



SERI KEDUA

MODUL MATAKULIAH

BIOLOGI FARMASI 2

Teori dan Praktikum

Tim Penyusun:

Wisnu Cahyo Prabowo, S.Farm.,M.Si, Apt

**PROGRAM STUDI (S1) FARMASI SAINS & TEKNOLOGI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MULAWARMAN
2023**

KATA PENGANTAR

Modul ini disusun agar mahasiswa agar para praktikan dapat lebih memahami teori yang disertai peningkatan pengetahuan dan skill melalui praktikum yang akan dilakukan. Materi ada modul ini meruakan seri kedua, kelanjutan dari seri pertama. Praktikum Biologi Farmasi 2 di Program Studi Sarjana Farmasi Universitas Mulawarman, diberikan dalam sebagai penyerta matakuliah Biologi Farmasi 2 yang diprogramkan dalam satu semester.

Modul matakuliah Biologi Farmasi 2 seri yang kedua, bertujuan memberikan kepada mahasiswa suatu pengetahuan dan keterampilan tentang dasar-dasar yang diperlukan untuk bekerja dalam bidang Biologi Farmasi Lanjut yaitu: Mikrobiologi, dan parasit mikrobiologis. Kuliah dan praktikum ini diharapkan dapat menjadi modal dasar untuk melakukan persiapan penelitian dalam bidang biologi farmasi. Di dalamnya disajikan keilmuan untuk mahasiswa farmasi yang memiliki keinginan untuk penelitian dibidang ini, serta merupakan dasar untuk mempelajari ilmu-ilmu farmasi khususnya dalam bidang mikrobiologi.

Samarinda, 25 Agustus 2023

Penulis

TIM KBI Biologi Farmasi

Universitas Mulawarman

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	i
Daftar isi	ii
Tata Tertib Laboratorium	iii
Bab 1 Sterilisasi dan Desinfeksi Serta Zat Anti Mikroba.	1
Bab 2 Pembuatan Medium	7
Bab 3 Inokulasi dan Isolasi Mikroorganisme di Sekitar Kita.....	14
Bab 4 Pengecatan Dan Morfologi Bakteri	22
Bab 5 Morfologi Parasit Jamur Dan Khamir.....	43
Daftar Pustaka	49
Lampiran komposisi medium sintetis.....	51

BAB 1

STERILISASI DAN DESINFEKSI

SERTA ZAT ANTI MIKROBA

Dalam pekerjaan mikrobiologi baik untuk praktikum maupun untuk penelitian, bekerja steril merupakan syarat utama untuk berhasil atau tidaknya pekerjaan kita. Ada beberapa teknik yang perlu dikuasai jika kita ingin bekerja pada bidang mikrobiologi antara lain :

Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu usaha untuk membebaskan alat-alat atau bahan-bahan dari segala macam bentuk kehidupan, terutama mikroorganisme. Seperti diketahui penyelidikan suatu spesies mikroorganisme selalu didasarkan atas penyelidikan sifat biakan murni dari spesies tersebut. Oleh karena itu, untuk memisahkan kegiatan mikroorganisme yang satu dengan yang lain, atau untuk memelihara sesuatu mikroorganisme secara biakan murni, perlu digunakan alat-alat dan medium yang steril.

Dalam praktek sterilisasi alat-alat atau medium dapat dikerjakan secara mekanis (misalnya secara penyaringan), secara kimia (menggunakan bahan-bahan kimia), dan secara fisik (dengan panas atau sinar radiasi).

Cara sterilisasi yang digunakan tergantung pada macamnya bahan dan sifat bahan yang akan disterilkan (ketahanan terhadap panas, bentuk bahan yang disterilkan misalnya padat, cair atau bentuk lainnya).

Sterilisasi dengan cara fisik

Cara ini dapat dilakukan meliputi cara panas dan cara sinar radiasi. Cara panas dilakukan dengan cara pemijaran (pembakaran), cara panas kering dan cara panas basah. Namun pada prinsipnya cara pemanasan tersebut dapat dilakukan dengan cara :

1. Sterilisasi dengan pemijaran atau dibakar
2. Sterilisasi dengan udara panas / panas kering (oven).
3. Sterilisasi dengan pemasakan
4. Sterilisasi dengan uap.
5. Sterilisasi dengan uap air bertekanan (otoklaf)

Sterilisasi dengan pemijaran

Cara ini terutama dipakai untuk sterilisasi bahan yang tahan panas tinggi seperti sterilisasi ose yang terbuat dari platina atau nichrome. Caranya adalah dengan membakar langsung alat tersebut di atas api lampu spiritus sampai pijar dan diulang beberapa kali.

Sterilisasi dengan Udara Panas Kering

Alat ini digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas seperti : cawan Petri, tabung-tabung reaksi, pipet dan sebagainya yang kesemuanya tahan terhadap panas tinggi. Untuk sterilisasi dengan cara ini digunakan suhu sekitar 160°C - 170°C selama kurang lebih 2 – 3 jam. Sebelum disterilkan cawan petri Petri harus dibungkus terlebih dahulu dengan kertas koran atau kertas doorlag. Makin tebal kertas yang digunakan untuk membungkus, maka makin lama waktu sterilisasinya. Sedangkan pipet, sebelum disterilisasi, maka pada ujungnya disumbat sedikit dengan kapas, selanjutnya pipet dibungkus dengan kertas. Perlu diingat bahwa pada pembungkus pipetnya ditulis volume pipetnya untuk mengetahui dengan cepat volume pipet yang terbungkus tersebut. Alat oven tersebut seperti yang terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Alat Oven.

Sterilisasi Secara Basah

Sterilisasi dengan Cara Memasak atau Mendidihkan

Cara ini tidak banyak digunakan pada laboratorium mikrobiologi, karena bahan akan basah pada saat disterilkan. Disamping itu suhu juga yang digunakan sangat rendah, paling tinggi hanya mencapai suhu didih air (100°C).

Sterilisasi dengan Menggunakan Uap Air Panas

Untuk bahan-bahan yang mengandung cairan dan tidak dapat disterilkan dengan udara panas, untuk itu paling efektif dilakukan sterilisasi dengan uap air panas. Bahan-bahan yang disterilkan dengan cara ini umumnya adalah medium kultur yang tidak tahan panas tinggi. Alat yang dipergunakan untuk sterilisasi dengan cara ini mirip seperti dandang. Alat tersebut disebut "**Arnold Steam Sterilizer**". Pada umumnya sel-sel vegetatif mikroorganisme mati pada suhu 100°C dalam keadaan lembab. Dalam praktek di laboratorium cara sterilisasi dengan Arnold steam sterilizer sering dilakukan.

Sterilisasi dengan Uap air Bertekanan

Alat ini digunakan untuk sterilisasi medium. Proses sterilisasi yang dilakukan dalam keadaan tekanan tinggi dari uap air jenuh. Tekanan yang digunakan biasanya 15 lbs (2 atm) pada suhu 121°C selama 15 – 20 menit. Tekanan dan waktu yang diperlukan bisa diubah, tergantung dari jenis bahan yang akan disterilkan. Pressure Cooker dapat digunakan sebagai pengganti otoklaf. (Gambar 5).

Sterilisasi Secara Kimia

Cara sterilisasi dengan menggunakan bahan kimia, biasanya berbentuk cairan atau larutan, yang mempunyai sifat yang mampu membunuh sel-sel vegetatif mikroorganisme, tetapi tidak membunuh spora. Sebagai contoh bahan-bahan tersebut adalah berupa desinfektansia meliputi : etanol 70 %, formalin 4%, HgCl₂ 1%, CaCl₂, dan lain-lain. Setelah disterilkan dengan larutan tersebut, maka bahan yang telah disterilkan tersebut harus dibilas dengan air suling steril. Untuk mensterilkan permukaan meja kerja dapat dipakai larutan formalin 4%, alkohol 50 – 70%, larutan lisol dan lain-lain sebagainya.



Gambar 4. Arnold Stem Sterilizer

Peralatan gelas yang baru seringkali terkontaminasi oleh spora bakteri *Bacillus subtilis* yang sangat resisten. Untuk menghilangkan spora tersebut, dapat dilakukan dengan cara merendam alat-alat gelas tersebut dalam larutan asam sulfat pekat selama beberapa jam, selanjutnya dibilas dengan air kran sampai netral (uji dengan kertas lakmus) sebelum dapat dipa



Gambar 5. autoklaf

Sterilisasi dengan Cara Mekanik

Cara ini diperlukan apabila bahan yang akan disterilkan berupa larutan yang bersifat termolabil (tidak tahan panas), karena akan rusak pada suhu yang tinggi, misalnya antibiotika, asam amino, vitamin, senyawa-senyawa gula dan lain sebagainya.

Untuk melakukan sterilisasi bahan-bahan tersebut, dilakukan dengan menggunakan penyaringan dengan menggunakan filter yang mempunyai pori-pori yang sangat halus. Digunakan pompa vakum untuk menyedot larutan, sehingga dapat melewati filter. Ada beberapa macam filter yang sering dipakai antara lain sebagai berikut :

Filter Chamberland Pasteur

Filter ini berbentuk seperti lilin yang terbuat dari porselen yang berpori-pori halus dan tidak dilapisi email. Porositas dari filter ini L1, L2, L3 dan seterusnya, yang banyak digunakan untuk penyaring bakteri adalah elemen penyaring yang mempunyai porositas L3 yang kira-kira sama dengan tipe N pada penyaring tipe Berkefeld filter.

Filter Berkefeld (Berkefeld Filter)

Filter ini mempunyai elemen penyaringan yang dibuat dari tanah diatomae dengan porositas V(Viel = kasar), N(normal) dan W(wenig = halus). Untuk sterilisasi biasanya dipakai elemen penyaring yang mempunyai porositas N dan W.

Zeits Filter (ENT Keimung Filter=Filter Asbes)

Zeits filter merupakan alat penyaring dari logam yang tidak berkarat (stainless steel) yang dilengkapi dengan filter asbes selulosa yang dapat diganti-ganti. Selain alat-alat penyaring tersebut di atas, masih ada beberapa lagi seperti : Sintered glass filter, U.F. Filter dan lain-lain. Untuk penyaring dengan filter bakteri diperlukan suatu tekanan negatif atau positif tertentu yaitu 20 sampai 50 cmHg dengan menggunakan pompa vakum atau pompa tekan. Dengan tekanan positif atau negatif 20 – 30 cmHg cukup baik untuk mempercepat penyaringan tanpa menyebabkan pembentukan buih daripada medium yang disaring.

Catatan :

Alat penyaring bakteri sebelum dipergunakan harus diuji terlebih dahulu bocor tidaknya filter tadi. Untuk mengetahui kebocoran filter bakteri dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- a. Mula-mula unit filter bakteri disterilkan dengan menggunakan otoklaf.
- b. Siapkan biakan murni *Bacterium prodignosum* = *Bacillus prodigosus* = *Serratia marcescen*. Biakan ini kemudian diinokulasikan ke dalam medium Boillon cair steril.
- c. Kemudian medium bouillon tersebut disaring.
- d. Filtrat diinkubasikan selama 3 – 5 hari pada suhu 37°C

Setelah diinkubasi dilakukan pengamatan. Apabila elemen penyaring bocor, maka ada bakteri yang lolos melalui filter. Setelah masa inkubasi 3 – 5 hari bakteri penguji akan tumbuh. Oleh karena itu bakteri tersebut membentuk pigmen prodigosin yang berwarna merah. Apabila tidak bocor maka medium tetap jernih.



Gambar 6. Beberapa macam filter yang biasa dipakai; kiri-kanan ,Filter Seitz, Filter Chamberland – Pasteur; Filter Gelas

BAB 2

PEMBUATAN MEDIUM

Mikroorganisme adalah juga makhluk hidup, untuk memeliharanya dibutuhkan medium yang harus mengandung semua zat yang diperlukan untuk pertumbuhannya, antara lain senyawa-senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak, mineral dan vitamin).

Pengelolaan Medium Menurut Bahan yang Digunakan

Medium Alamiah atau Substrat

Medium ini terdiri atas bahan-bahan alam seperti : sari buah, wortel, nasi, jagung dan bahan-bahan alamiah lainnya.

Medium Semi Alamiah Medium Buatan atau Medium Sintetis

Medium ini terdiri dari bahan alamiah ditambah dengan senyawa-senyawa kimia, misalnya Potato Dekstrosa Agar (PDA), Touge Ekstrak Agar (TEA), Malt Ekstrak Agar (MEA), dan lain-lain.

Medium Buatan atau Medium Sintetis

Medium ini terdiri dari senyawa-senyawa kimia yang komposisi dan jumlahnya sudah ditentukan, misalnya Czapek Dox Agar (CDA), Sabouraud Dekstrosa Agar (SDA) dan lain-lain sebagainya.

Pengelompokan Medium Berdasarkan Kegunaannya

Medium Umum

Medium ini dapat ditumbuhi mikroorganisme secara umum yaitu banyak jenis mikroorganisme yang dapat tumbuh pada medium tersebut, misalnya Nutrien Agar (NA), Potato Dekstrosa Agar (PDA), Touge Ekstrak Agar (TEA), dan lain-lain.

Medium selektif

Medium ini komposisinya disusun sedemikian rupa, sehingga hanya jenis-jenis mikroorganisme tertentu saja yang dapat hidup, misalnya : Salmonella Shigella Agar (SSA), Brilliant Green Lactose Broth (BGLB).

Medium Diferensial

Medium ini digunakan untuk membedakan jenis mikroorganisme satu dengan yang lainnya. Disebabkan adanya suatu reaksi atau ciri yang khas. Reaksi ini terjadi karena mikroorganisme mampu mengurai salah satu bahan dalam medium, misalnya Eosin Methylen Blue Agar (EMBA), Blood Agar (BA) dan sebagainya.

Medium Diperkaya (Enrichment Medium)

Medium ini dipakai untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu, sebelum dipakai dalam suatu proses fermentasi. Tujuannya adalah untuk mengaktifkan mikroorganisme tersebut, misalnya medium Selenite Cystin Broth (SCB), medium Malt Ekstrak Agar (MEA) untuk khamir dan lain-lain.

Penggolongan Medium Berdasarkan Fisiknya (Konsistensinya)

Medium Padat (Agar)

Medium ini ditambahkan agar, sehingga pada suhu kamar mengeras (padat), misalnya Nutrien Agar (NA), Vogel Johnson Agar (VJA), ENDO Agar dan lain-lain.

Medium Cair

Medium ini tidak dapat ditambahkan bahan pematat seperti agar-agar, jadi bentuknya cair, sebagai contoh adalah Nutrien Broth (NB), dan lain-lain.

Medium Setengah Padat (semi Solidum)

Medium ini digunakan untuk melihat gerakan dari mikroorganisme apakah bersifat motil atau non motil. Medium ini ditambahkan bahan pematat sebanyak 50%. Medium (media = jamaknya) adalah substansi yang terdiri atas campuran zat-zat makanan (nutrient) yang dipergunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme.

Zat-zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme pada umumnya sangat bervariasi dapat berbentuk senyawa-senyawa organik sederhana atau kompleks, senyawa-senyawa anorganik atau majemuk dan bahkan ada beberapa mikroorganisme tertentu dapat menggunakan unsur kimia. Misalnya saja bakteri-bakteri tanah media organik sederhana untuk pertumbuhannya, akan tetapi bakteri-bakteri patogen hanya dapat tumbuh dalam media yang mengandung ekstrak daging, sebab di dalam ekstrak daging terdapat bahan-bahan makanan yang cukup seperti asam amino, peptone, protease, hexosa fosfat dan beberapa zat tumbuh lainnya.

Agar semua mikroorganisme dapat tumbuh baik dalam suatu media, maka medium pertumbuhan harus memenuhi syarat-syarat antara lain :

1. Mengandung semua zat-zat makanan yang mudah dipergunakan (available) oleh mikroba
2. Mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan reaksi (pH) yang sesuai,

3. Tidak mengandung zat-zat penghambat (inhibitor)
4. Harus steril dan dicegah adanya kontaminasi

MEDIUM PERTUMBUHAN BAKTERI

Pembuatan Medium Nutrien Cair

Bahan yang diperlukan :

1. Ekstrak Daging (ekstrak Beef)
2. Pepton
3. Air Suling

Cara Pembuatan :

1. Timbang dengan teliti :

Ekstrak daging (ekstrak beef)	3 gram
Pepton	5 gram
2. Masing-masing bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml air suling, aduk sampai homogen.
3. Panaskan sehingga larutan medium mendidih selama 5 menit.
4. Dinginkan, kemudian netralkan larutan medium tersebut (menggunakan indikator phenol red pada waktu menetralkan). Untuk netralisasi digunakan NaOH 1 N sedikit demi sedikit sampai warna indikator berubah warna menjadi merah jambu.
5. Air yang hilang selama pemanasan supaya diganti dengan menambahkan air suling sampai volume tepat 1000 ml.
6. Saring dengan kapas atau kain flannel yang bersih.
7. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf 15 menit pada tekanan 2 atm.

Pembuatan Medium Nutrien Agar

Bahan yang diperlukan :

1. Ekstrak daging
2. Pepton
3. Agar
4. Air Suling

Cara Kerja :

1. Buatlah Nutrien cair seperti yang telah disebutkan di atas.
2. Timbanglah agar sebanyak 15 – 20 gram setiap 1000 ml medium

3. Masukkan agar tersebut ke dalam medium, kemudian dipanaskan sambil diaduk, sehingga semua agar-agar mencair (pemanasan dilakukan di atas penangas air / water bath)
4. Air yang hilang selama pemanasan supaya diganti dengan air suling. Bila perlu dilakukan penyetaraan pH sekali lagi.
5. Saring dalam keadaan panas-panas dengan kapas atau kain flannel yang bersih.
6. Masukkan medium tersebut kedalam tabung-tabung reaksi yang steril dan banyaknya medium yang diisikan tergantung dari pada keperluannya. Untuk medium agar tegak diisikan 10 ml, sedangkan untuk medium agar miring diisikan 5 ml medium.
7. Sterilkan dengan otoklaf selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Untuk medium agar miring setekah disterilisasi letakkan miring 30 derajat terhadap garis mendatar dan biarkan sampai memadat.

MEDIA DAN PEMBENIHAN JAMUR

Jamur adalah mikroorganisme yang juga membutuhkan medium untuk pertumbuhan dan pemeliharaannya. Medium jamur harus mengandung semua zat yang diperlukan untuk pertumbuhannya, antara lain senyawa-senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak, mineral dan vitamin). Medium untuk pertumbuhan jamur disarankan memiliki pH asam untuk meniadakan kontaminasi dari bakteri

Beberapa Medium yang digunakan untuk pertumbuhan Jamur

Beberapa medium yang digunakan secara khusus

1. **Acetat Askospore Agar, Gorodkova Medium, dan V- 8 Medium For Ascospores.**
Medium ini disarankan untuk digunakan pada kultur jamur yang memiliki askospora untuk kepentingan pengamatan (identifikasi)
2. **BHI, Yeast Extract-phosphat agar .**
Medium ini disarankan untuk digunakan pada pembiakan *Histoplasma capsulatum* dan *Blastoconidia dermatidis*. Biasanya ditambahkan antibiotic seperti Sikloheximid dan kloramfenikol , seperti jika menggunakan medium SDA (Sabouraud Dextrose Agar). Medium khusus ini sangat membantu dalam mengisolasi jamur pathogen dimana bakteri atau jamur yang lain terdapat bersama-sama. Juga disarankan penggunaan medium yeast ekstrak-fosfat yang ditambahkan ammonia.
3. **Casein Agar**

Medium ini digunakan secara khusus untuk membedakan Actinomycetes aerob dan karakterisasi beberapa jenis jamur Dematiaceous. Pengamatan dilakukan hanya dengan melihat hidrolisis casein yang tampak disekitar koloni bekas goresan jamur atau pada koloni itu sendiri sebagai bagian yang transparan (jernih). Metoda ini dilakukan pada medium agar plat.

4. **Cornmeal-Tween 80 Agar**

Medium ini biasa digunakan dalam membedakan spesies dari Candida dan juga digunakan dalam bentuk slide kultur (pada objek gelas) sebagai stimulant terbentuknya konidia pada beberapa jamur. Jika 10 gram dekstrosa ditambahkan ke dalam medium menggantikan tween 80, maka medium ini dapat digunakan untuk untuk membedakan *Trycophyton mentagrophytes* dengan *Trycophyton rubrum* berdasarkan pigmen yang dihasilkan.

5. **Tyrosin atau Xanthine Agar**

Medium ini digunakan untuk membedakan aerobic actinomycetes dan karakterisasi *Exogala* dan *Wangiella spp.*

6. **Urea Agar**

Medium ini digunakan untuk membedakan jamur yang serupa khamir (yeastlike fungi) dan mengidentifikasi beberapa spesies Tricophyton dan aerobic Actinomycetes.

7. **Yeast Ekstrak– Fosfat dengan Ammonia**

Medium ini digunakan untuk isolasi *Histoplasma capsulatum* dan *Blastomyces dermatitidis* dari kontaminan dalam specimen.

Pembuatan Medium Cair

Potato Dextrose Broth (PDB)

Bahan yang diperlukan :

4. Ekstrak Kentang (Potato extract)	4.0	g.
5. Glukosa	20.0	g
6. Air Suling	ad	1 L

Cara Pembuatan :

1. Timbang dengan teliti :

- | | | |
|-------------------------------------|------|------|
| a) Ekstrak Kentang (Potato extract) | 4.0 | gram |
| b) Glukosa | 20.0 | gram |

2. Masing-masing bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml air suling, aduk sampai homogen.

3. Tambahkan air suling sampai volume tepat 1000 ml.
4. Saring dengan kapas atau kain flannel yang bersih.
5. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf 15 menit pada suhu 121 ° C

Pembuatan Medium Padat

Potato Dextrose Agar (PDA)

Bahan yang diperlukan :

- | | | |
|-------------------------------------|------|----|
| a) Ekstrak Kentang (Potato extract) | 4.0 | g. |
| b) Glukosa | 20.0 | g |
| c) Agar | 15.0 | g |
| d) Air Suling ad | 1 | L |

Cara Pembuatan :

1. Timbang dengan teliti :
 - a) Ekstrak Kentang (Potato extract) 4.0 gram
 - b) Glukosa 20.0 gram
 - c) Agar 15.0 g
6. Masing-masing bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml air suling, aduk sampai homogen.
7. Tambahkan air suling, panaskan hingga agar larut. Tambahkan air suling sampai volume tepat 1000 ml.
8. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf 15 menit pada suhu 121 ° C

BHI Agar

Medium ini disarankan untuk medium pertumbuhan *Histoplasma capsulatum* dan *Blastomyces dermatitidis*

Bahan yang diperlukan :

- | | |
|-------------------|---------|
| BHI Agar (kering) | 52 g |
| Air | 1000 ml |

Cara Pembuatan :

1. Timbang dengan teliti :
 1. BHI Agar (kering) 52 g
 2. Air 1000 ml
2. Timbang bahan tersebut, dilarutkan dalam 100 ml air suling, aduk sampai homogen.

3. Tambahkan air suling, panaskan hingga agar larut. Tambahkan air suling sampai volume tepat 1000 ml.
4. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf 15 menit pada suhu 121 ° C

Pertanyaan-pertanyaan :

1. Jelaskan tentang agar-agar dan jelaskan fungsinya di dalam media !
2. Mengapa agar-agar lebih baik dibandingkan dengan gelatin sebagai bahan pematat yang ditambahkan dalam medium ?
3. Pada suhu berapa agar-agar dapat mencair dan memadat ?
4. Bagaimana caranya mensterilkan medium yang bersifat asam yang mengandung agar-agar, jelaskan !
5. Mengapa kentang dan Touge digunakan sebagai bahan dasar pembuatan medium untuk pertumbuhan Kapang/Khamir?
6. Apa tujuan pemansan kentang dan Touge dalam pembuatan medium alamiah

BAB 3
INOKULASI DAN ISOLASI
MIKROORGANISME DI SEKITAR KITA

INOKULASI MIKROORGANISME

Lingkungan di sekeliling kita mengandung beraneka ragam mikroorganisme dalam jumlah yang berbeda-beda. Keadaan lingkungan menentukan jumlah dan jenis mikroorganisme yang dominan di lingkungan tersebut.

Tujuan praktikum ini adalah untuk memperlihatkan adanya aneka ragam mikroorganisme pada berbagai bahan di lingkungan sekitar kita. Disamping itu praktikum ini juga menunjukkan pentingnya bekerja dengan peralatan steril dalam pekerjaan mikrobiologi.

Pencegahan yang Perlu Diperhatikan Bila bekerja dengan biakan di Daerah Tropik

Daerah tropik merupakan lingkungan yang ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme. Kontaminasi mudah terjadi dan pencegahan yang tidak diperlukan di daerah dingin justru dibutuhkan di daerah tropik. Hal-hal yang perlu diperhatikan antara lain :

1. Sedapat mungkin memindahkan biakan dilakukan dalam transfer box atau laminar air flow cabinet. Jika pemindahan biakan dilakukan dalam suatu ruangan, hendaknya ruangan tersebut bebas dari angin, jangan berbicara atau tahanlah napas pada waktu memindahkan biakan, dan sebaiknya pakailah masker.
2. Semut, kecoa dan serangga kecil lainnya dapat menjadi pengganggu dan mengkontaminasi biakan dalam cawan Petri. Sebaiknya ruangan disemprot dengan insektisida pada waktu-waktu tertentu. Kebersihan ruangan kerja perlu mendapat perhatian secara teratur.
3. Udara lembab di daerah tropik dapat menyebabkan pertumbuhan kapang pada sumbat kapas. Jika sumbat kapas akan ditutup dengan plastik atau kertas aluminium foil (untuk menyimpan biakan dalam lemari es), maka sebaiknya kapas tersebut ditetesi sedikit dengan sublimat alcohol atau tembaga sulfat jenuh.

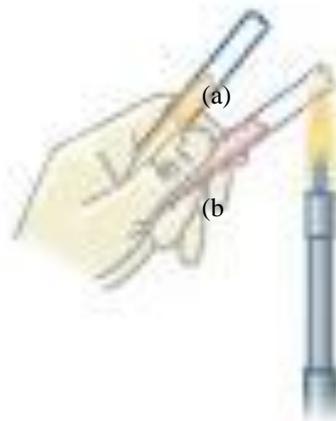
Cara memindahkan Biakan

Setiap manipulasi dalam pekerjaan mikrobiologi selalu merupakan kompromi antara ketelitian dan kecepatan kerja. Hanya melalui latihan yang teratur seorang pekerja dapat mencapai keterampilan kerja steril yang diperlukan. Bekerja lamban, akan memakan waktu dan mengakibatkan bahan yang diamati atau diperiksa terlalu lama berhubungan dengan udara. Hal

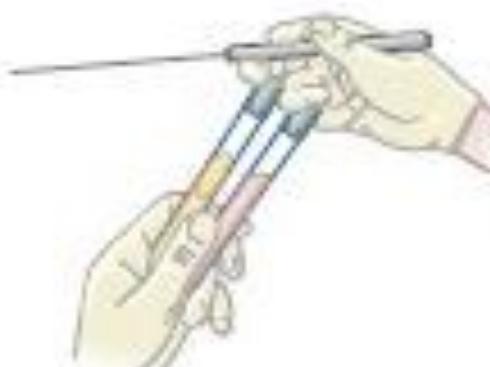
ini akan memperbesar kemungkinan terjadinya kontaminasi. Bekerja terlalu cepat, juga akan memperbesar peluang bekerja kurang steril.

Untuk memindahkan biakan dilakukan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Bersihkan meja kerja dari debu, kemudian sterilkan dengan desinfektansia (formaldehida 4%, alkohol 50 – 70%, timol 5% atau lisol 5%).
2. Lingkungan kerja harus tenang dan bebas angin. Napas sedapat mungkin dihembuskan menjauhi tabung biakan yang akan dipindahkan (pakai masker).
3. Periksa kembali apakah segala sesuatunya sudah siap.
4. Lakukan langkah-langkah berikut ini :



Gambar 7.1 Cara memegang tabung :Peganglah tabung yang berisi biakan mikroorganisme (a); dan tabung yang tidak berisi biakan (b); di tangan kiri. Peganglah jarum inokulasi dengan tangan kanan. (Sumber : Sussman, 1963).

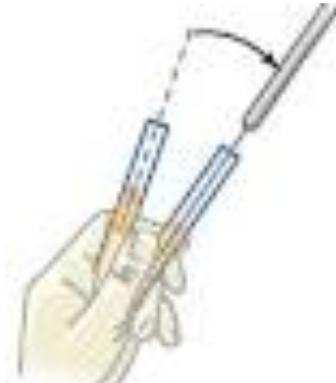


Gambar 7.2. Membuka kapas : Buka kedua tabung biakan dengan melepaskan sumbat kapas menggunakan tangan kanan. Panaskan mulut tabung dengan cara melewatkannya di atas nyala

api sebanyak 2 kali. Hendaknya mulut tabung yang berisi medium baru di pegang dengan posisi agak condong terhadap meja kerja untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi dari udara.



Gambar 7.3. Memanaskan jarum inokulasi; Panaskan jarum inokulasi sampai pijar. Dinginkan dalam larutan alcohol 70 % kemudian lewatkan kembali di atas nyala api atau sentuhkan pada permukaan agar.



Gambar 7. Cara memindahkan biakan

Menuang Medium Agar Secara Aseptik

Bahan dan Alat :

1. Beberapa cawan Petri Steril
2. beberapa tabung medium TEA (Tauge Ekstrak Agar)
3. Penangas Air
4. Pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Cairkan medium TEA tegak dalam pemanas air. Setelah semua medium mencair angkat tabung tersebut dan turunkan suhunya sampai 30°- 40° C dengan cara-menggosok-gosoknya di antara telapak tangan.
2. Lepaskan sumbat kapas dari tabung, bakar mulut tabung sebentar, angkat tutup cawan petri sedemikian sehingga mulut tabung dapat masuk.
3. Tuang agar ke dalam cawan petri dan usahakan jangan sampai ada agar tercecer atau melekat di pinggir cawan.
4. Tutup kembali cawan petri secara perlahan-lahan dan biarkan medium mengeras.
5. Bakar kembali mulut tabung dan tutup kembali dengan sumbat kapasnya.
6. Simpan cawan petri dalam posisi terbalik selama 2 – 3 hari sebelum dipakai.

Menangkap Mikroorganisme di Sekitar Kita

Bahan yang dibutuhkan :

1. Satu cawan petri yang tidak steril (nomor 1)
2. Delapan cawan petri steril (nomor 2 – 9)
3. Sepuluh tabung reaksi TEA tegak
4. Satu pipet 1 ml yang tidak steril
5. Satu pisau laboratorium
6. Satu pinset tumpul
7. Satu tabung air suling steril
8. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

Cara Kerja :

1. Panaskan semua tabung yang berisi medium TEA tegak dalam penangas air sampai mencair. Turunkan suhu sampai 38° - 40° C dengan cara menggosok-gosoknya di antara kedua telapak tangan.
2. Tuangkan medium dari salah satu tabung secara aseptik ke dalam cawan petri I, biarkan medium mengeras.
3. Lakukan hal yang sama untuk cawan petri steril (no. II sampai IX), kemudian lakukan berikut :
 - a. Biarkan cawan petri II tanpa perlakuan.

- b. Ambil secara aseptik 0,2 ml air suling steril dengan pipet yang tidak steril dan teteskan di atas permukaan medium cawan petri nomor III.
 - c. Korek sedikit kotoran gigi dan goreskan di atas permukaan medium pada cawan petri nomor IV.
 - d. Bersihkan pisau laboratorium dengan alkohol 70%, korek sedikit epidermis kulit tangan dan letakkan di atas permukaan medium cawan petri nomor V.
 - e. Ambil beberapa helai rambut kepala dan letakkan di atas permukaan medium cawan petri nomor VI, dengan menggunakan pinset tumpul yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%.
 - f. Sentuhkan jari anda pada permukaan medium pada cawan petri nomor VII.
 - g. Bukalah cawan petri nomor VIII,IX dan X di tiga tempat yang berlainan, misalnya satu di dalam laboratorium, satu ditempat yang banyak dilewati orang dan satu lagi ditempat banyak angin.
4. Inkubasikan semua cawan petri selama 24 – 48 jam. Amati perubahan yang terjadi. Simpan cawan-cawan tersebut dalam lemari es untuk bahan praktikum yang akan datang.

ISOLASI MIKROORGANISME

Dalam kehidupan sehari-hari kita selalu berhubungan dengan berbagai macam mikroorganisme, baik bakteri, kapang, maupun khamir. Untuk mempermudah dalam mempelajari jenis dan sifat mikroorganisme, maka mikroorganisme tersebut harus diisolasi dari lingkungan dan dipelihara pada medium yang sesuai untuk pertumbuhannya.

Isolasi adalah merupakan cara memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungan, sehingga dapat diperoleh biakan yang sifatnya murni, sehingga biakan tersebut disebut ***kultur murni***.

a. Memindahkan Biakan

Bahan dan alat :

1. Beberapa tabung medium miring
2. Jarum inokulasi (ose dan jarum tanam tajam)
3. Alkohol 70% dan pembakar spiritus
4. Satu biakan murni kapang
5. Satu biakan murni khamir

6. Satu biakan murni bakteri

Cara kerja :

1. Panaskan jarum tanam tajam di atas api sampai berpijar/membara. Dinginkan dalam alkohol 70% dan panaskan kembali sebentar di atas nyala api. Dengan jarum ini diambil sedikit biakan kapang dan diletakkan ke atas permukaan medium, kira-kira pada jarak 1/3 dari panjang permukaan medium, (gambar 7).
2. Bakar ose sampai pijar, dinginkan dalam alkohol 70% dan bakar kembali di atas api. Dengan ose tersebut diambil sedikit biakan khamir, gesekkan ujung ose yang telah mengandung khamir secara zig-zag di atas permukaan medium mulai dari ujung bagian bawah sampai ke bagian atas (gambar 7).
3. Lakukan cara nomor 2 untuk memindahkan bakteri
4. Inkubasikan semua tabung biakan selama 24 – 48 jam dan amati pertumbuhan yang terjadi.

b. Isolasi Mikroorganisme dari Udara

Bahan dan alat :

1. Beberapa tabung medium agar miring yang terdiri dari NA, PDA, TEA.
2. Tiga cawan petri hasil dari praktikum “mikroorganisme disekitar kita”.
3. Jarum inokulasi
4. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Pindahkan koloni-koloni yang tumbuh terpisah dalam cawan petri ke medium yang sesuai (konsultasikan dengan asisten)
2. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama 48 jam dan amati pertumbuhan yang terjadi.

c. Isolasi Mikroorganisme dari Subtrat Cair

1. Cara Sebar (Spread Method)

Bahan dan alat :

1. Beberapa cawan petri steril yang berisi medium TEA
2. Bahan cair yang akan diperiksa
3. Pipet steril

4. Spatel drygalki atau jarum inokulasi yang dibengkokkan
5. Beberapa tabung berisi medium agar miring (NA, PDA, TEA)
6. Jarum inokulasi
7. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

Cara kerja

1. Teteskan beberapa tetes cairan yang akan diperiksa di atas permukaan medium dalam cawan petri. Jika cairan terlalu pekat, encerkan terlebih dahulu dengan air suling.
2. Dengan menggunakan spatel dryglaski atau jarum inokulasi yang dibengkokkan, tetesan tersebut disebar seluas mungkin di atas permukaan medium.
3. Inkubasikan di dalam inkubator dalam posisi terbalik 24 – 48 jam.
4. Pindahkan koloni-koloni yang tumbuh ke dalam tabung yang berisi medium yang sesuai.

3. Cara Tuang (Pour Plate Method)

Bahan dan alat :

1. Tiga buah tabung medium TEA tegak
2. Bahan cair yang akan diperiksa
3. Tiga buah cawan petri steril
4. Jarum ose
5. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Cairkan medium dalam penangas air, angkat dan turunkan suhunya sampai mencapai 38° - 40° C.
2. Masukkan beberapa ose bahan cair yang akan diperiksa ke dalam medium mencair tadi.
3. Tuang medium yang sudah diinokulasikan ke dalam cawan petri secara aseptik. Ratakan permukaan agar dalam cawan petri dengan menggoyang-goyangkan secara perlahan-lahan dengan membentuk angka delapan dan biarkan medium mengeras.
4. Inkubasikan selama 24 – 72 jam dalam posisi terbalik.
5. Pindahkan koloni-koloni yang tumbuh ke dalam medium yang sesuai.

d. Isolasi Mikroorganisme dari Substrat Padat

Cara Tabur (Spread Method)

Bahan dan alat :

1. Bahan padat yang akan diperiksa (tanah, tepung, makanan)
2. Lumpang dan alunya
3. Medium TEA dalam labu Erlenmeyer
4. Spatel atau pisau laboratorium
5. Beberapa cawan petri steril
6. Alkohol 70% dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Cairkan medium dalam penangas air, dinginkan dan tuangkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril, biarkan mengeras.
2. Gerus bahan yang akan diperiksa dalam mortar yang sebelumnya sudah disterilkan dengan mencuci sedikit dengan alkohol 70 %.
3. Bersihkan spatel, sterilkan dengan alkohol 70 % dan lewatkan pada nyala api.
4. Ambil sedikit bahan padat yang telah digerus dan taburkan secara merata diatas permukaan medium dalam cawan petri. Tunggu selama 10 menit.
5. Inkubasikan selama 24 – 72 jam dalam posisi normal.
6. Pindahkan koloni-koloni yang tumbuh ke dalam tabung yang berisi medium yang sesuai.

BAB 4

PENGECATAN DAN MORFOLOGI BAKTERI

Bakteri adalah makhluk hidup yang sangat kecil dan hanya dapat dilihat dengan mikroskop, untuk ukurannya digunakan satuan micron. Ukuran bakteri yang biasa diamati di laboratorium berkisar antara $0,5 \mu$ - 2μ (lebar) dan 1μ - 5μ (panjang). Pengukuran bakteri dilakukan dengan menggunakan mikrometer yang diletakkan pada lensa okuler (ocular micrometer) yang skalanya dibandingkan dengan mikrometer yang terdapat pada kaca objek (stage micrometer).

Bentuk bakteri ada tiga macam :

1. Bulat (coccus) 
2. Batang (bacillus) 
3. Melengkung, melilit (pseudomonas), spiral (vibrio) 



Bacillus megaterium

Escherichia coli

Diplococcus pneumoniae

Hemophilus influenzae

Mycoplasma

Diagram menurut skala ukuran sel-sel prokariot

Karena ukurannya yang kecil dan sangat tipis, bakteri akan tembus cahaya sehingga sukar diamati dibawah mikroskop. Untuk itu perlu dilakukan pemberian zat warna yang lazim disebut pengecatan. Pengecatan bakteri sudah dilakukan sejak awal berkembangnya ilmu tentang mikroorganisme yakni pertengahan abad ke 19 oleh Louis Pasteur dan Robert Koch. Pada pengecatan bakteri, terjadi proses pertukaran ion-ion zat warna dengan ion-ion protoplasma.

Umumnya zat – zat warna yang digunakan ada 2 (dua) macam yaitu :

1. Zat warna yang bersifat asam, komponen warnanya adalah anion, biasanya dipakai dalam bentuk garam natrium.
2. Zat warna yang bersifat basa (alkalis), komponen warnanya adalah kation, biasanya dipakai dalam bentuk clorida.

Larutan – larutan zat warna yang digunakan pada pengecatan adalah larutan-larutan encer dengan konsentrasi tidak lebih dari 1%. Larutan encer yang dibiarkan agak lama , umumnya bekerja lebih baik dari larutan pekat yang bekerja dalam waktu yang singkat.

Pemantek (mordant)

Pemantek dapat diartikan sebagai suatu zat/bahan yang sanggup membentuk suatu persenyawaan yang tidak larut bersama dengan zat warna sehingga melekat dalam sel bakteri. Bahan tersebut antara lain adalah amonium oksalat, fenol, asam tanat, garam-garam Al, Fe, Zn, Ti, Cu, Cr dll. Pemantek diberikan pada saat :

- sebelum penambahan bahan cat
- kedalam larutan bahan cat
- antara pemakaian dua larutan bahan cat.

JENIS - JENIS PENGECATAN

a. PENGECATAN SEDERHANA

Pengecatan sederhana bertujuan untuk melihat bentuk dan ukuran bakteri serta membedakan bakteri dari benda-benda mati lainnya yang bukan bakteri. Larutan cat hanya terdiri dari satu bahan cat yang dilarutkan dalam suatu bahan pelarut. Zat yang lazim digunakan antara lain karbol fuchsin, kristal violet dan methylen blue.

Bahan dan Alat :

1. Biakan murni Bakteri dalam medium NB/NA
2. Larutan zat warna

3. Gelas objek dan kaca penutup.
4. Ose
5. Lampu spiritus
6. Batang pengaduk

Cara Kerja :

Pembuatan Preparat

1. Bersihkan gelas objek dengan sehingga bebas lemak.
2. Berikan tanda pada Ujung bagian atas gelas objek.
3. Ambillah secara aseptis biakan bakteri dengan menggunakan ose, lalu buat film yang tipis pada permukaan gelas objek.
4. Keringkan di udara atau dengan hawa hangat dari api.
5. Lakukan fiksasi dengan cara menyentuhkan bagian belakang gelas objek tiga kali berturut-turut pada ujung api.
6. Dinginkan kembali dan preparat siap untuk dicat.

Fiksasi adalah melekatkan bakteri pada gelas objek, mematikan baktyeri dengan cepat agar tidak banyak berubah. Fiksasi dilakukan setelah preparat kering.

b. PENGECATAN GRAM

Pengecatan GRAM pertama kali dilakukan oleh CHRISTIAN GRAM (1884). Pengecatan ini melalui tahapan berikut :

1. Preparat bakteri (film bakteri) dicat dengan cat utama (larutan kristal violet)
2. Mengintensifkan warna dengan menggunakan larutan mordant (larutan encer jodium.)
Sampi tahapan ini semua bakteri akan berwarna ungu
3. Pencucian preparat dengan larutan alkohol asam atau campuran alkohol dengan aceton. (dekolorisasi)
4. Pemberian cat imbalan (counter stain) seperti safranin, karbol fuchsin encer, Bismarck brown, atau pyronin B.

Atas dasar pengecatan di atas dapat dibedakan jenis bakteri menjadi 2 (dua) golongan, yaitu :

1. **Bakteri GRAM positif** , yaitu bakteri yang dapat mempertahankan zat warna utama/zat warna yang pertama diberikan padanya (ungu), meskipun telah dilakukan dekolorisasi.

2. **Bakteri GRAM negatif** , yaitu bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna utama/zatwarna pertama yang diberikan padanya setelah didekolorisasi, tetapi memberikan warna sesuai zat warna terakhir yang diberikan.

Reaksi GRAM ini bukanlah suatu ketentuan yang mutlak. Reaksi ini dapat berubah-ubah menurut umur biakan, pH dari medium dan lain-lain. BARTHOLOMEW dan MITTWER (1952) mengatakan bahwa sinar UV dari 2537 Å menyebabkan organisme GRAM positif berubah menjadi GRAM negatif. Karena organisme mati dikatakan bereaksi GRAM negatif, maka besar kemungkinan sinar-sinar UV mempunyai pengaruh destruktif terhadap sel-sel bakteri.

Penyelidikan dalam usaha untuk menerangkan mekanisme pengecatan GRAM belum dimengerti sepenuhnya, tetapi jelasnya bahwa reaksi terhadap pengecatan GRAM dapat menjadi ciri yang tetap dari bakteri. Sifat GRAM positif adalah suatu ciri beberapa sel bakteri yang relatif muda umurnya; semakin tua sel bakteri maka akan akan kehilangan sifat ini dan nampak seperti GRAM negatif. Oleh karena itu dalam melakukan pengecatan sebaiknya dilakukan terhadap biakan muda.

Beberapa sifat bakteri GRAM positif dan GRAM negatif yang ditemukan pada fenomena pengecatan GRAM, antara lain :

Bakteri GRAM positif	Bakteri GRAM Negatif
1. Mengandung Mg-ribonukleat	Tidak mengandung Mg-ribonukleat
2. Sangat sensitif terhadap zat warna trifenilmetan	Kurang sensitif terhadap zat warna trifenilmetan
3. Sensitif terhadap penicillin	Sensitif terhadap streptomycin
4. Resisten terhadap alkali-alkali; Tidak larut oleh KOH 1%	Sensitif terhadap alkali-alkali; larut oleh KOH 1%
5. Batas isoelektris pH 2,5-4,0	Batas isoelektris pH 4,5 – 5,5
6. Biasanya coccus atau batang-batang pembentuk spora(kecuali (Laktobacillus, Corynebacterium) coccus)	Biasanya batang-batang non spora (kecuali Neisseria yang berbentuk
7. Dapat bersifat tahan asam	Tidak tahan asam

Menurut hasil penyelidikan BARTHOLOMEW dan UMBREIT, iodium adalah zat yang essensial untuk reaksi GRAM dan satu-satunya bahan yang bereaksi dengan gugus sulfhidril dari protein,

meskipun gugus ini berada di bagian dalam molekul protein. Ciri GRAM positif dari suatu sel terletak pada Mg-ribonukleat dan ribonukleat dalam kombinasi dengan protein sel, dimana kristal violet serta iodium bereaksi secara kimia.

Bila bakteri GRAM positif yang telah dicat dengan GRAM direaksikan dengan lisozim untuk menghilangkan dinding selnya, maka 'protoplast' yang sudah tidak berdinding tersebut ternyata terwarnakan. 'Protoplast' semacam ini dapat dilunturkan warnanya dengan alkohol. Pengamatan ini menunjukkan :

1. Kompleks kristal violet-iodium terikat pada 'protoplast' suatu bakteri yang tercat oleh GRAM, baik yang berada didalam maupun dipermukaan sel itu.
2. Dinding sel dari bakteri GRAM positif bertindak sebagai barrier terhadap dekolonisasi kompleks kristal violet-iodium oleh alkohol.

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada medium NA umur 24 jam
2. Gelas objek dan kaca penutup
3. Air suling steril
4. Larutan kristal violet (GRAM A)
5. Larutan Mordant Lushol's Iodine (GRAM B)
6. Larutan alkohol-asam / aseton (GRAM C)
7. Larutan Safranin (GRAM D)
8. Jarum ose
9. Pembakar spiritus
10. Alkohol 70 %

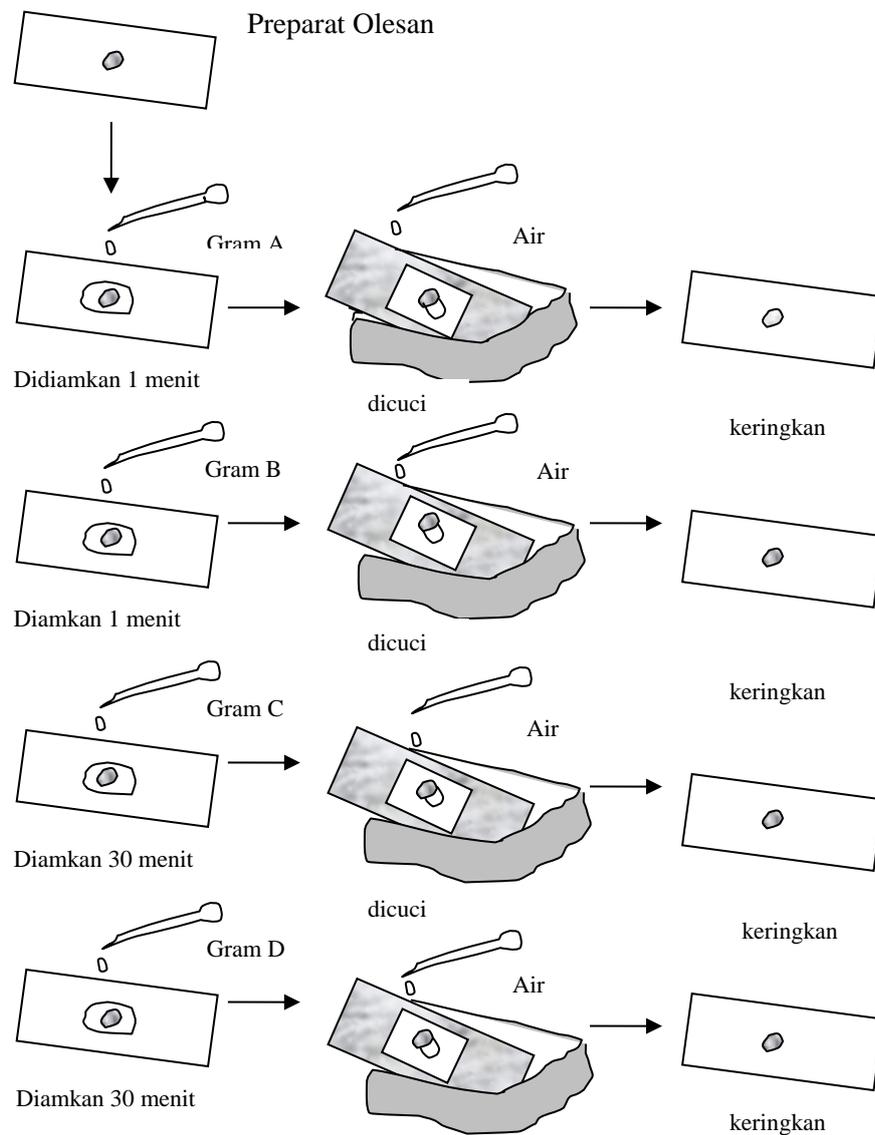
Cara Kerja

1. Siapkan preparat olesan bakteri dengan film yang tipis.
2. Keringkan di udara, setelah kering difiksasi di atas lampu spiritus
3. Setelah dingin, teteskan cat GRAM A sebanyak 2 – 3 tetes, biarkan 1 menit.
4. Cuci dengan air mengalir, keringkan di udara atau kertas isap
5. Teteskan larutan GRAM B, biarkan selama 1 menit.
6. Cuci dengan air mengalir dan keringkan.
7. Teteskan larutan GRAM C, biarkan selama 30 detik.

8. Cuci dengan air mengalir dan keringkan
9. Teteskan larutan GRAM C, biarkan selama 2 menit.
10. Cuci dengan air mengalir dan keringkan
11. Amati dengan mikroskop dengan pembesaran kuat dan menggunakan minyak imersi.
12. Gambar hasil-hasil pengecatan tersebut.

Hasil Pengamatan :

- Bakteri GRAM positif berwarna ungu
- Bakteri GRAM negatif berwarna merah



Tahap-tahap pengecatan GRAM

c. PENGECATAN TAHAN ASAM (Pengecatan ZIEHL NEELSEN)

Beberapa jenis bakteri tertentu dari genus mycobacteria (*M. Tuberculosis*, *M. leprae*, *M. smegmatis*) sukar diwarnai dengan cara pengecatan biasa, tetapi sekali bakteri ini tercat, maka sukar untuk dilunturkan kembali meskipun menggunakan decolorizing agent yang kuat seperti alkohol-asam. Untuk bakteri jenis ini digunakan metoda pengecatan tahan asam.

Beberapa teori menerangkan sifat tahan asam ini, antara lain bahawa sifat tahan asam ini ditentukan oleh adanya sifat permeabilitas yang selektif dari membran cytoplasma. Menonjolnya warna merah disebabkan oleh penyerapan warna dari karbol fuchsin yang larut dalam sel. Kemungkinan lain bahwa sifat tahan asam ini berhubungan dengan masalah kelarutan yang relatif. Kelarutan fuchsin dalam fenol lebih tinggi dibandingkan dalam air atau alkohol-asam, sedangkan kelarutan fenol dalam lipid lebih tinggi dibandingkan kelarutannya dalam air atau alkohol-asam. Dalam pengecatan tahan asam, fenol yang mengandung fuchsin meninggalkan air-alkohol dari larutan karbolfuchsin dan masuk ke dalam lipida sel bakteri yang kelarutannya lebih besar dan tidak dapat dilepaskan dengan pencucian menggunakan alkohol-asam. Membran sel yang utuh menahan lipida yang mengandung zat warna untuk melarut kedalam peluntur warna. Bila membran sel pecah maka lipida akan meninggalkan sel dan sifat tahan asannyapun akan hilang.

Alat dan Bahan

1. Biakan murni *Bacillus subtilis* dan *Mycobacterium sp*
2. Gelas obyek
3. Larutan Ziehl's Carbol Fuchsin
4. Larutan methyl biru dan larutan asam alkohol
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan preparat olesan bakteri
2. Tutuplah olesan dengan kertas isap (lebar kertas isap tidak boleh melebihi gelas obyek)

3. Tetesi kertas isap dengan larutan Ziehl's Carbol Fuchsin sampai jenuh.
4. Panaskan di atas api kecil atau hot plate selama 3 – 5 menit.
5. Angkat kertas isap, cuci preparat dengan air mengalir.
6. Cuci dengan asam alkohol selama 10-30 detik dengan hati-hati dan jangan sampai berlebihan.
7. Cuci dengan air mengalir
8. Tetesi dengan larutan metilen biru selama 30-45 detik, cuci kembali dan keringkan dengan kertas isap.
9. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
10. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan :

- Hasil positif menunjukkan warna merah
- Hasil negatif berwarna biru (zat warna yang ditetesi berikutnya)

Catatan :

1. Alat penetes minyak imersi tidak boleh mengenai preparat untuk menghindari terbawanya bakteri ke dalam botol minyak
2. Pemeriksaan harus dilakukan cukup lama dan teliti, terutama jika jumlah bakteri tahan asam sedikit.
3. Hasil negatif tidak berarti bahwa tidak terdapat *M. Tuberculosis*, karena untuk hasil mikroskopi positif diperlukan paling sedikit 50.000 bakteri /1,0 ml sputum.

d. PENGECATAN GRANULA METAKHROMATIK

Diantara bakteri-bakteri GRAM positif bentuk batang, ada bakteri yang di dalam selnya ditemukan granula polyfosfat yang disebut juga granula metakhromatik atau volutin bodies. Granula polifosfat timbul pada sel-sel yang sudah tua dan tidak ditemukan pada sel-sel yang sedang aktif membelah. Granula ini bersifat khromofil dan metakhromatik yakni mempunyai affinitas kuat terhadap zat-zat warna basa dan seringkali nampak berwarna lain dari zat warna yang diberikan. Granula pada *Corynebacterium* pertama kali diamati oleh BABES dan ERNST

sehingga dinamakan Granula BABEST-ERNST. Pada *Corynebacterium* yang pertumbuhan sel-selnya diperlambat sehingga ada cukup fosfat pada pembedahannya, akan tampak granula berwarna lila (purple) atau biru hitam setelah dicat dengan methylen blue atau toluidine blue. Pada *Corinebacterium diphtheriae* pengecatan tampak

Ada beberapa metoda pengecatan granula metakhromatik, tetapi yang umum digunakan adalah cara pengecatan NEISSER dan ALBERT.

Cara Pengecatan Neisser :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni *Corinebacterium diphtheriae* pada medium NA umur 1 minggu
2. Gelas obyek
3. Larutan cat A (methylen blue)
4. Larutan cat B (kristal violet)
5. Larutan cat C (chrysoidin atau Bismarck brown)
6. Jarum ose dan kertas isap
7. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan preparat olesan
2. Campur secara r.p. larutan A dan B dengan perbandingan 2 : 1
3. Siram preparat yang sudah difiksasi dengan campuran larutan (no.2) diamkan 30 detik
4. Bilas dengan larutan C dan diamkan selama 30 – 60 detik
5. Keringkan dengan kertas saring
6. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
7. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil Pengecatan : - Granula berwarna biru hitam
 - Sitoplasma kuning (chrysoidin)
 - Tengguli (bismarck-brown)

Cara Pengecatan Albert :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni *Corinebacterium diphtheriae* pada medium NA umur 1 minggu
2. Gelas obyek

8. Larutan Albert's stain
9. Larutan mordant.
10. Jarum ose dan kertas isap
11. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan preparat olesan bakteri *Corinebacterium diphteriae*
2. Siram preparat yang sudah difiksasi dengan larutan Albert's stain, diamkan 3 -5 menit
3. Cuci dengan air, kemudian siram dengan larutan mordant, diamkan selama 1 menit.
4. Cuci kembali dengan air dan keringkan dengan kertas saring
5. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
6. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil Pengecatan : - Granula berwarna biru hitam
- Sitoplasma hijau

e. PENGECATAN SPORA

Dalam preparat yang dicat secara konvensional, spora dapat dengan mudah dilihat sebagai benda-benda intraseluler yang refraktil dalam suspensi sel yang tidak tercat dengan kata lain spora tampak sebagai daerah kosong (tidak berwarna). Dinding spora relatif tidak permeabel, tetapi zat-zat warna dapat diserap[dengan memanaskan preparat tersebut. Sifat ini pula yang dapat mencegah dekolorisasi spora oleh alkohol. Spora-spora biasanya dicat dengan malachit green atau karbolfuchsin. Berikut beberapa cara pengecatan spora :

Dalam dunia bakteri pembentukan spora hanya terdapat pada beberapa species saja, khususnya yang terdapat pada famili Bacillaceae, yang terdiri dari 2 (dua) genus :

1. Genus Bacillus yang hidupnya aerob
2. Genus Clostridium yang hidupnya anaerob

Yang perlu diperhatikan dalam pengecatan spora adalah :

- a. Letak spora dalam sel : terminal, subterminal, dan sentral.
- b. Bentuk spora : bulat atau lonjong
- c. Apakah spora mengubah bentuk sel atau tidak

Jika letak spora terminal, bila spora bakteri mengubah bentuk sehingga spora menonjol keluar, maka bentuknya seperti pemukul tambur (ct. *Clostridium tetani*). Bila letaknya sentral atau subterminal dan diameter spora lebih besar dari diameter bakteri, maka bentuknya seperti kumparan.

Bakteri-bakteri berspora terdapat pada luka-luka dalam peperangan atau sebagai kontaminan pada luka-luka terbuka. Kadang-kadang muncul kecenderungan bakteri untuk tidak lagi membentuk spora yang bersifat permanen atau hanya merupakan reaksi sementara terhadap lingkungannya. Pembenihan yang mengandung ekstrak tanah dapat mengembalikan sifatnya semula.

Cara Pengecatan Spora menurut Klein :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri *Clostridium tetani* pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan karbolfuchsin
4. Larutan asam sulfat 1 %
5. Larutan methylen blue
6. Jarum ose dan kertas isap
7. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Sediakan suspensi biakan bakteri dalam larutan garam fisiologis
2. Tambahkan kedalam suspensi itu sama banyaknya larutan karbolfuchsin
3. Panaskan dalam penangas air pada suhu 80° C selama 10 menit
4. Buat preparat dari campuran tersebut dan fiksasi.
5. Celupkan preparat kedalam asam sulfat 1% selama 1 – 2 detik
6. Cuci dengan air
7. Cuci dengan larutan methylen blue selama 3 menit
8. Cuci kembali dengan air, keringkan dengan kertas saring.
9. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
10. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan : - spora berwarna merah
- sel berwarna biru

Cara Pengecatan Ziehl-Neelsen :

Alat dan Bahan

1. Biakan murni bakteri *Clostridium tetani* pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan Ziehl's Carbol Fuchsin
4. Larutan methyl biru
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan preparat olesan bakteri
2. Tutuplah olesan dengan kertas isap (lebar kertas isap tidak boleh melebihi gelas obyek)
3. Tetesi kertas isap dengan larutan Ziehl's Carbol Fuchsin sampai jenuh.
4. Panaskan di atas api kecil atau hot plate selama 3 – 5 menit.
5. Angkat kertas isap, cuci preparat dengan air mengalir.
6. Cuci dengan asam alkohol selama 10-30 detik dengan hati-hati dan jangan sampai berlebihan.
7. Cuci dengan air mengalir
8. Tetesi dengan larutan metilen biru selama 30-45 detik, cuci kembali dan keringkan dengan kertas isap.
9. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
10. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan : - spora berwarna merah
 - sel berwarna biru

Cara Lain :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri *Clostridium tetani* pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan malachite green jenuh (7,6%)

4. Larutan safranin dalam air (0,25%)
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Buatlah preparat bakteri.
2. Siram preparat dengan larutan malachite green dan diamkan selama 10 menit sambil dipanaskan.
3. Cuci dengan air selama kira-kira 10 detik
4. Siram dengan larutan safranin lalu diamkan selama 15 detik
5. Cuci kembali dengan air, keringkan dengan kertas saring.
6. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
7. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan : - spora berwarna hijau
 - sel berwarna merah

f. PENGECATAN KAPSUL

Beberapa bakteri dapat membentuk zat lendir disekitar tubuhnya yang kadang – kadang menjadi padat sehingga merupakan bentuk yang tetap sebagai lapisan luar. Lapisan inilah yang dinamakan kapsul. Kapsul mempunyai affinitas yang kecil terhadap zat-zat warna basa dan beberapa mudah rusak oleh gangguan mekanis (larut bila dicuci dengan air). Karena kapsul dari beberapa spesies berbeda penyusunnya, maka proses pengecatan berbeda pula.

Beberapa cara pengecatan kapsul :

Pengecatan negatif (negative staining methods) menurut Burri-Gins

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan tinta cina
4. Larutan karbolfuchsin
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Suspensikan bakteri dengan larutan fisiologis.
2. Letakkan 1 ose suspensi bakteri pada ujung gelas objek
3. Letakkan disampingnya 1 ose larutan tinta cina
4. Ambil gelas objek lain yang pinggirnya rata dan campur kedua campuran tadi dengan menggerakkan gelas objek (buat preparat hapus)
5. Keringkan dengan fiksasi
6. Siram dengan larutan karbol fuchsin lalu diamkan 10 menit.
7. Keringkan dengan kertas saring.
8. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
9. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan : - Bahan bakteri berwarna merah
 - Kapsul tampak sebagai bagian kosong disekitar tubuh bakteri
 dan sekitar kapsul berwarna gelap.

Cara Pengecatan menurut Anthony :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan kristal violet 1% dalam air
4. Larutan CuSO₄ 20%
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Buatlah preparat yang tipis (bila sampel bukan dari biakan susu, tambahkan skim milk untuk mendapatkan latar belakang yang uniform)
2. Keringkan di udara.
3. Siram dengan larutan kristal violet selama 2 menit
4. Cuci dengan larutan 10 % tembaga sulfat

5. Keringkan di udara dengan posisi tegak.
6. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
7. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil pengecatan :

- kapsul tidak berwarna, terletak pada latar belakang berwarna lila (purple)
- Sel berwarna lebih kelam

Cara Pengecatan menurut Tyler :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 48 - 72 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan cat yang terdiri dari :
 - kristal violet 0,18 gr
 - Asam asetat glacial 0,25 ml
 - Aquadest hingga 100 ml.
4. Jarum ose dan kertas isap
5. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Buatlah preparat yang tipis pada gelas objek
2. Keringkan di udara.
3. Siram dengan larutan cat lalu hangatkan selama 6 menit
4. Cuci dengan larutan 10 % tembaga sulfat lakukan hati-hati dan cepat.
5. Keringkan dengan kertas saring.
6. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
7. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil Pengecatan :

- Kapsul merupakan daerah biru-ungu disekitar bakteri
- Bakteri berwarna biru kelam.

Perhatian :

Hati-hatilah dalam membuat suspensi bakteri karena kapsul mudah larut dalam air.

PENGECATAN DINDING SEL

Bahan dan alat :

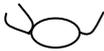
1. Biakan murni *Bacillus cereus* dalam medium NA umur 24 jam.
2. Larutan Cetylpyridinum chlorida
3. Larutan Congo red jenuh dan larutan metal biru
4. Gelas obyek, kertas isap dan jarum ose
5. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Siapkan preparat olesan bakteri
2. Tetesi 3 tetes larutan Cetylpyridinum chloride diatas preparat dan tambahkan 1 tetes larutan congo red jenuh.
3. Goyang-goyangkan gelas obyek sehingga kedua larutan tercampur baik.
4. Cuci dengan air mengalir.
5. Tetesi dengan larutan metal biru selama 10 detik.
6. Cuci dengan air mengalir dan keringkan dengan kertas isap.
7. Amati dibawah mikroskop memakai pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
8. Gambar dan catat hasil pengamatan.

Pemeriksaan Alat Gerak

Seperti halnya makhluk hidup yang lainnya, beberapa bakteri dapat pula bergerak. Organisme ini mempunyai potensi untuk bergerak dengan menggunakan salah satu bagian tubuhnya. Salah satu alat penggerak bakteri adalah flagel, suatu organ berupa benang yang berpangkal pada sitoplasma. Letak dan jumlah flagel dapat menjadi petunjuk determinasi bakteri. Menurut letak dan jumlah flagel, dikenal :

1. Monotrich  : Terdapat satu flagel pada salah satu ujungnya
 2. Amphitrich  : Terdapat satu flagel pada masing-masing ujung
- 

3. lophotrich  : Terdapat lebih dari satu flagel pada salah satu atau kedua ujung nya
4. Peritrich  : Terdapat flagel disekitar tubuhnya
5. Atrich  : Tidak terdapat flagel

g. PENGECATAN FLAGELLA

Bahan dan alat :

1. Biakan murni *Pseudomonas fluorescens* dan *Proteus vulgaris* umur 18 – 22 jam.
2. Larutan Gray's Flagella Mordant
3. Larutan Ziehl's Carbol Fuchsin
4. Tiga tabung air suling steril 1 ml.
5. Kertas isap dan gelas obyek serta jarum ose.
6. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Bilas gelas obyek dengan alkohol 70%, keringkan dengan kertas isap dan lewatkan beberapa kali diatas nyala api.
2. Buat suspensi encer bakteri dalam air suling steril, inkubasikan 10-15 menit, supaya flagella tumbuh dan berkembang (perlakukan dengan hati-hati untuk mencegah putusnya flagella)
3. Ambil satu tetes suspensi bakteri, letakkan pada ujung gelas obyek, miringkan gelas obyek tersebut dan biarkan suspensi mengalir kebawah.
4. Keringkan olesan tersebut dengan tiupan angin (jangan lewatkan di atas api)
5. Tetesi dengan larutan mordant selama 10 menit.
6. Cuci dengan air mengalir.
7. Tetesi dengan Larutan Ziehl's Carbol Fuchsin selama 5 menit.
8. Cuci dengan air mengalir.
9. Amati dibawah mikroskop memakai pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
10. Gambar dan catat hasil pengamatan.

Beberapa cara pemeriksaan gerak, antara lain :

1 Cara mikroskopik (langsung)

a. Pengecatan flagel

Cara menurut Gray :

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 24 jam
2. Gelas obyek
3. Larutan mordant yang dibuat baru terdiri dari :
 - Larutan jenuh potassium alum 5 ml.
 - Asam tanat 20% dalam air 2 ml.
 - Mercurychlorida, lar. Jenuh dalam air 2 ml.(campur lalu tambahkan 0,4 ml larutan jenuh fuchsin basa dalam alkohol)
4. Larutan karbolfuchsin ZN
5. Jarum ose dan kertas isap
6. Aquadest dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Paparkan aquadest pada gelas objek yang bebas lemak kira-kira 2 cm²
2. Ambillah kira-kira sedikit dari satu koloni biakan bakteri dengan ose.
3. Sentuhkan pada beberapa tempat dalam air di permukaan gelas objek, lalu putar perlahan-lahan.
4. Keringkan diudara. Jangan dipanaskan.
5. Siram perlahan-lahan dengan larutan mordant. Biarkan selama 10 menit.
6. Cuci perlahan-lahan dengan aquadest.
7. Siram dengan karbolfuchsin ZN. Biarkan 5 – 10 menit.
8. Cuci dengan air dan keringkan di udara
9. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat dengan menggunakan minyak imersi.
10. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil Pengecatan : Flagel berwarna merah trengguli

Tebal dan panjang flagel pada bermacam-macam spesies berbeda. Panjang flagel biasanya beberapa kali panjang selnya. Pada *Proteus vulgaris* misalnya, hanya mencapai 12 milimikron dan ukuran ini jauh lebih kecil dari ukuran gelombang cahaya yang terpendek yang dapat dilihat dengan mata. Inilah sebabnya maka flagel tidak dapat dilihat secara natif atau dalam preparat pengecatan biasa. Bila dilakukan dengan pengecatan Gray, maka permukaan flagel itu

dilapis dengan endapan dari suspensi koloid (mordant), sehingga merupakan lapisan yang dapat dicat dan menjadi lebih tebal.

b. Natif (preparat tetes gantung). Bakteri nampak bergerak, flagel tidak nampak.

Alat dan Bahan :

1. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 24 jam
2. Gelas obyek cekung dan gelas penutup
3. Vaseline
4. Jarum ose dan kertas isap
5. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan gelas objek cekung dan kaca penutup
2. Olesi tepi bagian cekung dari gelas objek dengan vaselin secara merata
3. Letakkan 1 ose suspensi bakteri ditengah-tengah gelas penutup.
4. Gelas objek dibalik sehingga bagian cekung menghadap gelas penutup dan tempelkan gelas objek pada gelas penutup sedemikian sehingga tetesan suspensi bakteri berada di tengah-tengah cekungan.
5. Balik gelas objek secara cepat sehingga gelas penutup berada diatas gelas objek dan suspensi bakteri bergantung pada gelas penutup di tengah-tengah cekungan.
6. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 X dan 45 X
7. Catat dan gambar hasil pengamatan.

Hasil Pengamatan : Gerak positif apabila bakteri tampak bergerak berpindah tempat, bukan gerak bergetar atau gerak menurut aliran cairan yang disebabkan oleh goyangnya meja.

Perhatian :
- dalam melakukan pengamatan, preparat tidak boleh mengering.
- Cahaya harus dikurangi
- Jika menggunakan gelas objek datar , maka pemeriksaan harus dilakukan cepat sebelum preparat kering

2. Cara makroskopik (tidak langsung)

Dengan cara ini pergerakan bakteri dapat diamati dalam pembenihan

3. Pembenihan setengah padat (semi solid medium)

Alat dan Bahan :

- 1) Biakan murni bakteri pada medium NA umur 24 jam
- 2) Tabung reaksi
- 3) Erlenmeyer
- 4) Ose lurus
- 5) Medium Bulyon Agar
- 6) Jarum ose dan kertas isap
- 7) Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan medium Bulyon Agar dengan konsentrasi 0,1 – 0,2 %
2. Tuang agar ke dalam tabung reaksi
3. Sterilkan medium lalu biarkan memadat secara tegak
4. Ambil bakteri dengan ose lurus dan tusukkan ke medium secara tegak lurus.
5. Inkubasi pada suhu 37° C selama 16 – 24 jam

Hasil Pengamatan :

- Bila bakteri tidak dapat bergerak : pertumbuhan hanya tampak di sekitar tempat tusukan berupa garis tebal putih.
- Bila bakteri dapat bergerak : maka tempat tusukan hampir tidak tampak, tetapi perbenihan disekitar tempat tusukan menjadi keruh, bahkan sampai ke dinding tabung.

4. Pengamatan menurut Craigie (Craigie tube method)

Alat dan Bahan :

- i. Biakan murni bakteri pada medium NA umur 24 jam
- ii. Tabung besar / botol mulut lebar
- iii. Tabung kecil dengan kedua ujungnya terbuka
- iv. Erlenmeyer
- v. Ose lurus
- vi. Medium Bulyon Agar
- vii. Jarum ose dan kertas isap
- viii. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus.

Cara Kerja :

1. Siapkan medium Bulyon Agar dengan konsentrasi 0,1 – 0,2 %
2. Tuang agar ke dalam botol
3. Sterilkan medium lalu biarkan memadat secara tegak

4. Tanam tabung kecil yang kedua ujungnya terbuka tegak lurus sedemikian sehingga sebagian tabung menonjol keluar medium
5. Tanam bakteri kedalam tabung kecil
6. Inkubasi pada suhu 37° C selama 16 – 24 jam

Hasil Pengamatan :

- Bakteri yang dapat bergerak akan keluar dari tabung kecil dan tumbuh di medium sekitar tabung kecil.

BAB 5

MORFOLOGI PARASIT KAPANG DAN KHAMIR

Untuk mengetahui nama genus dan spesies suatu biakan mikroorganisme, perlu dilakukan identifikasi. Tahap pertama untuk melakukan identifikasi adalah pengenalan ciri-ciri morfologi mikroorganisme tersebut. Pengamatan morfologi biasanya dilakukan baik secara makroskopik (dengan mata telanjang), maupun mikroskopik. Untuk mengidentifikasi kelompok khamir dan bakteri disamping ciri morfologinya, masih harus dilengkapi dengan sifat-sifat fisiologi dan biokimia.

Morfologi Kapang

A. Pengamatan Mikroskopik

Bahan dan alat :

1. Cawan Petri yang berisi medium yang sesuai dengan kapang yang akan diamati (PDA, CDA).
2. Biakan murni kapang
3. Jarum inokulasi
4. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus

Cara kerja :

I. Genus *Aspergillus*

- a. Pindahkan sedikit biakan kapang dari tabung yang berisi biakan murni dengan jarum tanam ke dalam cawan petri yang berisi medium CDA atau PDA.
- b. Inkubasikan selama 4 – 15 hari pada suhu kamar
- c. Amati setiap hari :
 1. Perubahan warna yang timbul pada koloni
 2. Keadaan permukaan koloni (rata, menggunung, seperti tepung, berbutir-butir, beludru atau seperti kapas).
 3. Ada tidaknya garis-garis radial : adanya garis atau lingkaran konsentris (zonation)
 4. Ada tidaknya kleistitesia
 5. Ada tidaknya exudates drops serta warnanya

6. Ada tidaknya bau yang khas
7. Keadaan bagian belakang koloni..

II. Genus *Rhizopus*

- a. Ambil sedikit biakan kapang yang murni dan letakkan di atas permukaan medium pada cawan petri yang berisi medium PDA dan MEA.
- b. Inkubasikan selama 3 – 7 hari pada suhu kamar.
- c. Amati setiap hari :
 - 1) Koloni secara umum (tinggi atau rendah pada permukaan medium serta warnanya)
 - 2) Keadaan permukaan koloni (seperti kapas, tepung, butur-butir kasar)
 - 3) Ada tidaknya exudates drops
 - 4) Keadaan bagian belakang koloni
 - 5) Amati pula dengan menggunakan kaca pembesar (loupe) bagian miselium yang menempel pada dinding cawan petri dan hitung jumlah fesikelnya).

Pengamatan Mikroskopik

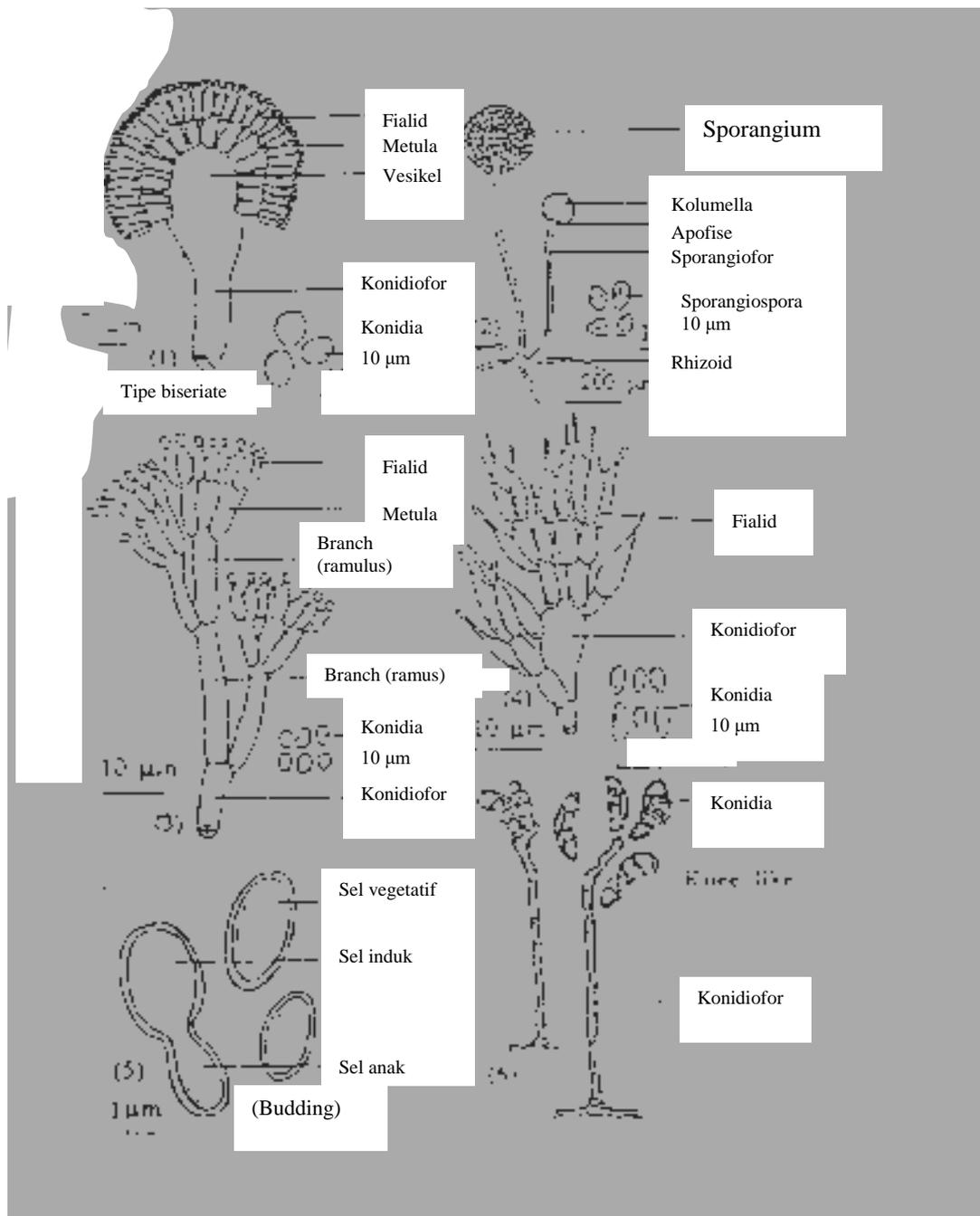
Bahan dan alat :

1. Biakan murni *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium sp.*
2. Gelas obyek dan kaca penutup
3. Larutan lactofenol cotton blue
4. Jarum tanam tajam
5. Jarum preparat
6. Alkohol dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Bersihkan gelas obyek dan kaca penutup dengan alkohol 70 % sampai bebas lemak, kemudian teteskan beberapa tetes lactofenol atau lactofenol cotton blue di atas permukaan gelas obyek tersebut.
2. Ambil sedikit koloni biakan dengan jarum inokulasi, letakkan dalam tetesan lactofenol dan uraikan dengan jarum preparat dengan cara hati-hati. Usahakan misellium basah terkena lactofenol.
3. Tutuplah dengan kaca penutup sedemikian rupa sehingga tidak terdapat gelembung udara dalam preparat. Bersihkan kelebihan lactofenol dengan kertas hisap.

4. Amati dengan mikroskop memakai lensa obyektif pembesaran 10x, kemudian dengan pembesaran 40x. Untuk melihat morfologi konidia atau spora, gunakan pembesaran 97x atau 100x.
5. Catat dan gambar semua yang diamati seperti : miselium (bercabang atau tidak, berseptum atau tidak, halus atau kasar), sterigma, konidia, spora, konidiofor, kolumela, vesikula, zigospora, klamidiospora, metula, fialid, stipe.



Gambar 8. Morfologi Kapang :

1. *Aspergillus oryzae*; 2. *Rhizopus oryzae*; 3. *Penicillium sp*;

4. *Paeciomyces variotii*; 5. *Saccharomyces cereviceae*;
6. *Curvularia lunata*

Morfologi Khamir

Khamir atau *yeast* adalah fungi yang bersel tunggal dan tidak membentuk misellium. Meskipun begitu ada beberapa spesies diantaranya dapat membentuk misellium semu (pseudomycellium). Morfologi khamir lebih sederhana daripada kapang dan ukurannya lebih besar daripada bakteri.

Bahan dan alat :

1. Biakan murni khamir *Saccharomyces cereviceae* dan *Saccharomycosis fibuligera* dalam medium YMA atau CMA umur 72 jam.
2. Larutan Methylen blue
3. Gelas obyek dan kaca penutup
4. Jarum ose
5. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Bersihkan kaca obyek dengan alkohol 70% sampai bebas lemak.
2. Teteskan sedikit larutan methylen blue di atas gelas obyek
3. Ambil sedikit biakan khamir dengan memakai jarum ose, letakkan dalam tetesan Methylen blue, dan tutuplah dengan kaca penutup.
4. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x
5. Gambar dan catat : bentuk sel, ada tidaknya pertunasan (budding), banyaknya tunas (budding) pada tiap sel, askospora, miselium semu (pseudomycellium).

Morfologi bakteri

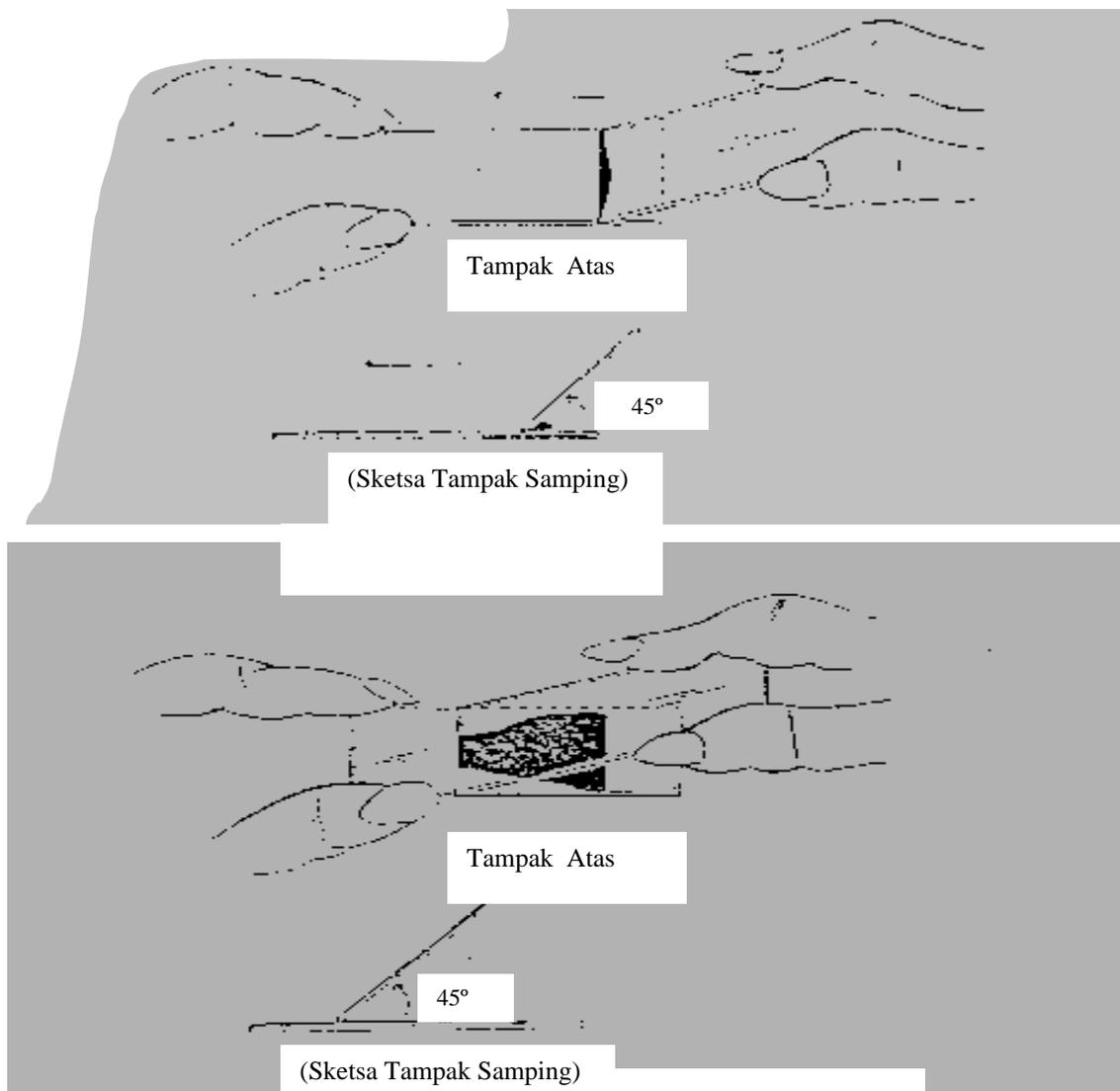
Sel bakteri tidak berwarna, sehingga sukar untuk diamati secara langsung. Untuk mempermudah pengamatan morfologi bakteri diperlukan pewarnaan. Proses pewarnaan bakteri lazimnya disebut pengecatan.

Bahan dan alat :

1. Biakan murni *Bacillus cereus* dalam medium NA umur 24 jam.
2. Larutan nigrosin
3. Gelas obyek
4. Jarum ose
5. Alkohol 70 % dan pembakar spiritus

Cara kerja :

1. Bersihkan gelas obyek dengan alkohol 70 % sehingga bebas lemak
2. Teteskan larutan nigrosin di atas gelas obyek
3. Ambil sedikit biakan bakteri dengan jarum ose dan letakkan dalam tetesan nigrosin tersebut.
4. Ratakan tetesan nigrosin dengan memakai obyek yang lain, kerjakan seperti pada gambar 9.
5. Biarkan preparat mengering
6. Amati dibawah mikroskop dengan pembesaran kuat 97x atau 100x dengan menggunakan minyak immersi.



Gambar 9. Cara meratakan nigrosin

DAFTAR PUSTAKA

1. Collin,C.H. & Lyne, 1976, *Microbiological Methods*, 4th, ed. London-Boston,Butter worths.
2. Cowan,S.T.,1974, Cowan and steel,s *Manual for the Identification of Medical Bacteri*, 2nd, ed. Cambridge Univercity Press, Cambridge,London,New York
3. Jutono,Y.,Soedarsono,S., Hartadi,S., Suhadi & Soesanto, 1973, *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi*, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yokyakarta.
4. Pelezar,MJ.,& E.C.S. Chan, 1977, *Laboratory Exercises in Microbiology*, 4th,ed., Mc.Graw-Hill Book Company, New Delhi.
5. Seeley,H.W., & P.J.van Demark, 1972, *Microbes in Action*, H.W. Freeman and Company, San Fransisco.
6. Fardiaz,S.,1987, *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Pangan*, Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian,IPB,Bogor.
7. Wheel,M.L. & W.P. Segel, 1979, *Laboratory Manual Introduction to the Microbial World*, Prentis Hall Inc, New York.
8. Brotowidjoyo, Mukayat Djarubito. 1990. *ZOOLOGI DASAR*. Erlangga. Jakarta.
9. Djuhanda, T. 1983. *Anatomi dari Empat Spesies Hewan Vertebrata*. Armico. Bandung
10. Jasin, Maskoeri. 1992. *ZOOLOGI VERTEBRATA untuk Perguruan Tinggi*. Sinar Wijaya. Surabaya.
11. Kimball, J. W. 1983. *Biologi*. Jilid III. Erlangga : Jakarta.
12. Mintohari, dkk. 2005. *Hewan-Hewan Vertebrata*. Prima Jaya. Bandung
13. Neil A. Campbell dkk. 2003. *BIOLOGI Edisi Kelima-Jilid 2*. Erlangga. Jakarta.
14. Martini, F. H. 2005. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. 7thEdition. Benjamin Cummings.
15. Mescher, A. L. 2009. *Junqueira's Basic Histologi: Text and Atlas*. 12th Edition. McGraw-Hill Medical, English.

16. Priyono, S. M. and Subiandono. 1991. *Identification of Live Mammals, Live Birds and Reptiles In Procording The Cities Plants and Animals Seminar for Asia and Oceania Region*. PHPA. Jakarta
17. Sukiya. 2003. *Biologi Vertebrata*. Yogyakarta press. Universitas Negeri Yogyakarta.
18. Syamsuri,Istamar. 2004. *Biologi*. Widya Utama. Jakarta
19. Weichert, Charles K. 1984. *Element of Chordate Anatomy*. 4th Edition. New Delhi: Mc Graw Hill Publishing Company Limited.
20. <https://www.edubio.info/2015/02/kelompok-pisces.html> (Februari 2015)
21. <http://www.personal.cytiu.edu.hk/~bhproj/fishbasic>(13 April 2010)
22. <http://www.amonline.net.au/fishes>(9 Maret 2010)
23. <http://www.microscopyu.com/galleries>(9 Maret 2010)
24. <http://www.4.bp.blogspot.com>(15 April 2011)
25. <http://bioweb.uwlax.edu>/23 April 2011
26. [http:// www.desnaikhsandra.blogspot.com](http://www.desnaikhsandra.blogspot.com)(23 April 2011)
27. <http://www.google.com/gambar>(3 Mei 2011)
28. <https://kidskunst.info/3/14600-house-lizard-drawing.htm> (Februari 2019)
29. <http://www.animalsworlds.com/internal-birds-anatomy.html>

LAMPIRAN I

KOMPOSISI MEDIUM SINTETIS

Endo Agar

Bahan	:	Pepton	10	g
		Laktosa	10	g
		K ₂ HPO ₄	3,5	g
		Agar	15	g
		Basic Fuchsin	0,5	g
		Na ₂ SO ₃	0,5	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut.
Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Gelatin

Bahan	:	Gelatin	150	g
		Air suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut.
Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Glukosa Phenol Red Broth (GPRB)

Bahan	:	Glukosa	0,5	g
		Trypticase	10	g
		NaCl	5	g
		Fenol Merah	0,018	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut.
Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Kligler Iron Agar (KIA)

Bahan	:	Pepton dari kasein	15	g
		Pepton dari daging	5	g
		Meat Extract	3	g
		Yeast Extract	3	g
		NaCl	5	g
		Laktosa	10	g
		D(1) glukosa	1	g
		Amonium besi (III) sitrat	0,5	g
		Na ₂ SO ₃	0,5	g
		Fenol Merah	0,024	g
		Agar	15	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit.

Koser Citrate Agar

Bahan	:	NaCl	5	g
		MgSO ₄ 7H ₂ O	0,28	g
		(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	g
		K ₂ HPO ₄	1	g
		Asam sitrat	2	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut. Atur pH 6,8. Saring dengan menggunakan rorong gelas. Sterilisasi pada suhu 115°C selama 20 menit.

Lactosa Broth (LB Tunggal)

Bahan dan cara sama dengan LB tunggal hanya konsentrasinya 2 kali lipat.

Malt Extract Agar (MEA)

Bahan	:	Beef Extract	3	g
		Pepton	5	g
		Laktosa	5	g
		Brom Thymol Blue	1	ml
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan semua bahan dalam air suling kecuali glukosa, panaskan sampai semua bahan larut, saring dan atur pH 7,5. Tambahkan glukosa. Sterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit. Untuk pengujian tambahkan Methyl red dengan komposisi 0,04 g ditambahkan etanol 40 ml diencerkan sampai volume 100 ml dengan air suling.

Motility Medium

Bahan	:	Gelatin	80	g
		Pepton	10	g
		Extract Beef	3	g
		NaCl	5	g
		Agar	30	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Oksidasi dan Fermentasi (OF Medium)

Bahan	:	Pepton	2	g
		NaCl	5	g
		K ₂ HPO ₄	0,3	g
		Agar	3,8	g
		Brom Thymol Blue 0,2%	15	ml
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut, atur pH 7,5, tambahkan indikator. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pepton 1%

Bahan	:	Pepton	10	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Potato Dextrosa Agar (PDA)

Bahan	:	Potato	200	g
		Dextrosa	10	g
		Agar	15	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Larutkan bahan dalam air suling, panaskan sampai semua bahan larut, atur pH 7,5, tambahkan indikator. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Starch Agar (SA)

Bahan	:	Pepton	5	g
		Beef Extract	3	g
		Soluble starch	2	g
		Agar	2	g
		Air Suling	1000	ml

Tauge Extract Agar (TEA)

Bahan	:	Tauge	100	g
		Sukrosa	60	g
		Agar	15	g
		Air Suling	1000	ml

Cara Kerja : Rebus tauge sampai mendidih selama 2-3 jam, saring dengan kapas dan cukupkan volumenya 1000 ml. Larutkan agar dan sukrosa. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.