

LAPORAN RESMI

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI TEKNIK



PERCOBAAN

ISOLASI BAKTERI DARI SUATU CAMPURAN DAN UJI **BIOKIMIA**

Hari : Kamis

Kelompok : D-II

Praktikan : 1. Haris Syukra P. (2310.100.150)
2. M.Iqbal (2310.100.117)
3. Salman Faris (2310.100.141)

Tanggal Percobaan : 29 Maret 2012

Tanggal Penyerahan laporan : 5 April 2012

Asisten : Fajar Singgih Kurnia Putra

JURUSAN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2012

LAPORAN RESMI

ISOLASI BAKTERI DARI SUATU CAMPURAN

DAN UJI BIOKIMIA

I. Tujuan Percobaan

I.1. Isolasi Bakteri Dari Suatu Campuran

Mempelajari cara-cara mengisolasi bakteri dari suatu campuran dengan teknik cawan gores dan cawan tuang.

I.2. Uji Biokimia

I.2.1 Katalase

Mempelajari dimiliki atau tidaknya enzim katalase pada suatu mikroorganisme.

I.2.2 Hidrolisa Gelatin

Menentukan jenis mikroorganisme yang memiliki gelatinase, eksoenzim yang mempunyai kemampuan menguraikan kanji menjadi glukosa.

II. Hasil Percobaan

II.1. Isolasi Bakteri Dari Suatu Campuran

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, diperoleh data-data pengamatan sebagai berikut :

II.1 Data Pengamatan Teknik Cawan Gores

Bentuk koloni jika dilihat dari	Pengamatan Metode Cawan Gores (24 jam)			
	Sektor 0	Sektor 1	Sektor 2	Sektor 3
Atas Keseluruhan				
Atas Tepi				

Permukaan (samping)				
<u>Keterangan:</u> • Warna • Diameter • Kepekatan	-	Putih 0,6 cm Pekat	Putih 0,1 cm Tidak pekat	Putih 0,05 cm Tidak pekat

Bentuk koloni jika dilihat dari	Pengamatan Metode Cawan Gores (96 jam)			
	Sektor 0	Sektor 1	Sektor 2	Sektor 3
Atas Keseluruhan				
Atas Tepi				
Permukaan (samping)				
<u>Keterangan:</u> • Warna • Diameter • Kepekatan	-	Putih 1,5 cm Sangat pekat	Putih 1,3 cm tidak pekat	Putih 1,7 cm Tidak pekat

II.2 Data Pengamatan Teknik Cawan Tuang

Bentuk koloni jika dilihat dari	Pengamatan Metode Cawan Tuang (24 jam)			
	Blanko	Petridish 1	Petridish 2	Petridish 3
Atas Keseluruhan				
Atas Tepi				
Permukaan (samping)				
<u>Keterangan:</u> - Warna - Diameter - Kepekatan	-	Putih 0,7 cm Sangat Pekat	Putih 0,5 cm pekat	Putih 0,3 cm pekat

Bentuk koloni jika dilihat dari	Pengamatan Metode Cawan Tuang (96 jam)			
	Blanko	Petridish 1	Petridish 2	Petridish 3
Atas Keseluruhan				
Atas Tepi				
Permukaan (samping)				
<u>Keterangan:</u> - Warna - Diameter - Kepekatan	-	putih 1 cm Sangat Pekat	putih 0,7 cm pekat	putih 0,5 cm pekat

II.2. Uji Biokimia

II.2.1. Katalase

Mikroorganisme	Uji Katalase
<i>Zymomonas m.</i>	+
<i>Entrobacter</i>	+

Tanda positif menunjukkan bahwa terdapat katalase pada bakteri

II.2.2 Hidrolisa Gelatin

Media	Mikroorganis me		
	<i>Blanko</i>	<i>Zymomonas m.</i>	<i>Enterobacter a.</i>
Gelatin	+	+	+

Tanda positif menunjukkan bahwa terjadi hidrolisis pada bakteri

III. Pembahasan

III.1. Isolasi Bakteri Dari Suatu Campuran

Percobaan isolasi bakteri ini menggunakan dua teknik isolasi, yaitu cawan gores dan cawan tuang. Jenis campuran mikroorganisme yang digunakan adalah *Zymomonas mobilis* dan *Entrobacter aerogenes*. Mediana adalah NB agar, suatu karbohidrat kompleks diperoleh dari algae marin tertentu:diolah untuk membuang substansi yang tak dikehendaki (Pelczar, 2006).

Untuk teknik cawan gores, membagi dasar *petridish* bagian luar menjadi 4 sektor dan mengisinya dengan media NB agar. Lalu mensterilisasi dengan *autoclave* (T=121°C) selama 15 menit. Tujuannya untuk membunuh seluruh mikroba yang mungkin ada dalam objek. Namun, tidak mungkin mikroba dapat tersterilisasi seluruhnya, hal ini dikarenakan mikroba memiliki kemampuan yang berbeda dalam bertahan dalam suhu yang berbeda. Kemampuan ini bisa dinyatakan dengan istilah *TDP* (*Thermal Dead Point*) suhu terendah dimana suatu bakteri dalam suatu suspensi liquid dapat terbunuh dalam waktu 10 menit (Pelczar, 2006).

Setelah sterilisasi, biarkan media agar memadat. Kemudian dilanjutkan dengan melakukan proses inokulasi dalam *incase*, tujuannya adalah agar media

tidak terkontaminasi oleh bakteri yang tidak diinginkan sehingga mengganggu bakteri yang ingin di tumbuhkan. Penggoresan dilakukan secara zig-zag menggunakan kawat ose. Sektor 0 sebagai media pembanding. Penggoresan pertama dilakukan di sektor I setelah pengambilan suspensi dari biakan asli. Penggoresan kedua di sektor II setelah pengambilan suspensi dari sektor I. Penggoresan ketiga di sektor III setelah pengambilan suspensi dari sektor II. Kawat ose harus dipijarkan terlebih dahulu setiap selesai melakukan penggoresan bakteri agar tidak terjadi kontaminasi.

Pada pengamatan 24 jam, muncul koloni bakteri pada bekas goresan. Terlihat koloni tumbuh paling banyak di sektor I dan koloni paling sedikit di sektor III. Dilihat dari atas tepi, koloni berbentuk rangkaian bulatan berbentuk menyerupai oval. Dilihat dari permukaan samping, koloni sedikit bergelombang. Di sektor I, koloni berwarna putih susu diameter $\pm 0,6$ cm. Di sektor II, koloni berwarna putih susu berdiameter $\pm 0,1$ cm. Di sektor III, belum berwarna putih susu diameter $\pm 0,05$ cm. Pada sektor 0 sebagai media pembanding, tak menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba. Pengamatan 96 jam perubahan koloni semakin jelas. Koloni tumbuh semakin banyak dengan diameter semakin besar di tiap sektor. Sektor I dan II terlihat lebih pekat dibanding sektor III. Dilihat dari atas tepi, koloni berbentuk lonjong dan bergerigi. Dilihat dari permukaan samping, koloni terlihat bergelombang. Di sektor I, koloni berwarna putih susu diameter $\pm 1,5$ cm. Di sektor II, koloni berwarna putih susu berdiameter $\pm 1,3$ cm. Di sektor III, koloni berwarna putih susu berdiameter $\pm 1,7$ cm. Sedangkan di sektor 0 menunjukkan adanya perubahan yakni tumbuhnya koloni bakteri. Ini berarti bahwa sektor 0 telah terkontaminasi oleh bakteri.

Berdasarkan hasil pengamatan, bakteri terisolasi pada sektor III. Ada kemungkinan bahwa bakteri yang terisolasi melalui teknik cawan gores adalah *Enterobacter aerogenes*. Parameternya adalah jumlah bakteri tumbuh paling sedikit di sektor III dan bentuk mikroba yang tumbuh di tiap sektor. Bakteri yang tumbuh di sektor III berbentuk lonjong panjang bila dilihat dari atas keseluruhan. Menurut literatur, bakteri *Enterobacter aerogenes* biasanya ditemui dalam bentuk

spherical atau oval seperti kapsul (Anonim, 2010).

Untuk teknik cawan tuang, 3 tabung reaksi diisi dengan media NB agar hingga mencapai $\frac{1}{2}$ isinya, kemudian disterilisasi. Inokulasi dilakukan ketika media agar masih dalam keadaan cair, karena jika sudah memadat akan sulit dituang ke dalam *petridish*.

Setelah disterilisasi, tabung reaksi dikocok dengan cara memutar perlahan di kedua telapak tangan agar merata disetiap pengambilan campuran. Pengambilan pertama, kawat ose dicelupkan hingga ke dasar tabung suspensi dan dipindahkan ke tabung I. Pengambilan kedua, kawat ose dicelupkan hingga ke dasar tabung I dan dipindahkan ke tabung II. Pengambilan ketiga, kawat ose dicelupkan hingga ke dasar tabung II dan dipindahkan ke tabung III. Sama seperti metode cawan gores, kawat ose tetap harus dipijarkan untuk menghindari kontaminasi. Setelah itu, isi tiap tabung reaksi dituangkan ke dalam tiap *petridish* sesuai urutan tabung.

Tujuan inokulasi secara berkesinambungan, baik pada teknik cawan gores dan cawan tuang adalah untuk untuk menumbuhkan bakteri yang telah diisolasi secara maksimal, sehingga diharapkan pada sektor III (cawan gores) dan *petridish* III (cawan tuang) didapat biakan murni yang terbentuk dari satu jenis bakteri. Selanjutnya, seluruh *petridish* diinkubasi ($T = 32^{\circ}\text{C}$). Tujuan dari pemilihan suhu sekitar 32°C karena mikroorganisme memiliki suhu minimum untuk tumbuh sekitar suhu 32°C , sehingga dengan inkubasi pada suhu ini pertumbuhan bakteri menjadi optimum.

Pada cawan tuang, pengamatan 24 jam koloni bakteri tumbuh di tiap *petridish*. Dilihat dari atas keseluruhan, koloni berupa bintik kecil dan ada juga yang berbentuk bulat besar berwarna putih. Bakteri paling banyak tumbuh di *petridish* I dibanding *petridish* lain. Di *petridish* III, bakteri tumbuh sangat sedikit dan jaraknya berjauhan. *Petridish* I, koloni terbesar berdiameter $\pm 0,7$ cm. *Petridish* II, koloni terbesar berdiameter $\pm 0,5$ cm. *Petridish* III, koloni terbesar berdiameter $\pm 0,3$ cm. Pengamatan 96 jam koloni bakteri semakin membesar berwarna putih. Dilihat dari atas keseluruhan, bentuk bakteri bulat dan bercampur satu sama lain. Koloni bakteri di *petridish* I sangat rapat dan merata di

seluruh media. Koloni terbesarnya berdiameter ± 1 cm. *Petridish* II, koloni menyebar di seluruh media namun tak sebanyak di *petridish* I. Koloni terbesarnya berdiameter $\pm 0,7$ cm. *Petridish* III, koloni terbesarnya berdiameter $\pm 0,5$ cm dan terlihat koloni bakteri yang berbentuk bulatan kecil tumbuh di bagian pinggir *petridish* dan koloni yang lebih besar tumbuh di bagian tengah *petridish*.

Terdapat beberapa persamaan dari kedua metode. Pertama, prinsip dasarnya adalah pengenceran suspensi. Jumlah biakan pada suspensi makin sedikit karena pengambilan berkesinambungan, tidak langsung dari biakan asli. Kedua, tumbuhnya bakteri makin sedikit di sektor dan *petridish* III akibat pengenceran. Makin encer suspensi, makin sedikit suspensi biakan yang terisolasi oleh media, makin murni biakan yang didapat.

Berdasarkan hasil pengamatan, bakteri terisolasi pada *petridish* III. Kemungkinan terdapat 2 koloni yang terisolasi pada *petridish* III yaitu *Zymomonas mobilis* dan *Enterobacter aerogenes*. *Zymomonas mobilis* adalah bakteri fakultatif anaerob yang mampu mengubah oksigen menjadi hidrogen peroksida dalam proses metabolismenya (Palha, 2002). Sedangkan *Enterobacter aerogenes* juga merupakan bakteri bersifat fakultatif anaerob, oksidasi-negatif dan hasil uji katalasenya positif. Bakteri *Enterobacter aerogenes* banyak tersebar di tanah, tumbuhan dan juga hewan (Anonim, 2010). Sebagai indikatornya adalah terdapat dua tipe koloni yang terdapat dalam *petridish* III, yaitu yang berbentuk bintik kecil dan berbentuk bulatan besar. Namun bakteri yang berbentuk bulatan besar lebih banyak dan tumbuh merata di semua bagian *petridish*. Pada *petridish* I, kemungkinan bakteri yang tumbuh adalah kedua jenis bakteri karena inokulumnya diambil langsung dari suspensi biakan campuran. Sedangkan proses inokulasi selanjutnya diambil dari suspensi inokulum paling akhir, begitu seterusnya. Sehingga jumlah bakteri yang tumbuh pada inokulasi terakhir akan semakin sedikit. Terdapat dua koloni bakteri yang tumbuh di *petridish* III berbentuk bulat dan bergerigi di sekelilingnya dan berbentuk bintik kecil berwarna putih. Hal ini terjadi karena proses pemisahan koloni yang dilakukan kurang sempurna sehingga masih terdapat 2 jenis koloni dalam *petridish* terakhir.

Apabila proses inokulasi dilanjutkan sampai *petridish* selanjutnya maka diharapkan biakan yang diperoleh akan semakin murni (*Benson, 2000*).

III.2. Uji Biokimia

III.2.1. Katalase

Untuk Uji katalase bertujuan untuk mengetahui apakah suatu organisme memiliki enzim katalase atau tidak. Metode yang digunakan adalah dengan mengambil sedikit dari kultur biakan bakteri kemudian mensuspensikannya dengan larutan H_2O_2 kemudian mengamatinya selama kurang lebih 5 menit apakah terjadi gelembung gas.

Dalam literatur disebutkan bahwa enzim katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sel dan menghasilkan gas oksigen dan air sesuai reaksi (*Pelczar, 1977*).



Berdasarkan data hasil pengamatan didapati bahwa kedua campuran bakteri ketika direaksikan dengan hidrogen peroksida sama-sama menghasilkan gelembung gas. Hal ini menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut memiliki enzim katalase. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa *Enterobacter aerogenes* adalah bakteri yang bersifat aerob sehingga membutuhkan oksigen untuk melaksanakan aktivitas sel, sehingga hasil pemecahan senyawa hidrogen peroksida yang berupa oksigen tersebut nantinya akan digunakan oleh bakteri sebagai bahan metabolismenya. Sedangkan *Zymomonas mobilis* bersifat fakultatif anaerob. Pada literatur disebutkan bahwa bakteri aerob dan fakultatif akan mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dalam proses metabolismenya. Hal ini disebabkan oleh enzim katalase yang ada pada bakteri (*Anonim, 2002*).

III.2.2. Hidrolisa Gelatin

Hidrolisa gelatin bertujuan mendeteksi mikroorganisme memiliki enzim gelatinase atau tidak. Enzim gelatinase merupakan jenis eksoenzim, yaitu enzim

yang dikeluarkan oleh sel guna mengambil dan mengubah zat makanan (karbohidrat, lemak, protein) di sekeliling sel sehingga zat makanan dapat terserap oleh bakteri. Enzim gelatinase adalah enzim yang mampu menguraikan gelatin menjadi asam-asam amino. Gelatin merupakan jenis protein yang tidak mengandung tryptophan, yaitu salah satu jenis asam amino esensial. Pada suhu di bawah 25 °C gelatin berwujud padat, sedangkan pada suhu di atas 25 °C gelatin berwujud cair. Bila gelatin telah terurai, maka senyawa ini akan kehilangannya sifat gel/padatnya.

Yang pertama dilakukan dalam uji hidrolisa gelatin adalah mengisi dua tabung reaksi dengan media gelatin cair hingga mencapai $\frac{1}{2}$ tinggi tabung reaksi, kemudian memanaskan hingga suhu 121°C. Menginokulasikan bakteri *Zymomonas mobilis* tabung 1 dan bakteri *Enterobacter aerogenes* pada tabung 2. Selanjutnya, menginkubasi inokulum dalam inkubator. Setelah masa inkubasi selama 96 jam, mendinginkan inokulum dengan es batu selama ± 10 menit. Tujuannya untuk mendeteksi media gelatin berubah wujud atau tidak. Ternyata, hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada tabung 1 dan 2, media gelatin mencair begitu juga dengan blanko. Blanko yang juga ikut mencair menunjukkan bahwa media gelatin yang digunakan mungkin telah terkontaminasi oleh bakteri. Hasil uji gelatinase memberikan hasil positif. Hasil uji positif menunjukkan bahwa terdapat enzim gelatinase pada bakteri *Zymomonas mobilis* dan bakteri *Enterobacter aerogenes*.

Hal ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi dalam sel lalu dilepas keluar sel, disebut bakteri proteolitik. Contohnya bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang tidak membentuk spora. Bakteri *Zymomonas mobilis* merupakan bakteri fermentatif yang memfermentasi asam piruvat. Sehingga bisa disimpulkan bahwa kedua jenis bakteri tersebut bersifat proteolitik, salah satunya cirinya mampu menguraikan protein gelatin menjadi asam-asam amino (Benson, 2000).

IV. Jawaban Pertanyaan

IV.1. Isolasi Bakteri Dari Suatu Campuran

1. Bagaimanakah keadaan media pembanding (blanko)? Apa kegunaannya?
Keadaan blanko steril, tidak ditumbuhi mikroba. Fungsi blanko sebagai pembanding media murni (tidak ditumbuhi bakteri) dengan media yang ditumbuhi bakteri.
2. Setelah melakukan isolasi bakteri dengan metode cawan gores, pada daerah manakah bakteri terisolasi? Bandingkan dengan media pembanding!
Bakteri terisolasi pada sektor III karena sektor ini merupakan penggoresan terakhir. Suspensi biakannya paling encer sehingga koloni bakteri yang tumbuh paling sedikit. Sektor 0 dalam kondisi steril karena tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri.
3. Apakah pada permukaan media agar yang tidak saudara gores tampak koloni? Jelaskan! (jika terdapat ataupun tidak)
Pada permukaan media yang tidak tergores, tidak tampak koloni. Ini menunjukkan permukaan media tersebut tidak terkontaminasi.
4. Apakah keunggulan dan kekurangan dari dua metode di atas?

Cawan gores :

Keunggulan → menghemat waktu dan bahan

Kekurangan → teknik ini lebih sulit karena membutuhkan teknik penggoresan yang baik sehingga mikroorganisme terisolasi dengan sempurna.

Cawan tuang :

Keunggulan → tidak perlu keterampilan khusus untuk mendapatkan hasil sempurna;

Kekurangan → boros waktu dan bahan karena teknik ini harus dilakukan saat

media masih cair.

IV.2. Uji Biokimia

1. Sebutkan media yang digunakan pada beberapa tes berikut :
 - a. Produksi Butanediol → media MR-VP
 - b. Hidrolisa Kanji → media kanji
 - c. Hidrolisa Lemak → media nutrisi agar cair dan minyak nabati
 - d. Hidrolisa Kasein → media kasein
2. Pilihlah nama-nama reagen yang digunakan tes berikut :
 - a. Uji Voges-Proskauer _____ **A** _____ Reagen Barrit (A)
 - b. Uji Katalase _____ **C** _____ Gram's Iodine (B)
 - c. Hidrolisa Kanji _____ **B** _____ Hidrogen Peroksida (C)
Reagen Kovacs (D)
Indikator Methyl-Red(E)
3. Enzim-enzim apa yang terlibat pada reaksi-reaksi berikut dan sebutkan pula produk hasil hidrolisanya :
 - a. Hidrolisa Kasein → enzim kaseinase - Glukosa → glukosa
 - b. Hidrolisa Kanji → enzim alpha-amilase - Glukosa
 - c. Hidrolisa Lemak → enzim lipase – Asam lemak & Gliserol
→ asam lemak dan gliserol
 - d. Hidrolisa Gelati → enzim gelatinase – Asam Amino
→ asam amino
4. Apakah perbedaan antara Methyl-Red test dengan Voges-Proskauer test?
Tes Methyl-Red → bertujuan untuk menguji apakah suatu mikroorganisme memiliki kemampuan untuk menghasilkan suatu asam organik.
Tes Voges-Proskauer → bertujuan untuk menguji apakah suatu

mikroorganisme memiliki kemampuan untuk menghasilkan asethyl methyl karbonil.

5. Apakah manfaat enzim-enzim tersebut (pada soal nomor 3) pada mikroorganisme?

enzim kaseinase → menguraikan kasein menjadi glukosa

enzim alpha-amilase → menguraikan amilum (suatu polisakarida) menjadi maltosa (suatu monosakarida)

enzim lipase → menguraikan lemak menjadi asam lemak & gliserol

enzim gelatinase → menguraikan gelatin menjadi asam-asam amino

V. Kesimpulan

V.1. Isolasi Bakteri Dari Suatu Campuran

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolasi mikroorganisme dari suatu campuran dapat dilakukan melalui dua metode, yaitu teknik cawan gores dan teknik cawan tuang.
2. Bakteri terisolasi paling sempurna (paling murni) pada inokulasi terakhir, yaitu di sektor III (cawan gores) dan *petridish* III (cawan tuang).
3. Bakteri yang terisolasi pada teknik cawan gores adalah *Zymomonas mobilis* dan bakteri yang terisolasi pada teknik cawan tuang adalah *Enterobacter aerogenes*.

V.2. Uji Biokimia

1. Bakteri *Zymomonas mobilis* dan *Enterobacter aerogenes* mengandung enzim katalase yang berfungsi untuk menguraikan H_2O_2 menjadi oksigen dan air.
2. Bakteri *Zymomonas mobilis* dan *Enterobacter aerogenes* mengandung enzim gelatinase yang berfungsi untuk menguraikan gelatin menjadi asam-asam amino.

Daftar Pustaka

Anonim. 2010. Identification of Enterobacteriaceae. London : Health Protection

Agency.

Benson, Harold J. 1998. Microbiology Application. New York : McGraw Hill.

Palha, Maria. 2002. The influences on *Zymomonas mobilis* aggregation. Chile :
Electronic Journal of Biotechnology.

Pelczar, Michael J. dan Chan E.C.S. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi, Jakarta : UI
– Press.

Lampiran