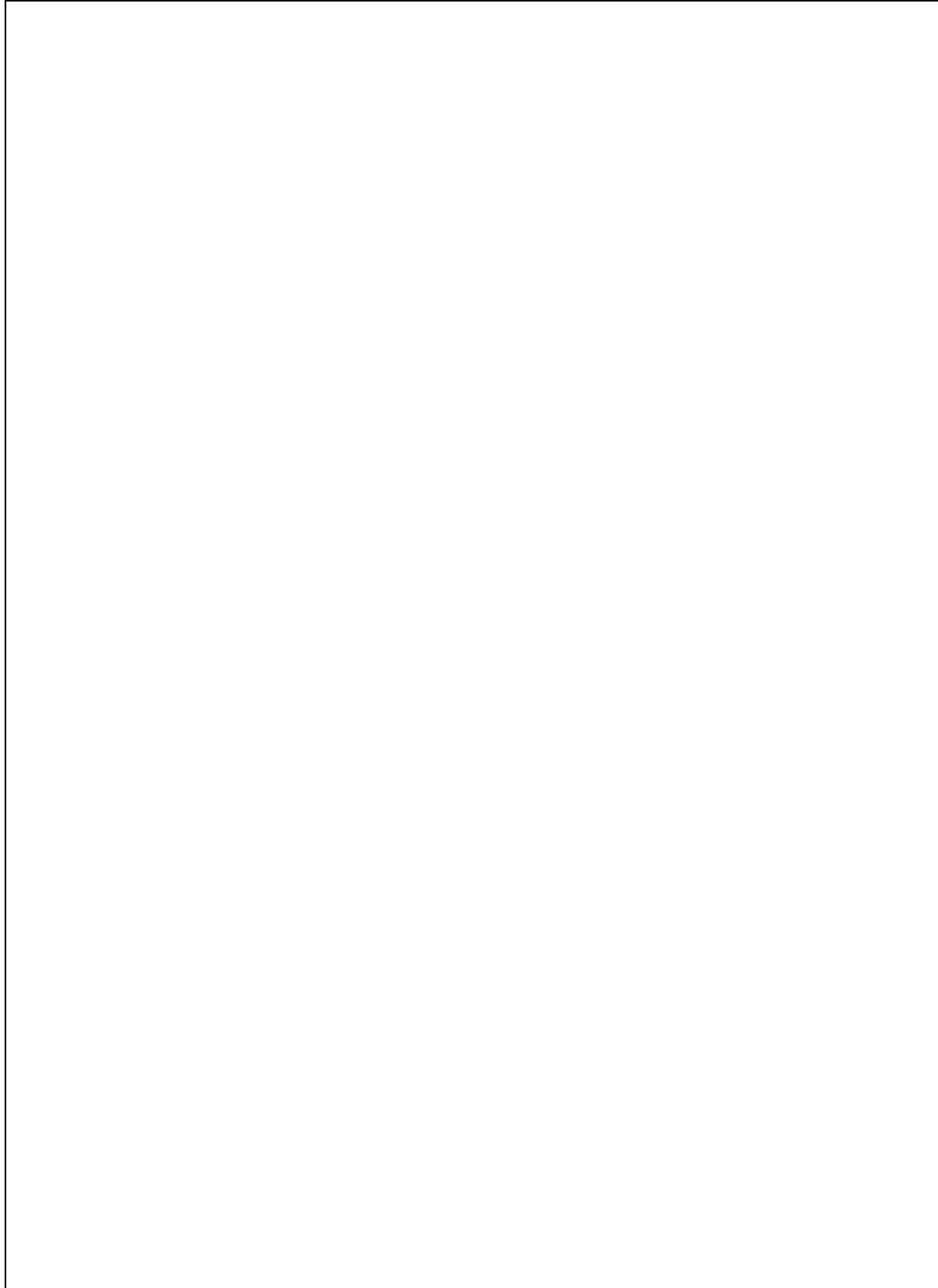
1. Sebutkan jenis metabolit dan antibiotik yang efektif untuk antimikroba?
2. Bagaimana resistensi bakteri yang saudara amati terhadap masing-masing zat antimetabolit dan antibiotika?
3. Mengapa bakteri tersebut menjadi resisten?
4. Bila bakteri tersebut tidak resisten, mengapa? Jelaskan!
5. Berapa fenol koefisien untuk desinfektans yang saudara amati?
6. Apa sesungguhnya fungsi desinfektans?
7. Jelaskan apa yang dimaksud dengan desinfektans!

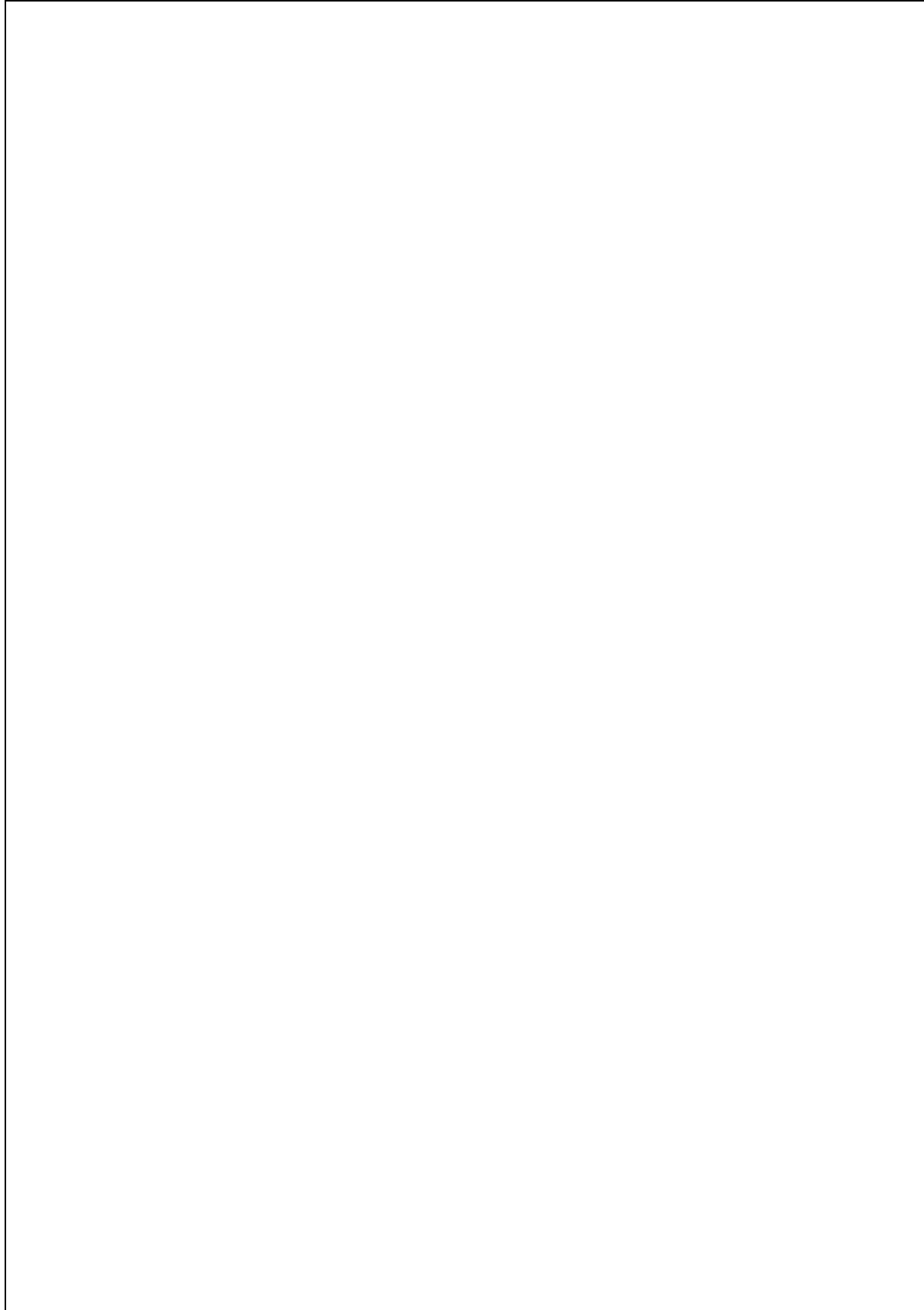
#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. *Materi Praktikum Mikrobiologi*. Teknik Penyehatan laboratorium Teknik Penyehatan ITB.
- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 1983. *Microbiology: a Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Company. New York.
- Sastramihardja, I. 1977. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Bandung: Laboratorium Mikrobiologi-Departemen Teknologi Kimia, ITB.

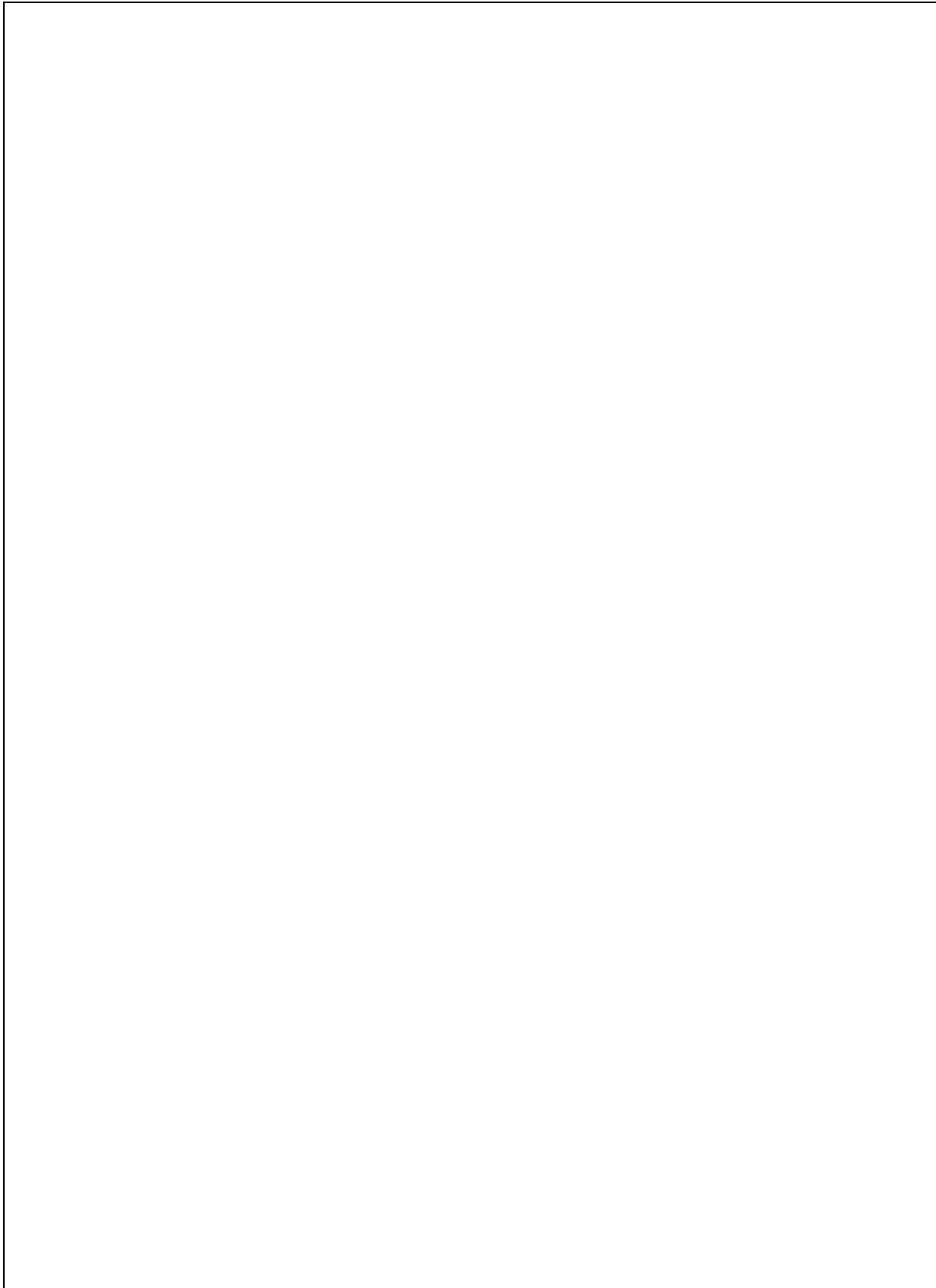
#### Hasil dan Pembahasan



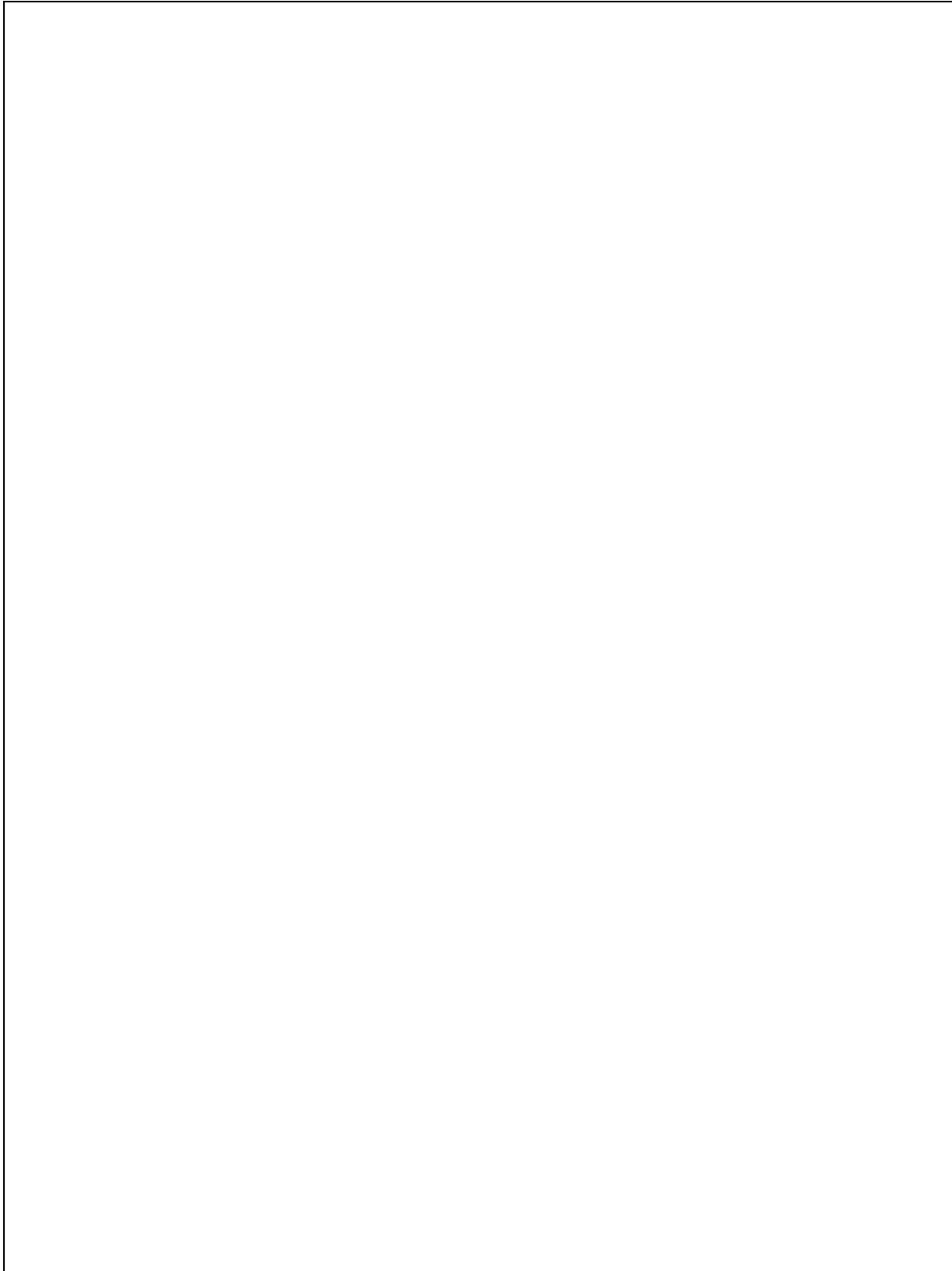




## Kesimpulan



## Tugas Praktikum



## Lampiran

# PENGAMATAN HASIL PRAKTIKUM

24-27 JANUARI 2022

BIOLOGI 2019

### Perhitungan total plate count

Contoh:

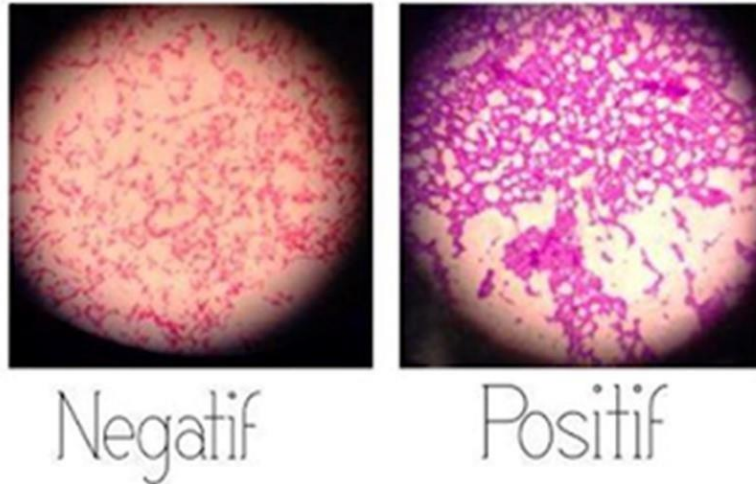
Pengenceran	Cawan I	Cawan II	Jumlah Koloni Rata-rata
$10^{-2}$	215	225	$= \frac{(215 + 225)}{2} \times 10^{-2}$ $= 220 \times 10^{-2}$
$10^{-3}$	55	45	$= \frac{(55 + 45)}{2} \times 10^{-3}$ $= 50 \times 10^{-3}$

Perhitungan *Total Plate Count* adalah :

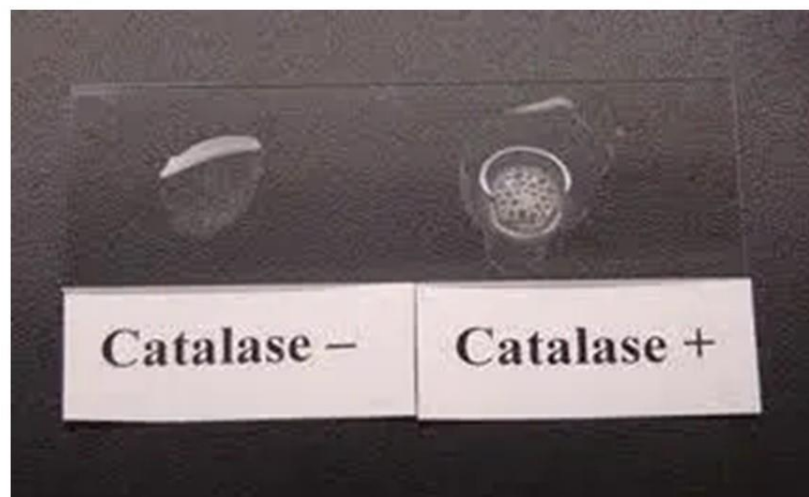
$$\begin{aligned} &= \frac{(220 \times 1/10^{-2}) + (50 \times 1/10^{-3})}{2} = \frac{(220 \times 10^2) + (50 \times 10^3)}{2} \\ &= \frac{22.000 + 50.000}{2} \\ &= 36.000 \end{aligned}$$

Maka jumlah koloni dalam 1 ml adalah 36.000 cfu/ml

## Identifikasi bakteri : Pewarnaan Gram



## Katalase test : reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



# Oksidase test

## Results

Oxidase positive: color changes to blue within 15 to 30 seconds.

Delayed oxidase-positive: color changes to purple within 2 to 3 minutes.

Oxidase negative: no change in color

Reagen : 1% tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, in water



# Hasil Uji Biokimia

## Motilitas

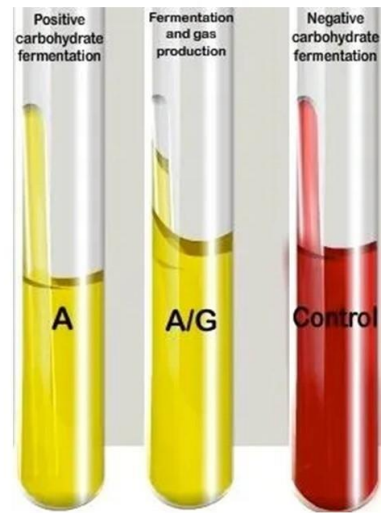
*Semi-Solid media results*

Sketch and photograph of semisolid agar tubes stabbed for motility test.

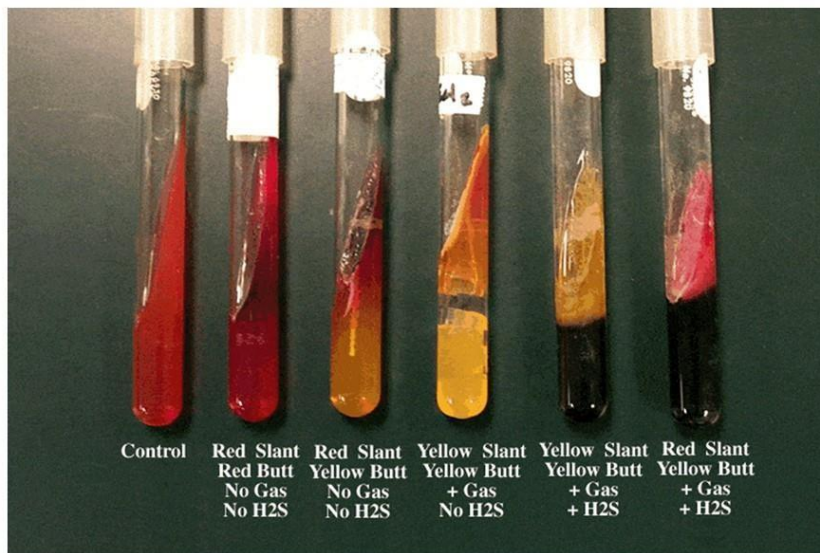
(a) Pattern of growth of a motile organism. The entire medium is turbid with the growth of the organism, which has moved away from the stab line.

(b) Pattern of growth of a nonmotile organism. Only the stab line is turbid with growth.

## Fermentasi Gula Uji Gula-Gula

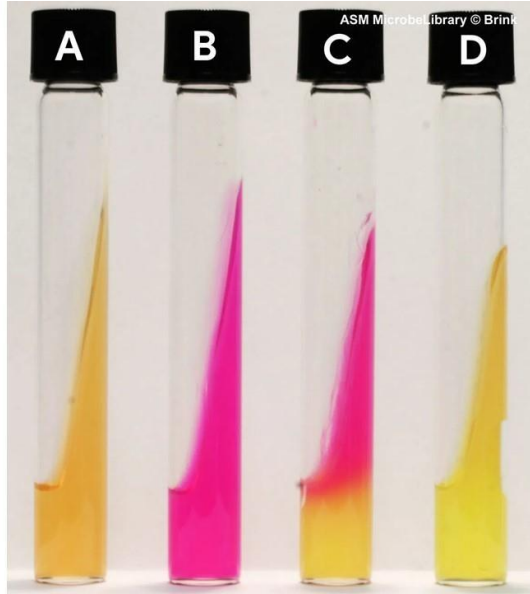


## Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

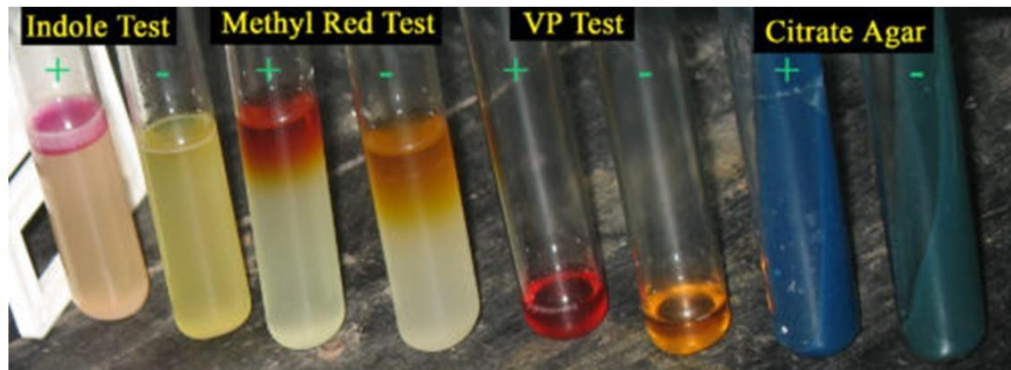




## Uji Urea



## Uji IMVIC



## Reagen

Uji Indol + reagen Kovacs (2-4 tetes)

Uji Metil Merah + reagen Metil merah (2-4 tetes)

Uji Voges Proskauer + reagen  $\alpha$ Naftol 1% dan KOH 40% (1 : 1)

## Contoh membaca hasil uji Biokimia

Test	Result	Result
Gram Stain	+	+
Gelatin Liquefaction	+	+
Starch Hydrolysis	+	+
Lactose Fermentation	-	-
Sucrose Fermentation	+	+
Nitrate Reduction	+	+
Indole Production	-	-
Methyl Red Test	-	-
Voges Proskauer Test	+	-
Citrate Utilization Test	-	-
Urease Test	-	+
Catalase Test	-	+
Oxidase Test	+	-
Organism	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

Characteristics	<i>Vibrio spp.</i>		
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
Pigment on TCBS	Green	Yellow	Green
Gram reaction	Negative rod	Negative rod	Negative rod
TSI	Alkaline/Acid	Acid/acid	Acid/acid
Urease	-	-	-
Citrate	-	-	-
Methy red test	-	+	-
Starch hydrolysis	-	+	-
Glucose	+	+	+
Lactose	-	+	-
Growth at 37°C	+	+	+
Catalase	+	+	+
Motility	+	+	+
Indole	+	+	+
Voges Proskauer	-	+	-
Oxidase	+	+	+
Growth in 0% NaCl	-	-	-
Growth in 7%NaCl	+	+	+

Note: - Negative test, + Positive test

## Pengukuran Zona Hambat

