

Susilo, M.Si

# PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DASAR





# **PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DASAR**

Susilo, M.Si

**Mitra Ilmu  
2022**

# PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DASAR

**Penulis :**

Susilo, M.Si

ISBN: (Sementara Proses)

Desain Sampul dan Tata Letak:

**Sulaiman**

**Penerbit :**

Mitra Ilmu

**Kantor:**

Jl. Kesatuan 3 No. 11 Kelurahan Maccini Parang

Kecamatan Makassar Kota Makassar

Hp. 0813-4234-5219/081340021801

Email : [mitrailmua@gmail.com](mailto:mitrailmua@gmail.com)

Website : [www.mitrailmumakassar.com](http://www.mitrailmumakassar.com)

Anggota IKAPI Nomor: 041/SSL/2022

Cetakan pertama: November 2022

Dilarang memperbanyak, menyalin, merekam sebagian atau seluruh bagian buku ini dalam bahasa atau bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit atau penulis.

## DAFTAR ISI

Daftar Isi.....	iii
Kata Pengantar .....	iiv

**(DI ISI SETELAH ISBN TERBIT)**

## **KATA PENGANTAR**

Penuntun praktikum mikrobiologi ini disusun dengan maksud dan tujuan membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum Mikrobiologi Dasar. Keahlian dan keterampilan kerja di laboratorium sangat membantu dalam memahami teori yang telah diperoleh di kuliah sehingga dapat tercipta korelasi yang saling membangun antara teori dengan kenyataan.

Penuntun praktikum ini disusun rinci dan sistematis, dilengkapi dengan gambar sehingga memudahkan praktikan memahami dan mempersiapkan diri sebelum melakukan kegiatan praktikum. Materi yang disajikan dalam buku ini mencakup teknik dasar yang lazim dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi pada umumnya.

Harapan kami, buku ini dapat bermanfaat bagi praktikan mikrobiologi dasar serta bagi mahasiswa yang memerlukannya. Segala kritik dan saran yang bersifat membangun tentang isi buku ini sangat dihargai demi perbaikan kualitas lebih lanjut.

Jakarta, 30 November 2022

Susilo

# MODUL 1

## PENGENALAN ALAT DAN STERILISASI

**A. Kompetensi:** Mahasiswa mengenal dan mengetahui fungsi dari tiap-tiap alat praktikum mikrobiologi dasar.

**B. Tujuan:** Mengetahui alat-alat yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi dan mengetahui cara sterilisasi alat dan bahan.

### C. Dasar teori

#### 1. Sterilisasi

Sterilisasi adalah proses membebaskan alat dan media dari semua organisme hidup. Tujuannya adalah untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Cara mensterilkan alat dan media yang paling umum dilakukan adalah dengan perlakuan panas lembap atau panas bertekanan. Bergantung pada macam-macam bahan yang akan disterilkan. Sterilisasi dapat pula dilakukan dengan perlakuan panas kering, kimia, penyaringan, atau radiasi.

Sterilisasi dengan panas lembap biasanya dilakukan di dalam suatu bejana logam yang disebut autoklaf. Sterilisasi ini dilakukan dengan uap air jenuh bertekanan 15 lb/in<sup>2</sup> selama 15 menit pada suhu 121°C. *Suhu tersebut merupakan suhu sterilisasi terbaik untuk bahan-bahan yang akan disimpan dalam waktu yang cukup lama.* Hubungan antara tekanan dan suhu tersebut hanya berlaku bagi tempat-tempat pada permukaan laut. Untuk tempat-tempat di atas permukaan laut diperlukan tekanan yang lebih tinggi untuk mencapai suhu yang sama. Autoklaf pada umumnya digunakan untuk mensterilkan bahan-bahan yang dapat ditembus oleh kelembapan (tidak menolak air) tanpa merusaknya. Contoh bahan yang dapat disterilkan dengan

autoklaf ialah media biakan, larutan, kapas, sumbar karet, dan peralatan laboratorium. Kontak langsung antara uap air dan benda yang akan disterilkan amat penting bagi keberhasilan sterilisasi. Penataan muatan di dalam autoklaf harus agak longgar sehingga memungkinkan tekanan uap air menembus ke seluruh bahan-bahan yang disterilkan tersebut.

Pengaruh panas lembap di dalam proses sterilisasi ialah mengkoagulasikan protein-protein mikrob (termasuk enzim-enzimnya) dan menginaktifkannya secara searah tak terbalikkan). Proses sterilisasi dapat berjalan dengan baik jika di dalam autoklaf hanya terdiri atas uap air saja tanpa ada udara. Oleh karena itu, udara yang ada di dalam autoklaf harus dikeluarkan dahulu. Setelah di dalam autoklaf tidak ada udara lagi, uap air dibiarkan mengisi ruangan sampai suhu mencapai 121° C. Setelah suhu tersebut tercapai masih diperlukan waktu antara 11-12 menit untuk mematikan endospora bakteri yang tahan panas.

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam sterilisasi antara lain kepadatan muatan, volume cairan, dan ukuran wadah yang dipakai. Umumnya bahan yang memakan tempat dan mendekati kedap air memerlukan pemanasan lebih lama. Volume media di dalam botol atau labu jangan sampai melebihi dua pertiga tinggi wadah. **Wadah sterilisasi yang berukuran kecil semakin baik digunakan.** Sebagai contoh jika ingin mensterilkan lima liter media lebih baik menggunakan lima labu yang masing-masing berisi satu liter media daripada menggunakan satu labu yang berisi lima liter media. Volume yang lebih kecil memerlukan waktu sterilisasi yang lebih pendek. **Jadi, lamanya siklus sterilisasi harus disesuaikan dengan ukuran dan jumlah wadah.** Hal yang harus diperhatikan pula yaitu botol tidak



boleh disumbat terlalu ketat sehingga kedap udara. Untuk menyumbat dapat digunakan kapas yang kemudian dilindungi dengan kertas atau aluminium foil supaya kapas tidak terkena tetesan air sewaktu sterilisasi. Apabila perlu, dapat juga digunakan sumbat karet, tutup sekrup, atau tutup plastik. Laju pendinginan dan pembebasan tekanan harus dilakukan dengan perlahan-lahan untuk mencegah pecahnya perangkat kaca pada waktu siklus sterilisasi telah selesai. Untuk itu, suhu di dalam autoklaf harus dibiarkan turun kembali seperti suhu kamar sebelum tutup autoklaf dibuka.

#### **D. Alat dan bahan**

##### **1. Alat**

- |                                       |                        |
|---------------------------------------|------------------------|
| a) Alat-alat elektrik                 | c) Alat-alat non gelas |
| 1) Mikroskop cahaya                   | 1) Jarum inokulum      |
| 2) Mikroskop stereo                   | / ose                  |
| 3) Autoklaf elektrik                  | 2) Pinset              |
| 4) Incubator                          | 3) Rubber bulb         |
| 5) Hot plate & stirrer                | 4) pH                  |
| 6) Colony counter                     |                        |
| 7) Biological Safety<br>Cabinet (BSC) |                        |
| 8) Mikropipet                         |                        |
| b) Alat-alat gelas dan<br>keramik     |                        |
| 1) Cawan Petri                        |                        |

- 2) Pipet ukur
- 3) Pipet tetes
- 4) Tabung reaksi
- 5) Labu Erlenmeyer
- 6) Glass beads
- 7) Mortar & pestle
- 8) Beaker glass
- 9) Buncen burner
- 10) Gelas ukur
- 11) Batang L / Drugalsky
- 12) Tabung Durham

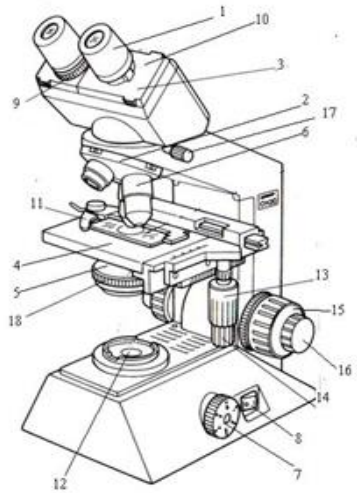
**a. Mikroskop Cahaya**

Salah satu alat untuk melihat sel mikroorganisme adalah mikroskop cahaya. Dengan mikroskop kita dapat mengamati sel bakteri yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Pada umumnya mata tidak mampu membedakan benda dengan diameter lebih kecil dari 0,1 mm. berikut merupakan uraian tentang cara penggunaan bagian-bagiandan spesifikasi mikroskop cahaya merk Olympus CH20 yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi.

**a) Bagian-bagian Mikroskop:**

1. Eyepiece / oculars (lensa okuler)  
Untuk memperbesar bayangan yang

- dibentuk lensa objektif
2. Revolving nosepiece (pemutar lensa objektif)  
Untuk memutar objektif sehingga mengubah perbesaran
  3. Observation tube (tabung pengamatan / tabung okuler)
  4. Stage (meja benda)  
Spesimen diletakkan di sini
  5. Condenser (condenser)  
Untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
  6. Objective lense (lensa objektif) untuk Memperbesar spesimen
  7. Brightness adjustment knob (pengatur kekuatan lampu) Untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
  8. Main switch (tombol on-off)
  9. Diopter adjustmet ring (cincin pengatur diopter) Untuk menyamakan focus antara mata kanan dan kiri
  10. Interpupillary distance adjustment knob (pengatur jarak interpupillar)
  11. Specimen holder (penjepit spesimen)



12. Illuminator (sumber cahaya)
13. Vertical feed knob (sekrup pengatur vertikal) Untuk menaikkan atau menurunkan object glass
14. Horizontal feed knob (sekrup pengatur horizontal) Untuk menggeser ke kanan / kiri objek glas
15. Coarse focus knob (sekrup fokus kasar)  
Menaik turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat
16. Fine focus knob (sekrup fokus halus) Menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat
17. Observation tube securing knob (sekrup pengencang tabung okuler)
18. Condenser adjustment knob (sekrup pengatur kondenser) Untuk menaik-turunkan kondenser

## **b) Prosedur Operasi**

1. Menyalakan lampu
  - a. tekan tombol on (8)
  - b. atur kekuatan lampu dengan memutar bagian (7)
2. Menempatkan spesimen pada meja benda
  - a. Letakan objek glas diatas meja benda (4) kemudian jepit dengan (11). Jika meja benda belum turun, diturunkan dengan sekrup kasar (15)
  - b. Cari bagian dari objek glas yang terdapat preparat ulas (dicari dan diperkirakan memiliki gambar yang jelas) dengan memutar sekrup vertikal dan horizontal (13) dan (14)
3. Memfokuskan
  - a. Putar Revolving nosepiece (2) pada perbesaran objektif

- 4x lalu putar sekrup kasar (15) sehingga meja benda bergerak ke atas untuk mencari fokus
- b. Setelah fokus perbesaran 4 x 10 didapatkan, maka putar (2) pada perbesaran selanjutnya yaitu perbesaran objektif 10x. kemudian putar sekrup halus (16) untuk mendapatkan fokusnya
  - c. Lakukan hal yang sama jika menggunakan perbesaran yang lebih tinggi

Berikut adalah tabel yang menunjukkan jarak antara spesimen dengan lensa objektif jika okus telah didapatkan

Perbesaran objektif	4x	10x	40x	60x
Jarak A (mm)	29	6,3	0,53	0,29

Catatan: Setelah mendapatkan fokus pada perbesaran tertentu, misal 40x, dan ingin memutar objektif ke perbesaran 100x, maka meja benda tidak perlu diturunkan dan tidak perlu khawatir bahwa lensa objektif akan menggesek cover glass karena terdapat sisa jarak A yang lebih kecil antara cover glass dengan lensa objektif (lihat tabel diatas).

4. Keterangan tambahan
  - a. Jika perlu interpupillar distance adjustment knob (10) dapat digeser, hal ini akan mengubah dua bayangan yang akan diterima oleh 2 mata menjadi gambar yang tunggal sehingga sangat membantu dalam mengatasi kelelahan mata
  - b. Jika perlu diopter adjustment knob (9) dapat diatur untuk memperoleh bayangan focus yang seimbang antara

mata kanan dan kiri

- c. Pengaturan condenser (5) akan memperjelas bayangan yang tampak dengan mensetting pada posisi tertinggi (cahaya penuh)

### **c) Perbesaran total**

Ukuran specimen yang diamati dapat diperoleh dengan mengalikan perbesaran lensa okuler dengan lensa objektif. Misal = Okuler (10x) x Objektif (40x) = 400x

### **d) Penggunaan minyak imersi**

Semakin kecil nilai daya pisah, akan semakin kuat kemampuan lensa untuk memisahkan dua titik yang berdekatan pada preparat sehingga struktur benda terlihat lebih jelas. Daya pisah dapat diperkuat dengan memperbesar indeks bias atau menggunakan cahaya yang memiliki panjang gelombang ( $\lambda$ ) pendek. Biasanya dapat digunakan minyak imersi untuk meningkatkan indeks bias pada perbesaran 10 x 100.

1. Jika fokus pada perbesaran 10 x 40 telah didapatkan maka putar ke perbesaran objektif 100x
2. tetesi minyak imersi 1 - 2 tetes dari sisi lensa
3. Jika telah selesai menggunakan mikroskop, bersihkan lensa objektif 100x dengan kertas lensa yang dibasahi xylol

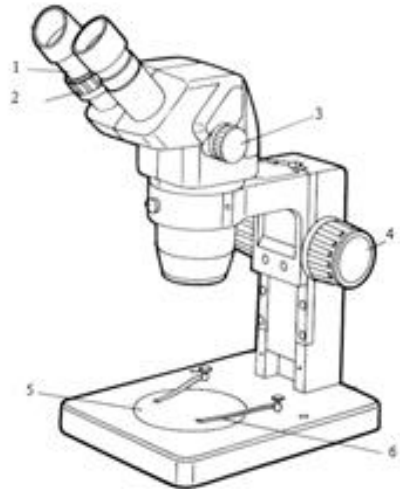
### **b. Mikroskop stereo (Zoom Stereo Microscope)**

Mikroskop ini berfungsi untuk melihat objek yang membutuhkan perbesaran tidak terlalu besar. Di Laboratorium Mikrobiologi, mikroskop stereo biasanya digunakan untuk

mengamati secara detail bentuk koloni dan jamur. Berikut merupakan uraian tentang mikroskop stereo yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi yaitu Zoom Stereo Microscope, Olympus SZ3060.

### **Bagian-bagian mikroskop**

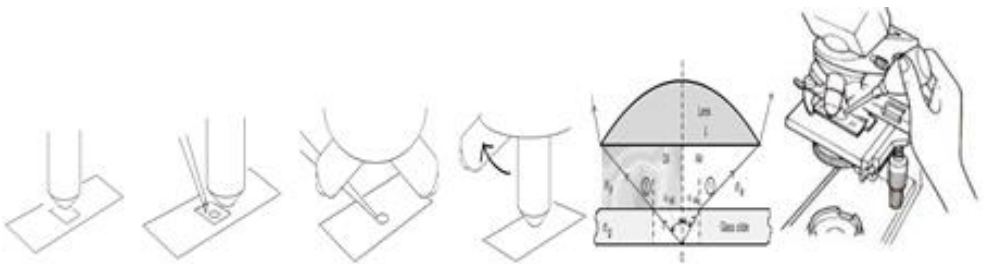
1. Oculars eyepiece (lensa okuler)
2. Diopter adjustment ring (cincin pengatur diopter)
3. Zoom control knob (sekrup pengatur pembesaran)
4. Focusing knob (sekrup pengatur fokus)
5. Stage plate (pelat tempat diletakkan)
6. Stage clip (penjepit spesimen / preparat)



### **Prosedur operasi**

1. Letakkan spesimen / preparat di stage plate (5), jepit jika perlu
2. Atur perbesaran pada perbesaran terkecil dengan memutar Zoom Control Knob (3) kemudian dicari fokusnya dengan memutar Focusing Knob (4)
3. Jika ingin mendapatkan bayangan yang lebih besar, putar Zoom Control Knob ke perbesaran yang lebih tinggi kemudian dicari fokusnya
4. Mikroskop ini memiliki pilihan perbesaran:

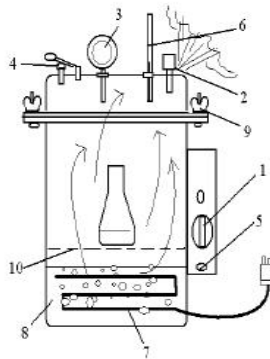
Okuler	Objektif	total
10 x	0,67 x	6,7 x
	0,9 x	9 x
	1 x	10 x
	2 x	20 x
	4 x	40 x



**a. Autoklaf (Autoclave)**

**Diagram autoklaf vertical**

1. Tombol pengatur waktu mundur (timer)
2. Katup pengeluaran uap pengukur tekanan kelep pengaman





3. Tombol on-off
4. Termometer
5. Lempeng sumber panas
6. Aquades ( $\text{dH}_2\text{O}$ )
7. Sekrup pengaman
8. batas penambahan air

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  ( $250^\circ\text{F}$ ). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi<sup>2</sup> (15 Psi = 15 pounds per square inch). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk  $121^\circ\text{C}$ .

## Cara

### Penggunaan :

1. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
2. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol beretutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
3. Tutup autoklaf dengan rapat lalu



kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.

4. Nyalakan autoklaf, diatur timer dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C.
5. Tunggu samapai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
6. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada preisure gauge menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.



#### **b. Inkubator (Incubator)**

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroba pada suhu yang terkontrol. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu untuk inkubator produksi Heraeus B5042 misalnya adalah 10-70°C.

#### **c. Hot plate stirrer dan Stirrer bar**

Hot plate stirrer dan Stirrer bar (magnetic stirrer) berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (plate) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu

mempercepat proses homogenisasi. Pengadukan dengan bantuan batang magnet Hot plate dan magnetic stirrer seri SBS-100 dari SBS® misalnya mampu menghomogenkan sampai 10 L, dengan kecepatan sangat lambat sampai 1600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425°C.

**d. Colony counter**

Alat ini berguna untuk mempermudah perhitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan karena adanya kaca pembesar. Selain itu alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni sangat banyak. Jumlah koloni pada cawan Petri dapat ditandai dan dihitung otomatis yang dapat di-reset.



**e. Biological Safety Cabinet**

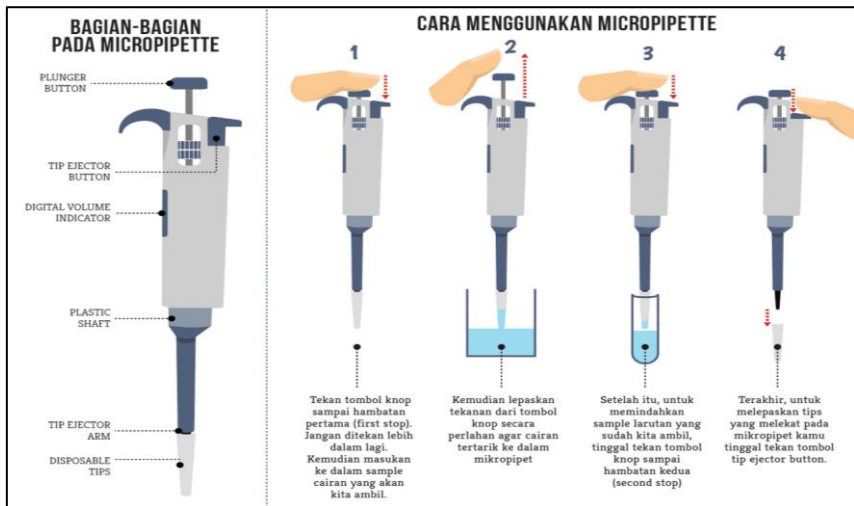
Biological Safety Cabinet (BSC) atau dapat juga disebut Laminar Air Flow (LAF) adalah alat yang berguna untuk bekerja secara aseptis karena BSC mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga menjadi steril dan aplikasi sinar UV beberapa jam sebelum digunakan. BSC ada tiga jenis yang beredar di pasaran dan memiliki fungsi yang berbeda. Prosedur penggunaan BSC seri 36212, Purifier™ Biological Safety Cabinet dari LABCONCO yang dimiliki laboratorium mikrobiologi adalah sebagai berikut:

- a) Hidupkan lampu UV selama 2 jam, selanjutnya matikan segera sebelum mulai bekerja
- b) Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah.
- c) Nyalakan lampu neon dan blower Biarkan selama 5 menit.

- d) Cuci tangan dan lengan dengan sabun gemisidal / alkohol 70 %.
- e) Usap permukaan interior BSC dengan alkohol 70 % atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap.
- f) masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (overload) karena memperbesar resiko kontaminan.
- g) Atur alat dan bahan yang telah dimasukkan ke BSC sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril .
- h) Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tapi gunakan yang berbahan bakar gas.
- i) Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja.
- j) setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan tidak keluar dari BSC .
- k) Usap permukaan interior BSC dengan alkohol 70 % dan biarkan menguap lalu tangan dibasuh dengan desinfektan.
- l) Matikan lampu neon dan blower .

**f. Mikropipet (Micropipete) dan Tip**

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 µl. Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (adjustable volume pipette) antara 1µl sampai 20 µl, atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (fixed volume pipette) misalnya mikropipet 5 µl. dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip.



### Cara Penggunaan :

- Sebelum digunakan Thumb Knob sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
- Masukkan Tip bersih ke dalam Nozzle / ujung mikropipet.
- Tekan Thumb Knob sampai hambatan pertama / first stop, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
- Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
- Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari Thumb Knob maka cairan akan masuk ke tip.
- Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
- Tekan Thumb Knob sampai hambatan kedua / second stop atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
- Jika ingin melepas tip putar Thumb Knob searah jarum jam dan

ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.

**g. Cawan Petri (Petri Dish)**

Cawan petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.



**h. Pipet Ukur (Measuring Pippete)**

Pipet ukur merupakan alat untuk memindahkan larutan dengan volume yang diketahui. Tersedia berbagai macam ukuran kapasitas pipet ukur, diantaranya pipet berukuran 1 ml, 5 ml dan 10 ml. Cara penggunaannya adalah cairan disedot dengan pipet ukur dengan bantuan filler sampai dengan



volume yang diinginkan. Volume yang dipindahkan dikeluarkan mengikuti skala yang tersedia (dilihat bahwa skala harus tepat sejajar dengan meniskus cekung cairan) dengan cara menyamakan tekanan filler dengan udara sekitar.

**i. Pipet tetes (Pasteur Pippete)**

Fungsinya sama dengan pipet ukur, namun volume yang dipindahkan tidak diketahui. Salah satu penerapannya adalah dalam menambahkan HCl / NaOH saat mengatur pH media, penambahan reagen ada uji biokimia, dll.

**j. Tabung reaksi (Reaction Tube / Test Tube)**

Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil.



Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2

bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (deep tube agar) dan agar miring (slants agar). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Untuk alasan efisiensi, media yang ditambahkan berkisar 10-12 ml tiap tabung.

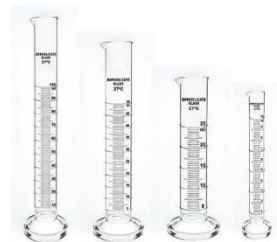
#### k. Labu Erlenmeyer (Erlenmeyer Flask)

Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan yang. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml, dsb.



#### l. Gelas ukur (Graduated Cylinder)

Berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan

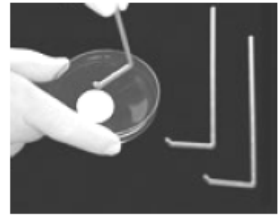




meniskus cekung larutan.

**m. Batang L (L Rod)**

Batang L bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut spreader.



**n. Mortar dan Pestle**

Mortar dan penumbuk (paste) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.



**o. Beaker Glass**

Beaker glass merupakan alat yang memiliki banyak fungsi. Di dalam mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media media, menampung akuades dll..



**p. Pembakar Bunsen (Bunsen Burner)**

Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar bunsen. Api yang menyala dapat



membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk sterilisasi jarum ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Perubahan bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas atau metanol.

**q. Glass Beads**

Glass Beads adalah manik-manik gelas kecil yang digunakan untuk meratakan suspensi biakan dengan menyebarkan beberapa butir di atas permukaan agar dan digoyang merata. Glass beads digunakan pada teknik spread plate yang fungsinya sama dengan batang L atau Spreader.



**r. Tabung Durham**

Tabung durham berbentuk mirip dengan tabung reaksi namun ukurannya lebih kecil dan berfungsi untuk menampung/menjebak gas yang terbentuk akibat metabolisme pada bakteri yang diujikan. Penempatannya terbalik dalam tabung reaksi dan harus terendam sempurna dalam media (jangan



sampai ada sisa udara).

**s. Jarum Inokulum atau Ose**

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nichrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (loop) dan disebut ose atau inoculating .



loop/transfer loop, dan yang terbentuk lurus disebut inoculating needle/Transfer needle. Inoculating loop cocok untuk melakukan streak di permukaan agar, sedangkan inoculating needle cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (stab inoculating). Jarum inokulum ini akan sangat bermanfaat saat membelah agar untuk preprasi Heinrich's Slide Culture.

**t. Pinset**

Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotik.



**u. pH Indikator Universal**

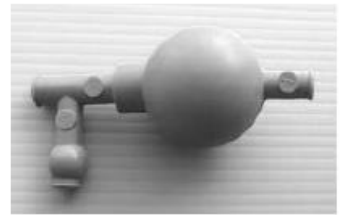
berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan.



Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.

**v. Pipet Filler / Rubber Bulb**

Filler adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan filler merupakan karet yang resisten bahan kimia. Filler memiliki 3 saluran yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (aspirate).



Berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (suction) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (exhaust) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.

**w. Cork borer**

Cork borer atau penggerak gabus merupakan alat logam untuk memotong atau membuat lubang diameter pada medium. Penggerak gabus juga digunakan untuk membuat lubang pada



pelat agar dan untuk melakukan uji difusi yang baik dalam mikrobiologi.

## 2. Teknik Aseptis

Teknik aseptis didefinisikan sebagai prosedur kerja yang meminimalisir kontaminan mikroorganisme dan dapat mengurangi resiko paparan terhadap pengguna. Tindakan aseptis ini bertujuan untuk mengurangi atau menghilangkan mikroorganisme yang terdapat pada permukaan benda hidup atau benda mati.

**Asepsis** : Kondisi di mana tidak dijumpainya organisme patogen.

Tindakan aseptis merupakan prosedur klinis yang dilakukan untuk mencegah kontaminasi dari luka dan bagian tubuh lainnya.

**Antiseptis** : Tindakan penggunaan bahan antiseptik untuk menghilangkan organisme patogen

### **Tindakan Asepsis:**

#### **a. Asepsis medis**

Teknik bersih, termasuk prosedur yang digunakan untuk mencegah penyebaran mikroorganisme. Contoh: mencuci tangan, menyemprotkan alkohol ke cangkir untuk obat.

#### **b. Asepsis bedah**

Teknik steril, termasuk prosedur yang digunakan untuk membunuh mikroorganisme dari suatu daerah.

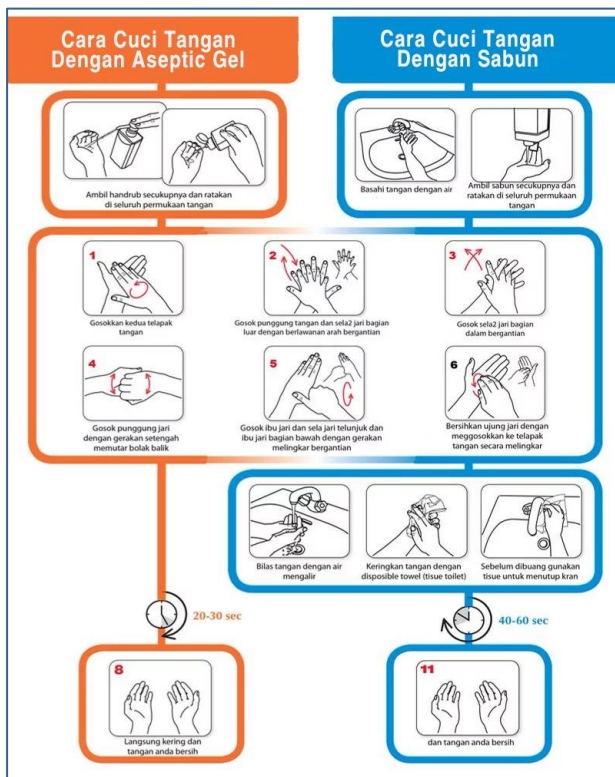
### **Prinsip Tindakan Asepsis:**

- a. Tindakan cuci tangan
- b. Penggunaan sarung tangan steril

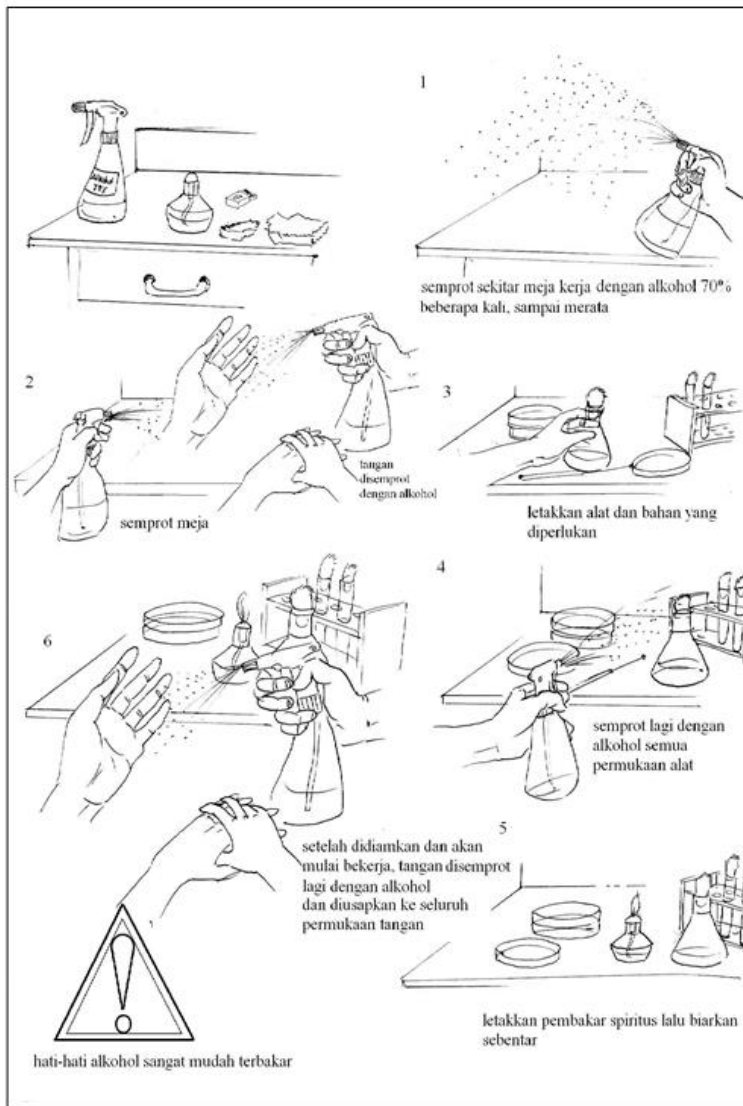
- c. Penggunaan apron sekali pakai
- d. Penggunaan cairan dan instrumen yang steril
- e. Menutup bagian tubuh yang cidera
- f. Tidak menggunakandua kali untuk alat dan bahan sekali pakai
- g. Melakukan prosedur pada tempat kerja yang tidak ramai
- h. Mengurangi berbicara saat bekerja

Berikut ini akan disajikan gambar beberapa prosedur aseptis. Perhatikan gambar dan petunjuknya.

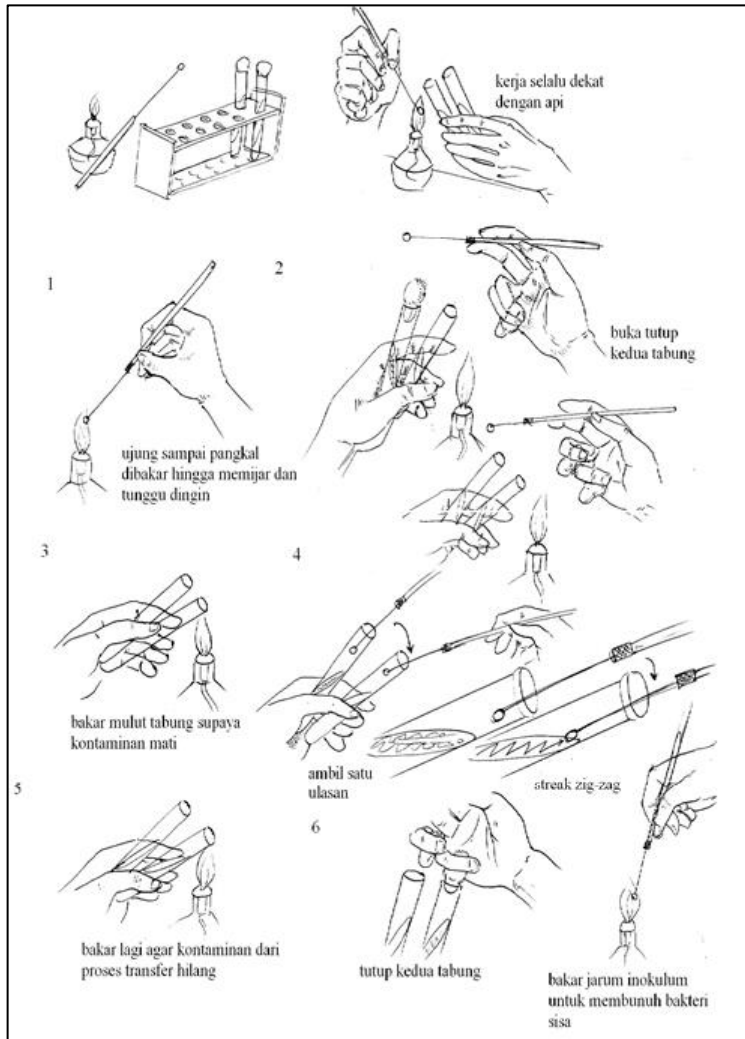
### 1. Cara mencuci tangan dengan benar



## 2. Tindakan aseptis saat bekerja dalam meja kerja mikrobiologi

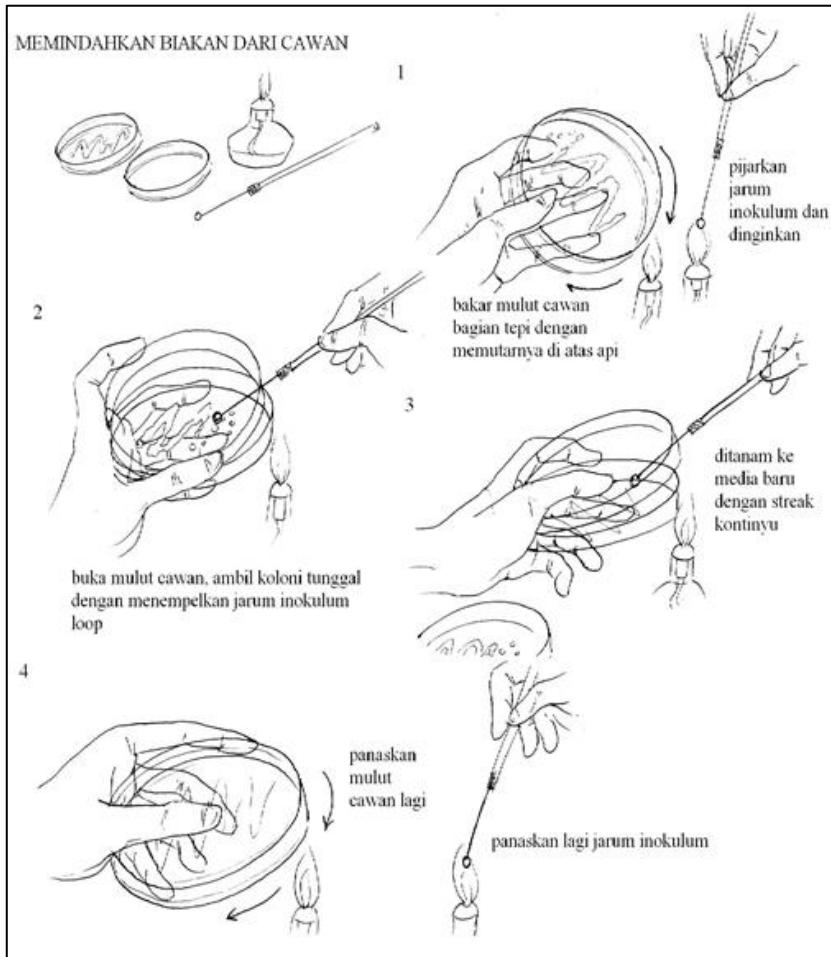


### 3. Tindakan aseptis saat memindahkan biakan

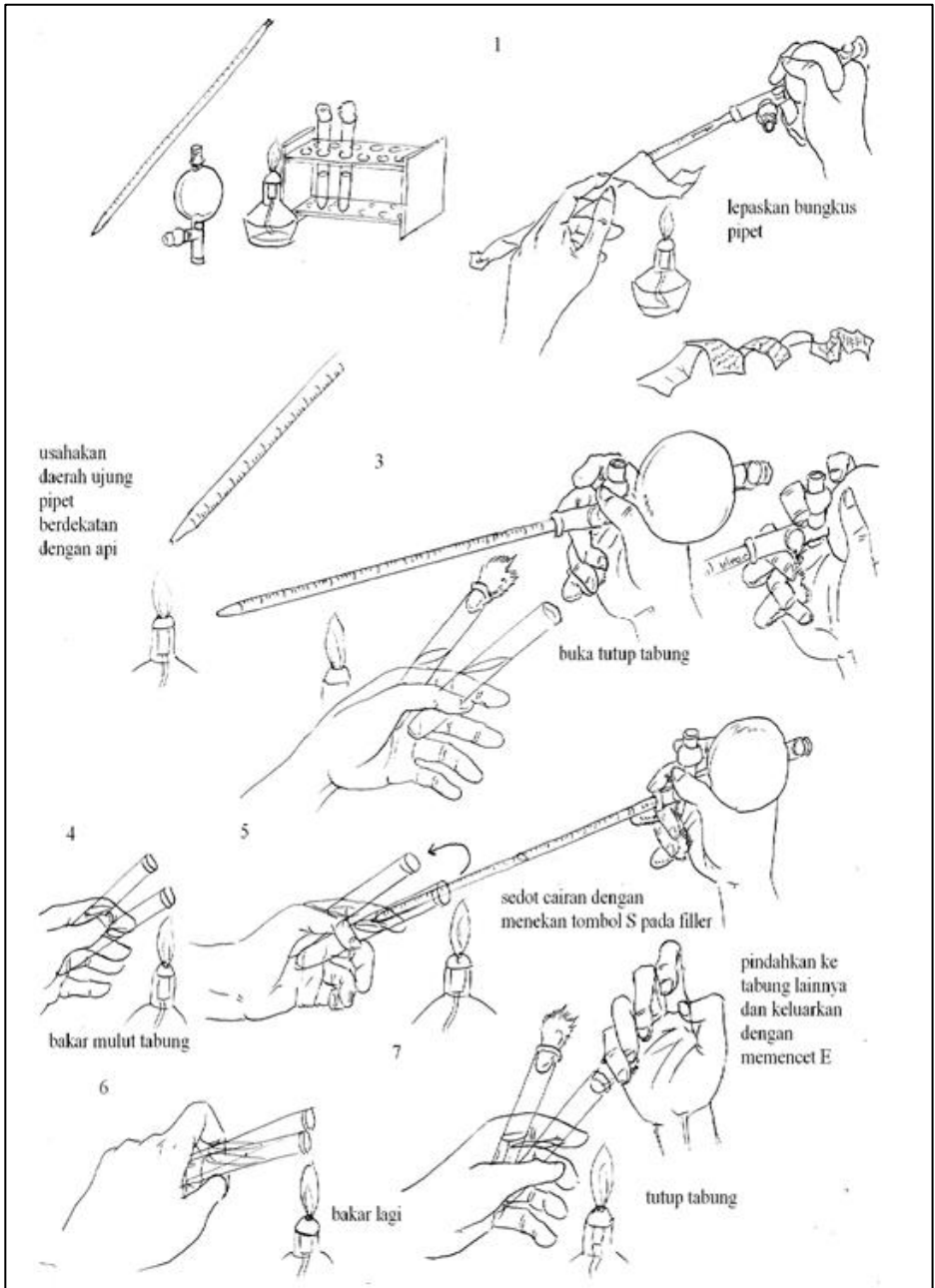




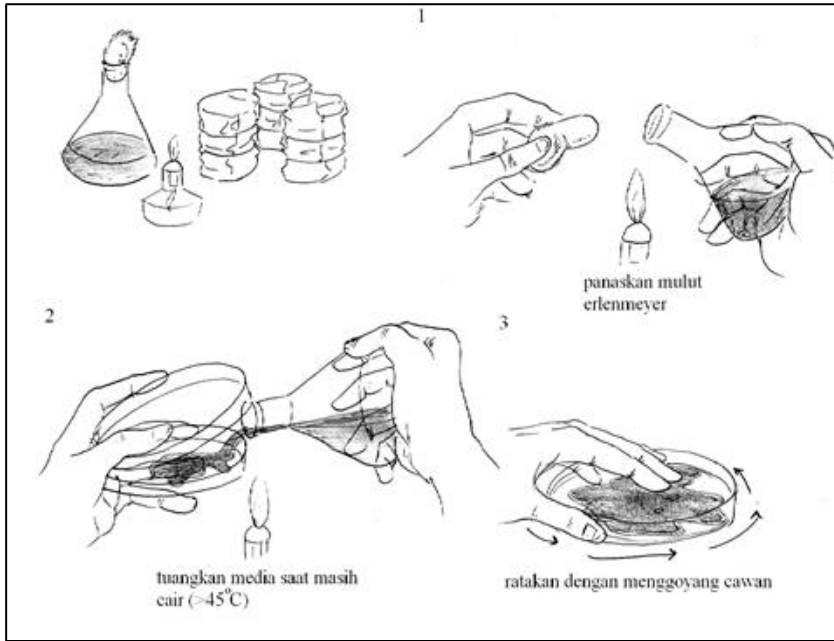
#### 4. Tindakan aseptis saat memindahkan biakan dari cawan petri



## 5. Tindakan aseptis saat memindahkan biakan dari pipet



## 6. Tindakan aseptis saat menuangkan media



## MODUL 2

### MEDIA PERTUMBUHAN

A. **Kompetensi:** Mahasiswa dapat memahami dan membuat berbagai macam media pertumbuhan mikroorganisme.

B. **Tujuan:** Mengetahui macam-macam media pertumbuhan mikroorganisme dan cara pembuatannya

C. **Dasar Teori:**

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Dengan media pertumbuhan dapat dilakukan isolat mikroorganisme menjadi kultur murni dan juga memanipulasi komposisi media pertumbuhannya.

1. Bahan-bahan media pertumbuhan
  - a) Bahan dasar
  - b) Nutrisi atau zat makanan
  - c) Bahan tambahan
  - d) Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media
2. Macam-macam media pertumbuhan
  - a) Berdasarkan sifat fisik
  - b) Berdasarkan komposisi
  - c) Berdasarkan tujuan

#### 1. Bahan-bahan media pertumbuhan

##### 1.1. Bahan Dasar

- a) air (H<sub>2</sub>O) sebagai pelarut

- b) agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk memadatkan media. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C.
- c) Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding agar.
- d) Silica gel, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematat media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.

### **1.2. Nutrisi atau zat makanan**

Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P; unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan/trace element.

- a) Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikrobanya. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik.
- b) Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea.
- c) Vitamin-vitamin.

### **1.3. Bahan tambahan**

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya phenol red (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam

organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba nontarget/kontaminan.

## **2. Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media**

### **a. Agar,**

agar dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya adalah sebagai pematat (gelling) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus diasuk dan dipanasi, pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam

### **b. Peptone**

Peptone adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.

### **c. Meat extract**

Meat extract atau ekstrak daging mengandung basa organik terbuat dari otak, limpa, plasenta dan daging sapi. Dipasaran meat ekstrak dapat dijumpai dalam bentuk serbuk/bubuk.

### **d. Yeast extract**

Yeast extract terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alcohol. Yeast extract mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (B complex).

### **e. Karbohidrat**

Karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang

umumnya digunakan dalam amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol, dll. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5-1%.

### **3. Macam-Macam Media Pertumbuhan**

#### **3.1 Medium berdasarkan sifat fisik**

- a) Medium padat yaitu media yang mengandung agar atau gelatin sehingga setelah dingin media menjadi padat.
- b) Medium setengah padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya bakteri yang tumbuh pada media NfB (Nitrogen free Bromthymol Blue) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media, jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. Semisolid juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media Nitrate Broth, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata diseluruh media.
- c) Medium cair yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (Nutrient Broth), LB (Lactose Broth).

#### **3.2 Medium berdasarkan komposisi**

- a) Medium sintesis yaitu media yang komposisi zat kimianya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya Glucose Agar, Mac Conkey Agar.
- b) Medium semi sintesis yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya PDA (Potato Dextrose Agar)

yang mengandung agar, dekstrosa dan ekstrak kentang. Untuk bahan ekstrak kentang, kita tidak dapat mengetahui secara detail tentang komposisi senyawa penyusunnya.

- c) Medium non sintesis yaitu media yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya Tomato Juice Agar, Brain Heart Infusion Agar, Pancreatic Extract..

### 3.3 Medium berdasarkan tujuan

- a) Media untuk isolasi

Media ini mengandung semua senyawa esensial untuk pertumbuhan mikroba, misalnya Nutrient Broth, Blood Agar.

- b) Media selektif/penghambat

Media yang selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Contohnya adalah Luria Bertani medium yang ditambah Amphisilin untuk merangsang E.coli resisten antibiotik dan menghambat kontaminan yang peka, Ampiciline. Salt broth yang ditambah NaCl 4% untuk membunuh Streptococcus agalactiae yang toleran terhadap garam.

- c) Media diperkaya (enrichment)

Media diperkaya adalah media yang mengandung komponen dasar untuk pertumbuhan mikroba dan ditambah komponen kompleks seperti darah, serum, kuning telur. Media diperkaya juga bersifat selektif untuk mikroba tertentu. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media ini tidak hanya membutuhkan nutrisi sederhana untuk berkembang biak, tetapi



membutuhkan komponen kompleks, misalnya Blood Tellurite Agar, Bile Agar, Serum Agar, dll.

d) Media untuk peremajaan kultur

Media umum atau spesifik yang digunakan untuk peremajaan kultur

e) Media untuk menentukan kebutuhan nutrisi spesifik.

Media ini digunakan untuk mendiagnosis atau menganalisis metabolisme suatu mikroba. Contohnya adalah Koser's Citrate medium, yang digunakan untuk menguji kemampuan menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon.

f) Media untuk karakterisasi bakteri

Media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan spesifik suatu mikroba. Kadang-kadang indikator ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan kimia. Contohnya adalah Nitrate Broth, Lactose Broth, Arginine Agar.

g) Media differential

Media ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari campurannya berdasar karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial, misalnya TSIA (Triple Sugar Iron Agar) yang mampu memilih Enterobacteria berdasarkan bentuk, warna, ukuran koloni dan perubahan warna media di sekeliling koloni.

#### 4. Jenis Media Tumbuh dan Cara Pembuatannya

##### 1) Nutrient Agar

Nutrien Agar (NA) adalah medium umum untuk uji kultur. NA juga digunakan untuk pertumbuhan mayoritas dari mikroorganisme yang tidak selektif, dalam artian mikroorganisme heterotrof. Media ini merupakan media sederhana yang dibuat dari ekstrak beef, pepton, dan agar. Na merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji biasa dari air, sewage, produk pangan, untuk membawa stok kultur, untuk pertumbuhan sampel pada uji bakteri, dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni.

NA dibuat dari campuran ekstrak daging dan peptone dengan menggunakan agar sebagai pematid. Dalam hal ini agar digunakan sebagai pematid, karena sifatnya yang mudah membeku dan mengandung karbohidrat yang berupa galaktam sehingga tidak mudah diuraikan oleh mikroorganisme. Dalam hal ini ekstrak beef dan pepton digunakan sebagai bahan dasar karena merupakan sumber protein, nitrogen, vitamin serta karbohidrat yang sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang. Medium Nutrient Agar (NA) merupakan medium yang berwarna coklat muda yang memiliki konsistensi yang padat dimana medium ini berasal dari sintetik dan memiliki kegunaan sebagai medium untuk menumbuhkan bakteri. Saat ini sudah banyak tersedia media NA dipasaran. Berikut contohnya.

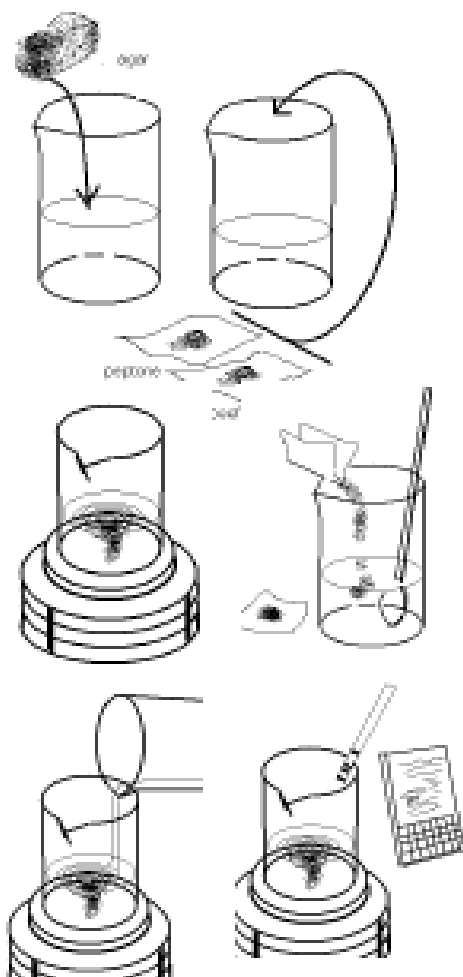


Untuk komposisi nutrisi agar adalah ekstrak beef 3 g, pepton 10 g, NaCl 5 g, air desitilat 1.000 ml dan 15 g agar/L. Agar dilarutkan dengan komposisi lain dan disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Kemudian siapkan wadah sesuai yang dibutuhkan. Nutrient Agar (NA) merupakan suatu medium yang berbentuk padat, yang merupakan perpaduan antara bahan alamiah dan senyawa-senyawa kimia.

### **Pembuatan Media NA Manual**

- 1) Timbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut:
  - a. Beef extract                      5 g atau daging sapi tanpa lemak  
500 g
  - b. Peptone                              5 g
  - c. Agar                                    15 g
  - d. Akuades s.d                        1000 ml

- 2) Potong daging sapi ukuran 1 x 1 cm lalu masukkan ke dalam beaker glass yang berisi 500 ml aquades dan rebus selama 30 menit. Jika menggunakan beef ekstrak langsung larutkan ke aquades 100 ml lalu panaskan sampai mendidih dan diaduk secara konstan. (jaga agar volume air tetap, jika berkurang tambahkan akuades)
- 3) Larutkan agar dan peptone pada 100 ml aquades dengan mengaduk secara konstan dan diberi panas. Dapat menggunakan kompor gas atau hot plate stirrer (jangan sampai overheat, karena akan terbentuk busa dan memuai sehingga tumpah).
- 4) Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen. Kemudian pH media diukur dengan mencelupkan kertas pH indikator. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH.
- 5) Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf.
- 6) Tuang media steril ke cawan petri steril secara aseptis. Jika diinginkan media tegak atau miring pada point ke 5, media langsung dituang ke tabung kemudian disterilisasi.
- 7) Tutuplah tabung berisi medium dengan kapas yang telah dibungkus kain kasa.



### **Pembuatan Media NA Instan**

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

## **2) Pembuatan Potato Dextrose Agar (PDA)**

Potato Dextrose Agar (PDA) merupakan media yang sangat umum yang digunakan untuk mengembangbiakkan dan menumbuhkan jamur dan khamir. Komposisi Potato Dextrose Agar ini terdiri dari bubuk kentang, dextrose dan juga agar. Bubuk kentang dan juga dextrose merupakan sumber makanan untuk jamur dan khamir.

Potato Dextrose Agar juga bisa digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme menggunakan metode Total Plate Count. Perindustrian seperti industri makanan, industri produk susu dan juga kosmetik menggunakan PDA untuk menghitung jumlah mikroorganisme pada sample mereka.

Karena fungsinya yang dapat mengembangbiakkan jamur, sekarang ini PDA juga banyak digunakan oleh pembudidaya jamur seperti jamur tiram. Untuk memaksimalkan pertumbuhan bibit jamur, biasanya pembudidaya mengatur kondisi pH yang rendah

(sekitar 3,5) dan juga menambahkan asam atau antibiotik untuk menghambat terjadinya pertumbuhan bakteri.

### **Langkah kerja pembuatan media PDA**

- 1) Kupas kentang, cuci bersih lalu potong kecil dengan ukuran kurang lebih 2 x 2 cm kemudian timbang sebanyak 200 g.
- 2) Rebus potongan kentang tersebut dalam 500 ml aquadest selama 1,5 -2 jam, atau sampai air menjadi setengah bagian.
- 3) Selama perebusan aduk secara berkala.
- 4) Setelah selesai, ambil rebusan kentang dan saring dengan kertas saring untuk memperoleh cairan ekstrak kentang yang bening pada Beaker glass.
- 5) Tambahkan dextrose 20 gr lalu panaskan dan diaduk pada magnetic stirrer sampai larut.
- 6) Tambahkan agar 20 g lalu panaskan dan diaduk sampai larut.
- 7) Tambahkan aquadest 500 ml sambil di aduk sampai homogen dan jaga agar tidak menggumpal.
- 8) Periksa pH media dan atur pada pH 5-6 dengan menggunakan HCl/NaOH atau asam sitrat.
- 9) Setelah homogeny, media dituang ke dalam labu Erlenmeyer atau Beaker glass lalu tutup dengan aluminium foil.
- 10) Sterilkan media tersebut dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 11) Setelah selesai, media dapat langsung digunakan dengan menuangkan ke petri disk atau tabung reaksi, atau dapat di simpan pada refrigenerator.

Komposisi media tersebut diatas dapat berbeda tergantung peruntukannya. Pada umumnya, formula komposisi PDA yang cocok untuk pertumbuhan jamur dan khamir (per liter) yaitu :

- Kentang/potato starch.....200 gram
- Dextrose.....10 gram
- Agar..... 15 gram
- Aguades .....1000 ml

Contoh beberapa mikroorganisme yang dapat tumbuh dengan baik pada PDA, yaitu : *Pleurotus ostreatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Trichophyton mentagrophytes*.

### 3) Lactose Broth (LB)

Lactose broth digunakan untuk mendeteksi adanya coliform, menjadi preenrichment broth untuk Salmonella dan juga sebagai bahan pembelajaran fermentasi laktosa pada bakteri secara umum.

Formulasi dari Lactose Broth sendiri merupakan rekomendasi dari Asosiasi Kesehatan Publik di Amerika (APHA) dan juga American Water Works Association untuk menguji ada atau tidaknya organisme coliform pada produk susu dan juga air.

Komposisi per liter dari Lactose Broth terdiri dari :

- Beef extract..... 3 gram
- Peptone..... 5 gram
- Lactose..... 5 gram

Kegunaan atau manfaat dari masing-masing komponen pada lactose broth yaitu peptone dan beef extract merupakan sumber nutrisi esensial untuk metabolisme bakteri. Sedangkan fungsi dari laktosa yaitu sumber karbohidrat untuk bakteri melakukan



fermentasi. Jika terbentuk gas, maka proses fermentasi telah terjadi. Hal itu menandakan adanya coliform di dalam sample tersebut.

#### **4) Pembuatan Nutrient Broth**

Komposisi untuk media NB sama dengan NA tetapi tidak memakai agar sebagai pematat. Proses pembuatannya pun lebih sederhana, tinggal melarutkan peptone dan beef extract kemudian ditampung dalam labu Erlenmeyer atau tabung reaksi dan siap disterilisasi. Proses pembuatan ini tidak memerlukan panas, peptone dan beef extract akan mudah larut sempurna pada air suhu kamar jika diaduk

#### **5) Media Eosin Methylene Blue Agar (EMB)**

Media Eosin Methylene Blue Agar adalah hasil modifikasi dari Levine M. (1918-1921) yang digunakan untuk diferensiasi *Escherichia coli* dan *Enterobacteria aerogenes*, untuk identifikasi cepat dari *Candida albicans*, dan untuk identifikasi Staphylococcus koagulase-positif. Media ini dibuat dan dirumuskan dengan tujuan untuk mendeteksi dan membedakan mikroorganisme dari kelompok bakteri coliform.

Media EMB Agar agar yang memiliki karakteristik sebagai berikut :

- Berdasarkan sifat fisiknya media EMB Agar merupakan media padat atau solid karena mengandung agar sekitar 15g /liter sehingga setelah dingin media akan menjadi padat.
- Berdasarkan kandungan bahannya media EMB Agar merupakan media sintetis karena komposisinya tersusun dari bahan-bahan kimia yang telah diketahui komposisinya secara pasti.

- Berdasarkan tujuan pembuatannya media EMB Agar merupakan media selektif diferensial untuk menubuhkan bakteri gram negatif dari golongan Enterobacteriaceae.
- Media EMB Agar yang masih berupa serbuk memiliki warna ungu berbentuk serbuk dan media yang sudah jadi berwarna ungu gelap dengan konsistensi padat.
- Berdasarkan jenisnya media EMB Agar merupakan media plate, karena dicetak di dalam petridisk steril.
- Media EMB Agar memiliki pH asam yaitu  $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$ .

#### ❖ **FUNGSI MEDIA EMB**

Secara umum media EMB agar adalah media isolasi untuk membedakan bakteri Enterobacteriaceae. EMB Agar adalah media yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri coliform di dalam suatu sample. Media Eosin Methylene Blue Agar ini mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk membedakan mikroba yang memfermentasikan laktosa seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *Salmonella*. Mikroba yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam. Sedangkan mikroba lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Fungsi dari eosin dan metilen blue membantu mempertajam perbedaan warna. Namun demikian, jika media ini digunakan pada tahap awal, kuman lain bisa juga tumbuh terutama *P. Aeruginosa* dan *Salmonella sp.* Hal ini dapat menimbulkan keraguan. Bagaimanapun media ini sangat baik untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah *E. coli*. Media ini berbentuk padat berguna untuk menjaga sel tidak berpindah tempat sehingga akan mudah dihitung dan dipisahkan jenisnya ketika tumbuh menjadi koloni. Media

padat juga menampakkan difusi hasil metabolit bakteri sehingga memudahkan dalam pengujian suatu hasil metabolit.

#### ❖ **KOMPONEN MEDIA EMB**

Komposisi dari EMB Agar secara umum terdiri dari sumber nutrisi atau zat makanan dan komposisi media pertumbuhan. Salah satu media EMB Agar yang diproduksi oleh pabrik yang biasa digunakan di laboratorium adalah media EMB Agar dengan merk Oxoid CM0069, terdiri dari komponen :

Peptone	: 10.0 g/L
Lactose	: 10.0 g/L
Dipotassium hydrogen phosphate	: 2.0 g/L
Eosin	: 0.4 g/L
Methylene blue	: 0.065 g/L
Agar	: 15.0 g/L

#### ❖ **FUNGSI KOMPONEN PENYUSUN MEDIA**

Adapun fungsi dari masing-masing komponen tersebut adalah sebagai berikut :

##### **Pepton 10 g**

Peptone adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya. Sebagai sumber protein untuk mikroorganisme yang akan dibiakkan.

**Lactose 10 g**

Laktosa dan berfungsi untuk memisahkan bakteri yang memfermentasikan laktosa seperti E.coli, dengan bakteri yang tidak memfermentasi laktosa seperti S. aureus, Pseudomonas aeruginusae, dan Salmonella. Berfungsi sebagai sumber karbohidrat untuk pertumbuhan mikroorganisme.

**Di-potassium hydrogen phosphate 21 g**

Merupakan garam yang sangat larut dalam air. Bahan ini berfungsi sebagai pupuk, makanan aditif dan zat penyangga.

**Eosin 0.4 g**

Berfungsi sebagai indikator warna.

**Methyline blue 0.06 g**

Berfungsi sebagai Indikator warna.

**Agar 15 g**

Agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematat media. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C.

**Perhitungan Pembuatan Media Emb**

Perhitungan dalam pembuatan media EMB Agar sangat diperlukan untuk membantu dalam penimbangan dan pelarutan media yang dibuat dengan volume tertentu. Penimbangan diperlukan agar komposisi media yang dibuat tepat, tidak berubah dan tetap dapat berfungsi baik dan sama walaupun dibuat dalam volume berbeda. Dalam kemasan media EMB Agar yang diproduksi oleh pabrik telah tertera standar penimbangan dan pelarutan media. Seperti pada media dehidrasi EMB Agar merk OXOID CM0069 standar penimbangan dan pelarutan yang diberikan adalah 37,5 gram dalam satu liter. Jika ingin

membuat media dengan volume berbeda baik lebih besar maupun lebih sedikit dapat dikonversi menggunakan rumus sebagai berikut:  $V1/W1=V2/W2$ . Dengan  $V1$  dan  $W1$  merupakan volume dan berat dari standar penimbangan dan pelarutan yang diberikan oleh perusahaan yang memproduksi media, sedangkan  $V2$  dan  $W2$  merupakan volume pelarutan dan berat media yang akan ditimbang.

### **Penimbangan**

Penimbangan dilakukan dengan terlebih dahulu menyesuaikan dengan volume media yang ingin dibuat. Jika sudah ditentukan berapa besar volume media yang ingin dibuat, maka berat penimbangan dapat dihitung dengan perhitungan seperti di atas ( $V1/W1=V2/W2$ ).

### **Prosedur Pembuatan EMB Agar**

Media EMB Agar dapat dibuat melalui prosedur-prosedur sebagai berikut :

- 1) Dipastikan semua alat dan bahan dalam keadaan siap digunakan. Semua APD digunakan dengan baik, benar, dan lengkap. Disiapkan semua alat-alat dan bahan-bahan yang akan digunakan.
- 2) Ditimbang serbuk media EMB agar (sesuai dengan volume yang dibuat)
- 3) Dipindahkan serbuk media EMB agar ke beaker glass, lalu ditambahkan aquadest sesuai dengan volume, dipindahkan ke Erlenmeyer.
- 4) Dihomogenkan larutan dengan bantuan pemanasan dan pengadukan.

- 5) Pelarutan tidak boleh sampai mendidih (pelarutan harus sempurna sehingga tidak ada kristal yang tersisa).
- 6) Dicek pH larutan sesuai petunjuk media (pH=  $6,8 \pm 0,2$ ) pada suhu 250C.
- 7) Diperhatikan pengecekan suhu larutan saat pengecekan pH media.
- 8) Ditambah NaOH 0,01 N jika pH larutan kurang basa dan ditambahkan HCl 0,01 N jika pH larutan kurang asam.
- 9) Disterilisasi  $\pm 1210C$  (1 atm);  $\pm 15$  menit.
- 10) Dibagi/ dimasukkan kedalam petridisk steril yang sudah disiapkan.
- 11) Dibiarkan media membeku dengan sempurna.
- 12) Dimasukkan media ke inkubator ( $\pm 370C$ ),  $\pm 24$  jam untuk uji kualitas media, dengan posisi petridisk terbalik.
- 13) Disimpan pada suhu 40 C - 80 C untuk menyimpan media.

### **UJI KUALITAS MEDIA**

Kualitas media harus diperiksa terlebih dahulu sebelum media digunakan. Secara umum ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk menguji mutu media yang telah dibuat, antara lain.

#### **Secara visual**

Secara visual dapat dilakukan dengan cara melihat warna, kekeruhan, dan perubahan lain yang dapat dilihat, contohnya :

Bila warna media EMB berubah warna dari warna standarnya yaitu ungu gelap. Jika hal ini terjadi patut dicurigai terjadi pergeseran nilai pH. Untuk itu dapat nilai pH dapat diukur kembali menggunakan alat ukur pH, seperti pH stik atau pH meter. Bila pH media berbeda  $\pm 0,2$  satuan , maka media

harus dibuat baru, atau dapat pula ditambahkan larutan basa seperti NaOH jika kurang basa, atau larutan asam seperti HCl jika kurang asam.

### **Uji sterility**

Uji sterilitas merupakan satu keharusan untuk mengetahui kualitas media apakah masih layak digunakan atau tidak. Uji sterilitas ini dilakukan dengan mengambil 5 % media dari setiap batch media yang dibuat. Kemudian diinkubasi selama dua hari pada suhu 350 C. Bila terdapat pertumbuhan lebih dari dua koloni kuman pada satu cawan petri atau lebih, berarti seluruh media dari batch tersebut tidak dapat dipakai.

### **Penanaman kuman kontrol positif dan kontrol negatif**

Kuman kontrol positif adalah kuman yang seharusnya tumbuh pada media tertentu, sedangkan kontrol kuman negatif adalah kuman yang seharusnya tidak tumbuh pada media tertentu.

### **Nilai-Nilai Kritis Dalam Pembuatan Madia EMB**

- Penimbangan bubuk media harus sesuai dengan volume yang akan dibuat, maka dari itu dapat dibantu dengan perhitungan.
- Pelarutan media jangan sampai mendidih karena dapat merusak komposisi media, khususnya kandungan gula (laktosa), merubah pH media, dan membuat media susah memadat.
- Pengecekan pH media harus pada suhu 25 °C agar tidak merusak indikator pH yang digunakan.
- Proses sterilisasi harus tepat suhu, waktu dan tekanan pada autoklaf agar media yang dibuat terhindar dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.

- Proses pengerjaan harus cepat dan tepat, khususnya saat media akan dituang ke petridisk, agar media tidak memadat sebelum dipindahkan ke petridisk.
- Penuangan media ke petri disk harus pada kondisi steril yaitu melalui proses fiksasi.
- Media diinkubasi selama  $\pm$  24 jam, dengan posisi petridisk terbalik, untuk menyediakan sirkulasi udara yang baik untuk pertumbuhan bakteri, dan agar uap air yang berkondensasi menjadi tetesan air tidak jatuh ke permukaan media dan menyebabkan kontaminasi.
- Jika tidak digunakan media harus disimpan terhindar dari sinar matahari langsung dan disimpan di dalam kulkas pada suhu 20 – 80 C.



## **MODUL 3**

# **ISOLASI MIKROORGANISME**

A. **Kompetensi:** Mahasiswa dapat memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapat kultur murni.

**B. Isolasi Mikroorganisme:**

1. Teknik Pengambilan sampel
2. Isolasi dengan cara pengenceran
  - i. Teknik preparasi suspensi
    1. Swab
    2. Rinse
    3. Maserasi
  - ii. Teknik pengenceran bertingkat
  - iii. Teknik penanaman
    1. Dari suspensi (spread dan pour plate)
    2. Dengan goresan (streak dan quadrant streak inoculation)
3. Prosedur isolasi bakteri dari sampel
4. Prosedur isolasi jamur dari sampel

**C. Pengertian**

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai macam sel. Di dalam laboratorium populasi bakteri ini dapat diisolasi menjadi kultur murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat dan kemampuan biokimiawinya.

#### D. Teknik Pengambilan Sampel

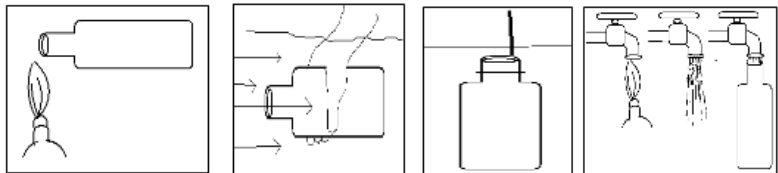
Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel. Berikut merupakan prosedur pengambilan sampel.

##### 1) Sampel tanah

Jika mikroorganisme yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah, maka cara pengambilannya disesuaikan dengan tujuan dan kebutuhan. Misal jika yang diinginkan mikroorganisma rhizosfer maka sampel diambil dari sekitar perakaran dekat permukaan hingga ujung perakaran.

##### 2) Sampel air

Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air. Bila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan dengan tali, jika ingin mengambil sampel dari air keran maka sebelumnya keran dialirkan dulu beberapa saat dan mulut kran dibakar



## **E. Isolasi Dengan Cara Pengenceran (Dilution)**

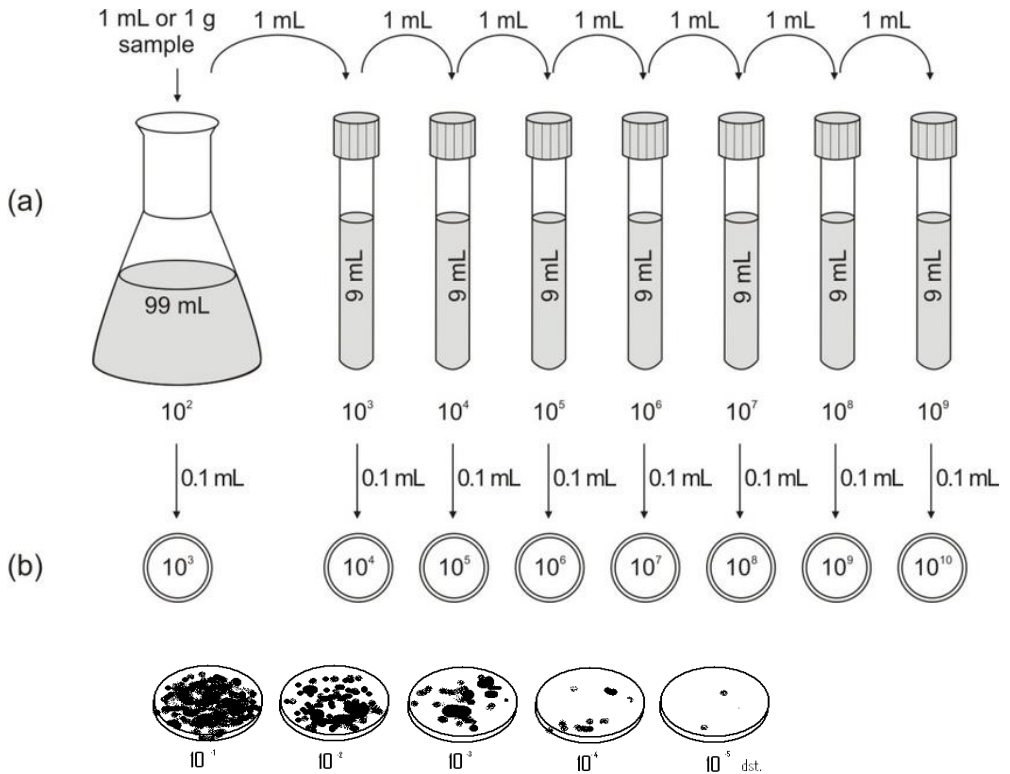
### **1. Teknik Preparasi Suspensi**

Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

- a. Swab (ulas), dilakukan menggunakan cotton bud steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan cotton bud memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari cotton bud kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika cotton bud dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal pepton water.
- b. Rinse (bilas) ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. Rinse merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam akuades dengan perbandingan 1 : 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan akuades 45 ml yang terdapat dalam beaker glass.
- c. Maseration (pengancuran), sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antar alain bakso, biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama

adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi.

## 2. Teknik Pengenceran Bertingkat



Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga

pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.

#### **F. Cara Kerja :**

- a. Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10<sup>-1</sup>) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan ingat akuades yang digunakan jika memakai teknik rinse dan swab sudah termasuk pengencer 10<sup>-1</sup>. Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya (pengocokan yang benar dapat dilihat pada gambar disamping)
- b. Diambil 1 ml dari tabung 10<sup>-1</sup> dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10<sup>-2</sup> secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

#### **G. Teknik Penanaman**

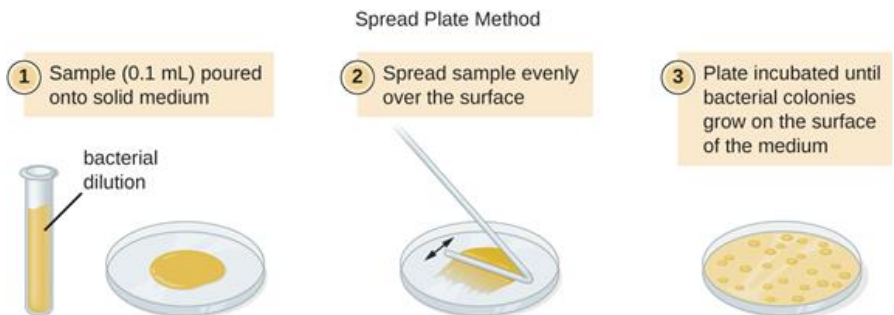
##### **1) Teknik penanaman dari suspensi**

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

##### **a) Spread Plate (agar tabur ulas)**

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut : Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.

- Batang L atau batang drugal diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menggosokkannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.
- Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroorganismenya dapat mati karena panas.



## **b) Pour Plate (agar tuang)**

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ( $>45^{\circ}\text{C}$ ) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya  $\text{O}_2$  dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ( $>45^{\circ}\text{C}$ )
- Teteskan 1 ml secara aseptis. suspensi sel ke dalam cawan kosong
- Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi. Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk spread plate dan 1 ml untuk pour plate karena spread plate ditujukan untuk menumbuhkan dipermukaannya saja, sedangkan pour plate membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada spread plate.

### Pour Plate Method

1 Bacterial sample mixed with warm agar (45–50 °C)



2 Sample poured onto sterile plate



3 Sample swirled to mix, allowed to solidify



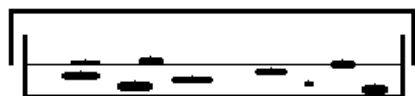
4 Plate incubated until bacterial colonies grow



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



spread plate



pour plate

## 2) Teknik Penanaman dengan Goresan (Streak)

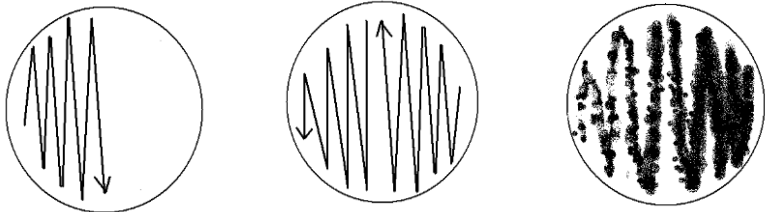
Bertujuan untuk mengisolasi mikroorganismenya dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.



a) **Goresan Sinambung**

Cara kerja :

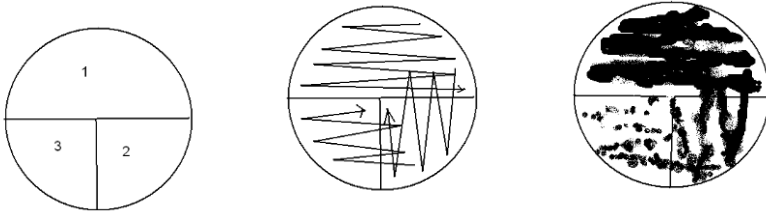
- Sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar.
- Jangan pijarkan loop, lalu putar cawan 180oC lanjutkan goresan sampai habis. Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru.



b) **Goresan T**

Cara kerja :

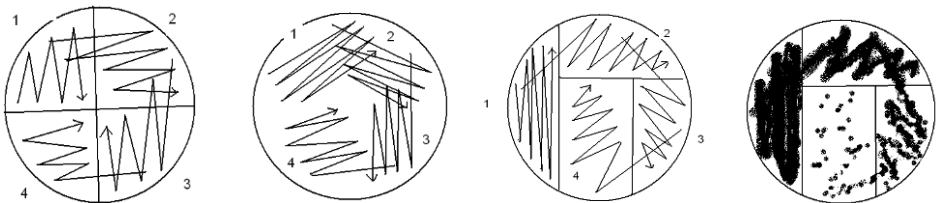
- Bagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker
- Inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag
- Panaskan jarum inokulan dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2 (streak pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna
- Lakukan hal yang sama pada daerah 3



**c) Goresan Kuadran (Streak quadrant)**

Cara kerja :

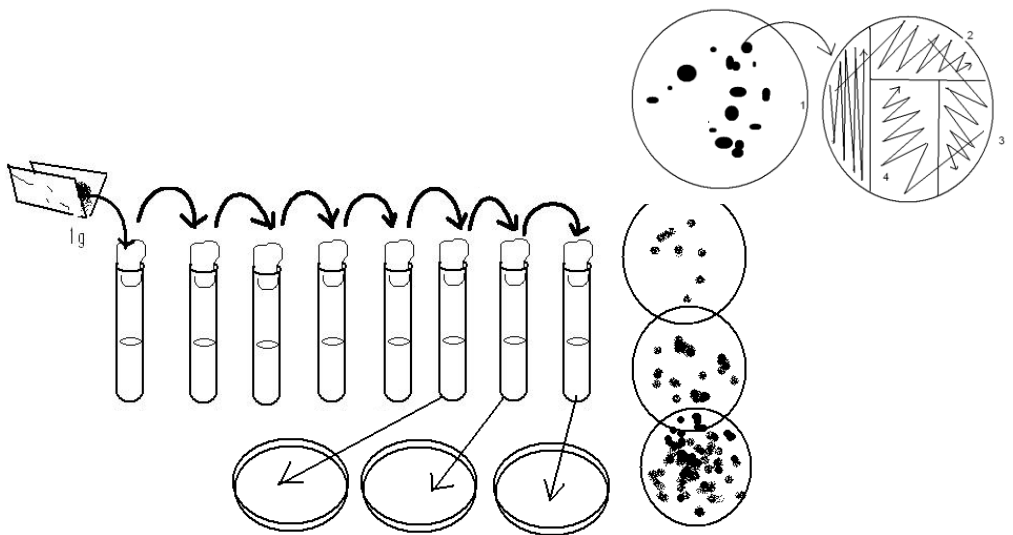
- Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganisme. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah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



**Cara Kerja Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah :**

- Tanah seberat 1 g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10-1 secara aseptis dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10-8

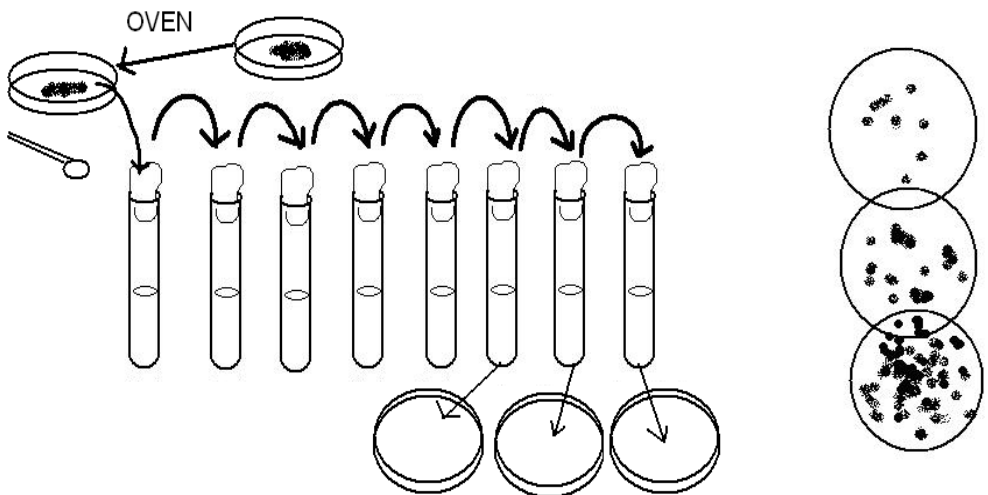
- Tiga pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara spread plate pada medium NA, setelah selesai, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
- Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut kemudian dipilih koloni yang relatif terpisah dari koloni lain dan koloni yang mudah dikenali
- Koloni yang terpilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA baru dengan teknik streak kuadran
- Inkubasi 1x24 jam.



### Cara Kerja Isolasi Jamur dari Tanah :

- Tanah dalam cawan petri dipanaskan dengan oven pada suhu 80°C selama 30 menit dengan cawan petri untuk membunuh sel vegetatif tetap bertahan

- Tanah yang telah dioven diambil 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung pengenceran bertingkat
- Tiga pengenceran terakhir diambil untuk ditanam secara spread plate ke media PDA yang ditambah streptomycin atau penicillin. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari
- Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada medium PDA baru,
- Inkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.



## MODUL 4

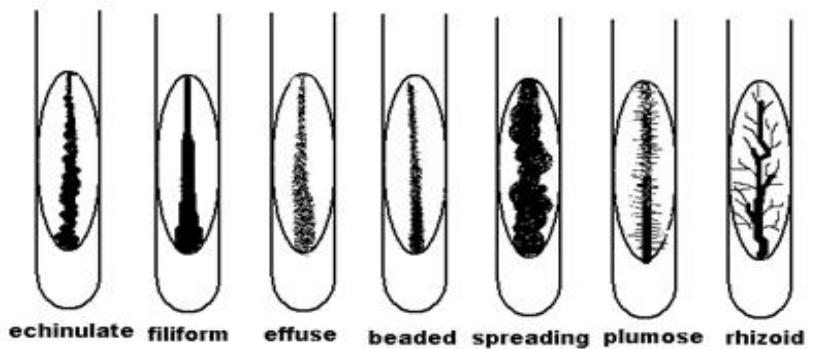
### PENGAMATAN MORFOLOGI MIKROBA

**A. Kompetensi :** mahasiswa dapat mengenali bentuk dan morfologi sel dan koloni mikroorganisme

#### **B. Bentuk Koloni Bakteri**

##### **1. Pertumbuhan pada Agar Miring**

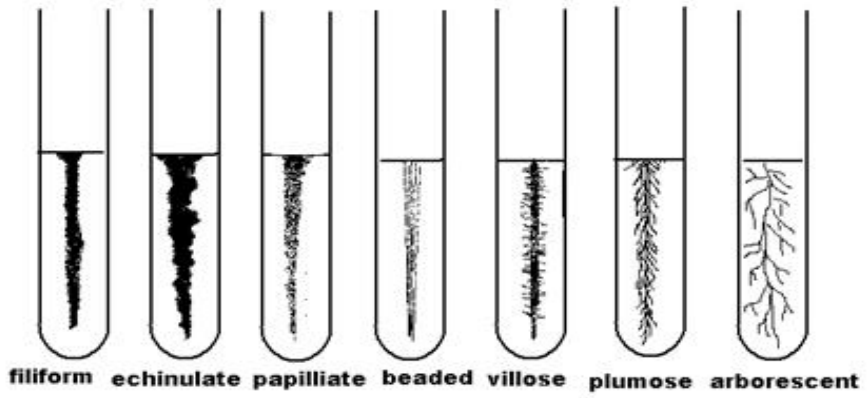
Ciri-ciri koloni diperoleh dengan menggoreskan jarum inokulum tegak dan lurus ciri koloni berdasarkan bentuk:



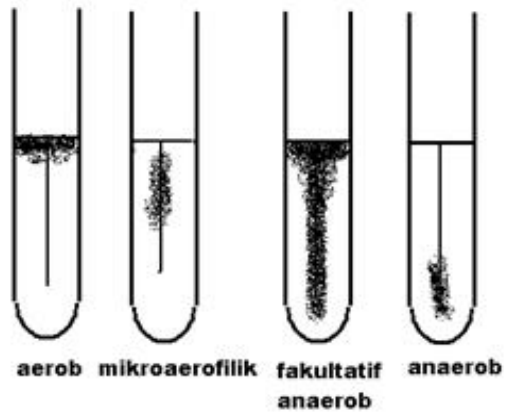
##### **2. Pertumbuhan pada Agar Tegak**

Cara penanaman adalah dengan menusukkan jarum inokulum needle ke dalam media agar tegak.

Ciri-ciri koloni berdasar bentuk:

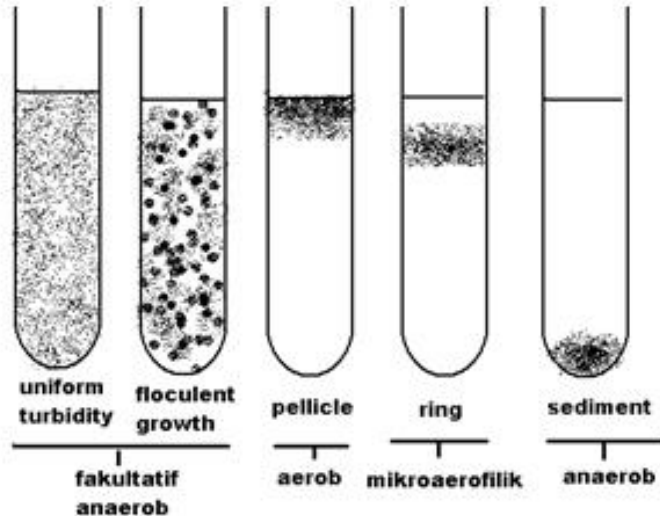


Ciri koloni berdasar kebutuhan O<sub>2</sub>



### 3. Pertumbuhan pada Media Cair

Pola pertumbuhan berdasarkan kebutuhan O<sub>2</sub>











### 4. Pertumbuhan pada Cawan Petri

Ciri-ciri yang perlu diperhatikan adalah sebagai berikut :

- Ukuran; pinpoint/punctiform (titik)
  - Small (kecil)
  - Moderate (sedang)
  - Large (besar)
- Pigmentasi : mikroorganisme kromogenik sering memproduksi pigmen intraseluler, beberapa jenis lain memproduksi pigmen ekstraseluler yang dapat terlarut dalam media
- Karakteristik optik: diamati berdasarkan jumlah cahaya yang melewati koloni. Opaque (tidak dapat ditembus cahaya), Translucent (dapat ditembus cahaya sebagian), Transparent (bening)



• Bentuk :

Circular		Elevasi	Flat	
Irregular			Raised	
Spindle			Convex	
Filamentous			Umbonate	

• Permukaan :

Halus



mengkilap



Kasar



Berkerut



Kering seperti bubuk



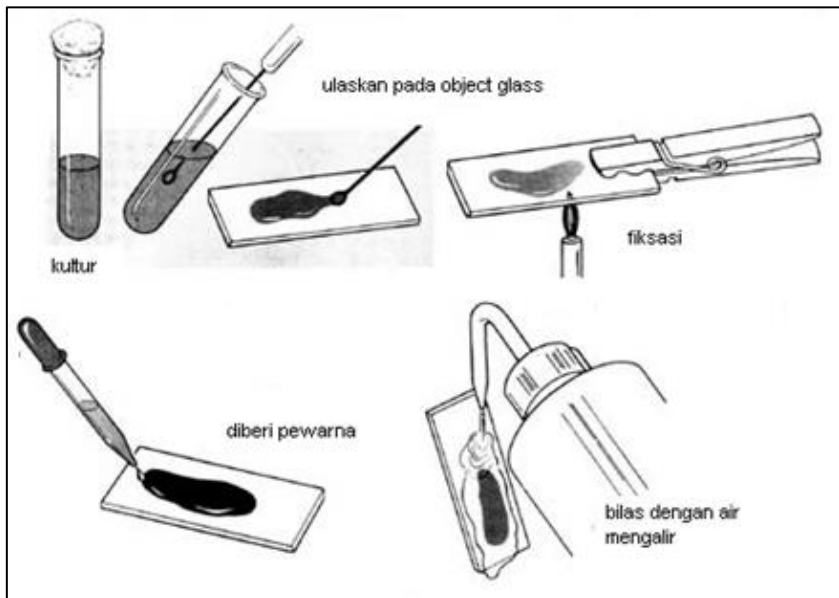
### C. Cara Kerja Pengamatan Bakteri

Kegiatan ini merupakan tindakan pertama kali jika ingin mempelajari suatu jenis bakteri lebih lanjut, khususnya untuk tujuan identifikasi. Setelah mendapatkan kultur murni maka biakan yang diinginkan ditumbuhkan ke berbagai bentuk media untuk dikenali ciri koloninya.

1. Membersihkan objek benda dengan alcohol kemudian panggang di atas lampu spirtus sampai kering
2. Mengambil secara aseptik suspensi bakteri dan letakkan pada objek glass tersebut. Meratakan suspensi bakteri tersebut.



3. Mengeringkan dan selanjutnya fiksasi di atas nyala lampu spiritus
4. Setelah dingin bubuhkan **Kristal violet** (Gram A 1 sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 1 menit)
5. Mencuci dengan aquades mengalir kemudian keringkan
6. Menetesi lagi objek glass tersebut dengan **Murdon** (Gram B), biarkan selama 1 menit, cuci dengan aquades mengalir dan keringkan
7. Menetesi objek glass dengan **ethanol** (Gram C), biarkan selama 30 detik. Selanjutnya cuci dengan aquades mengalir dan keringkan
8. Menetesi dengan **safranin** (Gram D) selama 1 menit. Selanjutnya cuci dengan aquades mengalir dan keringkan
9. Mengamati preparat di bawah mikroskop. Amati warna dan gambar bentuk sel. Tentukan sifat Gram dari bakteri tersebut. (Gram positif untuk warna ungu sedang gram negatif untuk warna merah).



#### D. Pewarnaan Gram

Adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi. Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis. Sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel.

**Berikut merupakan prosedur pewarnaan Gram:**

No	Cara Kerja	Dampak/Hasil
1.	Buat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi dari bakteri gram positif misal <i>Bacillus subtilis</i> dan gram negatif misal <i>Escherichia coli</i>	Sel bakteri tertempel pada permukaan kaca (object glas)
2.	Teteskan kristal violet sebagai pewarna utama pada kedua preparat, usahakan semua ulasan terwarnai dan tunggu selama $\pm 1$ menit	Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri gram positif dan negatif
3.	Cuci dengan akuades mengalir	
4.	Teteskan mordant (lugol, s iodine) lalu tunggu $\pm 1$ menit	Adanya lugol's iodine menyebabkan adanya ikatan Crystal Violet (CV) dengan iodine yang akan

		meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada gram positif dapat terbentuk CV iodine-ribonukleat pada dinding sel
5.	Cuci dengan akuades mengalir	
6.	Beri larutan pemucat (ethanol 96%/aseton) setetes demi setetes hingga ethanol yang jatuh berwarna jernih. Jangan sampai terlalu banyak (overdecolorize)	Penetasan ethanol absolut menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam ethanol), sehingga kompleks CV-iodine akan lepas dari permukaan sel gram negatif, sedangkan pada gram positif CV-iodine tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening
7.	Cuci dengan akuades mengalir	
8.	Teteskan counterstain (safranin) dan tunggu selama $\pm$ 45 detik	Safranin akan mewarnai sel gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. Counterstain hanya berfungsi sebagai pengontras saja.
9.	Cuci dengan akuades mengalir	

10.	Keringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu biarkan mengering di udara.	Sel bakteri tertempel pada permukaan kaca (object glas).
-----	---	--

Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri gram positif dan negatif. Adanya lugol's iodine menyebabkan adanya ikatan CV dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada gram positif dapat terbentuk CV iodin-ribonukleat pada dinding sel.

Penetasan etanol absolut menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks CV-iodine akan lepas dari permukaan sel gram negatif, sedangkan pada gram positif CV-iodine tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening. Safranin akan mewarnai sel gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. Counterstain hanya berfungsi sebagai pengontras saja.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pewarnaan gram adalah sbb:

- Fase yang paling kritis dari prosedur di atas adalah tahap dekolorisasi yang mengakibatkan CV-iodine lepas dari sel.
- Pemberian ethanol jangan sampai berlebih yang akan menyebabkan overdecolorization sehingga sel gram positif tampak seperti gram negatif. Namun juga jangan sampai terlalu sedikit dalam penetasan etanol (underdecolorization) yang tidak akan melarutkan CV-iodine secara sempurna sehingga sel gram negatif seperti gram positif.

- Preparasi pewarnaan gram terbaik adalah menggunakan kultur muda yang tidak lebih lama dari 24 jam. Umur kultur akan berpengaruh pada kemampuan sel menyerap warna utama (CV), khususnya pada gram positif. Mungkin akan menampakkan gram variabel yaitu satu jenis sel, sebagian berwarna ungu dan sebagian merah karena pengaruh umur. Walaupun ada beberapa species yang memang bersifat gram variabel seperti pada genus *Acinetobacter* dan *Arthrobacter*.

### C. Mengamati motilitas bakteri

#### 1. Pengamatan Langsung

Cara Kerja :

- Teteskan biakan bakteri motil seperti *Bacillus* atau *E.coli* ke object glass
- (sebaiknya dari biakan cair). Jika digunakan biakan padat maka ulas dengan jarum inokulum lalu ditambah akuades satu tetes, ratakan.
- Tutup dengan cover glass
- Amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran maksimum. Bakteri akan tampak transparan dan pola pergerakannya tidak beraturan. Hati-hati jangan salah membedakan antara sel yang bergerak sendiri karena flagel atau bergerak terkena aliran air.

#### 2. Pengamatan tidak langsung

Cara Kerja :

- Tanam biakan pada media NA tegak atau Media Motilitas dengan cara tusuk (Stab inoculation) sedalam + 5 mm.
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 1x 24 jam

- Hasil positif (motil) jika bakteri tumbuh pada seluruh permukaan media, hasil negatif menunjukkan bakteri hanya tumbuh pada daerah tusukan saja

Bakteri motil akan bermigrasi ke seluruh permukaan agar dan bekas tusukan.

## **Pengamatan Yeast / Khamir**

### **1. Mengamati morfologi koloni yeast**

- Tanam biakan yeast (dapat berupa *Sacharomyces cereviceae* atau *Candida albicans*) pada PDA dengan cara streak quadrant.
- Inkubasi selama 2x24 jam.
- Setelah didapatkan koloni tunggal, pengamatan ciri-ciri morfologi koloni hampir sama dengan ciri morfologi bakteri.

### **2. Mengamati Morfologi Sel Yeast**

Yeast merupakan fungi mikroskopik uniseluler, tidak membentuk hifa (beberapa spesies dapat membentuk pseudohifa). Bentuk selnya bervariasi dapat berbentuk bulat, bulat telur, bulat memanjang dengan ukuran 1-9x20  $\mu\text{m}$ . Beberapa spesies yeast memiliki sifat dimorfisme yaitu bentuk sel tunggal dan bentuk hifa atau pseudohifa. Pseudohifa adalah hifa yeast yang terbentuk dari rangkaian sel hasil pembelahan aseksual secara budding, tetapi tidak melepaskan diri dari induk. Morfologi internal sel mudah dilihat dan terdiri dari inti dan organel seperti mitokondria, grannula lemak dan glikogen.

### 3. Melihat bentuk sel Yeast

Cara Kerja :

- Tumbuhkan *Sacharomyces cereviceae* pada glukosa cair selama 24 jam.
- Ulaskan suspensi biakan pada object glass lalu teteskan Methylene Blue hingga rata (jangan difiksasi).
- Tutup preparat dengan cover glass.
- Amati dengan perbesaran 40x10 atau 100x10.

### 4. Melihat bentuk spora sel Yeast

Cara kerja :

- Buat preparat ulas dari biakan yeast pada Goodkowa Agar yang berumur 10 hari.
- Fiksasi dengan api bunsen.
- Warnai dengan cara Shager dan Fulgen yaitu:  
Tetesi preparat dengan Malachite Green dan biarkan 30-60 detik. Panasi preparat dengan api bunsen selama + 30 detik (sampai timbul uap).
- Cuci preparat dengan air mengalir. Keringkan dengan tissue kemudian biarkan pada udara terbuka. Amati di bawah mikroskop. Perhatikan spora yang berwarna.

### Kapang / Jamur

Jamur merupakan mikroba dengan struktur talus berupa benang-benang (hifa) yang terjalin seperti jala (myselium). Hifa dapat berekat (septat) dengan inti tunggal/ lebih dan hifa tidak bersekat (aseptat). Penampakan morfologi koloni pada umumnya seperti Benang (filamentous) yang pertumbuhannya membentuk lingkaran. Morfologi koloninya dapat dengan mudah dibedakan dengan bakteri walaupun ada beberapa jenis

bakteri yang koloninya mirip jamur, seperti dari kelompok Actinomycetes atau Bacillus mycoides. Koloni kapang memiliki keragaman warna yang muncul dari sporanya.

### **A. Mengamati morfologi koloni kapang**

Cara kerja :

- Tanam/pindahkan biakan kapang dengan jarum inokulum needle yang diletakan di tengah-tengah cawan petri.
- Inkubasi selama beberapa hari.
- Amati pertumbuhan koloni (miselium) yang menyebar.

### **B. Mengamati sel morfologi kapang dengan metode Slide Culture (Microculture)**

Teknik ini bertujuan untuk mengamati sel kapang dengan menumbuhkan spora pada object glass yang ditetesi media pertumbuhan. Pengamatan struktur spora dan miselium dapat juga dilakukan dengan preparat ulas seperti yang telah diuraikan di depan. Namun seringkali miselium atau susunan spora menjadi pecah atau terputus sehingga penampakan di mikroskop dapat membingungkan. Dengan teknik ini, spora dan miselium tumbuh langsung pada slide sehingga dapat mengatasi masalah tersebut.

#### 1. Metode Heinrich's, cara kerja :

- Siapkan object glass, cover glass, tissue basah yang dimasukkan dalam cawan dan sterilkan dengan autoclave.
- Setelah selesai sterilisasi berikan lilin (parafin-petrolatum) steril pada sebelah kiri dan kanan tempat yang akan ditutup cover glass (aseptis).



- Tutup dengan cover glass.
- Teteskan suspensi spora jamur dalam media cair pada media cover glass yang tidak diberi lilin. Berikan sampai setengah luasan cover glass. Tekan cover glass secara merata.
- Inkubasi pada suhu kamar selama 3x24 jam.
- Ambil preparat dan amati di bawah mikroskop.

2. Metode Riddel, cara kerja :

- Persiapan sama seperti di atas
- Setelah semua steril, potong media Saboraud Dextrose Agar steril berbentuk kubus dan letakkan di atas object glass.
- Inokulasikan spora jamur pada bagian atau potongan agar.
- Tutup potongan agar dengan cover glass.
- Inkubasi pada suhu kamar selama 3x24 jam.
- Ambil preparat dan diamati di bawah mikroskop.

3. Prosedur yang lebih sederhana, cara kerja :

- Sterilkan cawan petri yang berisi kapas yang di atasnya terdapat object glass dan cover glass.
- Siapkan media PDA dan dijaga supaya tetap cair.
- Teteskan media PDA pada object glass secara aseptis lalu tunggu memadat (teteskan jangan terlalu banyak).
- Belah media yang memadat dengan jarum inokulum yang berujung L.
- Ulaskan spora jamur yang akan diamati pada belahan tersebut.
- Tutup dengan cover glass tepat di atas media dan tekan hingga merata.
- Inkubasi selama 2x24 jam.

Amati pertumbuhan miselium dan spora pada object glass dengan perbesaran sedang