MODUL

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DAN PARASITOLOGI

Disusun Oleh :

PRODI S1 KEBIDANAN

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BENGKULU

Visi dan Misi

PROGRAM S1 KEBIDANAN

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

Visi

Menghasilkan Lulusan Profesi Bidan yang Berbudaya, Unggul dan Profesional Dalam Menjalankan Praktik Kebidanan Holistik Berdasarkan *Evidence Based Midwifery* dengan Penerapan

Interprofessional Education

Misi

1. **Menyelenggarakan dan mengembangkan pendidikan akademik dan profesi bidan yang berbudaya, unggul dan profesional pada pelayanan kebidanan holistik berdasarkan *evidence based midwifery* dengan menerapakan Interprofessional Education (IPE)**
2. **Meningkatkan kualitas penelitian dan publikasi ilmiah yang berkontribusi pada IPTEK dan *evidence based midwifery* melalui pendekatan lintas profesi (*Interprofessional Collaboration*/IPC)**
3. **Menyebarluaskan ilmu pengetahuan dan teknologi melalui kegiatan pengabdian masyarakat bidang asuhan kebidanan yang berorientasi pada pengembangan kesehatan masyarakat khususnya kesehatan ibu dan anak.**
4. **Menerapkan sistem tata kelola yang dapat dipertanggungjawabkan;**
5. **Meningkatkan kerjasama bidang pendidikan dan penelitian dengan berbagai institusi tingkat nasional dan internasional**

LEMBAR PENGESAHAN

Modul Praktikum Mikrobiologi Dan Parasitologi Ini sah untuk digunakan di
PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BENGKULU

Disusun oleh :

Linda Yulyani, SST., M.Keb
Asmariyah, SST., M.Keb

Disahkan oleh :

Koordinator Program Studi S1 Kebidanan

Yetti Purnama, SST., M.Keb
NIP. 197705302007012007

1. PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

A. Pendahuluan

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

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

B. Alat dan Fungsinya

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

1. Inkubator

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

Gambar Inkubator

2. Autoklaf

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

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

a b.

Gambar a. Autoklaf manual; b. Autoklaf otomatis

3. Oven

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

Gambar Oven

4. Mikroskop

   Alat ini adalah alat bantu untuk melihat struktur yang tidak terlihat dengan mata telanjang. Mikroskop cahaya dapat melihat struktur mikroorganisme berupa jamur, alga dan bakteri. Adapun virus dapat dilihat dengan bantuan mikroskop electron. Mikroskop tersedia dalam berbagai macam jenis, sesuai dengan kebutuhan pengamatan yang diinginkan.

Gambar Mikroskop

5. Timbangan (Neraca) Analitik

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

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

Gambar Neraca analitik digital

6. *Biological Safety Cabinet*

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

Gambar *Biological safety cabinet*

7. *Laminar airflow cabinet*

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

Gambar Laminar Airflow Cabinet

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

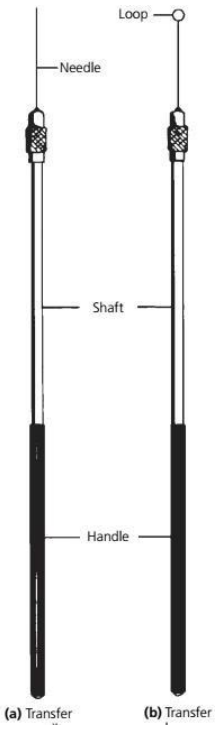
Gambar *Colony Counter*

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

Gambar *Vortex mixer*

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

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



Gambar Jarum Ose

11. Cawan petri

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

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

Gambar Cawan petri

12. Batang penyebar (*Spreader*)

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

Gambar Spreader

13. Gelas ukur (*Measuring cylinder*)

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

Gambar Gelas Ukur

14. Labu Erlenmeyer

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

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

Gambar Erlenmeyer

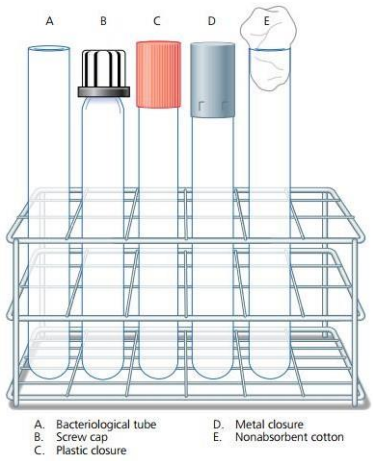
15. *Beaker Glass*

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

Gambar *Beaker Glass* (Gelas Kimia)

16. Tabung reaksi

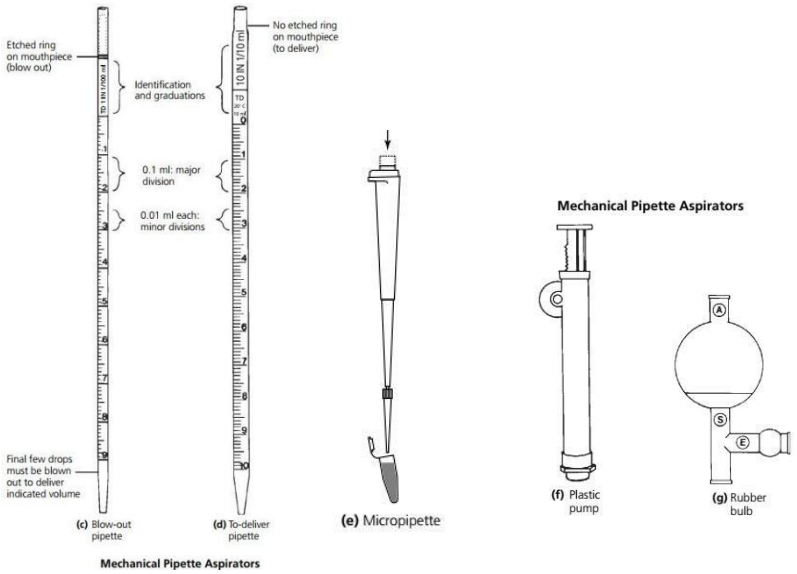
Tabung reaksi digunakan untuk mengkultur mikroba dan melakukan percobaan dengan berbagai medium serta uji-uji biokimiawi. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik, atau *alumunium foil*.



Gambar Tabung Reaksi

17. Pipet

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



Gambar Berbagai macam pipet dan aspirator

C. Tujuan Praktikum

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

D. Alat dan Bahan

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

E. Prosedur Praktikum

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

F. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

Nama : _____ Tanggal :_____

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

No	Alat	Prinsip Kerja
1	Inkubator	
2	Timbangan analitik	
3	Oven	
4	Autoklaf	
5	*Laminar Air Flow Cabinet*	

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

No	Alat	Prinsip Kerja
1		
2		
3		
4		
5		

2. PENGENALAN DAN PENGGUNAAN MIKROSKOP CAHAYA

A. Pendahuluan

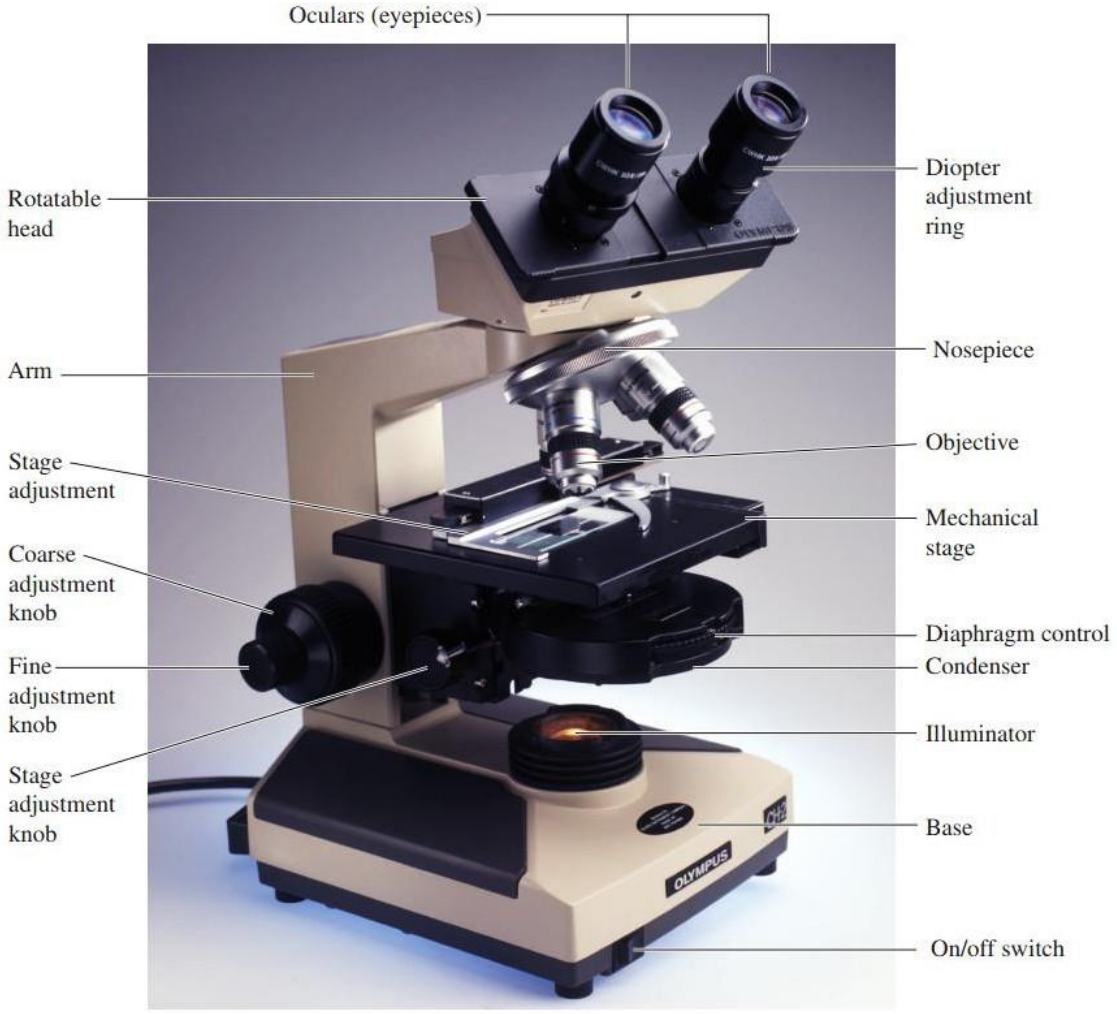
Mikroskop adalah alat bantu yang digunakan untuk pengamatan struktur mikroskopis, yaitu struktur yang tidak dapat teramati dengan mata telanjang. Mikroskop sangat beragam sesuai dengan tujuan akhir yang diinginkan. Tipe mikroskop yang menghasilkan bayangan akhir 2 dimensi adalah *compound microscope*, sedangkan mikroskop yang mengahasilkan bayangan tiga dimensi adalah mikroskop stereo atau disebut juga dengan diseecting microscope karena dapat digunakan untuk membedah objek yang berukuran kecil.

Beberapa jenis mikroskop antara lain Mikroskop cahaya (brightfield), Mikroskop medan gelap (Darkfield), Mikroskop fase kontras (Phase contrast). Mikroskop cahaya adalah mikroskop yang membiarkan cahaya sinar lewat secara langsung ke mata tanpa dibelokkan oleh pelat buram di kondensor. Mikrsokop cahaya mendapatkan sumber cahaayanya dari pantulan cahaya matahari atau dari lampu mikrokop yang ada pada bagian bawah mikroskop. Mikroskop cahaya adalah mikrsokop yang ummnya digunakan pada laboratorium Biologi, MIkrobiologi dan Laboratorium sains pada umumnya (Gambar 2.1).

Berikut fungsi bagian-bagian mikroskop cahaya :

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

17. *Fine focus knob* (sekrup fokus halus) Menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat
18. *Observation tube securing knob* (sekrup pengencang tabung okuler)
19. *Condenser adjustment knob* (sekrup pengatur kondenser) untuk menaik-turunkan kondenser



Gambar mikroskop cahaya beserta bagiannya (Benson, 2021)

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui dan mampu menjelaskan bagian mikroskop beserta fungsinya
2. Mahasiswa mampu menggunakan mikroskop dalam pengamatan jamur maupun bakteri

C. Alat dan Bahan

1. Mikroskop
2. *Object glass*
3. *Cover glass*
4. Larutan pati
5. Lugol
6. Potongan huruf "a"

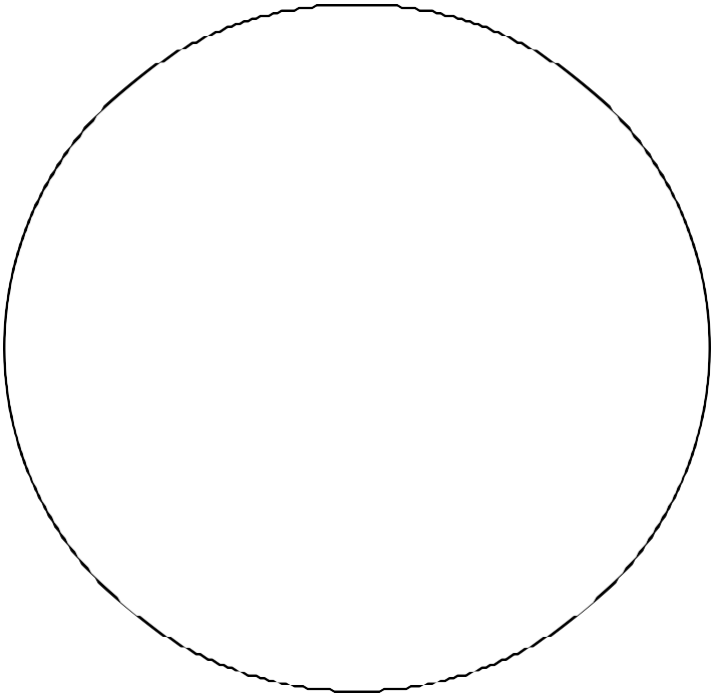
D. Prosedur Praktikum

- **Pengamatan Huruf "a"**
  1. Letakkan potongan kertas berhuruf "A" pada gelas obyek dan tutup dengan gelas penutup.
  2. Amati dengan perbesaran lemah (10x10)\
  3. Amati apakah bayangan benda sama atau terbalik dan gambarkan!
  4. Sambil memandang ke dalam lensa okuler, geser preparat dari kiri ke kanan dan dari atas ke bawah. Amati kemana bayangan bergerak!
  5. Ubahlah lensa objektif ke perbesaran yang lebih besar. Amati apakah ada perubahan luas bidang pandang!
  6. Beberapa diameter bidang pandang mikroskop pada objektif lemah (mm) dan berapa pada objektif kuat?
- **Pengamatan butir pati pada umbi kentang**
  1. Sayat tipis umbi kentang dengan silet, letakkan sayatan pada permukaan gelas obyek yang telah diberi setets air, selanjutnya tutup dengan gelas penutup.
  2. Amati di bawah mikroskop sel-sel penyusun umbi tersebut, serta butir-butir pati di dalamnya.
  3. Teteskan larutan iodin pada tepi kanan kaca penutup dan pada tepi kiri kaca penutup kemudian tempelkan kertas hisap/ tisu.
  4. Amati gambar di bawah mikroskop dan gambar perubahan yang terjadi pada butir- butir pati tersebut.
- **Hal-hal yang perlu diperhatikan**
  1. Peganglah erat-erat lengan mikroskop dengan tangan kanan, sedang tangan kiri digunakan untuk menyangga kaki mikroskop.

2. Meja preparat tetap horizontal untuk mencegah agar preparat tidak jatuh. Meja preparat
   dengan posisi miring juga kurang baik untuk pengamatan preparat segar, karena media
   (air) akan mengalir ke bawah, sehingga preparat menjadi kering dan tidak dapat diamati.
3. Bersihkan lensa dengan kertas lensa (tisu khusus untuk lensa)
4. Pengamatan dengan menggunakan dua mata (pada mikroskop dengan lensa binokuler)
5. Gunakan perbesaran lemah dulu, kemudian setelah obyek yang akan anda amati ditemukan, gunakan perbesaran yang lebih besar. Gantikan lensa objektif lemah dengan
   objektif kuat tanpa mengubah pengatur fokus kasar. Gunakan pengatur fokus halus untuk
   mendapatkan bayangan yang jelas.
6. Bersihkan semua kotoran yang ada pada mikroskop dengan menggunakan kertas tisu.

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

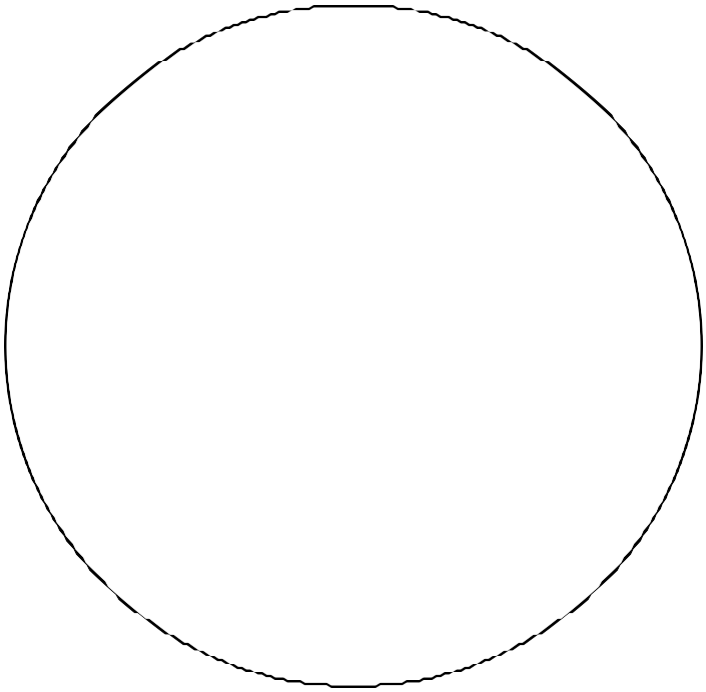
1. Hasil Pengamatan Huruf “a”



Penjelasan hasil pengamatan :

Kesimpulan :

2. Hasil Pengamatan Pati



Penjelasan hasil pengamatan :

Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi lensa objektif pada mikroskop cahaya?
2. Apa fungsi kondensor ?
3. Apa fungsi pengatur halus ?
4. Apa fungsi pengatur kasar ?
5. Bagaimana sifat bayangan dari mikroskop cahaya?
6. Mengapa meja praparat mikroskop harus dalam posisi horizontal?
7. Bagaimana struktur pati pada kentang?
8. Warna apa yang terlihat setelah pati ditambahkan lugol ?

3. STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA MIKROBIOLOGIS

A. Pendahuluan Sterlisasi

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

Terdapat beragam cara agar kita dapat mencapai kondisi steril. Sterilisasi berdasarkan caranya dibagi ke dalam metode fisik, metode kimia dan metode mekanik. Metode kimia menggunakan bahan kimia dalam proses sterilisasi. Metode mekanik menggunakan penyaringan dalam proses sterilisasi. Sedangkan metode fisik menggunakan penyinaran dan pemanasan, yaitu panas lembab dan panas kering. Sterilisasi yang akan kita lakukan pada praktikum kali ini yaitu metode fisik dengan menggunakan pemanasan.

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

Sterilisasi panas kering

Sterilisasi panas kering dilakukan dengan memasukkan alat yang akan disterilkan ke dalam oven dengan suhu sekitar 160°C selama minimal 2 jam. Panas kering dapat digunakan pada alat dan bahan yang tahan panas. Peralatan dan bahan yang tidak tahan panas akan rusak jika disterilisasi dengan panas kering. Hal lainnya yang perlu diingat untuk sterilisasi panas kering tidak menggunakan air.

Sterilisasi panas lembab

Sterilisasi panas lembab dilakukan dengan memasukkan alat yang akan disterilkan ke dalam autoklaf. Autoklaf akan mensterilkan peralatan dan bahan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 ATM. Dengan demikian maka dihasilkan panas dan uap air yang

bertekanan. Pada sterilisasi panas lembab digunaka air, sehingga pada hasil akhir sterilisasi peralatan dan bahan akan menjadi basah karena adanya uap air. Sebelum memasukkan alat dan bahan ke dalam autoklad biasanya dilakukan persiapan dengan membungkus atau menyumbat peralatan tersebut. Cawan biasanya dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas, Sedangkan wadah erlenmeyer dan tabung reaksi dapat disumbat dengan menggunakan kapas, kapas kemudian dibungkus lagi dengan plastik tahan panas atau *aluminium foil*.

Media mikrobiologis

Pembiakan mikroorganisme dalam laboratorium memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai. Zat hara digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Secara umum media biakan mengandung air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen dan *trace element*. Dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleosida.

Media berdasarkan bentuk

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

Media berdasarkan kandungan kimia

Secara kimiawi, media biakan dibedakan menjadi media sintetis, nonsintetis (Alami) dan semi sintetis. Pada media sintetis kandungan dan isi bahan yang ditambahkan diketahui secara terperinci. Media sintetis digunakan untuk mempelajari sifat fisiologis dan genetik mikroba. Senyawa anorganik dan organik yang ditambahkan dalam media harus murni, sehingga harganya seringkali mahal.

Media nonsintetis menggunakan bahan yang terdapat di alam yang biasanya tidak diketahui kandungan kimianya secara rinci. Contohnya media ekstrak daging (*beef extract*), ekstrak kentang, pepton, ekstrak ragi (*yeast extract*) dan kaldu daging. Terkadang ditambahkan darah, serum, vitamin, asam amino atau nukleosida.

Media semi sintetis merupakan media yang mengandung bahan sintetis dan bahan alami. Contoh media jenis ini adalah *Blood agar plate* (Agar darah).

Media berdasarkan kegunaannya

Media umum (universal)

Media ini digunakan secara umum artinya media ini dapat ditumbuhi oleh berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur misalnya NA (*Nutrient agar*). Sedangkan media yang merupakan media tempat tumbuhnya jamur adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*).

Media selektif

Media ini dipakai untuk menyeleksi mikroorganisme yang diinginkan, jadi hanya satu jenis atau satu kelompok mikroorganisme saja yang dapat tumbuh dalam media ini. Contoh media selektif yaitu SSA (*Salmonella shigella agar*). SSA umumnya digunakan sebagai .media khusus dalam isolasi cemaran bakteri *Salmonella* atau *Shigella* dari makanan maupun minuman yang tercemar.

Media diferensial

Media ini digunakan untuk menyeleksi mikroorganisme. Medium ini dapat ditumbuhi berbagai jenis mikroorganisme tapi salah satu diantaranya dapat memberikan salah satu ciri yang khas sehingga dapat dibedakan dari yang lain dan dapat dipisahkan. Contoh media ini adalah *Eosine Methylene Blue Agar* (EMBA) merupakan media yang digunakan untuk membedakan *Escherichia coli* dengan bakteri gram negatif lain.

Media diperkaya (*enriched media*)

Medium ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme untuk keperluan tertentu. Dibiakkan dalam medium ini supaya sel-sel mikroorganisme tertentu dapat berkembang dengan cepat sehingga diperoleh populasi yang tinggi. Contoh media ini adalah *Blood Agar,* dan *Chocolate Agar*.

B. Tujuan Praktikum

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

C. Alat dan Bahan

7. Autoklaf
8. Oven
9. Media Bakteri (*Nutrient Agar*)
10. Media Jamur (*Potato Dextrose Agar*)
11. Kertas HVS atau kertas sampul cokelat
12. Kapas
13. Batang pengaduk
14. Erlenmeyer
15. Cawan petri
16. Tabung reaksi
17. Gelas kimia
18. Plastik tahan panas
19. Kapas
20. Karet gelang

D. Prosedur Praktikum

Prosedur Sterilisasi

1. Bungkus cawan petri dengan kertas HVS kemudian masukkan ke dalam plastik tahan panas. Alat gelas yang lain dibungkus menggunakan *alumunium foil* dan atau plastik tahan panas.
2. Isilah autoklaf dengan aquades setinggi batas sarangan, masukkan alat dan bahan (media) yang akan disterilisasi.
3. Aturlah suhu sebesar 121^{o}C, dengan tekanan 1 atm dan aturlah waktu yang akan digunakan sampai pada angka 15-20 menit.
4. Tutup autoklaf dan pastikan dalam kondisi terpasang rapat.
5. Pastikan lubang uap dalam keadaan tertutup (EXHAUST CLOSE)
6. Tarik tuas power ke arah ON, lalu tekan tombol ON (push) untuk memulai sterilisasi, apabila lampu merah menyala maka dapat dipastikan autoklaf dalam keadaan bekerja.

7. Setelah alarm berbunyi maka tarik tuas power hingga ke titik OFF kemudian bukalah lubang uap dengan cara memutarnya kearah OPEN.
8. Diamkan autoklaf selama 15 menit atau lebih untuk mematikan bahwa uap telah keluar dan autoklaf dalam keadaan tidak panas.
9. Cek suhu sebelum membuka autoklaf. Bukalah tutup autoklaf dan keluarkan alat- alat yang telah steril

Prosedur Pembuatan Media

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

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

Tabel Hasil Pengamatan Media Mikrobiologis

Nama Media	Warna media sebelum disterilisasi	Warna media setelah disterilisasi	Keterangan
NA			
PDA			
……			

Penghitungan takaran media
Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa yang dimaksud dengan sterilisasi?
2. Sebutkan jenis-jenis steriliasi!
3. Mengapa suhu autoklaf harus mencapai 121^{o}C?
4. Apa fungsi media mikrobiologis?
5. Mengapa mikroorganisme harus ditumbuhkan di dalam media?

4. ISOLASI MIKROORGANISME

A. Pendahuluan Isolasi

Mikroorganisme yang ada di alam secara alami berjumlah banyak dan beraneka ragam. Pada aplikasi diagnosis, penelitian dan pemeriksaan mikrobiologi lebih lanjut maka dibutuhkan pemisahan mikroorganisme dari populasinya. Agar dapat memisahkan mikoorganisme yang menjadi target pemeriksaan maka harus dilakukan isolasi mikroorganisme dari lingkungan aslinya ke media mikrobiologis. Isolasi adalah proses memindahkan atau memisahkan satu jenis mikroorganisme dari lingkungan aslinya ke media mikrobiologis sampai mendapatkan kultur (biakan) murni. Biakan murni adalah biakan yang hanya terdiri dari satu jenis mikroorganisme saja. Jika bakteri maka hanya terdiri dari satu jenis bakteri saja dan jika jamur maka hanya terdiri dari satu jenis jamur saja.

Aseptik

Agar dapat memisahkan satu jenis mikroorganisme dari popuasinya maka kita harus yakin tidak ada kontaminasi pada isolat kita. Oleh karenanya proses isolasi harus dilakukan secara aseptik. Aseptik adalah teknik yang meminimalisir masuknya kontaminasi. Kontaminasi disini dapat berupa mikroorganisme maupun bagian tubuh mikroorganisme yang beresiko mengkontaminasi. Target aspetik adalah menjaga (mempertahankan) kondisi terbebas dari segala bentuk kehidupan (steril). Cara kerja aspetik dimulai dengan membersihkan tangan dan peralatan yang akan digunakan. Mempersiaplan bahan dan peralatan steril yang dibutuhkan. Membersihkan meja kerja dengan menyemprotkan desinfektan pada permukaan meja serta membakar ose saat akan melakukan inolulasi. Dan berbagai persiapan lainnya sesuai dengan yang dibutuhkan saat kerja di laboratorium mikrobiologi.

Pengambilan sampel

Sebelum mikroorganisme diisolasi langkah pertama yang kita lakukan adalah melakukan pengambilan sampel yang akan kita pelajari. Sampel tersebut kemudian kita inokulasikan ke media mikrobiologis. Inokulasi atau penanaman adalah pemindahan mikroorganisme

dari suatu tempat ke tempat yang baru. Pengambilan sampel harus dilakukan secara aseptik. Sampel dikelompokkan menjadi dua, sampel padat dan sampel cair.

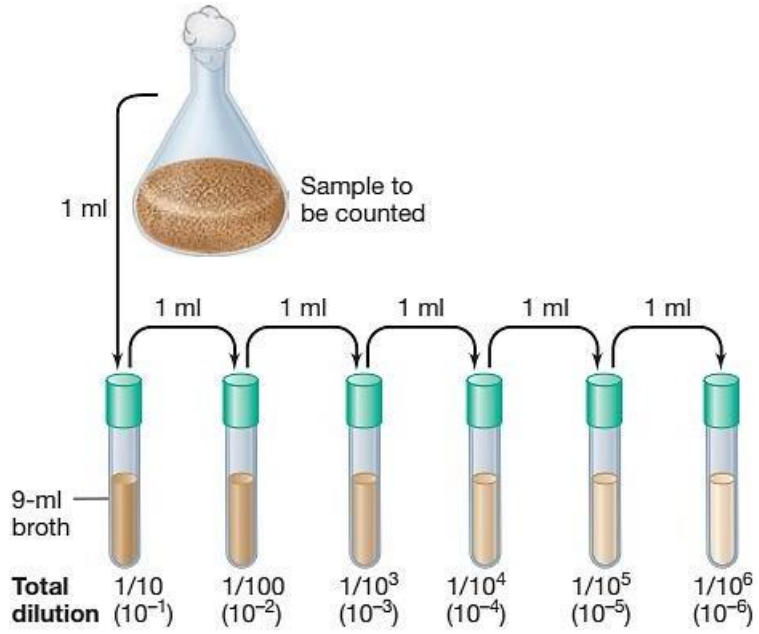
Sampel padat biasanya tidak langsung diinokulasikan. Sampel padat biasanya dilarutkan ke pelarut berupa NaCl fisiologis, akuades steril dengan pH netral atau pelarut lainnya, disesuaikan dengan jenis sampelnya. Sampel padat yang keras atau sulit larut akan dihancurkan dulu sebelum dilarutkan. Namun sampel padat juga dapat langsung diinokulasikan ke media, sesuai dengan kebutuhan isolasi. Sampel cair umumnya tidak dilarutkan. Setelah sampel diambil maka dapat langsung dilakukan inokulasi atau penanaman sampel ke dalam media mikrobiologis.

Teknik Pengenceran Bertingkat

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1:9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya**.** Adapun teknik pengenceran dapat dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

a. Sampel yang mengandung bakteri dimasukan ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10^{-1}) secara aseptik (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1:9 dan ingat akuades yang digunakan jika memakai teknik rinse dan swab sudah termasuk pengencer 10^{-1}. Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya.

b. Diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptik kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan. pipet steril yang baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.



Gambar Teknik pengenceran

Teknik Penanaman

Teknik penanaman dari suspensi

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

1) *Spread Plate* (Cawan sebar)

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut :

a) Ambil suspensi cairan senamyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.

b) Batang L atau batang drugal diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.

c) Kemudian disebarkan dengan menggosokannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

d) Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroorganisme dapat mati karena panas.

2) *Pour Plate* (Cawan tuang)

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat (>45°C) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar). Sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya oksigen dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

a) Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair (>45^{o}C)

b) Teteskan 1 ml secara aseptik suspensi sel kedalam cawan kosong

c) Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian media diinkubasi

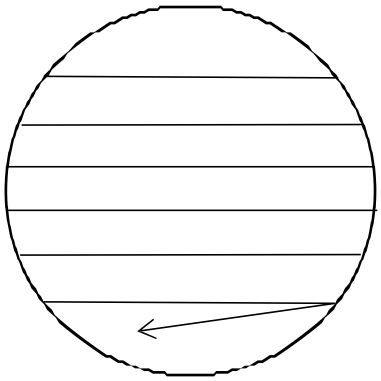
Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk spread plate dan 1 ml untuk *pour plate* karena *spread plate* ditujukan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada *spread plate*.

Teknik penanaman dengan goresan (*streak*)

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

1. Goresan Sinambung (*Full Streak*)

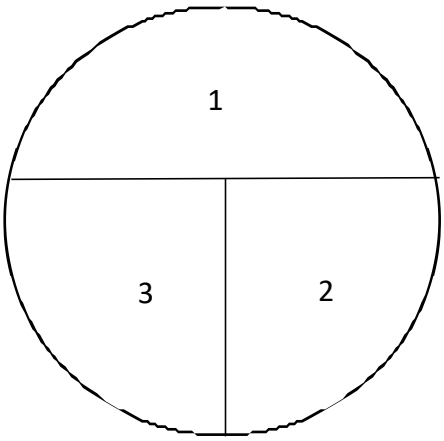
Cara kerja : sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar, lanjutkan goresan sampai habis.



Gambar Goresan Sinambung

2. Goresan T

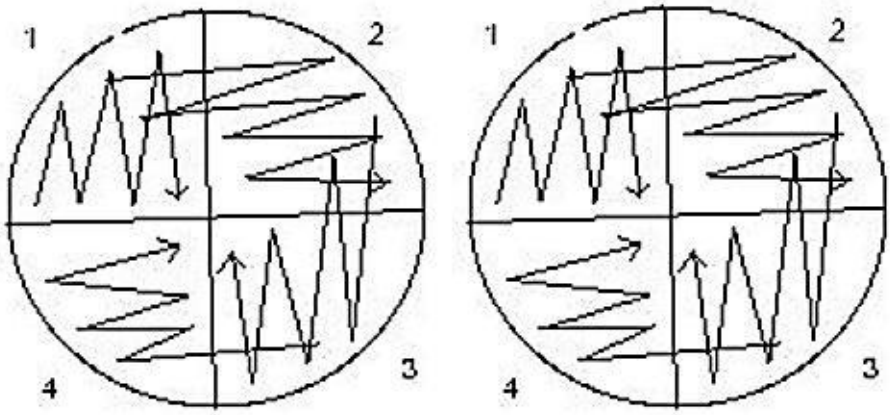
Cara kerja : bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker. Inokulasi daerah 1 dengan gores zig-zag. Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan gores zig-zag pada daerah 2. Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna. Lakukan hal yang sama pada daerah 3.



Gambar Goresan T

3. Goresan Kuadran (*Quadrant streak*)

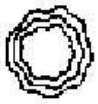
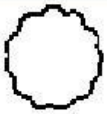
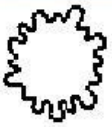
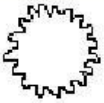
Cara kerja : hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroba. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.



Gambar Goresan Kuadran

Parameter pengamatan morfologi mikrobiologi

Setelah mikroorganisme yang ditumbuhkan berhasil tumbuh maka ada parameter pengamatan yang harus diamati pada pertumbuhan mikrorganisme. Parameter pengamatan bakteri lebih banyak dibandingkan dengan parameter pengamatan jamur. Pada pertumbuhan bakteri parameter yang diamati antara lain bentuk koloni pada cawan petri, elevasi, warna koloni, tekstur, dan ukuran koloni. Sedangkan secara umum pada jamur parameter yang diamati adalah warna koloni, elevasi, bentuk dan margin.

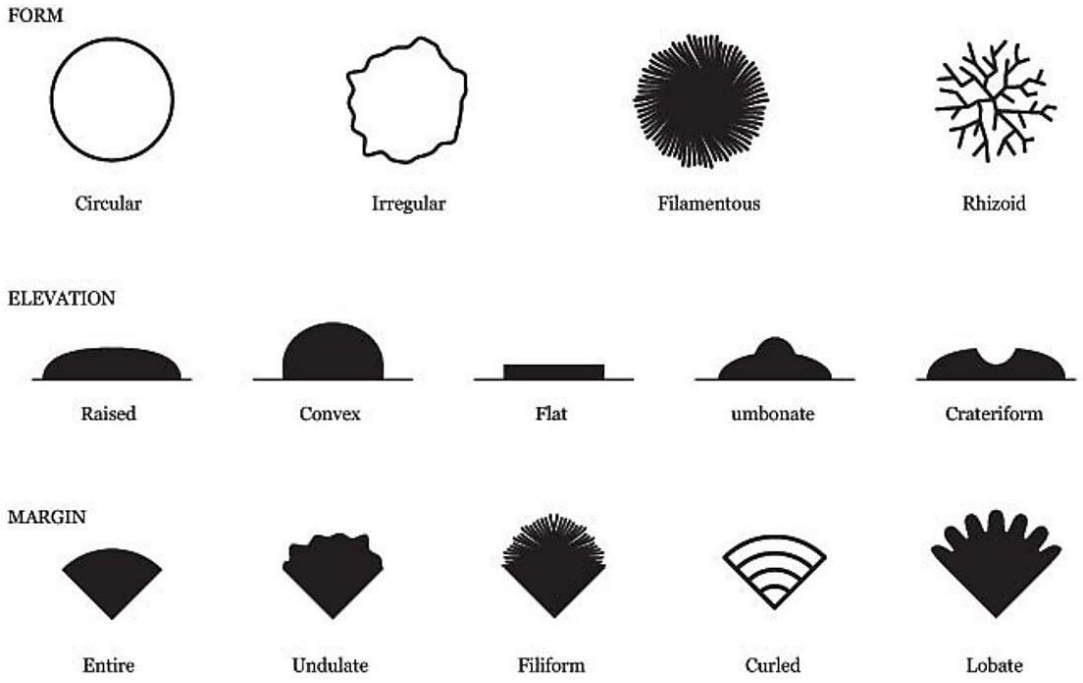
MARGIN	COLOUR	ELEVATION	TEXTURE	SHAPE
 Curled	Orange	Raised	Slimy, moist	Round
Entire (smooth)	Red or pink	Umbonate	Matte, brittle	Punctiform
Filamentous	Black	Flat	Shiny, viscous	Rhizoid (root-like)
 Undulate (wavy)	Brown	Convex	Dry, mucoid	Filamentous
 Lobate	Opaque or white	Pulvinate (Cushion-shaped)	Translucent	Irregular
 **Erose (serrated)**	**Milky**	**Growth into culture medium**	**Iridescent (changes colour in reflected light)**	**Spindle**

Source: MicroDok

Colony Size

Punctiform: <1 mm
Small: 1-2 mm
Medium: 3-4 mm
Large: >5 mm

Gambar parameter pengamatan koloni bakteri



Gambar parameter pengamatan koloni jamur

B. Tujuan Praktikum

7. Mahasiswa mengetahui prinsip isolasi mikroorganisme dan mampu melakukan isolasi mikroorganisme
8. Mahasiswa mengetahui prinsip aseptik dan mengaplikasikannnya dalam praktikum
9. Mahasiswa dapat mengevaluasi hasil isolasi mikroorganisme yang telah dilakukan

C. Alat dan Bahan

1. Media NA steril
2. Media PDA steril
3. Cawan Petri
4. NaCl fisiologis
5. *Cotton bud* steril
6. Ose
7. Spidol permanen
8. Plastik *seal*
9. Inkubator

D. Prosedur Praktikum

Prosedur Isolasi Mikroorganisme

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Ambil cawan yang berisi media steril. Dengan menggunakn spidol permanen buatlah 4 zona yang sama besar dibagian belakang cawan.
3. Celupkan *cotton bud* ke akuades steril, kemudian usaplah bagian tempat pengambilan sampel. Jika sampel basah maka tidak perlu mencelupkan cotton bud ke akuades steril.
4. Setelah itu goreskan *cotton bud* ke cawan petri steril dengan gerakan zig-zag. Masukkan *cotton bud ke* gelas piala yang sudah disediakan.
5. Ulangi untuk sampel berikutnya dengan menggunakan *cotton bud* yang baru.
6. *Seal* cawan dan Inkubasi cawan petri di inkubator
7. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam

Prosedur Biakan murni

1. Bersihkan meja secara aseptik. Siapkan peralatan yang dibutuhkan atur dengan rapi diatas meja
2. Bakar ose sampai membara, dinginkan
3. Ambil koloni yang diinginkan menggunakan jarum Ose kemudian goreskan pada media dengan menggunakan teknik goresan T atau kuadran.
4. Seal cawan dan Inkubasi cawan petri di inkubator
5. Amati biakan mikroorganisme yang tumbuh setelah 24 jam

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

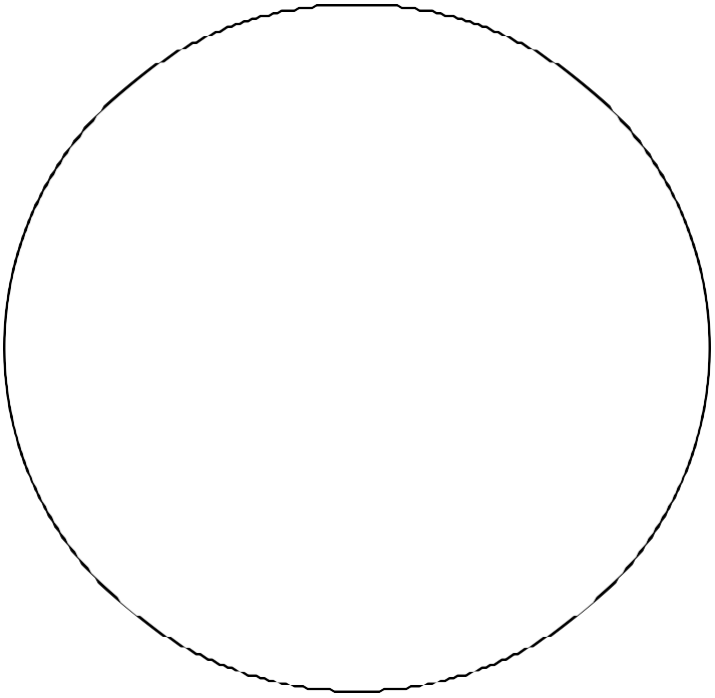
Tabel Data pengambilan sampel media NA

No Zona	Sampel	Koloni (isi dengan ada/tidak, diisi setelah pengamatan)
1		
2		
3		
4		

Tabel Data pengambilan sampel media PDA

No Zona	Sampel	Koloni (isi dengan ada/tidak, diisi setelah pengamatan)
1		
2		
3		
4		

1. Hasil Pengamatan Isolasi Bakteri



Penjelasan hasil pengamatan

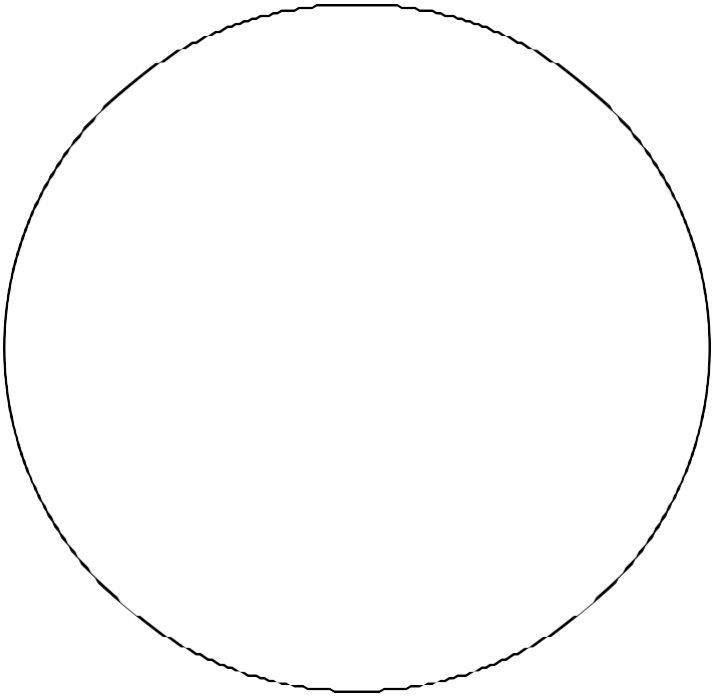
Jumlah koloni bakteri

Ukuran koloni bakteri

Warna koloni bakteri

Kesimpulan :

2. Hasil Pengamatan Isolasi Jamur



Penjelasan hasil pengamatan

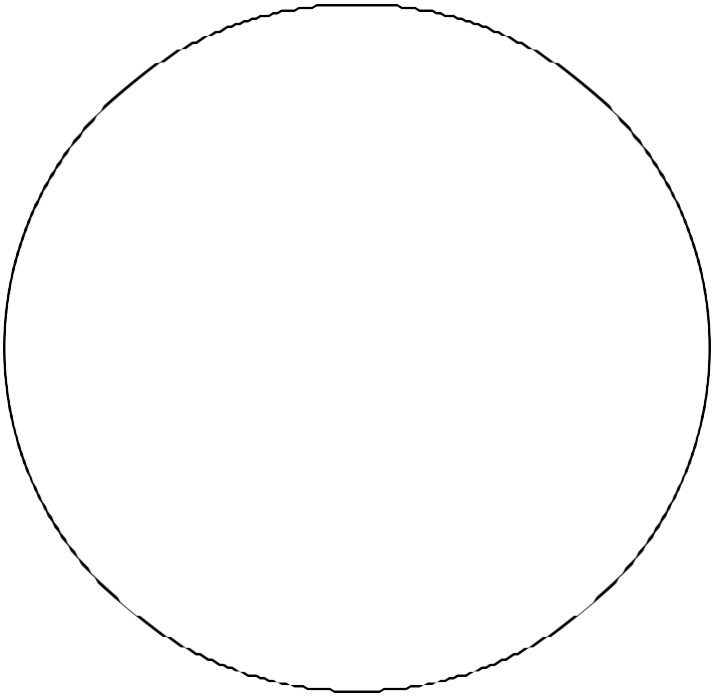
Jumlah koloni jamur

Ukuran koloni jamur

Warna koloni jamur

Kesimpulan :

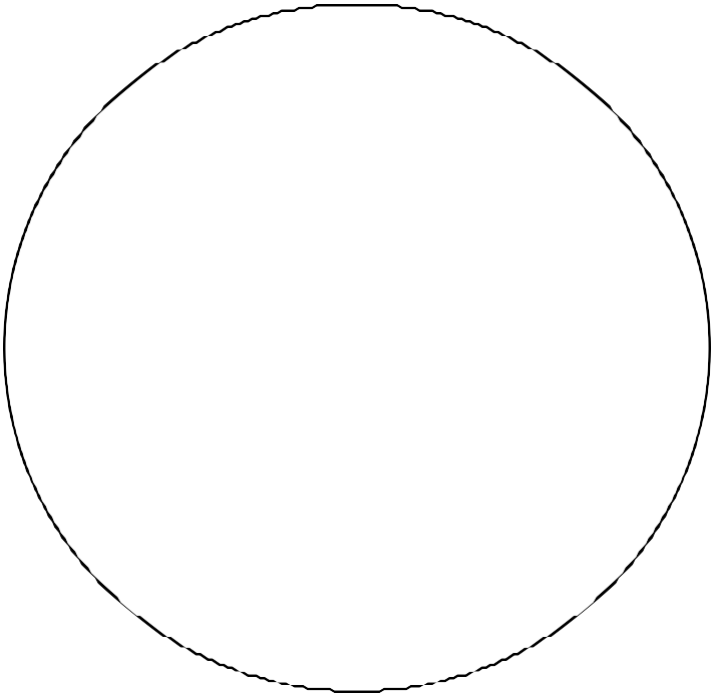
3. Hasil Pengamatan Biakan Murni Bakteri



Penjelasan hasil pengamatan (Jelaskan berhasil tidak memperoleh biakan murni)

Kesimpulan :

4. Hasil Pengamatan Biakan Murni Jamur



Penjelasan hasil pengamatan :
(Jelaskan berhasil tidak memperoleh biakan murni)

Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa yang dimaksud dengan isolasi?
2. Mengapa isolasi dilakukan?
3. Apa perbedaan metode *pour plate* dengan *spread plate*?
4. Apa fungsi teknik gores kuadran?
5. Mengapa harus melakukan teknik aseptik?

5. PEWARNAAN MIKROORGANISME

A. Pendahuluan

Pewarnaan Sederhana dan Pewarnaan Diferensial

Sebelum mikroorganisme diamati di bawah mikroskop maka perlu dilakukan pewarnaan . Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memperjelas struktur yang akan diamati di bawah mikroskop. Karena umumnya mikrooganisme tidak berwarna ketika diamati dibawah mikroskop. Selain itu pewarnaan juga dapat berperan dalam mengamati struktur tertentu seperti flagel dan endospora pada bakteri. Fungsi lain dari pewarnaan adalah untuk membedakan suatu kelompok bakteri dengan bakteri lainnya. Hal ini diaplikasikan pada pewarnaan Gram dan pewarnaan bakteri tahan asam (BTA).

Pewarnaan sederhana adalah pewarnaan yang digunakan untuk dapat melihat struktur mikrooganisme secara umum. Pewarnaan ini hanya menggunakan satu jenis zat warna. Beberapa contoh pewarna untuk pewarnaan sederhana adalah pewarna *methylene blue, lactophenol cotton blue,* Safranin, *Carbol fuchsin* dan nigrosin.

Pewarnaan diferensial biasanya digunakan untuk membedakan struktur tertentu dengan struktur lainnya. Selain itu pewarnaan diferensial juga berfungsi dalam membedakan kelompok bakteri yang satu dengan bakteri lainnya. Beberapa contoh pewarnaan diferensial adalah pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, pewarnaan flagela dan pewarnaan BTA.

Pada bab praktikum ini kita akan melakukan pewarnaan Gram. Hasil akhir pewarnaan Gram adalah warna ungu pada bakteri Gram positif. Sedangkan hasil akhir pada pewarnaan Gram negatif adalah warna merah. Bakteri Gram positif adalah bakteri yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tebal. Sedangkan bakteri Gram negatif adalah bakteri yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan lebih tipis dari Gram positif. Karakteristik utama dinding sel bakteri Gram positif adalah tebalnya lapisan peptidoglikan pada dinding sel. Akibatnya, pada saat prosedur pewarnaan Gram, meninggalkan warna ungu. Tidak seperti dinding sel Gram positif, dinding sel Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis. Hal ini menyebabkan lunturnya warna ungu saat pembilasan dengan alkohol.

B. Tujuan Praktikum

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

C. Alat dan Bahan

1. Media padat berisi biakan bakteri
2. Kristal violet
3. Iodin
4. Safranin
5. *Methylene blue*
6. Ose
7. Minyak imersi
8. Spidol permanen
9. Gelas objek
10. *Cover Glass*
11. Lampu spirtus
12. Akuades steril

D. Prosedur Praktikum

- **Pembuatan ulasan bakteri**

Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Berikut ini cara membuat preparat ulas:

o Ulasan pada Biakan Cair

1. Bersihkan kaca objek dengan kapas yang dibasahi alkohol

2. Bari label pada sudut kaca

3. Kocok tabung berisi suspensi bakteri kemudian ambil 2 mata ose suspensi dan ulaskan di bagian tengah kaca objek

4. Biarkan mengering di udara sebentar

5. Fiksasi di atas api untuk membunuh dan melekatkan mikroba pada kaca objek

i. Ulasan pada Biakan Padat

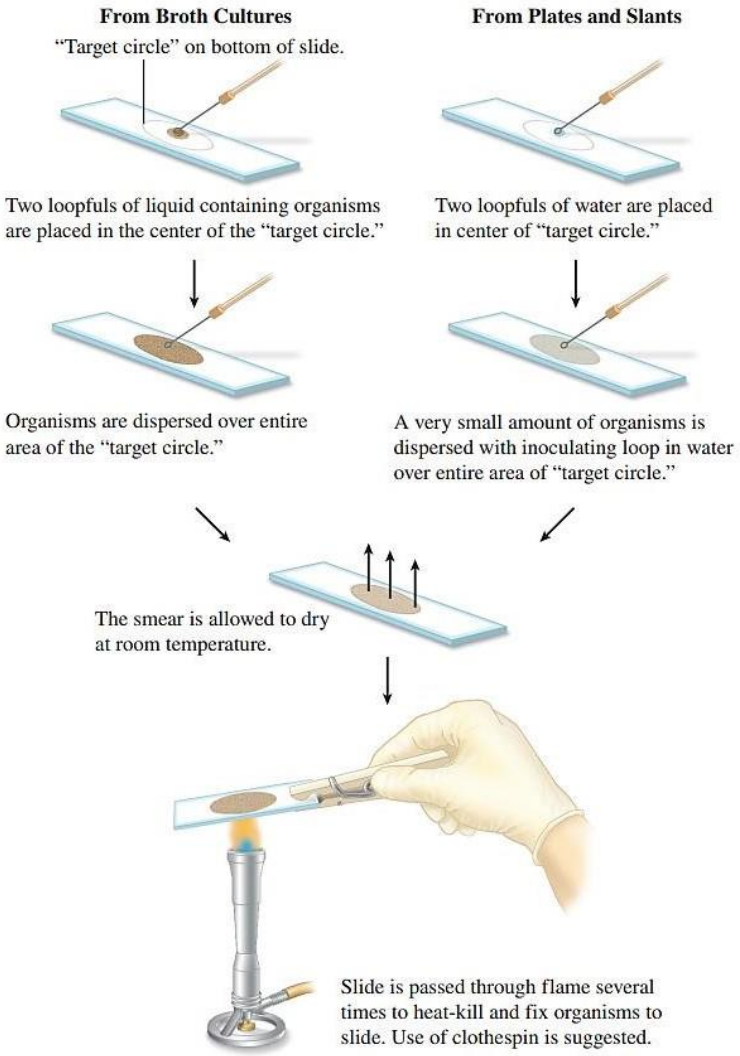
1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol

2. Beri label pada sudut kaca

3. Teteskan 2 mata ose garam fisiologis atau akuades steril di atas kaca objek

4. Lalu ambil satu ose biakan bakteri dari koloni di atas medium padat, campurkan dengan akuades steril secara merata. Ulaskan campuran ini di atas kaca objek

5. Keringkan di udara sebentar



6. Fiksasi di atas api

Gambar Teknik Membuat Ulasan Bakteri

- Pewarnaan Sederhana

1. Buat preparat ulas.

2. Beri larutan zat warna, dapat menggunakan larutan biru metilen atau larutan karbol fukhsin basa ataupun safranin.

3. Biarkan zat warna selama 30 detik.

4. Cuci dan keringkan dengan hati-hati menggunakan kertas saring atau tisu.

5. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.

6. Bila menggunakan pewarna biru metilen mikroba akan tampak berwarna biru, dan bila menggunakan pewarna karbol fukhsin basa atau safranin akan tampak berwarna merah.

7. Laporkan hasil pengamatan

- Pewarnaan Gram

1. Buat preparat ulas

2. Beri larutan kristal violet selama 90 detik.

3. Cuci dengan air mengalir.

4. Beri larutan lugol selama 1 menit

5. Beri larutan pemucat (aseton alkohol) selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena jika terlalu lama akan memberikan hasil yang menyimpang.

6. Cuci dengan air mengalir.

7. Beri larutan safranin selama 90 detik.

8. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan kertas saring atau tisu.

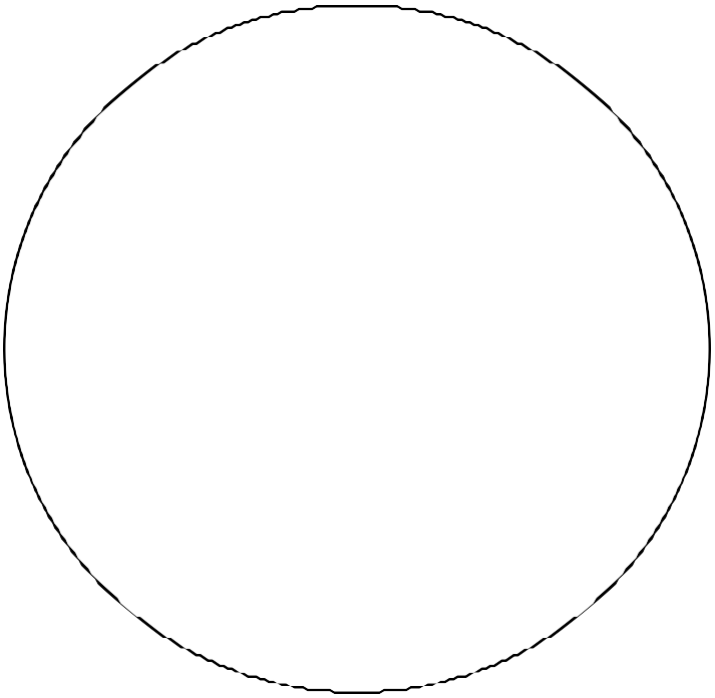
9. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.

10. Laporkan hasil pengamatan

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

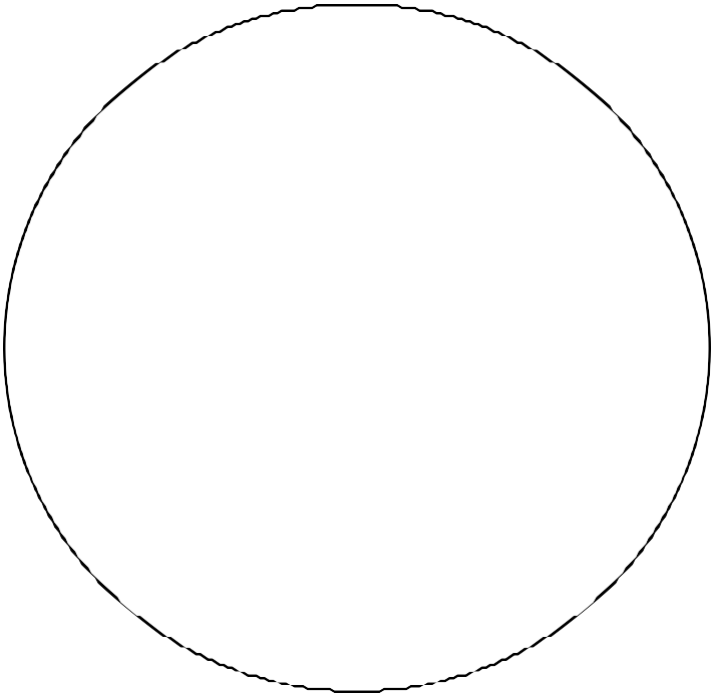
5. Hasil Pengamatan Pewarnaan Gram Bakteri

Penjelasan hasil pengamatan



Kesimpulan :

6. Hasil Pengamatan Pewarnaan Jamur



Penjelasan hasil pengamatan

Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pewarnaan mikroorganisme?
2. Apa saja contoh zat warna untuk pewarnaan sederhana?
3. Apa perbedaan pewarnaan sederhana dan pewarnaan diferensial?
4. Apa saja zat warna yang digunakan pada pewarnaan Gram?
5. Mengapa harus dilakukan pembuatan apusan sebelum dilakukan pewarnaan?

6. PENGAMATAN BAKTERI PADA URIN

A. Pendahuluan

Air seni, air kencing, kemih atau urin adalah cairan sisa yang diekskresikan oleh organ eksresi manusia yaitu organ ginjal. Urin dikeluarkan melalui proses urineasi. Kompoisi zat yang terkandung pada urin menggambarkan kesehatan dan kemampuan ginjal untuk menahan dan menyerap zat yang penting untuk metabolisme dasar tubuh.

Urin yang normal mengandung air, urea,, asam urat, amoniak. Kreatinin, asam laktat, asam fosfat, asam sulfat, klorida, garam dan zat berlebih yang ada pada darah. Urin tidak mengandung mikroorganisme, sehingga keberadaan mikroorganisme menandakan adanya infeksi pada saluran kencing. Infeksi saluran kencing pada ibu hamil merupakan penyakit yang sering terjadi.

Infeksi saluran kencing (ISK) adalah berkembangbiaknya mikroorganisme di dalam saluran kencing yang pada kondisi normal steril dari mikroorganisme. Infeksi saluran kencing dapat terjadi pada pria maunpun pada wanita. Pada ibu hamil ISK sering terjadi karena perubahan fisik dan hormon. Selain itu karena sering berkemih (buang air kecil) maka meningkatkan kelembapan pada area sekitar saluran kencing.

ISK dapat diketahui dengan memeriksakan sampel urin untuk ditumbuhkan pada media mikrobiologis. Cara lainnya dapat dilakukan dengan melakukan pengamatan mikroskopis langsung dari sampel urin maupun pada mikroorganisme yang tumbuh pada cawan. Pengamatan mikroskopis dapat dilakukan dengan menggunakan pewarnaan maupun tanpa pewarnaan Gram.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pembuatan preparat dari sampel urin
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat preparat dari urin
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan diferensial pada urin

C. Alat dan Bahan

1. Sampel urin
2. Kristal violet
3. Iodin
4. Safranin
5. Ose
6. Tisu
7. Minyak imersi
8. Spidol permanen
9. Gelas objek
10. *Cover Glass*
11. Lampu spirtus
12. Akuades steril

D. Prosedur Praktikum

- **Persiapan sampel urin**

Sampel urin yang dikumpulkan dipindahkan ke tabung sentrifuge. Kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet diambil untuk diamati.

- Pembuatan preparat urin

Sebelum dilakukan pengamatan, lebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Berikut ini cara membuat preparat ulasan

1. Bersihkan kaca objek dengan kapas yang dibasahi alkohol
2. Bari label pada sudut kaca
3. Teteskan urin pada bagian tengah kaca objek
4. Tutup dengan *cover glass*
5. Amati di bawah mikroskop

- Pembuatan ulasan urin untuk pewarnaan

1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol
2. Beri label pada sudut kaca

3. Teteskan urin pada bagian tengah kaca objek, sebarkan urin pada kaca objek dengan ose atau dengan kaca objek steril lainnya.

4. Kering udarakan

5. Fiksasi preparat

- Pewarnaan Gram

1. Buat preparat ulas

2. Beri larutan kristal violet selama 90 detik.

3. Cuci dengan air mengalir.

4. Beri larutan lugol selama 1 menit

5. Beri larutan pemucat (aseton alkohol) selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena jika terlalu lama akan memberikan hasil yang menyimpang.

6. Cuci dengan air mengalir.

7. Beri larutan safranin selama 90 detik.

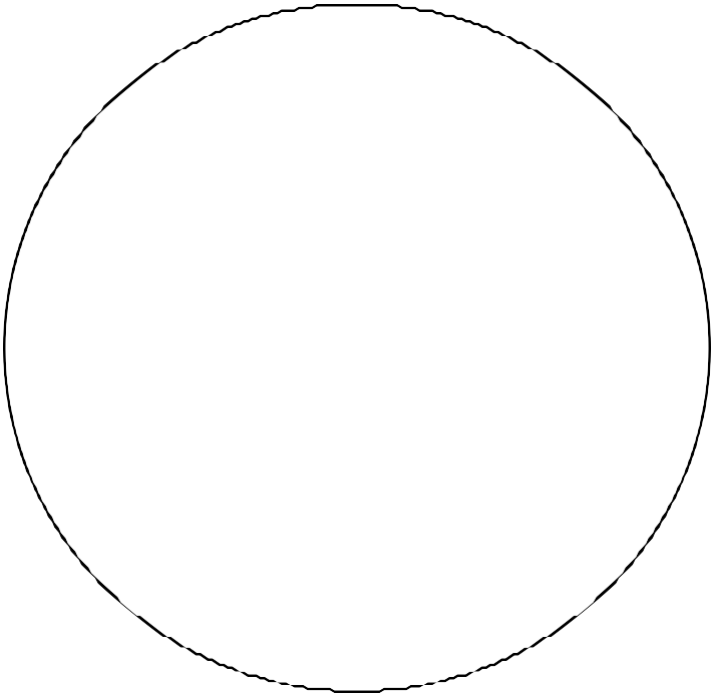
8. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan kertas saring atau tisu.

9. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.

10. Laporkan hasil pengamatan

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. Hasil Pengamatan Tanpa Pewarnaan Gram

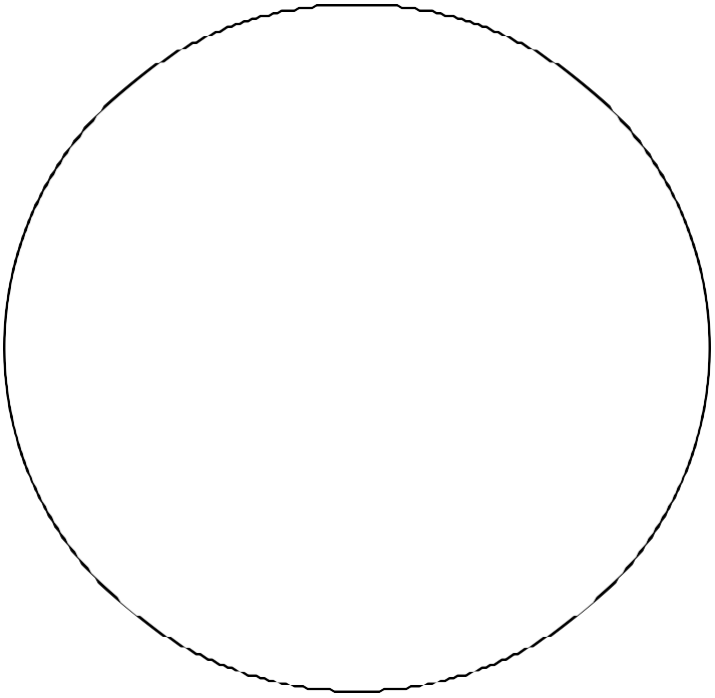


Penjelasan hasil pengamatan

Kesimpulan :

2. Hasil Pengamatan Dengan Pewarnaan Gram

Penjelasan hasil pengamatan



Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa fungsi pengamatan sampel urin?
2. Mengapa preparat urin harus diwarnai dengan pewarnaan Gram?
3. Mengapa pada urin dapat ditemukan bakteri?

7. PENGAMATAN JAMUR *Candida sp.* PADA KEPUTIHAN

A. Pendahuluan

Keputihan merupakan masalah rutin yang dialami semua wanita. Keputihan dapat dibedakan menjadi keputihan normal dan keputihan yang tidak normal. Keputihan normal terjadi pada masa ovulasi dan kehamilan. Sedangkan pada keputihan tidak normal terjadi karena adanya infeksi pada saluran genital wanita baik pada bagian atas maupun bagian bawah. Infeksi ini disebabkan karena kondisi lembab dan karena kurangnnya perilaku higiene pada penderita.

Ciri-ciri keputihan normal yaitu keluarnya cairan yang tidak terlalu kental, jernih, putih atau kekuningan. Keputihan normal tidak disertai rasa sakit nyeri, tidak berbau dan tidak menimbulkan rasa gatal berlebih. Sedangkan keputihan tidak normal merupakan penyakit karena disebabkan oleh infeksi mikroorganisme. Ciri dari keputihan tidak normal antara lain cairan yang keluar sangat kental, berwarna kekuningan sampai kehijauan. Keputihan tidak normal menimbulkan bau tidak sedap yang menyengat. Jumlah cairan yang keluar berlebihan, timbul rasa gatal serta nyeri dan terasa panas saat berkemih. Umumnya keputhan tidak normal mengandung banyak leukosit jika diamati di bawah mikroskop.

Beberapa mikroorganisme yang dapat menyebabkan keputihan tidak normal (keputihan patologis) antara lain *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* serta spesies *Candida albicans* dan *Candida sp.* Lainnya. Infeksi jamur Candida sp. merupakan infeksi yang paling sering pada keputihan. *Candida* sp. menyebabkan Kandidiasis vulvovaginalis (KVV). Selain KVV keputihan dapat disebabkan oleh bakteri dan parasit. Keputihan yang disebabkan oleh bakteri disebut dengan Bakterial vaginosis (BV). Sedangkan keputihan yang disebabkan oleh parasit *Trichomonas vaginalis* disebut dengan *Trichomoniasis*.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui prinsip pembuatan preparat dari sampel keputihan
2. Mahasiswa mengetahui dan mampu membuat preparat dari sampel keputihan
3. Mahasiswa dapat melakukan pewarnaan diferensial pada sampel keputihan

C. Alat dan Bahan

1. Sampel keputihan
2. Kristal violet
3. Iodin
4. Safranin
5. Ose
6. Tisu
7. Minyak imersi
8. Spidol permanen
9. Gelas objek
10. Lampu spirtus
11. Akuades steril

D. Prosedur Praktikum

- **Persiapan sampel keputihan**

Sampel swab keputihan yang diperoleh dengan media transpor dapat diinkubasi di inkubator pada suhu 37 derajat celsius selama 24 jam. Jika sampel berupa apusan pada kaca objek maka dapat langsung diwarnai dengan pewarnaan gram dan diamati

- Pembuatan ulasan urin untuk pewarnaan

1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol

2. Beri label pada sudut kaca

3. Teteskan sampel pada bagian tengah kaca objek, sebarkan sampel pada kaca objek dengan ose atau dengan kaca objek steril lainnya.

4. Kering udarakan

5. Fiksasi preparat

- Pewarnaan Gram

1. Buat preparat ulas

2. Beri larutan kristal violet selama 90 detik.

3. Cuci dengan air mengalir.

4. Beri larutan lugol selama 1 menit

5. Beri larutan pemucat (aseton alkohol) selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena jika terlalu lama akan memberikan hasil yang menyimpang.

6. Cuci dengan air mengalir.

7. Beri larutan safranin selama 90 detik.

8. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan kertas saring atau tisu.

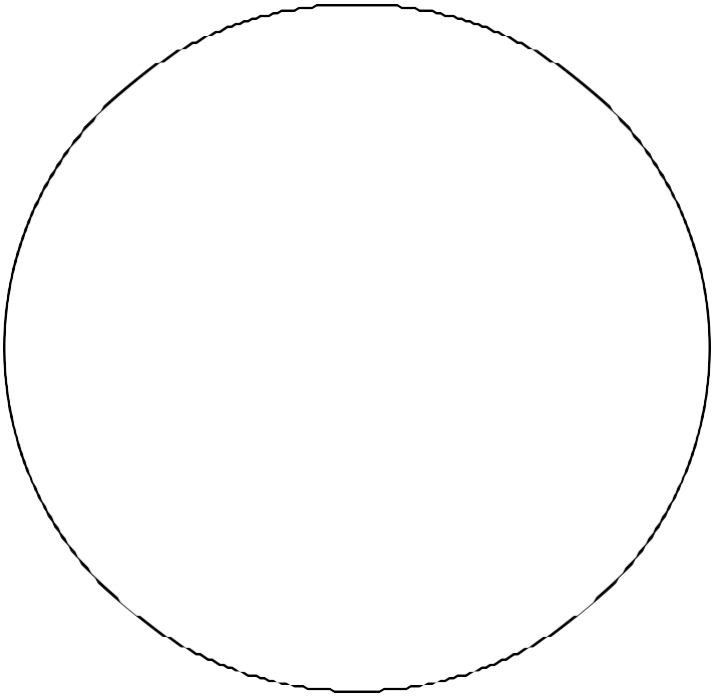
9. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.

10. Laporkan hasil pengamatan

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

Hasil Pengamatan Sampel Keputihan dengan Pewarnaan Gram

Penjelasan hasil pengamatan



Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

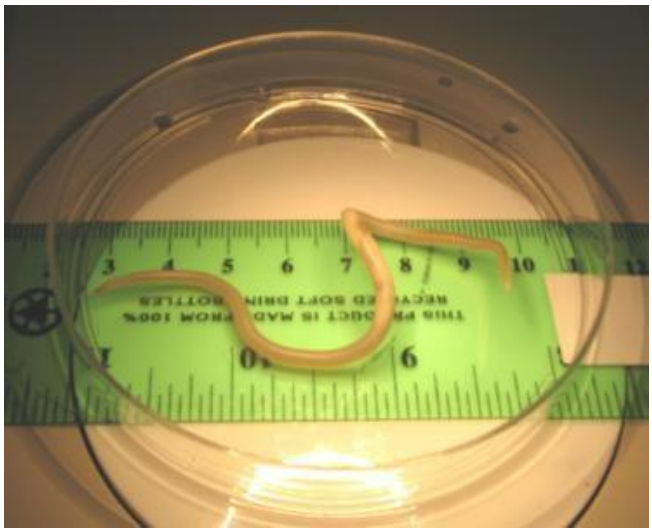
1. Apa fungsi pengamatan sampel keputihan?
2. Mengapa preparat harus diwarnai dengan pewarnaan Gram?
3. Jenis mikroorganisme pada saja yang dapat diamati pada sampel keputihan?
4. Apa perbedaan BV dan KVV ?

8. PENGAMATAN PREPARAT AWETAN CACING

A. Pendahuluan

Cacing adalah salah satu parasit yang merugikan manusia. Infeksi cacing masih terjadi sampai saat ini. Indonesia sendiri masih memiliki angka infeksi cacing yang sangat tinggi.. Cacing hidup di dalam kotoran dan tanah. Sehingga tanah merupakan tempat yang sering menjadi sumber infeksi awal cacing. pada anak-anak. Telur cacing yang bertebaran pada tanah biasanya akan terbawa pada tangan dan kaki yang tidak dicuci setelah menyentuh tanah atau kotoran. Angka kecacingan di Indonesia masih cukup tinggi. Berapa faktor yang berperan dalam tingginya angka kecacingan di Indonesia antara lain kurangnya Praktik Hidup Bersih dan Sehat (PHBS). Cacing masuk ke dalam kelompok Metazoa. Secara biologi cacing masuk ke dalam kelompok helminths. Terdapat tiga kelompok cacing yang masuk kedalam kelompok parasit yaitu Nematoda (cacing gilig), Trematoda (cacing hisap) dan Cestoda (cacing pipih). Ketiga jenis cacing ini sering menyebabkan kecacingan pada manusia,terutama pada anak-anak.

Nematoda merupakan jenis cacing yang memiliki ciri-ciri tubuh yang bulat memanjang. Sebagian nematoda memiliki alat kelamin yang terpisah (terdapat individu yang berbeda antara jantan dan betina). Ukuran tubuhnya bervariasi dari yang sangat kecil hingga tidak terlihat mata sampai berukuran 5 cm. Bagian tubuhnya terdiri dari kepala, ekor dan rongga dada yang di dalamnya terdapat organ pencernaan, sekresi dan reproduksi. Beberapa spesies yang termasuk dalam kelompok cacing ini antara lain *Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Trichuris trichiura, Trichinella spiralis, Dracunculus medinensis,*



dan *Toxocara.*

Gambar 8.1. *Ascaris lumbricoides* betina (CDC, 2019)

Trematoda merupakan kelompok cacing isap. Salah satu jenis yang terkenal adalah Fasciola hepatica. Cacing ini umumnya ditemukan pada organ hati hewan ternak. Sapi dan Kambing dapat memiliki cacing hati pada organ hatinya. Jika tidak dimasak dengan baik, maka dapat menyebabkan kecacingan pada manusia. Cacing hisap hidup di daerah perairan. Telur cacing isap akan berkembang di air dan dapat masuk ke hewan yang hidup di air seperti siput. Tanaman yang membawa telur cacing dapat menyebarkan penyakit ke hewan ternak. Jika terinfeksi maka cacing ini akan berkembang biak di usus dan bermigrasi ke empedu. Diagnosis penyakit kecacingan cacing isap dapat dilakukan dengan pengamatan telur cacing pada feses penderita pada fase kronis. Pada fase akut deteksi kecacingan dapat dilakukan dengan pengukuran titer antibodi.

Gambar 8.2. *Fasciola hepatica*(CDC, 2019)

Cestoda merupakan jenis cacing yang dikenal dengan nama cacing pita (tape worm). Kelompok ini dinamakan cacing pita dikarenakan bentuk tubuhnya yang panjang menyerupai pita. Beberapa spesies yang termasuk ke dalam kelompok cacing ini adalah *Diphyllobothrium latum, Hymenolepsos nana, Dipylidium caninum, Taenia saginata, Taenia solium*. Dua spesies utama yang bisa menginfeksi manusia adalah *Taenia solium dan Taenia saginata.* Infeksi pada manusia dapat disebabkan karena tertelannya sisitiserkus yang terdapat pada daging mentah. Sistiserkus adalah bentuk larva dari cacing pita. Setelah tertelan , larva cacing akan berkembang menjadi cacing dewasa di usus halus manusia. Ketiak bertelur maka telur-telur ini akan keluar dari tubuh manusia melalui feses. Gejala infeksi kecacingan cacing pita tergolong sangat ringan sampai tidak bergejala. Gejala yang dapat timbul antara lain sakit perut, rasa tidak nyaman pada daerah perut, nafsu makan menurun dan penurunan berat badan.

Gambar 8.3. *Diphyllobothrium latum* (CDC, 2019)

B. Tujuan Praktikum

1. Mengetahui morfologi dari beragam cacing
2. Mengetahui morfologi dari beragam telur cacing

C. Alat dan Bahan

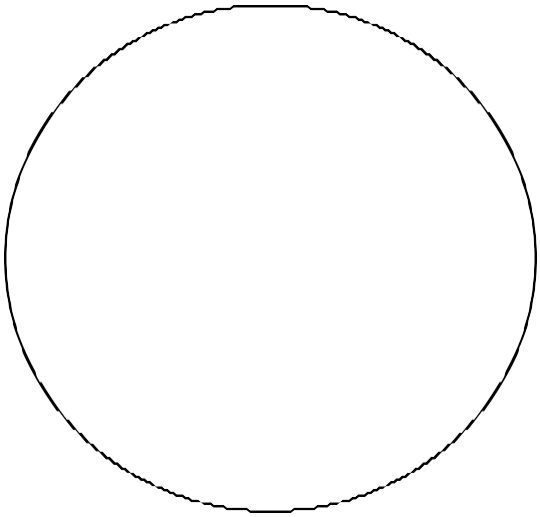
1. Beragam cacing dan telur dalam bentuk awetan preparat
2. Mikroskop cahaya

D. Prosedur

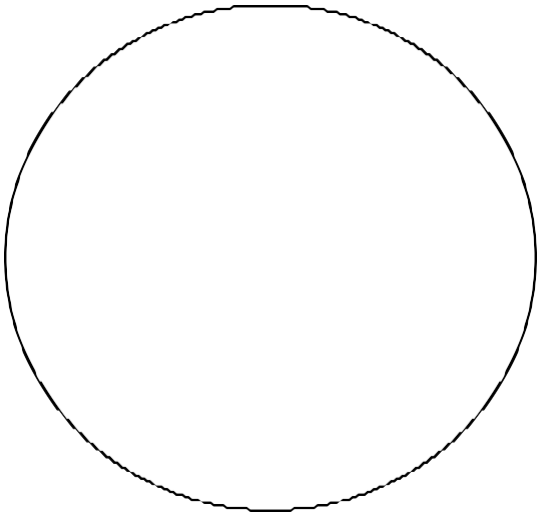
1. Aambil salah satu preparat awetan.
2. Letakkan preparat awetan diatas meja mikroskop, kemudian lihat dengan jumlah perbesaran 10 x 10, 40 x 10 dan 100 x 10
3. Amati dan gambar setiap bentuk preparat yang dilihat.

E. Lembar Hasil dan Evaluasi Praktikum

1. **Cacing Spesies Pertama** Penjelasan hasil pengamatan

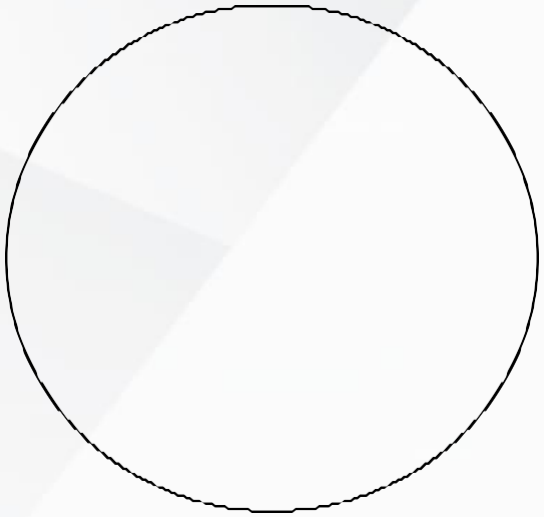


2. **Telur Cacing Spesies Pertama** Penjelasan hasil pengamatan

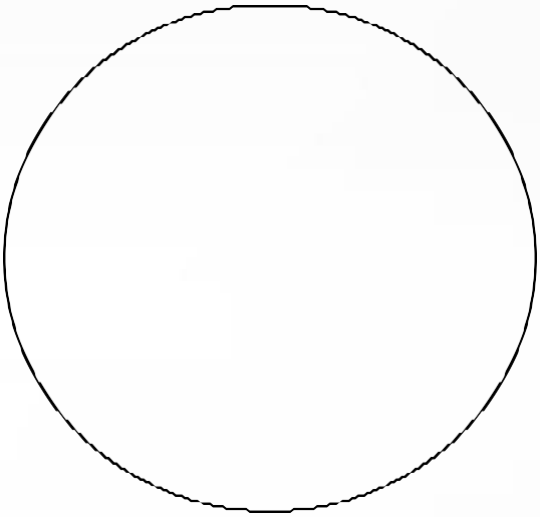


Kesimpulan :

1. **Cacing Spesies Kedua** Penjelasan hasil pengamatan



2. **Telur Cacing Spesies Kedua** Penjelasan hasil pengamatan



Kesimpulan :

Pertanyaan Evaluasi Praktikum

1. Apa perbedaan cacing dengan protozoa?
2. Jelaskan tiga jenis penyakit kecacingan?
3. Jelaskan bagaimana anak bayi dapat terhindar dari peny