

LAPORAN PRAKTIKUM KULTUR JARINGAN

Disusun Oleh:

Musthari – Ningrum Wahyuni

Kamis, 17 November 2011

Tujuan Praktikum

- Agar mahasiswa dapat melakukan teknik mengisolasi bakteri di media sederhana
- Agar mahasiswa memahami cara pewarnaan sederhana sel bakteri atau ragi (yang berasal dari hasil kultur pada media sederhana) yang akan dilihat dibawah mikroskop
- Agar mahasiswa memahami cara penggunaan mikroskop dengan baik dan benar
- Agar mahasiswa memahami teknik McFarland scale dan spektrum absorbansi dari preparat ragi yang diencerkan, serta spektrum absorbansi bromophenol blue
- Agar mahasiswa memahami efek bahan tertentu terhadap viabilitas kultur sel ragi

1. Mengisolasi bakteri di media

Alat dan Bahan

- Petri *dish* dengan *nutrient agar* didalamnya
- Ragi yang telah diencerkan, yang akan diisolasi
- Petri *dish* berisi bakteri yang telah dikultur
- Ose
- Lampu bunsen
- *Laminar flow* (untuk pelaksanaan proses isolasi)

Cara:

- Ose dibakar sampai berpijar → didinginkan dengan cara menyentuhkan ujung ose pada pinggir media
- Dengan ose yang sudah steril ambil sampel ragi yang telah diencerkan (berikutnya ambil bakteri dari petri *dish* lain yang telah dikultur)
- Buka dengan perlahan petri *dish* media tempat bakteri akan diisolasi, buka sedikit saja sebatas ose bisa masuk
- Pulaskan di salah satu sisi/tepi media, jangan menyentuh dinding petri *dish*

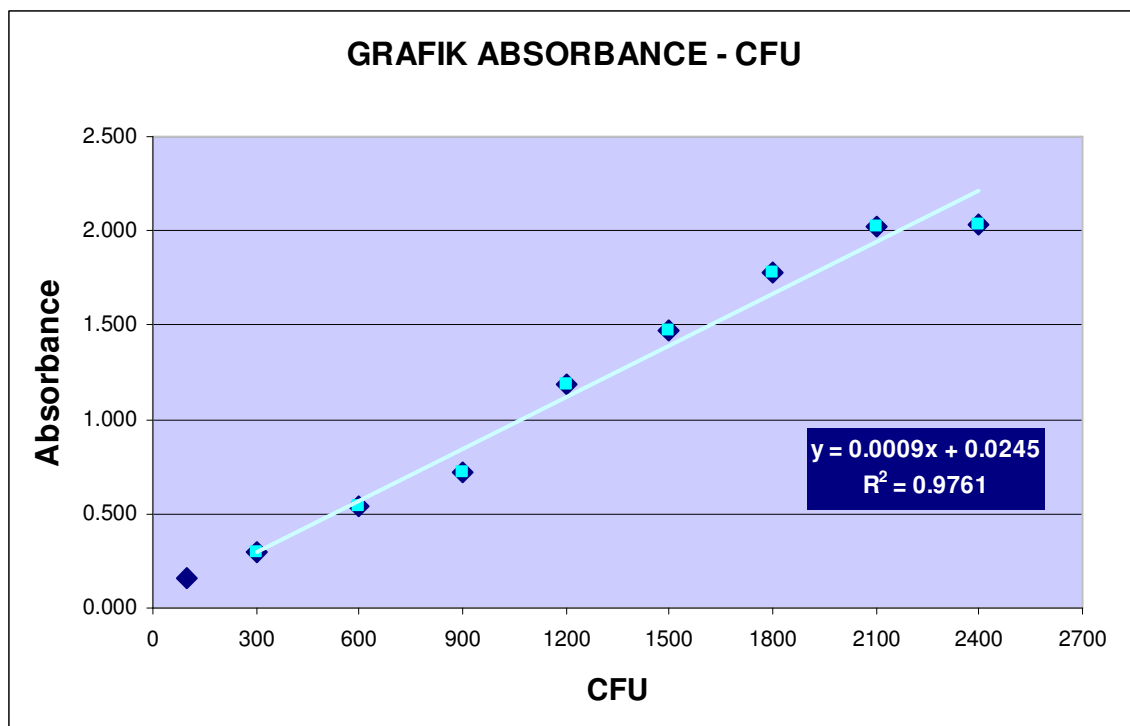
- Pulasan digoreskan sejajar sampai memenuhi permukaan media
- Tutup segera petri *dish* untuk menghindari kontaminasi
- Bakar kembali ose untuk membunuh bakteri bekas inokulasi
- Simpan petri *dish* dalam inkubator

2. Memperkirakan konsentrasi sel (CFU – “colony forming units”) melalui kekeruhannya

Tabel 2 : hasil serapan standar-standar McFarland Scale

Diukur pada $\lambda = 550 \text{ nm}$

scale	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8
CFU ($\times 10^6/\text{mL}$)	< 300	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400
A	0,160	0,298	0,543	0,724	1,186	1,473	1,776	2,025	2,036



3. Mengukur CFU preparat ragi

Tabel 3 : Hasil serapan doubling dilution preparat ragi

Diukur pada $\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$

Faktor	asli	2	4	8	16	32	64	128	256	512
A	-	-	-	-	2,476	1,752	1,087	0,043	0,643	0,072

Detil preparat ragi: jumlah ragi: 3 g; sukrosa 9 g; temperatur yg ditentukan : 45 °C

waktu sejak fermentasi dimulai : 12.47

menghitung konsentrasi preparat ragi pada pengenceran 128 dengan rumus pada yang didapat pada grafik perbandingan absorbansi – CFU adalah sebagai berikut:

$$y = 0,0009 x + 0,0245$$

dengan $y = A = 0,043$ dan $x = c$ (konsentrasi) yang ingin dicari, maka

$$0,043 = 0,0009 x + 0,0245$$

$$x = 20,55$$

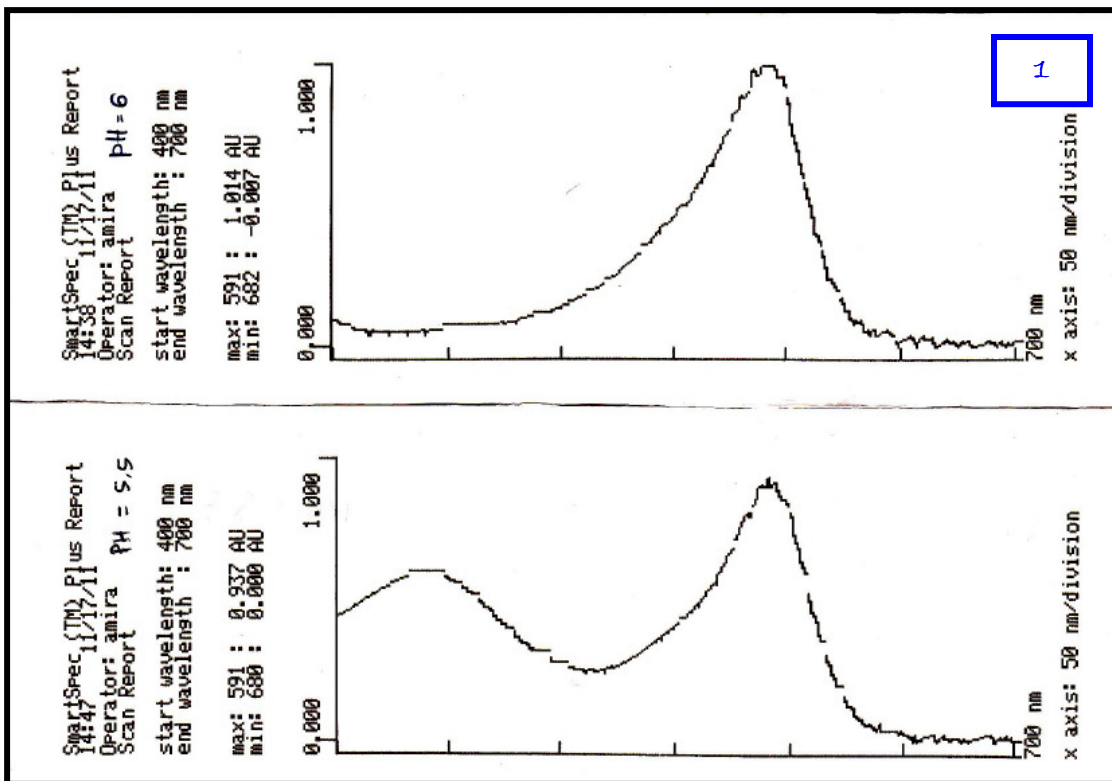
CFU ($\times 10^6$ /mL), maka jumlah konsentrasi pengenceran 128 adalah **$20,55 \times 10^6$ /mL**

Kegunaan McFarland Scale:

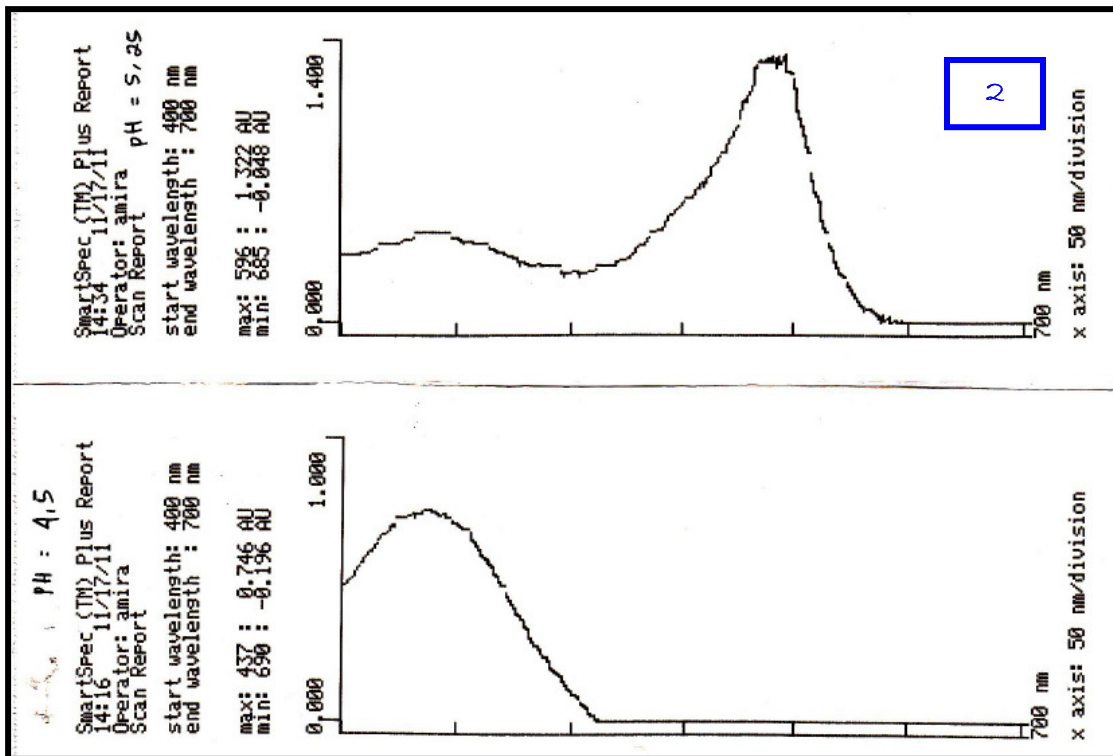
Adalah untuk menentukan jumlah koloni bakteri atau ragi dengan cara membandingkan CFU dengan absorbansi. Setelah dibuat grafik, maka bisa dicari persamaan untuk mencari jumlah koloni ragi dari absorbansi yang telah diketahui.

4. Mengukur absorbance spectrum *bromophenol blue*

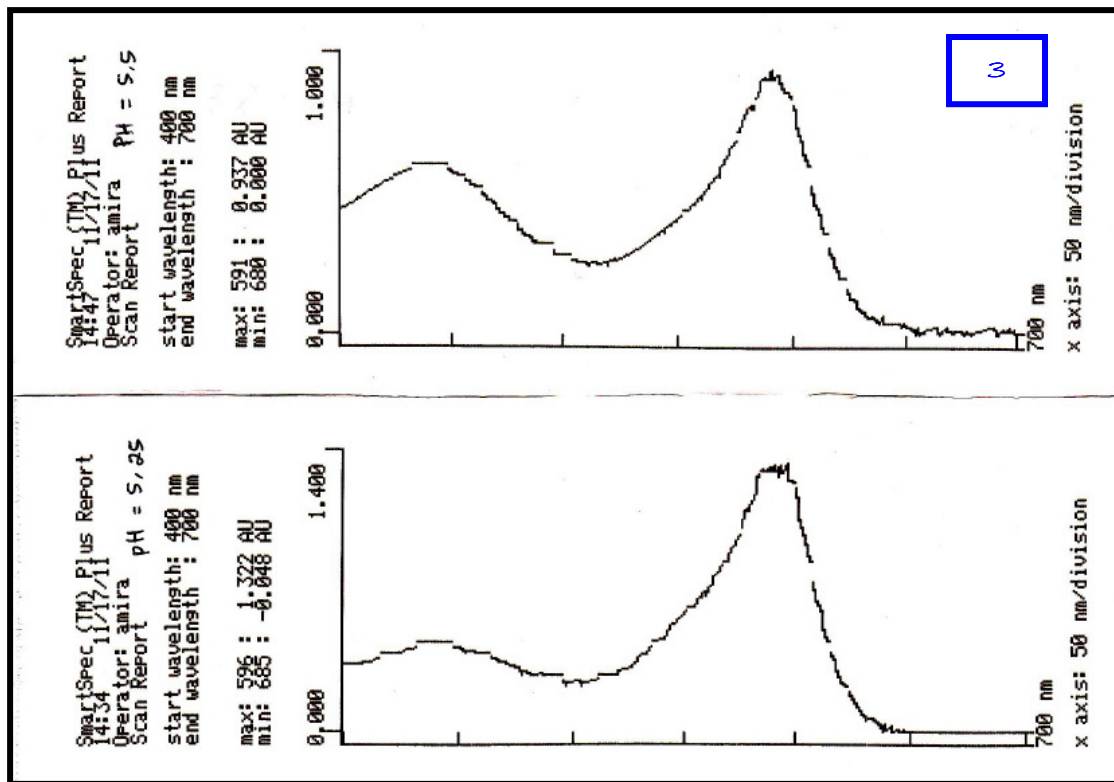
Hasil :



Dari hasil scan diketahui bahwa pada panjang gelombang 400 – 700 nm, larutan *bromophenol blue* yang telah ditentukan derajat keasamannya dengan menambahkan HCl 0,01M menjadi pH 6, didapat bahwa panjang gelombang maksimal (591 nm) adalah pada 1,014 AU, sementara panjang gelombang minimal (682 nm) pada -0,007 AU. Dan yang ditentukan menjadi pH 5,5 didapat panjang gelombang maksimal (591 nm) pada 0,937 AU dan panjang gelombang minimal (680 nm) pada 0,000 AU.



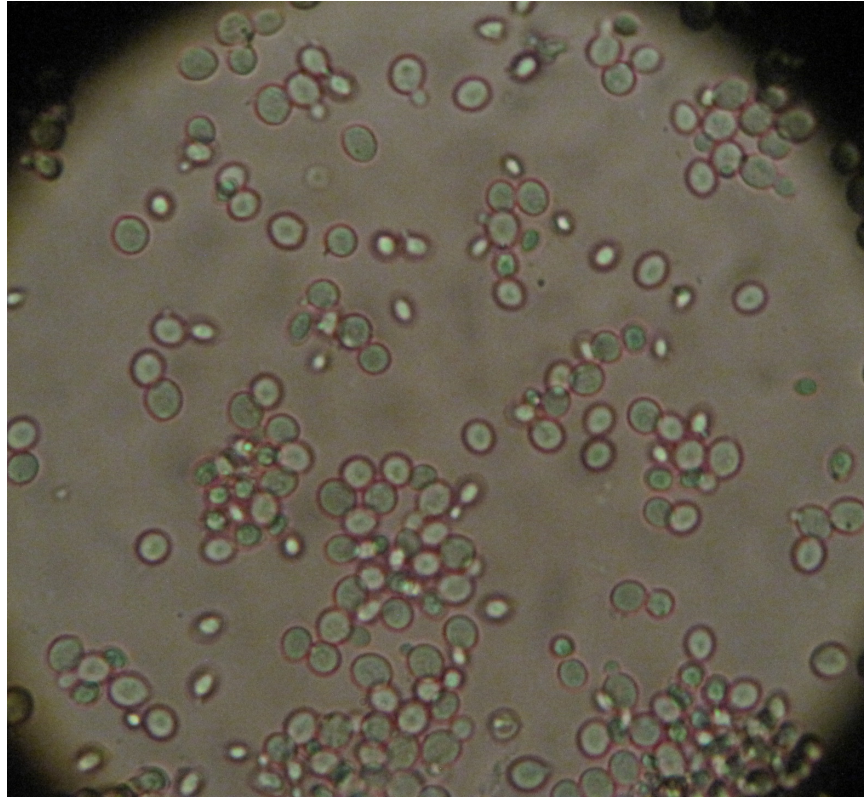
Dari hasil scan berikutnya diketahui bahwa pada panjang gelombang 400 – 700 nm, larutan *bromophenol blue* yang telah ditentukan derajat keasamannya dengan menambahkan HCl 0,01M menjadi pH 5,25, didapat bahwa panjang gelombang maksimal (596 nm) adalah pada 1,322 AU, sementara panjang gelombang minimal (685 nm) pada -0,048 AU. Dan yang ditentukan menjadi pH 4,5 didapat panjang gelombang maksimal (437 nm) pada 0,746 AU dan panjang gelombang minimal (690 nm) pada -0,196 AU.



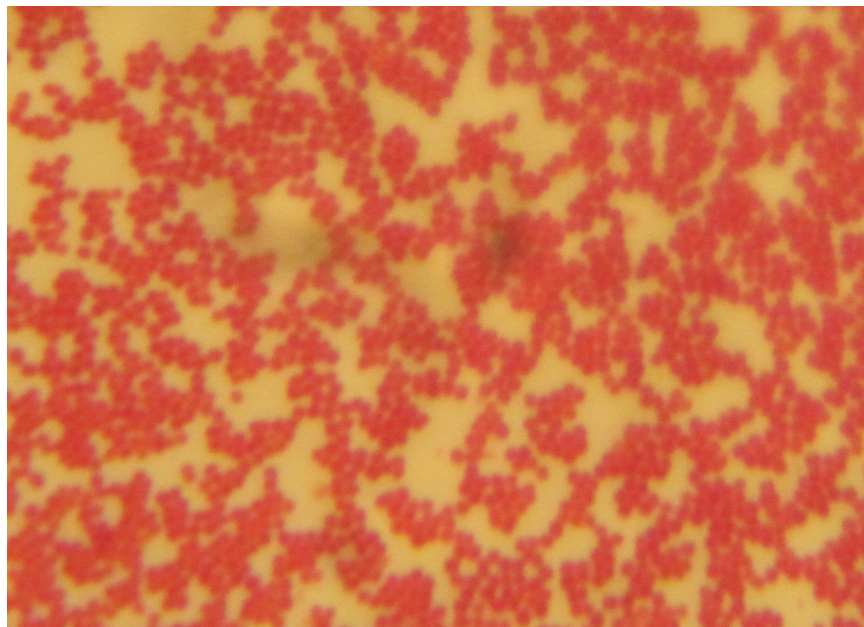
Kesimpulan:

- Pada perbandingan pertama antara pH 6 dan pH 5,5 didapat bahwa semakin rendah pH maka semakin rendah daya absorbansinya. Terbukti pada panjang gelombang yang sama maksimal, terdapat perbedaan pada nilai absirbansinya. Begitu juga dengan perbandingan yang kedua antara pH 5,25 dengan pH 4,5.
- Pada perbandingan yang ketiga antara pH 5,5 dengan pH 5,25 didapat peningkatan absorbansi, meskipun perbedaan panjang gelombang tidak begitu jauh. Padahal seharusnya absorbansi pada pH 5,25 lebih rendah dari pH 5,5. Hal ini bisa disebabkan karena pengaturan scan pada pH 5,25 batas absorbansi dinaikkan menjadi 1,4 AU lebih tinggi 0,4 AU dari batas absorbansi pH 5,5 yang sebesar 1 AU.
- Jadi sebenarnya besar absorbansi pada pH 6 bisa jadi lebih besar dari 1,014 AU jika batas absorbansi kita naikkan menjadi 2 AU.

5. Pengamatan hasil kultur dibawah mikroskop



koloni ragi



koloni kokus

2 hal tentang kultur bakteri:

- Teknik kultur bakteri ini cukup mudah dan sederhana. Bisa dengan mudah mengambil sekret-sekret tubuh untuk ditanamkan dan diketahui apakah ada bakteri tertentu pada sekret tersebut.
- Pada saat akan mengkultur, yang paling penting untuk diperhatikan adalah kesterilan prosesnya. Karenanya proses isolasi bakteri dilakukan didalam *laminar flow* untuk memastikan tidak adanya kontaminan lain yang masuk dan merusak hasil kultur 24 jam kemudian. Jika terdapat kontaminan, maka sebaiknya kultur diulang kembali untuk mendapatkan hasil yang lebih baik.

2 hal yang berkaitan dengan ragi

- Pada percobaan melihat perubahan warna *bromophenol blue* yang dialiri CO₂ yang dihasilkan oleh larutan ragi dan sukrosa (3 gram ragi dan 9 gram sukrosa) yang dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 45 °C, terlihat bahwa terjadi perubahan warna larutan *bromophenol blue* yang tadinya ungu pekat perlahan-lahan berubah menjadi ungu kemerahan. Hal ini membuktikan bahwa kondisi asam akan menaikkan pH dan menyebabkan terjadinya perubahan warna larutan *bromophenol blue* yang basa.
- Jumlah ragi dan sukrosa yang dipakai serta tingkat suhu pemanasan akan sangat menentukan banyaknya kadar CO₂ yang dihasilkan, selain juga ditentukan oleh faktor lamanya waktu pemanasan. Suhu yang tinggi mempercepat terbentuknya CO₂. Jadi untuk menghasilkan kadar CO₂ yang banyak, maka perlu menambah jumlah ragi dan sukrosa dengan perbandingan tertentu, dipanaskan pada suhu tinggi tertentu dan selama waktu tertentu.

SARAN

1. Akan lebih mudah jika topik praktikum dipisah, misal ketika kita akan mengamati perubahan pH, maka kita akan menggunakan sejumlah larutan tertentu. Sementara untuk kultur, dilakukan tersendiri dan kita bisa mencoba mengkultur lebih banyak bahan.
2. Mungkin untuk praktikum berikutnya kita bisa coba mengukur jumlah CFU bakteri lainnya dengan *McFarland Scale*.