

Modul

03

BIOL4445  
Edisi 3

# Faktor Lingkungan, Antimikroba, dan Aktivitas Enzimatik

Dra. Dyah Fitri Kusharyati, M.P.

# Daftar Isi Modul

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Modul 03</b>   | <b>3.1</b>  |
| Faktor Lingkungan, Anti-Mikroba, dan Aktivitas Enzimatis        |             |
| <b>Kegiatan Praktikum 1</b>                                     | <b>3.6</b>  |
| Faktor Lingkungan yang Berpengaruh Terhadap Pertumbuhan Mikroba |             |
| <b>Latihan</b>  | <b>3.7</b>  |
| <b>Rangkuman</b>  | <b>3.7</b>  |
| <b>Tes Formatif 1</b>   | <b>3.7</b>  |
| <b>Kegiatan Praktikum 2</b>                                     | <b>1.14</b> |
| Antimikroba dan Daya Kerja Oligodinamik                         |             |
| <b>Latihan</b>  | <b>3.16</b> |
| <b>Rangkuman</b>  | <b>3.16</b> |
| <b>Tes Formatif 2</b>   | <b>3.16</b> |
| <b>Kegiatan Praktikum 3</b>                                     | <b>1.29</b> |
| Aktivitas Enzimatis Mikroba                                     |             |
| <b>Latihan</b>  | <b>3.26</b> |
| <b>Rangkuman</b>  | <b>3.26</b> |
| <b>Tes Formatif 3</b>   | <b>3.26</b> |
| <b>Kunci Jawaban Tes Formatif</b>                               | <b>3.35</b> |
| <b>DaftarPustaka</b>  | <b>3.36</b> |
| <b>Lampiran</b>   | <b>3.39</b> |



## Pendahuluan

Modul ini mempraktikkan 3 kegiatan praktikum, yaitu (1) faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba; (2) daya kerja oligodinamik dan antimikroba, serta (3) aktivitas enzimatik mikroba. Kegiatan Praktikum 1 membuktikan bahwa faktor lingkungan seperti suhu dan pH berpengaruh terhadap kehidupan mikroba. Begitu pula kehadiran logam berat di lingkungan sekitar mikroba akan berpengaruh pada kehidupan mikroba. Kegiatan Praktikum 2 membuktikan bahwa zat antimikroba, termasuk desinfektan terbukti mampu menekan bahkan membunuh mikroba. Berbagai zat antibiotik akan dicontohkan dalam praktikum untuk membuktikan bahwa mikroba mampu menghasilkan antibiotik tertentu yang mampu menekan/menghambat atau membunuh mikroba lainnya. Pada Kegiatan Praktikum 3, akan dipraktikkan bahwa dalam metabolisme sel, mikroba mampu menghasilkan enzim-enzim tertentu yang berfungsi sebagai biokatalisator.

Setelah menyelesaikan praktikum ini, Anda diharapkan dapat:

1. menjelaskan pengaruh suhu, tekanan osmotik, sinar UV, dan pH terhadap pertumbuhan mikroba;
2. menerapkan cara kerja pengujian daya oligodinamik dan zat antimikroba; dan
3. menerapkan beberapa cara pengujian aktivitas enzimatik mikroba.

Pelaksanaan praktikum akan berjalan dengan lancar, apabila terlebih dahulu Anda membaca Buku Materi Pokok (BMP) atau modul yang berkaitan dengan praktikum ini. Uji oligodinamik, uji zat antimikroba, dan uji aktivitas enzimatik mikroba akan sangat bermanfaat untuk membantu determinasi genus atau spesies bakteri.

### **Faktor Lingkungan, Antimikroba, dan Reaksi Enzimatik**

Dalam kehidupannya, mikroba dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau oleh unsur-unsur ekologi. Perubahan faktor lingkungan akan mengakibatkan perubahan sifat mikroba baik morfologi maupun fisiologi.

Faktor-faktor lingkungan hidup dapat dikelompokkan menjadi 2 macam yaitu sebagai berikut.

1. Faktor abiotik yang meliputi faktor kimiawi dan fisik atau faktor yang tidak bersifat hidup. Faktor kimiawi, misalnya zat atau senyawa tertentu dalam nutriennya dan bahan kimia toksik serta keasaman. Faktor fisik misalnya suhu dan tekanan yang ekstrim.
2. Faktor biotik yaitu jasad hidup atau bersifat hidup. Faktor biotik misalnya kehadiran spesies lain pada lingkungannya.

Perbedaan kelompok mikroba membutuhkan faktor lingkungan optimal yang berbeda untuk kehidupan terbaiknya. Pada kenyataannya faktor lingkungan optimum itu belum dapat dipenuhi, sedangkan kehidupan dipertahankan terus. Sehubungan dengan hal itu mikroba mempunyai kisaran nilai faktor lingkungan, yaitu minimum, optimum, dan maksimum.

Suhu merupakan faktor lingkungan yang sangat menentukan kehidupan sel. Pengaruh suhu pada sel adalah berhubungan dengan aktivitas enzim. Suhu rendah mengakibatkan aktivitas enzim menurun dan pertumbuhan sel juga terhambat. Di bawah suhu minimum mikroba tidak melakukan pertumbuhan meskipun tidak mati. Di atas suhu maksimum, mikroba akan mati. Suhu yang mendukung pertumbuhan baik adalah suhu optimum.

Umumnya mikroba tumbuh paling baik di dalam substrat dengan tekanan osmosa lebih rendah daripada tekanan osmosa selnya. Hal itu dikarenakan sitoplasma mengandung zat terlarut lebih banyak daripada di dalam medium. Akibatnya, ada kecenderungan air masuk ke dalam sel yang akan dimanfaatkan untuk kehidupannya. *Yeast* dapat tumbuh pada medium mengandung zat terlarut tinggi sehingga dikenal sebagai jasad **osmotoleran**. Ada beberapa kapang disebut sebagai jasad **osmofilik** artinya senang tumbuh pada medium yang mengandung zat terlarut konsentrasi tinggi.

Berdasarkan nilai pH yang dibutuhkan untuk kehidupannya dikenal 3 kelompok mikroba, yaitu (1) Asidofilik, (2) Mesofilik (Neutrofilik), dan (3) Basofilik, yang berturut-turut menyukai medium asam, netral dan basa. Medium pertumbuhan mikroba dapat mengalami perubahan pH sebagai akibat dari peruraian zat-zat di dalam medium. Misalnya, peruraian gula akan menghasilkan asam yang dapat menurunkan pH dan peruraian protein atau turunannya akan meningkatkan pH.

Sinar dengan panjang gelombang pendek seperti: sinar X, ultraviolet, dan sinar gamma dapat mematikan mikroba atau dikenal mempunyai efek germisida. Penyinaran menggunakan sinar-sinar itu disebut **irradiasi**. Sel yang terkena irradiasi akan terhambat pertumbuhannya, sifat genetiknya berubah atau mati.

Logam-logam berat, seperti Hg, Cu, Ag, Pb, dan Zn bersifat racun terhadap sel mikroba meskipun hanya dengan kadar yang sangat rendah. Logam mengalami ionisasi dan ion-ionnya bereaksi dengan bagian-bagian penting dari sel. Daya menghambat atau mematikan dari logam dengan konsentrasi rendah disebut **daya oligodinamik**. Di sekitar logam yang diletakkan pada agar cawan tidak terjadi pertumbuhan bakteri di mana daerah itu terlihat jernih dan disebut dengan **daerah/zona hambat**.

Antibiosis atau antagonisme atau amensalisme merupakan asosiasi di mana salah satu anggotanya mengalami gangguan pertumbuhan, pertumbuhan terhambat atau bahkan mati. Hal ini sebagai akibat dari salah satu anggota lainnya mengeluarkan zat berefek mematikan dan zat itu dikenal sebagai **antibiotik**. Jadi, selain beradaptasi terhadap faktor lingkungan seperti yang telah dibahas di atas, mikroba mampu menghasilkan zat tertentu dalam rangka bertahan hidup yaitu salah satunya antibiotik.

Dalam rangka adaptasi dan bertahan hidup pula, mikroba harus mampu merombak dan menggunakan hasil perombakan bahan-bahan kimia yang ada di lingkungannya. Perombakan bahan-bahan kimia berlangsung melalui proses yang kompleks, di antaranya proses metabolisme dengan hasil energi atau senyawa-senyawa penyusun sel.

Semua kegiatan proses metabolisme dalam sel mikroba melibatkan enzim atau biokatalisator yang dapat mempercepat berlangsungnya proses kimiawi. Berbagai jenis enzim terlibat di dalam proses metabolisme dan masing-masing jenis akan berfungsi secara spesifik, satu jenis enzim hanya akan mengkatalisis satu proses reaksi kimia.

Sisa bahan maupun produk baru hasil dari reaksi kimia tersebut dapat diukur atau dideteksi ada atau tidaknya. Produk yang dapat dideteksi sangat tergantung daripada sifat mikroba atau tergantung dari sifat fisiologis atau biokimiawinya. Uji fisiologi merupakan uji yang harus dilakukan terutama untuk bakteri karena dapat membantu determinasi genus atau spesies bakteri.

## Faktor Lingkungan yang Berpengaruh terhadap Pertumbuhan Mikroba

### A. PENGARUH SUHU

Berdasarkan suhu optimum untuk pertumbuhan mikroba maka dapat dikelompokkan menjadi 3, yaitu (1) psikrofilik (0-20°C), (2) mesofilik (20-30°C), (3) termofilik (50-100°C). Suhu merupakan faktor lingkungan yang sangat menentukan kehidupan mikroba. Pengaruh suhu berhubungan dengan aktivitas enzim. Suhu rendah menyebabkan aktivitas enzim menurun dan jika suhu terlalu tinggi dapat mendenaturasi protein enzim.

### B. PENGARUH TEKANAN OSMOTIK

Keberadaan mikroba di lingkungan dapat dipengaruhi kepekatan suspensi/cairan di lingkungan. Apabila kepekatan suspensi di lingkungan tinggi maka isi sel akan ke luar. Sebaliknya, kepekatan suspensi di lingkungan rendah maka akan terjadi pergerakan massa cair ke dalam sel.

### C. PENGARUH SINAR ULTRAVIOLET

Sinar UV panjang gelombang 210-300 nm dapat membunuh mikroba jika dipaparkan. Komponen seluler yang dapat menyerap sinar UV adalah asam nukleat sehingga dapat rusak dan menyebabkan kematian.

### D. PENGARUH PH

pH berpengaruh terhadap sel dengan memengaruhi metabolisme. Pada umumnya bakteri tumbuh dengan baik pada pH netral (7,0). Berdasarkan nilai pH yang dibutuhkan untuk kehidupannya dikenal 3 kelompok mikroba, yaitu (1) acidofilik, (2) mesofilik/neutrofilik, dan (3) basofilik.



## Latihan

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Bagaimana kaitan antara faktor suhu dengan aktivitas enzim mikroba?
- 2) Jelaskan bagaimana pengaruh tekanan osmotik dapat mempengaruhi keberadaan mikroba di lingkungan!
- 3) Jelaskan bagaimana sinar UV dapat membunuh mikroba!
- 4) Apa yang dimaksud dengan bakteri acidofilik?
- 5) Jelaskan perbedaan bakteri mesofilik dan basofilik!

### *Petunjuk Jawaban latihan*

Latihan soal tersebut dapat dijawab, apabila Anda mempelajari kembali uraian teori tentang faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba, misalnya: pengaruh suhu, tekanan osmotik, sinar UV, dan pH.



## Rangkuman

Kehidupan mikroba sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan tempat mereka tumbuh dan berkembang biak. Perubahan dari faktor lingkungan akan mengakibatkan perubahan sifat baik morfologi maupun fisiologi. Tiap-tiap kelompok mikroba membutuhkan faktor lingkungan optimal untuk kehidupan terbaiknya. Faktor lingkungan abiotik yang memengaruhi kelangsungan hidup mikroba adalah suhu, tekanan osmotik, radiasi sinar ultraviolet, dan pH.



## Tes Formatif 1

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Kisaran suhu untuk bakteri thermofilik adalah:
  - A. 50-100°C
  - B. 40-50°C
  - C. 20-30°C
  - D. 0-20°C
- 2) Bila kepekatan cairan di lingkungan sekitar sel mikroba terlalu tinggi, maka sel mengalami ....
  - A. massa cair masuk ke dalam sel.
  - B. sel mengkerut.

- C. mutasi gen dalam sel.  
D. isi sel akan keluar.
- 3) Sinar UV dapat membunuh mikroba pada panjang gelombang ....  
A. 200-300 nm.  
B. 100-300 nm.  
C. 210-300 nm.  
D. 210-250 nm.
- 4) Basofilik adalah bakteri yang menyukai lingkungan hidup dengan pH ....  
A. asam.  
B. netral.  
C. basa.  
D. kadar NaCl tinggi.
- 5) Acidofilik merupakan bakteri yang menyukai lingkungan hidup dengan pH ....  
A. asam.  
B. netral.  
C. basa.  
D. kadar NaCl tinggi.

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 1.

$$\text{Tingkat Penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100$$

Arti tingkat penguasaan



Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan Kegiatan Praktikum 2. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 1, terutama bagian yang belum dikuasai.

# Praktikum

## A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

### 1. Pengaruh Suhu

#### a. Alat

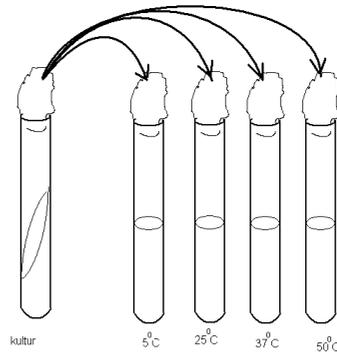
- 1) Tabung reaksi.
- 2) Inkubator.
- 3) Label.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.

#### b. Bahan

- 1) Media Nutrient Broth (NB).
- 2) Isolat *E. coli*
- 3) Isolat *B. subtilis*
- 4) Alkohol 70%

#### c. Cara kerja

- 1) Disiapkan 10 tabung reaksi berisi media NB.
- 2) Masing-masing tabung reaksi diberi label dengan keterangan suhu, yaitu 5°C, 25°C, 37°C, dan 50°C. Sisakan dua tabung sebagai kontrol.
- 3) Isolat *E. coli* diinokulasikan pada 4 tabung dengan label suhu berbeda
- 4) Isolat *B. subtilis* diinokulasikan pada 4 tabung yang tersisa.
- 5) Semua tabung diinkubasi sesuai suhu yang tertera selama 2×24 jam (Gambar 3.1).
- 6) Diamati dan dibandingkan kekeruhan dari tiap tabung dengan kontrol.



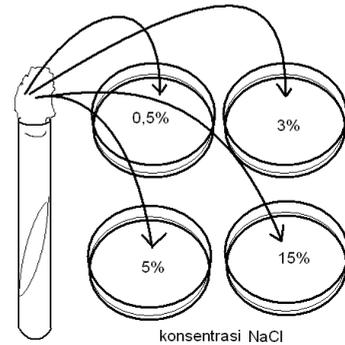
Gambar 3.1.  
Empat Biakan Diinkubasi pada Suhu Yang Berbeda

### 2. Pengaruh Tekanan Osmotik

#### a. Alat

- 1) Cawan petri.
- 2) Inkubator.
- 3) Label.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.

- b. Bahan
- 1) Media Nutrient Agar (NA).
  - 2) Isolat *E. coli*.
  - 3) Isolat *B. subtilis*.
  - 4) Alkohol 70%.
  - 5) NaCl 0,5%; 3%; 5%; dan 15%.
- c. Cara kerja (Gambar 3.2)
- 1) Dibuat 4 buah cawan *Nutrient Agar* yang mengandung NaCl 0,5%; 3%; 5%; dan 15%.
  - 2) Setiap konsentrasi, cawan dibagi menjadi 2 dengan spidol kemudian labeli dengan bakteri *E. coli* dan *Bacillus subtilis*.
  - 3) Diinokulasikan *E. coli* dan *Bacillus subtilis* dengan streak kontinu.
  - 4) Kontrol digunakan untuk masing-masing biakan dengan media yang tidak ditambah NaCl.
  - 5) Diinkubasi selama 48 jam dan diamati pertumbuhannya.



Gambar 3.2.  
Empat Biakan dengan Konsentrasi NaCl yang Berbeda

### 3. Pengaruh Sinar Ultraviolet

- a. Alat
- 1) Lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm.
  - 2) Inkubator.
  - 3) Bunsen.
  - 4) Jarum ose.
- b. Bahan
- 1) Media Nutrient Agar (NA)
  - 2) Isolat *E. coli*
  - 3) Isolat *B. subtilis*
  - 4) Alkohol 70%
  - 5) Isolat *Aspergillus sp.*
- c. Cara kerja
- 1) *Aspergillus sp.*, *E. coli* dan *B. subtilis* diinokulasikan pada 3 cawan NA.
  - 2) Ketiga cawan tersebut didedahkan pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm selama 1 menit, 5 menit, dan 15 menit (ingat tutup cawan dibuka dan diusahakan lingkungan sekitar steril). Jarak antar UV dan cawan sekitar 12 inci.
  - 3) Kontrol digunakan untuk masing-masing biakan dengan tidak memaparkan pada sinar UV.
  - 4) Diinkubasi selama 48 jam dan diamati pertumbuhan koloninya.

#### 4. Pengaruh pH

##### a. Alat

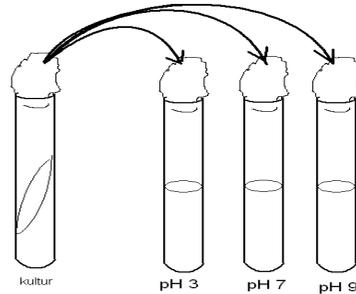
- 1) Tabung reaksi
- 2) Inkubator
- 3) Label
- 4) Bunsen
- 5) Jarum ose
- 6) pH meter

##### b. Bahan

- 1) Media Nutrient Broth (NB)
- 2) Isolat *E. coli*
- 3) Isolat *B. subtilis*
- 4) Alkohol 70%
- 5) NaOH/KOH
- 6) HCl

##### c. Cara kerja

- 1) Dibuat tabung reaksi berisi NB dan pH-nya diatur (pH 3, 7, dan 9) masing-masing 2 tabung untuk tiap nilai pH (Gambar 3.3).
- 2) Diberi label dengan nama bakteri yang akan diinokulasikan.
- 3) Tiap tabung diinokulasi dengan *B. subtilis* dan *E. coli* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 4) Perbedaan kekeruhan diamati pada tiap nilai pH.



Gambar 3.2.  
Empat Biakan dengan Konsentrasi NaCl yang Berbeda

## B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

## C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN PRAKTIKUM

1. Hasil pengamatan yang Anda dapatkan dari kegiatan praktikum Faktor Lingkungan dicatat.
2. Petunjuk penulisan laporan

Laporan praktikum berisikan sebagai berikut.

- a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
  - b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
  - c. Alat, bahan, dan cara kerja: dalam cara kerja gunakan kalimat berita jika memungkinkan usahakan untuk menggunakan kalimat pasif. Jangan sekali-kali menggunakan kalimat perintah.
  - d. Hasil dan pembahasan: pembahasan merupakan hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil yang didapatkan dengan hasil penelitian terdahulu.
  - e. Kesimpulan.
  - f. Daftar Pustaka.
3. Penyerahan Laporan
- Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

# Antimikroba dan Daya Kerja Oligodinamik

## Kegiatan Praktikum 2

### A. ANTIMIKROBA

**Zat antimikroba** adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba. Zat antimikroba dapat bersifat membunuh mikroba (*microbicidal*) atau menghambat pertumbuhan mikroba (*microbiostatic*). **Desinfektan** yaitu suatu senyawa kimia yang dapat menekan pertumbuhan mikroba pada permukaan benda mati, seperti meja, lantai, dan pisau bedah. Adapun **antiseptik** adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menekan pertumbuhan mikroba pada jaringan tubuh, misalnya kulit. Efisiensi dan efektivitas desinfektan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

1. konsentrasi;
2. waktu terpapar;
3. jenis mikroba;
4. kondisi lingkungan: temperatur, pH, dan jenis tempat mikroba hidup.

Beberapa jenis desinfektan terlihat pada tabel 3.1 berikut ini.

Tabel 3.1.  
Beberapa jenis desinfektan

| Jenis  | Keterangan  |
|--|---|
| Senyawa fenol:<br>Fenol<br>Cresol<br>Hexachlorophene<br>Reorcinol<br>Thymol  | Merusak membran sel<br>Mendenaturasi protein<br>Konsentrasi kerja: 2-5%   |
| Alkohol:<br>Ethyl<br>Isopropil   | Pelarut lemak<br>Denaturasi dan koagulasi protein<br>Konsentrasi kerja: 50-75%  |
| Senyawa halogen:<br>Senyawa chlorin:<br>Sodium hipochlorite<br>Chloramine<br>Senyawa iodine:<br>Povidone-iodine (betadine) | Agen oksidasi<br>Presipitasi protein<br>Klorin bereaksi dengan air membentuk asam hipoklorit yang bersifat bakterisidal |

| Jenis  | Keterangan  |
|--|---|
| Logam berat:<br>Senyawa Hg<br>Senyawa Zn<br>Senyawa Cu.                | Bereaksi dengan gugus SH (sulfhidril) pada enzim yang menyebabkan denaturasi                        |
| Agen aktif permukaan:<br>Sabun<br>Detergen<br>Emulsifier               | Menciptakan tegangan permukaan yang rendah<br>Merusak membran sel<br>Memindahkan sel secara mekanis |
| Senyawa kationik:<br>Senyawa amonium kuaterner<br>benzalconiumchloride | Tegangan permukaan yang rendah  |
| Senyawa anionik:<br>Sodium Tetradecyl Sulphate                         | Daya kerja sama dengan senyawa aktif permukaan  |
| Asam (H <sup>+</sup> )   | Merusak dinding sel dan membran sel   |
| Basa (OH <sup>-</sup> )  | Koagulasi protein   |
| Pewarna:<br>Crystal Violet   | Memiliki afinitas terhadap asam nukleat   |

## B. DAYA OLIGODINAMIK

Logam-logam berat, seperti Hg, Cu, Ag, dan Pb bersifat racun terhadap sel meskipun hanya dalam kadar rendah. Logam mengalami ionisasi dan ion-ion tersebut bereaksi dengan bagian sulfhidril pada protein sel sehingga menyebabkan denaturasi. Daya hambat atau mematikan dari logam dengan konsentrasi yang rendah disebut **daya oligodinamik**.

## C. ANTIBIOTIK

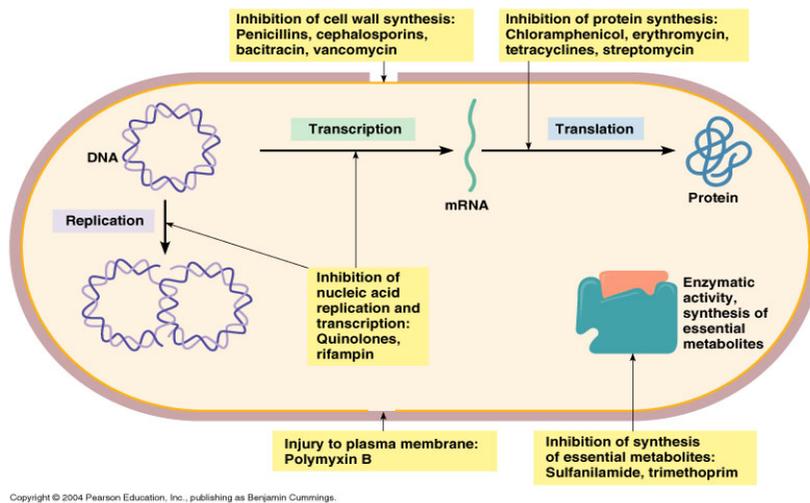
**Antibiotik** adalah bahan yang dihasilkan oleh mikroba atau sintetis yang dalam jumlah kecil mampu menekan/menghambat atau membunuh mikroba lainnya. Antibiotik memiliki spektrum aktivitas antibiosis yang beragam.

Antibiotik dikelompokkan berdasarkan gugus aktifnya, misal antibiotik *macrolide*, antimikroba peptida. Adapun penamaan biasanya berdasarkan gugus kimiawi ataupun mikroba produsernya, misalnya:

1. Ragam antibakteria:
  - a. *Penicillin* dan *cephalosporin*
  - b. *Erythromycine*
  - c. *Sulfa drugs*
  - d. *Trimethoprim* dan *sulfamethoxazole*
  - e. *Polymyxin B*
  - f. *Quinolone*
  - g. *Tetracycline*
2. Antifungi:
  - a. *Nystatin*
  - b. *Azoles*

Mekanisme kerja antibiotik (Gambar 3.4) antara lain berikut ini.

1. Menghambat sintesis dinding sel.
2. Merusak permeabilitas membran sel.
3. Menghambat sintesis RNA (proses transkripsi).
4. Menghambat sintesis protein (proses translasi).
5. Menghambat replikasi DNA.



Gambar 3.4.  
Mekanisme Kerja Antibiotik

Prosedur difusi-kertas cakram-agar yang distandarisasikan (metode Kirby-Bauer) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibiotik untuk bakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik.

Faktor yang memengaruhi metode Kirby-Bauer, antara lain:

1. Konsentrasi mikroba uji.
2. Konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram.
3. Jenis antibiotik.
4. pH medium.  $h\ sel \times 4 \times 10^6$



#### Latihan

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Apa yang dimaksud dengan zat antimikroba?
- 2) Mengapa logam berat dapat membunuh mikroba?
- 3) Sebutkan beberapa jenis antibiotik!
- 4) Jelaskan beberapa jenis desinfektan dan dampaknya!
- 5) Jelaskan apa yang dimaksud dengan daya oligodinamik!

#### *Petunjuk Jawaban Latihan*

Baca kembali dan cermati uraian teori mengenai antimikroba, daya oligodinamik, dan antibiotik terhadap perkembangan mikroba.



#### Rangkuman

Pertumbuhan mikroba merugikan dapat dihambat bahkan dibunuh dengan menggunakan zat antimikroba. Faktor lingkungan abiotik yang berupa keberadaan logam berat juga memengaruhi kehidupan mikroba. Pada kadar tertentu, logam berat mampu membunuh mikroba. Antibiotik dihasilkan oleh mikroba dan bersifat menekan, menghambat, bahkan membunuh mikroba lain.



#### Tes Formatif 2

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Tetracyclin termasuk dalam zat ....
  - A. antimikroba
  - B. antifungal
  - C. antibiotik
  - D. desinfektan
- 2) Daya hambat atau mematikan dari logam dengan konsentrasi rendah disebut ....
  - A. daya hambat
  - B. zona hambat
  - C. daya antimikroba
  - D. daya oligodinamik

- 3) Pengujian kekuatan desinfektan, antibiotik, dan antimikroba secara difusi biasanya menggunakan ....
- kertas buram
  - kertas cakram
  - membran filter
  - tisu
- 4) Berikut adalah faktor- faktor yang mempengaruhi efektivitas desinfektan *kecuali* ....
- konsentrasi
  - jenis mikroba
  - pH
  - tekanan osmotik
- 5) Jenis desinfektan yang dapat menyebabkan denaturasi adalah ....
- senyawa Hg
  - ethyl alkohol
  - detergen
  - emulsifier

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 2.

$$\text{Tingkat Penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100$$

Arti tingkat penguasaan



Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan Kegiatan Praktikum 3. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 2, terutama bagian yang belum dikuasai.

## Praktikum

### A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

#### 1. Antimikroba

##### a. Alat

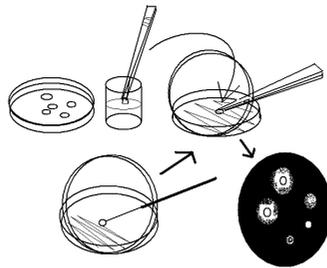
- 1) Cawan petri.
- 2) Inkubator.
- 3) Label.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.
- 6) Kertas cakram.
- 7) Pinset.
- 8) Penggaris.

##### b. Bahan

- 1) Media Nutrient Agar (NA).
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.
- 5) Lysol 5%.
- 6) Betadine.
- 7) Hipoklorit 5%.

##### c. Cara kerja

- 1) *E. coli* dan *B. subtilis* diinokulasikan pada NA cawan dengan *streak* kontinu.
- 2) Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam larutan desinfektan (alkohol 70%, Lysol 5%, betadine, dan hipoklorit 5%). Kemudian diangkat, sisa tetes larutan yang berlebihan pada kertas cakram diulaskan pada dinding wadah karena dikhawatirkan larutan akan meluas di permukaan agar jika larutan terlalu banyak.
- 3) Kertas cakram diletakkan di permukaan agar dengan pinset. Tekan dengan pinset supaya kertas cakram benar-benar menempel pada agar.
- 4) Diinkubasi selama 48 jam pada 37°C.
- 5) Zona hambat yang terbentuk diukur diameternya, dibandingkan daya kerja berbagai desinfektan (Gambar 3.5).



Gambar 3.5.  
Pengujian Antimikroba

## 2. Daya Oligodinamik

### a. Alat

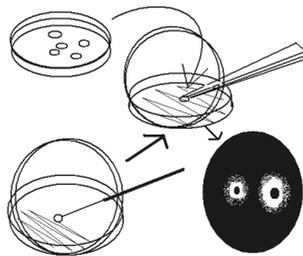
- 1) Cawan petri.
- 2) Inkubator.
- 3) Label.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.
- 6) Pinset.
- 7) Penggaris.

### b. Bahan

- 1) Media Nutrient Agar (NA).
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.
- 5) Koin Pb dan Zn.

### c. Cara kerja

- 1) *E. coli* dan *B. subtilis* diinokulasikan pada cawan NA dengan *streak* kontinu.
- 2) Koin tembaga dan seng diletakkan ke dalam cawan dengan pinset.
- 3) Diinkubasi 37°C selama 48 jam.
- 4) Hitung zona hambat yang terbentuk dengan mengukur diameter daerah yang jernih atau tidak ada pertumbuhan (Gambar 3.6).



Gambar 3.6.  
Pengujian Daya Oligodinamik

### 3. Antibiotik

#### a. Alat

- 1) *Cotton swab*.
- 2) Inkubator.
- 3) Label.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.
- 6) Kertas cakram.
- 7) Pinset.
- 8) Penggaris.

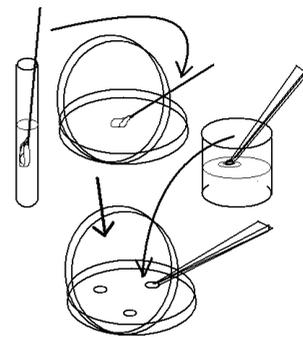
#### b. Bahan

- 1) Media Mueller Hinton Agar.
- 2) Media Nutrient Broth (NB).
- 3) Isolat *E. coli*.
- 4) Isolat *B. subtilis*.
- 5) Alkohol 70%.
- 6) Larutan antibiotik (misal: Ampicilin).

#### c. Cara kerja

Cara kerja pengujian antibiotik dengan metode Kirby-Bauer:

- 1) Celupkan *cotton bud* (*cotton swab*) dalam biakan bakteri kemudian tekan kapas ke sisi tabung agar air tiris.
- 2) Diulaskan pada seluruh permukaan cawan Mueller-Hinton Agar secara merata.
- 3) Cawan dibiarkan selama 5 menit.
- 4) Kertas cakram dicelupkan dalam larutan antibiotik dengan konsentrasi tertentu.
- 5) Diangkat, dibiarkan sejenak agar tiris, selanjutnya kertas cakram diletakkan pada permukaan agar.
- 6) Kertas cakram ditekan menggunakan pinset supaya menempel sempurna di permukaan agar.
- 7) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
- 8) Diameter zona hambat diukur (mm), kemudian dibandingkan dengan tabel sensitivitas antibiotik (Gambar 3.7).



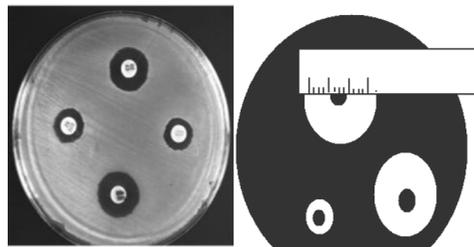
Gambar 3.7.  
Pengujian Antibiotik

Tabel 3.2 berikut ini menunjukkan sensitivitas antibiotik yang dinyatakan dalam diameter zona hambat (mm).

Tabel 3.2.  
Penentuan Sensitivitas Antibiotik (diameter zona hambat dalam mm)

| Antibiotic             | Resistant/tahan | Intermediate/Medium | Susceptible/Peka |
|------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| Tetracycline           | = 14            | 15-18               | = 19             |
| Ciprofloxacin          | = 15            | 16-20               | = 21             |
| Enoxacin               | = 14            | 15-17               | = 18             |
| Erythromycin           | = 13            | 14-22               | = 23             |
| Penisilin              |                 |                     |                  |
| Staphylococci          | = 28            |                     | = 29             |
| Oxacillin              |                 |                     |                  |
| Staphylococci          | = 10            | 11-12               | = 13             |
| Tobramycin             | = 12            | 13-14               | = 15             |
| Ceftriaxone            | = 13            | 14-20               | = 21             |
| Kanamycin              | = 13            | 14-17               | = 18             |
| Clindamycin            | = 14            | 15-20               | = 21             |
| Piperacillin           |                 |                     |                  |
| Gram Negative          | = 17            | 18-20               | = 21             |
| Ampicillin             |                 |                     |                  |
| Gram Negative Enterics | = 13            | 14-16               | = 17             |
| Staphylococci          | = 28            |                     | = 29             |

Berikut ini cara pengukuran zona hambat (Gambar 3.8).



Gambar 3.8.  
Cara Pengukuran Zona Hambat

Cara menginterpretasikan:

1. Diameter zona hambat (zona jernih) diukur.
2. Misal didapatkan zona hambat suatu bakteri berdiameter 26 mm untuk *Erythromycin*.
3. Maka interpretasinya adalah bakteri tersebut peka terhadap antibiotik *Erythromycin* (lihat Tabel 3.2).
4. *Resistent*: tahan, *intermediate*: medium, dan *susceptible*: peka.

## **B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM**

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

## **C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN PRAKTIKUM**

### *1. Petunjuk penulisan laporan*

Laporan praktikum berisikan sebagai berikut.

- a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
- b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
- c. Alat, bahan, dan cara kerja: dalam cara kerja gunakan kalimat berita jika memungkinkan usahakan untuk menggunakan kalimat pasif. Jangan sekali-kali menggunakan kalimat perintah.
- d. Hasil dan pembahasan: pembahasan merupakan hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil yang didapatkan dengan hasil penelitian terdahulu.
- e. Kesimpulan.
- f. Daftar Pustaka.

### *2. Penyerahan Laporan*

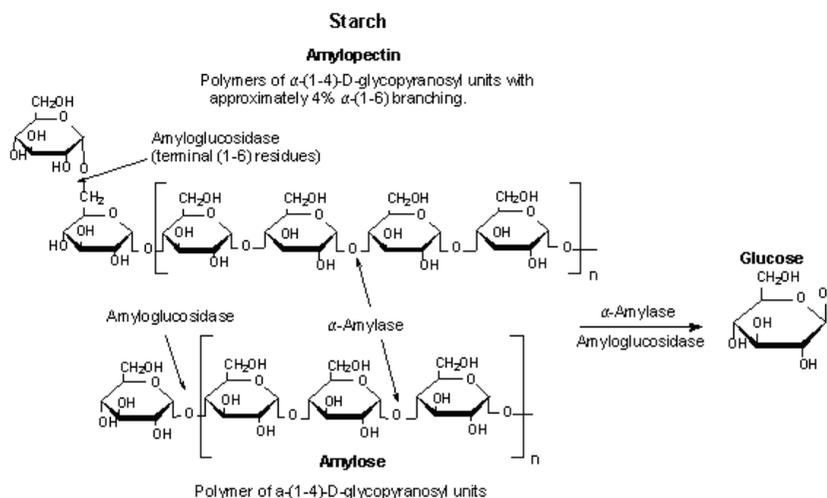
Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

## Aktivitas Enzimatis Mikroba

### A. UJI AMILOLITIK

**Amilum** adalah senyawa yang memiliki berat molekul tinggi, terdiri atas polimer glukosa yang bercabang-cabang yang diikat dengan ikatan glikosidik. Degradasi amilum membutuhkan enzim amilase yang akan memecah/menghidrolisis menjadi polisakarida yang lebih pendek (*dextrin*), dan selanjutnya menjadi maltosa. Hidrolisis akhir maltosa menghasilkan glukosa terlarut yang dapat ditranspor masuk ke dalam sel (Gambar 3.9). Indikator yang dipakai pada uji amilolitik adalah *iodine*. Amilum akan bereaksi dengan *iodine* membentuk warna biru hitam yang terlihat pada media.

Prosedur di bawah ini menunjukkan aktivitas amilase. NA yang tersuspensi pati digunakan sebagai media. Indikator yang dipakai adalah *iodine*. Amilum akan bereaksi dengan *iodine* membentuk kompleks warna biru hitam yang terlihat pada media. Warna biru hitam terjadi jika *iodine* masuk ke dalam bagian kosong pada amilum yang berbentuk spiral.

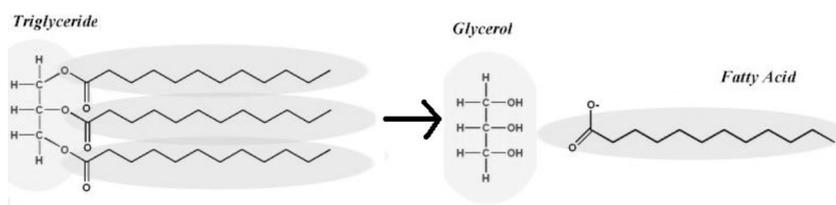


Gambar 3.9.  
Degradasi Amilum

## B. UJI LIPOLITIK

Lipid misalnya trigliserida merupakan sumber energi bagi sejumlah mikroba. Cara mendapatkan energi dari lipid, mikroba akan menghasilkan enzim lipase dan esterase yang memecah ikatan ester menghasilkan gliserol dan asam lemak (Gambar 3.10).

Terdapat berbagai macam prosedur untuk mengetahui aktivitas lipase, di antaranya dengan menggunakan media *Trybutirin Agar*, *Rodhamine Agar* dan *Spirit Blue Agar*. Pada prinsipnya metode-metode di atas menggunakan indikator yang mampu mendeteksi keberadaan asam lemak yang terbentuk akibat hidrolisis lemak.



Gambar 3.10.  
Degradasi Lipid

## C. UJI PROTEOLITIK

Uji proteolitik ditujukan untuk mengetahui kemampuan mikroba menghasilkan enzim protease. Pada praktikum ini protein yang digunakan dalam bentuk kasein susu. Hidrolisis kasein secara bertahap akan menghasilkan monomernya berupa asam amino. Proses ini dinamakan peptonisasi atau proteolisis (Gambar 3.11).



Gambar 3.11.  
Degradasi Protein

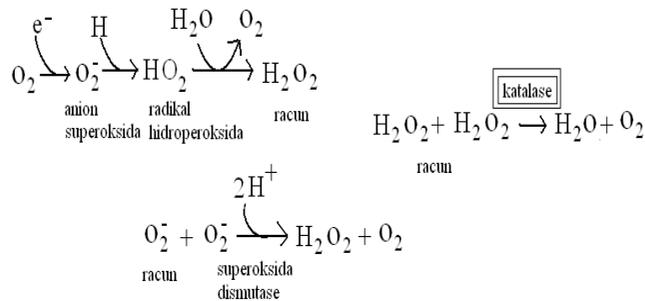
## D. UJI OKSIDASE

Enzim oksidase memegang peranan penting dalam transpor elektron selama respirasi aerobik. Sitokrom oksidase mengkatalisis oksidasi dan reduksi sitokrom oleh molekul oksigen. Enzim oksidase dihasilkan oleh bakteri aerob, fakultatif anaerob, dan mikroaerofilik. Mikroba ini menggunakan oksigen, sebagai akseptor elektron terakhir selama penguraian karbohidrat untuk menghasilkan energi. Kemampuan bakteri memproduksi sitokrom oksidase dapat diketahui dari reaksi yang ditimbulkan setelah pemberian reagen oksidase pada koloni bakteri. Enzim ini merupakan bagian

dari kompleks enzim yang berperan dalam proses fosforilasi oksidatif. Reagen yang digunakan adalah *tetramethyl-D-phenylenediamine dihydrochloride*. Reagen akan mendonorkan elektron terhadap enzim ini sehingga akan teroksidasi membentuk senyawa yang berwarna biru kehitaman. **Positif tertunda** (warna biru muncul antara 10-60 detik setelah ditetesi) menandakan bahwa bakteri uji memiliki sedikit enzim. Tidak adanya perubahan warna mengindikasikan bahwa uji yang dilakukan negatif.

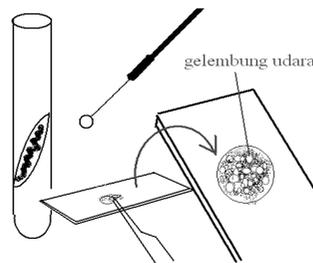
## E. UJI KATALASE

Selama respirasi aerobik (proses fosforilasi oksidatif), mikroba menghasilkan hidrogen peroksida, bahkan ada yang menghasilkan superoksida yang sangat beracun (Gambar 3.12). Senyawa ini dalam jumlah besar akan menyebabkan kematian pada mikroba. Senyawa ini dihasilkan oleh mikroba aerobik, fakultatif aerob, maupun mikroaerofilik yang menggunakan jalur respirasi aerobik.



Gambar 3.12.  
Pembentukan dan Pemecahan  $H_2O_2$

**Superoksida dismutase** adalah enzim yang bertanggung jawab untuk penguraian khususnya superoksida pada organisme aerob yang bersifat katalase negatif. Produksi katalase bisa diidentifikasi dengan menambahkan reagen  $H_2O_2$  pada suspensi bakteri. Jika dihasilkan gelembung gas, berarti bakteri tersebut mampu memproduksi enzim katalase. Jika tidak dihasilkan gelembung gas berarti uji katalase dinyatakan negatif (Gambar 3.13).



Gambar 3.13.  
Uji Katalase

## F. UJI TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSIA)

**TSIA** adalah uji yang dirancang untuk membedakan beberapa jenis bakteri yang termasuk kelompok *Enterobacteriaceae*, yang bersifat Gram negatif dan memfermentasikan glukosa membentuk asam sehingga dapat dibedakan dengan bakteri Gram negatif intestinal lain. Perbedaan ini didasarkan pada pola fermentasi karbohidrat dan produksi  $H_2S$  pada tabung reaksi. Pada pengamatan fermentasi karbohidrat, media TSIA mengandung laktosa dan sukrosa dengan konsentrasi 1%, dan mengandung glukosa dengan konsentrasi yang lebih rendah, yaitu 0,1%. Konsentrasi ini akan berpengaruh terhadap penggunaan karbohidrat dan keadaan asam yang terbentuk. Indikator pH (*phenol red*) ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan pH akibat fermentasi karbohidrat. Perubahan warna menjadi kuning menandakan asam, sedangkan warna menjadi lebih merah menandakan media menjadi basa. Warna media mula-mula adalah merah-oranye. Selain itu, ditambahkan  $FeSO_4$  untuk mendeteksi adanya gas  $H_2S$ .



### Latihan

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Jelaskan bagaimana amilum dapat digunakan oleh mikroba!
- 2) Uraikan reaksi yang terjadi pada pengujian enzim katalase melalui pemberian  $H_2O_2$  sehingga timbul gas!
- 3) Apa fungsi pemberian indikator pH pada uji TSIA?
- 4) Jelaskan bagaimana zona jernih di sekitar koloni mikroba pada media Skim Milk Agar menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim protease!
- 5) Apa peranan penting enzim oksidase dalam metabolisme sel?

### *Petunjuk Jawaban Latihan*

Baca dan cermati kembali uraian mengenai degradasi amilum, lipid, dan protein oleh enzim, serta cara pengujian oksidase, katalase, dan TSIA.



### Rangkuman

Perombakan bahan-bahan kimia oleh mikroba berlangsung melalui proses yang kompleks, di antaranya proses metabolisme dengan hasil energi atau senyawa-senyawa penyusun sel. Semua proses kimia ini melibatkan enzim sebagai biokatalisator. Beberapa jenis enzim ini adalah lipase, amilase, protease, oksidasi, dan katalase.



## Tes Formatif 2

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Pada Triple Sugar Iron Agar, apabila bagian *butt* berwarna kuning dan bagian *slant* berwarna merah, hal ini menunjukkan bahwa ....
  - A. terjadi fermentasi laktosa, sukrosa, dan glukosa
  - B. terjadi fermentasi laktosa saja
  - C. terbentuk  $H_2S$
  - D. terjadi fermentasi glukosa saja
  
- 2) Senyawa hidrogen peroksida yang beracun biasanya dihasilkan oleh organisme berikut, *kecuali* ....
  - A. mikroaerofilik
  - B. obligat aerob
  - C. anaerob
  - D. fakultatif aerob
  
- 3) Indikator yang dipakai untuk menguji amilase adalah ....
  - A. *neutral red*
  - B. *phenol red*
  - C. *bromthymol blue*
  - D. *iodine*
  
- 4) Media yang biasa digunakan untuk menguji lipase adalah ....
  - A. skim milk agar
  - B. trybutirin agar
  - C. triple sugar iron agar
  - D. nutrient agar
  
- 5) Indikator yang digunakan untuk uji amilolitik adalah ....
  - A. iodine
  - B. *neutral red*
  - C. *phenol red*
  - D. alkohol 70%

### 3.28 Faktor Lingkungan, Antimikroba, dan Aktivitas Enzimatik

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 3 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 3.

$$\text{Tingkat Penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100$$

Arti tingkat penguasaan

|        |           |           |             |
|--------|-----------|-----------|-------------|
| <70%   | 70% - 79% | 80% - 89% | 90% - 100%  |
| kurang | cukup     | baik      | baik sekali |

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda telah lulus praktikum. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 3, terutama bagian yang belum dikuasai.

# Praktikum

## A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

### 1. Uji Amilolitik

#### a. Alat

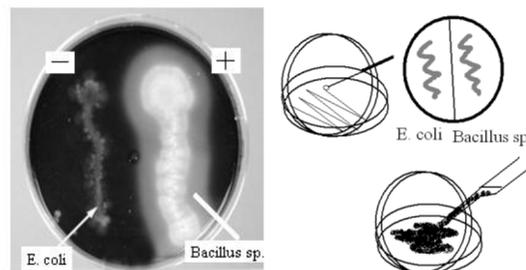
- 1) Pipet tetes.
- 2) Inkubator.
- 3) Cawan petri.
- 4) Bunsen.
- 5) Jarum ose.

#### b. Bahan

- 1) Media Nutrient Agar (NA)
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.
- 5) Zat pati.
- 6) Lugol's iodine.

#### c. Cara kerja

- 1) Diinokulasikan *Nutrient Agar* yang mengandung pati (2 g/l) dengan *E. coli* dan *Bacillus sp.* secara *streak*.
- 2) Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.
- 3) Setelah selesai inkubasi, tetesi cawan dengan *lugol's iodine* secukupnya sehingga seluruh permukaan media terkena.
- 4) Hidrolisis zat pati terlihat sebagai zona jernih di sekeliling koloni, sedangkan hasil negatif ditunjukkan warna sekitar koloni tetap biru hitam (Gambar 3.14).



Gambar 3.14.  
Uji Amilolitik

## 2. Uji Lipolitik

### a. Alat

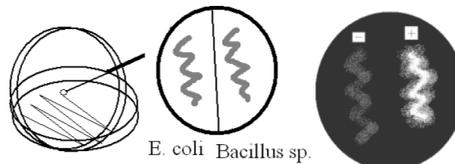
- 1) Inkubator.
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.
- 4) Jarum ose.

### b. Bahan

- 1) Media Tributyrin Agar.
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.
- 5) Neutral red.

### c. Cara kerja

- 1) *B. subtilis* dan *E. coli* diinokulasikan pada media Tributyrin Agar dengan indikator *neutral red*.
- 2) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 3) Reaksi positif ditandai oleh bercak-bercak kuning di sekeliling koloni, sedangkan reaksi negatif ditandai oleh bercak-bercak yang tetap berwarna merah (Gambar 3.15).



Gambar 3.15.  
Uji Lipolitik

## 3. Uji Proteolitik

### a. Alat

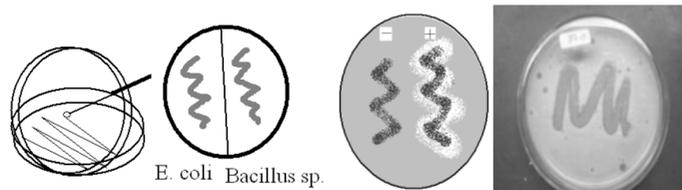
- 1) Inkubator.
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.
- 4) Jarum ose.

### b. Bahan

- 1) Media Skim Milk Agar (SMA).
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.

## c. Cara kerja

- 1) *B. subtilis* dan *E. coli* diinokulasikan pada *Skim Milk Agar* (SMA) secara *streak*.
- 2) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 3) Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih di sekeliling koloni (Gambar 3.16).



Gambar 3.16.  
Uji Proteolitik

## 4. Uji Oksidase

## a. Alat

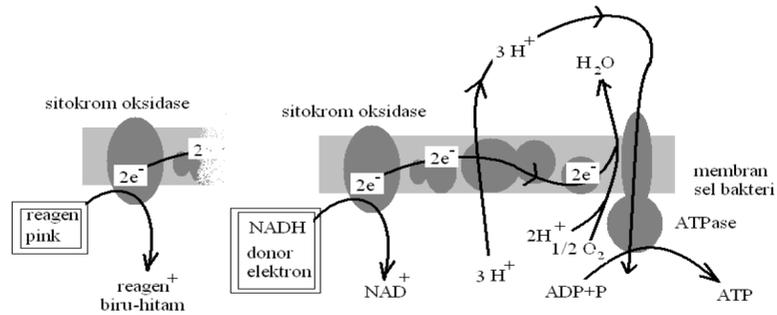
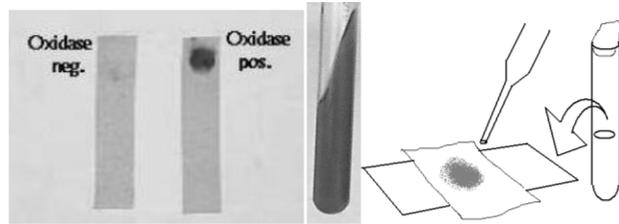
- 1) Pinset.
- 2) Kertas cakram.
- 3) Bunsen.
- 4) Jarum ose.
- 5) Pipet tetes.

## b. Bahan

- 1) Reagen oksidasi.
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.

## c. Cara kerja

- 1) Koloni bakteri diambil satu tetes (sebaiknya dari biakan cair) secara aseptis dan diinokulasikan pada *object glass*.
- 2) Di atas *object glass* diberi kertas merang sehingga tetesan tersebar pada kertas.
- 3) Tetesi dengan reagen, lalu lihat perubahan yang terjadi.
- 4) Jika warna berubah menjadi biru marun maka hasil uji positif, sedangkan bila tidak terjadi perubahan maka hasil uji negatif. Hasil uji positif tertunda jika warna biru muncul antara 10-60 detik setelah ditetesi (Gambar 3.17).



Gambar 3.17. Uji Oksidase dan Reaksinya

5. Uji Katalase

a. Alat

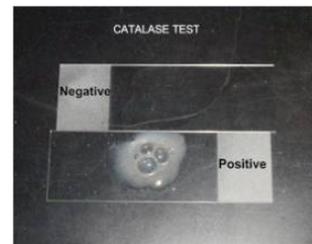
- 1) Bunsen.
- 2) Jarum ose.
- 3) Pipet tetes.
- 4) Object glass.

b. Bahan

- 1) Reagen katalase ( $H_2O_2$ ).
- 2) Isolat *E. coli*.
- 3) Isolat *B. subtilis*.
- 4) Alkohol 70%.

c. Cara kerja

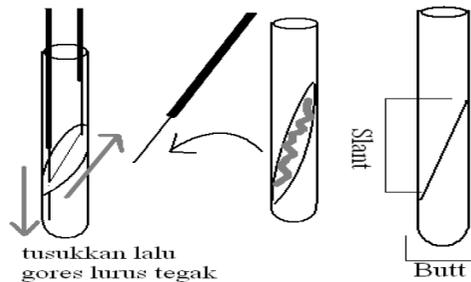
- 1) Koloni bakteri diambil satu ose secara aseptis dan diinokulasikan pada *object glass*.
- 2) Dengan menggunakan pipet tetes, 3%  $H_2O_2$  diteteskkan pada *object glass* secukupnya.
- 3) Diamati adanya gelembung untuk hasil positif dan tidak ada gelembung untuk hasil negatif, hati-hati membedakan antara gelembung yang muncul dari sel dengan kumpulan sel yang mengambang akibat ditambahi reagen (Gambar 3.18).



Gambar 3.18. Uji Katalase

## 6. Uji Triple Sugar Iron

- a. Alat
  - 1) Needle loop.
  - 2) Bunsen.
  - 3) Inkubator.
- b. Bahan
  - 1) Triple Sugar Iron Agar.
  - 2) Isolat *E. coli*.
  - 3) Isolat *B. subtilis*.
  - 4) Alkohol 70%.
- c. Cara kerja
  - 1) Biakan diinokulasikan pada media TSIA dengan cara inokulasi tusuk kemudian dilanjutkan dengan diulaskan lurus tegak pada agar miring (lihat gambar).
  - 2) Diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam (Gambar 3.19).



Gambar 3.19.  
Uji TSIA

- 3) Interpretasikan hasil dengan melihat keterangan di bawah ini.



= slant dan butt merah (alkali) atau tidak terjadi perubahan warna → tidak terjadi fermentasi karbohidrat, sedangkan pepton yang ada digunakan untuk sumber energi dalam keadaan aerob atau anaerob sehingga meningkatkan pH karena produksi amonia meningkat sebagai hasil samping metabolisme protein. Jika kemerahan lebih pekat pada *slant* maka terjadi degradasi aerobik *peptone*, sedangkan warna merah pekat tampak di semua media maka interpretasinya adalah degradasi *peptone* secara aerob maupun anaerob.



= slant merah (alkali) sedangkan butt kuning (asam) dengan atau tanpa produksi gas → hanya terjadi fermentasi glukosa, sedangkan fermentasi laktosa dan sukrosa tidak terjadi. Sel lebih memilih untuk mendegradasi glukosa terlebih dahulu karena glukosa adalah monosakarida yang dapat langsung masuk ke dalam jalur metabolisme (glikolisis). Media mengandung glukosa yang sangat sedikit (lebih sedikit dibanding laktosa dan sukrosa) sehingga jumlah asam

pada permukaan (*slant*) hilang secara cepat menjadi basa karena pada mulanya bagian *slant* telah menjadi kuning tapi dalam waktu lebih dari 24 jam sel akan kehabisan glukosa dan memilih untuk memanfaatkan protein sehingga media menjadi merah.



= *slant dan butt kuning (asam)* dengan atau tidak adanya gas → telah terjadi fermentasi glukosa, laktosa dan atau sukrosa karena laktosa dan sukrosa memiliki konsentrasi yang lebih tinggi sehingga dapat dimanfaatkan untuk substrat fermentasi lanjutan (jika glukosa habis) menghasilkan asam yang ditandai warna kuning setelah 24 jam.



= *butt berwarna kehitaman* → adanya  $H_2S$  yang bereaksi dengan senyawa besi  $FeSO_4$  pada media menghasilkan  $FeS$  yang berwarna kehitam-hitaman.  $H_2S$  ini merupakan hasil dari metabolisme protein.



= media pecah atau terangkat → timbul gas sebagai hasil samping fermentasi.

## B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

## C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN PRAKTIKUM

### 1. *Petunjuk penulisan laporan*

Laporan praktikum berisikan sebagai berikut.

- a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum. .
- b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
- c. Alat, bahan, dan cara kerja: dalam cara kerja gunakan kalimat berita jika memungkinkan usahakan untuk menggunakan kalimat pasif. Jangan sekali-kali menggunakan kalimat perintah.
- d. Hasil dan pembahasan: pembahasan merupakan hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil yang didapatkan dengan hasil penelitian terdahulu.
- e. Kesimpulan.
- f. Daftar Pustaka.

### 2. *Penyerahan Laporan*

Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

## Kunci Jawaban Tes Formatif

### *Tes Formatif 1*

- 1)
  - A. Benar, bakteri pertumbuhannya sangat ditentukan oleh suhu (faktor lingkungan). Kisaran suhu untuk bakteri termofilik adalah 50-100°C
  - B. Salah, 40-50°C masih tergolong mesofil.
  - C. Salah, 20-30°C tergolong mesofil.
  - D. Salah, 0-20°C tergolong psikrofil.
- 2)
  - A. Salah, bila kepekatan cairan di lingkungan sekitar sel terlalu tinggi maka massa cair tidak akan masuk ke dalam sel.
  - B. Salah, bila kepekatan cairan di lingkungan sekitar sel terlalu tinggi maka sel tidak akan mengerut.
  - C. Salah, penyebab mutasi dalam gen bukan karena kepekatan cairan di lingkungan sekitar sel terlalu tinggi.
  - D. Benar, keberadaan mikroba di lingkungan dapat dipengaruhi kepekatan cairan. Bila kepekatan cairan di lingkungan sekitar sel terlalu tinggi, maka isi sel akan keluar.
- 3)
  - A. Salah, panjang gelombang 200-300 nm dapat membunuh mikroba, tetapi yang paling efektif adalah 210-300 nm.
  - B. Salah, panjang gelombang 100-300 nm dapat membunuh mikroba, tetapi yang paling efektif adalah 210-300 nm.
  - C. Benar, asam nukleat pada sel mikroba dapat rusak akibat pengaruh sinar UV. Sinar UV dengan panjang gelombang 210-300 dapat membunuh mikroba.
  - D. Salah, panjang gelombang 210-250 nm dapat membunuh mikroba, tetapi yang paling efektif adalah 210-300 nm.
- 4)
  - A. Salah, bakteri yang menyukai pH asam disebut asidofilik.
  - B. Salah, bakteri yang menyukai pH netral disebut neutrofilik.
  - C. Benar, basofilik adalah bakteri yang menyukai pH basa.
  - D. Salah, bakteri yang menyukai kadar garam tinggi disebut halofilik.
- 5)
  - A. Benar, asidofilik adalah bakteri yang menyukai pH asam.
  - B. Salah, neutrofilik adalah bakteri yang menyukai pH netral.
  - C. Salah, basofilik adalah bakteri yang menyukai pH basa.
  - D. Salah, halofilik adalah bakteri yang menyukai kadar garam tinggi.

### *Tes Formatif 2*

- 1)
  - A. Salah, tetracyclin bukan antimikroba tetapi antibiotik.
  - B. Salah, tetracyclin bukan antifungal tetapi antibiotik.
  - C. Benar, antibiotik merupakan bahan yang diproduksi oleh mikroba atau merupakan bahan sintesis yang mampu menghambat perkembangan. Tetracyclin merupakan salah satu jenis antibiotik.
  - D. Salah, tetracyclin bukan desinfektan tetapi antibiotik.

- 2)
  - A. Salah, cukup jelas.
  - B. Salah, cukup jelas.
  - C. Salah, cukup jelas.
  - D. Benar, daya oligodinamik logam berat bersifat racun terhadap sel mikroba. Daya hambat dari logam dengan konsentrasi rendah disebut daya oligodinamik.
- 3)
  - A. Salah, kertas buram tidak digunakan untuk metode Kirby-Bauer.
  - B. Benar, metode Kirby-Bauer merupakan metode yang menggunakan kertas cakram untuk menguji kekuatan desinfektan, antibiotik, dan antimikroba secara difusi.
  - C. Salah, membran filter tidak digunakan untuk metode Kirby-Bauer.
  - D. Salah, kertas tisu tidak digunakan untuk metode Kirby-Bauer.
- 4)
  - A. Salah, konsentrasi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektivitas desinfektan.
  - B. Salah, jenis mikroba merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektivitas desinfektan.
  - C. Salah, pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektivitas desinfektan.
  - D. Benar, tekanan osmotik bukan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektivitas desinfektan.
- 5)
  - A. Benar, senyawa Hg merupakan salah satu jenis senyawa desinfektan yang dapat menyebabkan denaturasi.
  - B. Salah, ethyl alkohol merupakan salah satu jenis senyawa desinfektan yang dapat menyebabkan denaturasi dan koagulasi protein.
  - C. Salah, detergen merupakan salah satu jenis senyawa desinfektan yang dapat merusak membran sel.
  - D. Salah, emulsifier merupakan salah satu jenis senyawa desinfektan yang dapat memindahkan sel secara mekanis.

#### Tes Formatif 3

- 1)
  - A. Salah, terjadi fermentasi laktosa, sukrosa, dan glukosa apabila bagian *slant* dan *butt* berwarna kuning.
  - B. Salah, terjadi fermentasi laktosa saja apabila bagian *slant* berwarna kuning.
  - C. Salah, terbentuk  $H_2S$  apabila *butt* berwarna hitam.
  - D. Benar, uji TSIA bila positif terbentuk fermentasi glukosa maka akan memperlihatkan bagian *butt* berwarna kuning dan bagian *slant* berwarna merah.
- 2)
  - A. Salah, salah satu kelompok organisme yang menghasilkan  $H_2O_2$  beracun adalah mikroaerofilik.
  - B. Salah, salah satu kelompok organisme yang menghasilkan  $H_2O_2$  beracun adalah obligat aerob.
  - C. Benar, senyawa  $H_2O_2$  dihasilkan oleh mikroba yang menggunakan glukosa yang bersifat mikroaerofilik, obligat aerob, fakultatif aerob.
  - D. Salah, salah satu kelompok organisme yang menghasilkan  $H_2O_2$  beracun adalah fakultatif aerob.

- 3) A. Salah, *netral red* merupakan indikator yang diperlukan untuk menguji lipolitik.  
B. Salah, *phenol red* merupakan indikator yang diperlukan untuk menguji TSIA.  
C. Salah, *bromthymol blue* merupakan bahan yang digunakan untuk penghitungan secara MPN.  
D. Benar, *iodine* merupakan indikator yang diperlukan untuk menguji amilase.
- 4) A. Salah, *skim milk agar* merupakan media untuk menguji proteolitik.  
B. Benar, tributyrin agar merupakan media untuk menguji lipase.  
C. Salah, TSIA merupakan media untuk membedakan kelompok Enterobacteriaceae.  
D. Salah, NA media umum yang biasa digunakan untuk peremajaan.
- 5) A. Benar, *iodine* merupakan salah satu indikator yang dipakai pada uji amilolitik.  
B. Salah, *netral red* merupakan indikator yang diperlukan untuk menguji lipolitik.  
C. Salah, *phenol red* merupakan indikator yang diperlukan untuk menguji TSIA.  
D. Salah, alkohol 70% untuk kerja aseptis dan kondisi steril.

## Daftar Pustaka

- Benson, H.J. (1973). *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa: W.M.C. Brown Co. Publ. Dubuque.
- Brooks G. F, *et al.* (2005). Jawetz, Melnick & Adelberg's. *Medical Microbiology*. Twenty Second. Ed. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.
- Diliello, L.R. (1982). *Methods in Food and Dairy Microbiology*. Connecticut: Avi Publ. Co. Inc. Westport.
- Fardiaz, S. (1994). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Frazier, W.C.; Merth, E.H.; and Deibel, R.H. (1968). *Laboratory Manual for Food Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Minneapolis, Burgess Publ. Co.
- Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; and Krieg, N.R. (1976). *Microbiology*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Presscott, *et al.* (2002). *Microbiology*. 5<sup>th</sup> Edition. Mc. Graw Higher Edition Company.
- Salle, A.J. (1961). *Fundamental Principles of Bacteriology*. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Seeley, Jr., H.W.; and Demark, P.J.V. (1972). *Selected Exercises from Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Stainer, R.Y.; Adelberg, E.A.; and Ingraham, J. (1976). *The Microbial world*. 4<sup>th</sup> ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc.

# Lampiran

## Lampiran 1

### Kunci Identifikasi Karang Penyebab Kerusakan Pangan

#### Keterangan

1. Miselium vegetatif biasanya tanpa dinding penyekat atau septa. Spora timbul dalam bentuk sporangia bulat atau silindrikal. Mempunyai kolumela.
  - a. **Sporangiofora** timbul dalam bentuk rumpun dari **stolon**
    - 1) Sporangiofora timbul pada noda dari stolon. Sporangia spherikal ..... Rhizopus.
    - 2) Sporangiofora timbul pada internoda dari stolon. Sporangia berbentuk buah pear ..... Absidia.
  - b. Sporangiofora tidak timbul dari stolon
    - 1) Sporangia satu jenis.
    - 2) Zygospora jarang atau tidak ada, tidak pada hifa (hyphae) ..... Mucor.
    - 3) Zyfospora relatif banyak, pada hifa yang bercabang ..... Zygorrhynchus.
    - 4) Sporangia dua jenis/bentuk ..... Thamnidium.
2. **Miselium vegetatif** mempunyai banyak dinding penyekat atau septa. Spora tumbuh pada konidiofora dari berbagai bentuk.
  - a. **Hifa** dalam bentuk masa, seperti kapas, konidiofora tidak bersatu, biasanya jelas terpisah.
    - 1) Hifa dan konidia berwarna terang
      - a) Konidia satu sel
        - (1) Konidiofora pendek, sedikit berbeda dari konidia.
          - (a) Konidiofora pendek, jarang bercabang ..... Geotricum.
          - (b) Konidiofora lebih panjang, tidak bercabang ..... Monilia.
        - (2) Konidiofora jelas berbeda dari konidia
          - (a) Konidiofora tidak bercabang, sedikit bercabang, atau membengkak pada ujungnya.
            - Konidia tidak membentuk rantai. Dikelilingi oleh lendir. .... Hyalopus.
            - Konidia membentuk rantai
              - Konidiofora membesar pada ujungnya.
                - Sterigmata pendek dan banyak ..... Aspergillus

- Sterigmata relatif panjang dan lebih sedikit *Penicillia monovertikulata*.
  - Konidiofora bercabang pada ujungnya, membentuk sikat ..... *Penicillium*.
- (b) Konidiofora lebih atau kurang bercabang secara lateral
- Konidiofora melengkung ..... *Spirotrichum*.
  - Konidiofora tegak. Konidia pada ujungnya ..... *Botrytis*.
- ...
- b) **Konidia** dua sel, berbentuk buah pear, terminal pada konidiogora ..... *Trichothecium*.
- 2) Hifa dan/atau konidia berwarna gelap  
**Konidia** satu sel. Hifa berbeda dari konidia.  
Konidia membentuk rantai
- a) Konidiofora sederhana. Rantai konidia lateral ..... *Dematium*.
- b) Konidiofora lebih bercabang seperti pohon ..... *Hormodendrum*.
- 3) Konidia tidak membentuk rantai, berkelompok. Konidiofora bercabang, seperti pohon dan timbul spora ..... *Haplographium*.
- a) **Konidia** dua sel, tidak berkelompok, biasanya tidak membentuk rantai ..... *Caladosporium*.
- b) **Konidia** banyak sel
- (1) Konidia membentuk rantai. Muriform, dengan sambungan-sambungan kecil ..... *Alternaria*.
- (2) Konidia tidak membentuk rantai ..... *Stemphylium*.
- b. Konidiofora bersatu secara jelas
- 1) Konidiofora bersatu membentuk bulatan atau silinder, kadang-kadang seperti batang.
- a) Hifa, koremium dan konidia berwarna muda. Koremium dengan spora di samping dan di atas ..... *Isaria*.
- b) Hifa, koremium dan spora berwarna gelap. Konidia bercabang ..... *Stysanus*.
- 2) Konidiofora bersatu membentuk satuan spherikal. Konidia berwarna muda, beberapa sel, berbentuk sickle ..... *Fusarium*.

## Lampiran 2

## Komposisi Medium

| No | Nama Media                              | Bahan   | Komposisi       |
|----|---|---|-----------------|
| 1. | Blood Agar                              | Infusi jantung sapi   | 500 g           |
|    |   | Triptosa  | 10 g            |
|    |   | NaCl  | 5 g             |
|    |   | Agar  | 15 g            |
|    |   | Akuades   | 1.000 ml        |
|    |   | pH  | 7,0-7,2         |
|    |   | Setelah sterilisasi dan didinginkan sampai 45-50°C, Tambahkan 5% defibrinated blood steril. |                 |
| 2. | Brain Heart Infusion Broth              | Infusi otak sapi  | 200 g           |
|    |   | Infusi jantung sapi   | 250 g           |
|    |   | Pepton  | 10 g            |
|    |   | Dekstrosa   | 2 g             |
|    |   | NaCl  | 5 g             |
|    |   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 2,5 g           |
|    |   | Akuades   | sampai 1.000 ml |
|    |   | pH  | 7,4             |
| 3. | Brilliant Green Agar                    | Pepton  | 10 g            |
|    |   | Yeast Ekstrak   | 3 g             |
|    |   | Laktosa   | 10 g            |
|    |   | Sukrosa   | 10 g            |
|    |   | NaCl  | 5 g             |
|    |   | Agar  | 20 g            |
|    |   | Hijau brilliant   | 0,0125 g        |
|    |   | Phenol Red  | 0,08 g          |
|    |   | Akuades   | 1.000 ml        |
| 4. | Brilliant Green Lactose Bile Broth (2%) | Pepton  | 10 g            |
|    |   | Laktosa   | 10 g            |
|    |   | Oxgall  | 20 g            |
|    |   | Brilliant Green   | 0,0133 g        |
| 5. | Eosin Methylene Blue (EMB) Agar         | Pepton  | 10 g            |
|    |   | Laktosa   | 5 g             |
|    |   | Sukrosa   | 10 g            |
|    |   | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 10 g            |
|    |   | Agar  | 2 g             |
|    |   | Eosin-Y   | 13,5 g          |
|    |   | Methylene Blue  | 0,4 g           |
|    |   | Akuades   | 1.000 ml        |
| 6. | Goodkova Agar                           | Pepton  | 10 g            |
|    |   | NaCl  | 5 g             |
|    |   | Glukosa   | 1 g             |
|    |   | Agar  | 30 g            |
|    |   | Akuades   | 1.000 ml        |

### 3.42 Faktor Lingkungan, Antimikroba, dan Aktivitas Enzimatik

|     |                            |  |          |
|-----|----------------------------|--|----------|
| 7.  | Koser Citrate Medium       | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                              | 1 g      |
|     |                            | Magnesium sulfat   | 0,2 g    |
|     |                            | Na-amonium fosfat  | 1,5 g    |
|     |                            | Na-sitrat  | 3 g      |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | pH   | 6,8      |
| 8.  | Lactose Broth              | Ekstrak sapi   | 3 g      |
|     |                            | Pepton   | 5 g      |
|     |                            | Laktosa  | 5 g      |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | pH   | 6,7      |
| 9.  | Litmus Milk                | Skim milk  | 100 g    |
|     |                            | Litmus   | 0,75 g   |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
| 10. | McConkey Agar              | Pepton   | 17 g     |
|     |                            | Protease pepton  | 3 g      |
|     |                            | Laktosa  | 10 g     |
|     |                            | Bile Salts No. 3   | 1,5 g    |
|     |                            | NaCl   | 5 g      |
|     |                            | Agar   | 13,5 g   |
|     |                            | Neutral Red  | 0,03 g   |
|     |                            | Kristal violet   | 0,001 g  |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
| 11. | Malt Agar                  | Ekstrak malt   | 30 g     |
|     |                            | Glukosa  | 16 g     |
|     |                            | Agar   | 15 g     |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | Cairkan dan asamkan dengan larutan asam laktat sampai pH 3,5 |          |
| 12. | Malt Ekstrak Agar          | Ekstrak Malt   | 30 g     |
|     |                            | Pepton   | 5 g      |
|     |                            | Agar   | 15 g     |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
| 13. | Mueller- Hinton Agar       | Beef infusion  | 6 g      |
|     |                            | Casein hydrolysate   | 17, 5 g  |
|     |                            | Starch   | 1,5 g    |
|     |                            | Agar   | 10 g     |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | pH diatur sampai   | 7, 4     |
| 14. | Manitol Yeast Ekstrak Agar | Peptone  | 2,5 g    |
|     |                            | NaCl   | 2, 5 g   |
|     |                            | Agar   | 20 g     |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | Manitol  | 5 g      |
|     |                            | Yeast ekstrak  | 2, 5 g   |
| 15. | Nutrient Broth (Agar)      | Ekstrak sapi   | 3 g      |
|     |                            | Pepton   | 5 g      |
|     |                            | Akuades  | 1.000 ml |
|     |                            | Agar   | 15 g     |

|   |                                    |   |  |
|---|------------------------------------|---|--|
| 16.   | NA + 1% fat                        | Margarin  | 10 g (+ neutral red)   |
| 17.   | Nutrient Gelatin                   | Beef Ekstrak<br>Pepton<br>Gelatin<br>Akuades  | 3 g<br>5 g<br>120 g<br>100 ml  |
| 18.   | Plate Count Agar                   | Tripton<br>Ekstrak khamir<br>Glukosa<br>Agar<br>Akuades   | 5 g<br>2,5 g<br>1 g<br>15 g<br>1.000 ml  |
| 19.   | Patato Dextrose Agar,<br>Acidified | Potato infusio<br>Glukosa<br>Agar<br>Aquades  | 200 g<br>20 g<br>15 g<br>1.000 ml  |
| Diatur pHnya menjadi pH 3,5-4,0 dengan larutan 10% asam tartarat. |                                    |   |  |
| 20.   | Protease Broth (Medium<br>MR-VP)   | Polipepton<br>Glukosa<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Aquades<br>pH   | 7 g<br>5 g<br>5 g<br>1.000 ml<br>6,9   |
| 21.   | Salmonella-Shigella (S-S)<br>Agar  | Beef Ekstrak<br>Protease pepton<br>Laktosa<br>Bile Salts No.3<br>Na-sitrat<br>Na-thiosulfat<br>Ferric sitrat<br>Agar<br>Brilliant Green<br>Neutral Red<br>Akuades | 5 g<br>5 g<br>10 g<br>8,5 g<br>8,5 g<br>8,5 g<br>1 g<br>13,5 g<br>0,00033 g<br>0,025 g<br>1.000 ml |
| 22.   | Selenite Cystine Broth             | Tripton<br>Laktosa<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Na-acid selenite<br>L-cystine<br>Akuades<br>pH  | 5 g<br>4 g<br>10 g<br>4 g<br>0,01 g<br>1.000 ml<br>7,0   |
| 23.   | Skim Milk Agar                     | Skim Milk<br>Agar<br>Akuades  | 100 gr<br>15 g<br>1.000 ml   |
| 24.   | Staphylococcus Medium 110          | Ekstrak khamir<br>Tripton<br>Gelatin<br>Laktosa<br>Mannitol<br>NaCl<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Agar<br>Akuades   | 2,5 g<br>10 g<br>30 g<br>2 g<br>10 g<br>75 g<br>5 g<br>15 g<br>1.000 ml                            |

### 3.44 Faktor Lingkungan, Antimikroba, dan Aktivitas Enzimatik

|  |                              |  |          |
|--|------------------------------|--|----------|
| 25.  | Starch Agar                  | Tripton                                      | 10 g     |
|  |                              | Ekstrak khamir                               | 10 g     |
|  |                              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 5 g      |
|  |                              | Soluble starch                               | 3 g      |
|  |                              | Agar   | 15 g     |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
| 26.  | Sugar Broth                  | Nutrient Broth                               | 1.000 ml |
|  |                              | Gula: Glukosa/Sukrosa/Laktosa                |          |
|  |                              | Brom cresol purple                           | 5 g      |
|  |                              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 0,04 g   |
| 27.  | Sulfite Agar                 | Tripton                                      | 10 g     |
|  |                              | Na-sulfit (NA <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) | 1 g      |
|  |                              | Ferriesitrat                                 | 0,59 g   |
|  |                              | Agar   | 20 g     |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
|  |                              |  |          |
| 28.  | Triple Sugar Iron (TSI) Agar | Polipepton                                   | 20 g     |
|  |                              | Laktosa                                      | 10 g     |
|  |                              | Sukrosa                                      | 10 g     |
|  |                              | Glukosa                                      | 10 g     |
|  |                              | NaCl   | 5 g      |
|  |                              | Ferous amonium sulfat                        | 0,2 g    |
|  |                              | Na-thiosulfat                                | 0,2 g    |
|  |                              | Phenol Red                                   | 0,025 g  |
|  |                              | Agar   | 12 g     |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
|  |                              | pH   | 7,4      |
| 29.  | Trypticase Soy Agar/Broth    | Trypticase (tryptone)                        | 17 g     |
|  |                              | Phyton (soytone)                             | 3 g      |
|  |                              | Glukosa                                      | 2,5 g    |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
|  |                              |  |          |
| Untuk Broth, hilangkan agar dan tambahkan 2,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> per liter. |                              |  |          |
| 30.  | Thioglycolate Medium         | Infusi daging sapi                           | 500 g    |
|  |                              | Pepton                                       | 10 g     |
|  |                              | Dekstrosa                                    | 5 g      |
|  |                              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 2 g      |
|  |                              | NaCl   | 5 g      |
|  |                              | Na-thioglycolate                             | 0,5 g    |
|  |                              | Methylene Blue                               | 0,002 g  |
|  |                              | Agar   | 0,5 g    |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
|  |                              |  |          |
| 31.  | Vogel-Johnson Agar           | Tripton                                      | 10 g     |
|  |                              | Ekstrak khamir                               | 5 g      |
|  |                              | Mannitol                                     | 10 g     |
|  |                              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 5 g      |
|  |                              | Agar   | 15 g     |
|  |                              | LiCl   | 5 g      |
|  |                              | Glicin                                       | 10 g     |
|  |                              | Merah fenol (phenol red)                     | 0,025 g  |
|  |                              | Akuades                                      | 1.000 ml |
|  |                              |  |          |

### Lampiran 3

#### Komposisi Larutan Pengencer

| No | Nama Larutan                    | Bahan, Komposisi, dan Prosedur  |
|----|---------------------------------|---|
| 1. | Larutan Bufer Fosfat            |   |
|    | Larutan stok                    | $K_2HPO_4$ 34 g<br>Akuades 500 ml<br>Atur pHnya sampai pH 7,2<br>Tambahkan air sampai 1.000 ml        |
|    | Larutan pengencer               | Larutan stok 1,25 ml<br>Tambahkan akuades sampai 1.000 ml   |
| 2. | Larutan garam fisiologi         | NaCl 8,5 g<br>Akuades 1.000 ml  |
| 3. | Larutan pengencer + pasir       | Tambahkan 10 g pasir quartz ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi           |
| 4. | Larutan pengencer + glass beads | Tambahkan satu sendok teh glass beads ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi |

## Lampiran 4

## Komposisi Larutan Pewarna

| No | Nama Larutan   | Bahan, Komposisi, dan Prosedur  |
|----|--|---|
| 1. | Alfa-naftol  | 5% alfa-naftol di dalam 95% etil alkohol  |
| 2. | Larutan Pewarnaan Gram<br>Larutan amonium oksalat kristal violet<br><br>Campuran larutan A dan B | <p>- Larutan A:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kristal violet (90%) 2 g</li> <li>Etanol 95% 20 ml</li> </ul> <p>- Larutan B:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Amonium oksalat 0,8 g</li> <li>Akuades 80 ml</li> </ul> <p>- Larutan Gram's Iodine (Lugol):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Iodine (yodium)</li> <li>KJ 1 g</li> <li>Akuades 2 g</li> </ul> <p>- Alkohol Aseton: 300 ml</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Alkohol 95%</li> <li>Aseton</li> </ul> <p>Larutan Safranin (counterstain): 70 ml</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Safranin (2,5% di dalam etanol 95%) 30 ml</li> <li>Akuades 10 ml</li> </ul> <p>100 ml</p> |
| 3. | Malachite Green  | Larutan 5% malachite green oksalat di dalam air   |
| 4. | Methylene Blue (untuk uji MBRT)  | Air sebanyak 202 ml direbus hingga mendidih, kemudian ditambahkan 1 tablet methylene blue thiocyanat. Perebusan dilakukan di dalam wadah tertutup   |
| 5. | Methylene Blue (berwarna)  | Kristal biru metilen 1 g<br>Akuades 100 ml  |
| 6. | Larutan Methyl Red   | 0,1 g methyl red (bubuk) dan 300 ml etanol 95% dilarutkan di dalam aquades sampai 500 ml  |
| 7. | Nigrosin   | Nigrosin 10 gr<br>Formalin 0,5 ml<br>Akuades 100 ml<br><br>Campurkan nigrosin dalam aquades dan panaskan sampai mendidih selama 3 menit. Kemudian formalin ditambahkan dan saring dengan kertas saring  |
| 8. | Ziehl Nelson KArbol Fuchsin  | Basic fuchsin 0,3 gr<br>Alkohol 95% 10 ml<br>Kristal fenol 5 gr<br>Akuades 95 ml<br><br>Basic fuchsin dilarutkan dalam alcohol. Kristal fenol dilarutkan dalam aquades. Campurkan kedua larutan itu dan homogenkan  |

**Lampiran 5**

## Reagen

| No | Nama Reagen                      | Bahan   | Komposisi             |
|----|----------------------------------|---|-----------------------|
| 1. | Kovacs                           | p-Dimetilaminobenzaldehida<br>Amil alkohol<br>HCl pekat     | 5 g<br>75 ml<br>25 ml |
| 2. | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pekat (30%)<br>Akuades sampai | 10 ml<br>100 ml       |
| 3. | Fenol 5%                         | Kristal fenol<br>Akuades                                    | 5 gr<br>95 ml         |
| 4. | Neutral red                      | Netral red<br>Akuades                                       | 1 gr<br>100 ml        |
| 5. | HCl 1%                           | HCl pekat (37%)<br>Akuades sampai                           | 2, 7 ml<br>100 ml     |
| 6. | NaOH 1 N                         | NaOH c.p<br>Akuades sampai                                  | 40 gr<br>1.000 ml     |