

MODUL PRAKTIKUM

MIKROBIOLOGI



DISUSUN

Oleh:

SEPTIANI, S.Pt., M.PKim

**PROGRAM STUDI GIZI
FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS BINAWAN
JAKARTA
2019**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat tuhan yang maha kuasa, karena dengan rahmat dan hidayahnya kami dapat menyelesaikan penyusunan Modul Praktikum Mikrobiologi.

Praktikum Mikrobiologi merupakan pelengkap dari mata kuliah Mikrobiologi yang diberikan pada semester III oleh Program Studi Gizi Universitas Binawan. Penyusunan Modul Praktikum ini dimaksudkan untuk membantu mahasiswa agar lebih mudah mendalami praktikum, menambah kecakapan skill di laboratorium, dan menambahkan khasanah keilmuan.

Tersusun modul ini berkat masukan dari berbagai pihak untuk itu penyusun mengucapkan banyak terima kasih. Upaya secara terus menerus menyempurnakannya menjadi kewajiban penyusun oleh karena itu kritik dan sarannya sangat kami harapkan untuk perbaikan selanjutnya lebih baik.

Dengan segala kerendahan hati penyusun menyadari modul ini masih jauh dari semua pihak sempurna oleh karena itu butuh kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Semoga modul ini mampu menyumbang pemikiran untuk meningkatkan mutu pengajaran di Program Studi Gizi Universitas Binawan dan masyarakat akademis pada umumnya.

Jakarta, September 2019

Tim Penyusun



U N I V E R S I T A S
BINAWAN

SURAT TUGAS

034a/ST/UBINAWAN.FKM/IX/2019

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **dr. Agung Cahyono T., M.Si**
Jabatan : **Dekan FKM**

Memberikan tugas kepada :

Nama : **Septiani, S.Pt.,M.PKim**
Jabatan : **Dosen Prodi Gizi**

Maksud dan Tujuan : Membuat Modul Praktikum Mikrobiologi

Tanggal : 10 September 2019

Surat Tugas ini diberikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya dan agar menyampaikan laporan hasil kegiatan secara tertulis.

Demikian agar menjadi maklum dan diharapkan dukungan seperlunya bagi pihak terkait.

Jakarta, 09 September 2019
Universitas Binawan

dr. Agung Cahyono T., M.Si
Dekan FKM

KAMPUS BINAWAN

Jl. Dewi Sartika - Jl. Kalibata Raya Jakarta Timur 13630 INDONESIA
Telp. (62-21) 80880882, Fax (62-21) 80880883
Website : www.binawan.ac.id

TATA TERTIB PRAKTIKUM

A. Untuk menjaga keamanan

1. Praktikan harus telah mengenakan jas lab saat memasuki laboratorium dan bekerja dengan peralatan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi dan bahan kimia
2. Dilarang keras makan, merokok dan minum di laboratorium
3. Sebelum dan sesudah bekerja, meja praktikum dibersihkan dengan desinfektan
4. Praktikan berambut panjang harus mengikat rambutnya sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu kerja dan menghindari dari hal-hal yang tidak diinginkan
5. Pengambilan bahan kimia harus menggunakan sendok atau pipet atau mikropipet bila cair
6. Dilarang membuang biakan sisa atau habis pakai dan pewarna sisa disembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan
7. Laporkan segera jika terjadi kecelakaan seperti kebakaran, biakan tumpah, ada yang menelan bahan kimia, atau biakan kepada asisten/pembimbing praktikum
8. Jika menggunakan jarum inokulum, ujung jarum dibakar sampai memijar sesudah dan sebelum bekerja menggunakan alat ini (teknik aseptik)
9. Sebelum meninggalkan laboratorium disarankan untuk mencuci tangan dengan seksama.

B. Untuk kelancaran praktikum

1. Praktikan diwajibkan memakai jas laboratorium sebelum memasuki laboratorium dan dilepas di luar laboratorium
2. Praktikan wajib memakai sepatu pada saat praktikum.
3. Praktikan dilarang berbicara yang tidak perlu dan membuat gaduh
4. Memakai jas laboratorium pada saat praktikum
5. Kuis akan dilaksanakan pada awal acara sebelum memulai praktikum untuk mengetahui sejauh mana kompetensi yang dicapai
6. Toleransi keterlambatan bagi praktikan adalah 10 menit

7. Praktikan yang tidak hadir praktikum (absen), maka disarankan membuat surat izin, dengan surat dokter atau orangtua bila sakit dan diserahkan ke asisten/pembimbing praktikum
8. Praktikan yang tidak tidak hadir praktikum (absen) atau terlambat lebih dari 20 menit tidak diizinkan mengikuti praktikum
9. Laporan harus dibawa saat masuk praktikum sebagai syarat mengikuti praktikum
10. Praktikan yang tidak membawa laporan karena tertinggal, tetap diizinkan mengikuti praktikum tetapi laporan harus diserahkan satu hari setelah pelaksanaan praktikum dan nilainya akan berbeda bila mentaati tata tertib no 9.

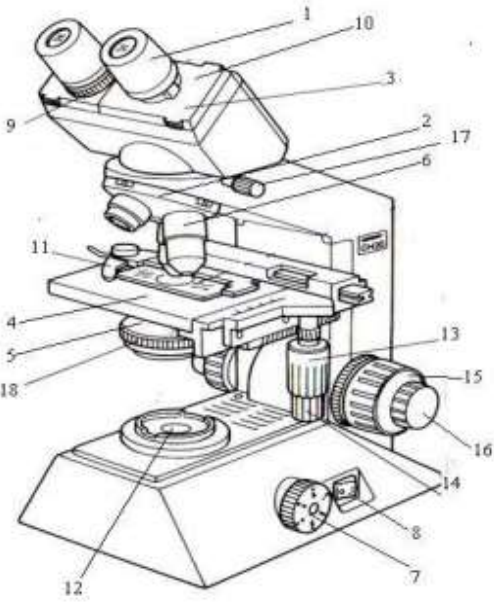
DAFTAR ISI

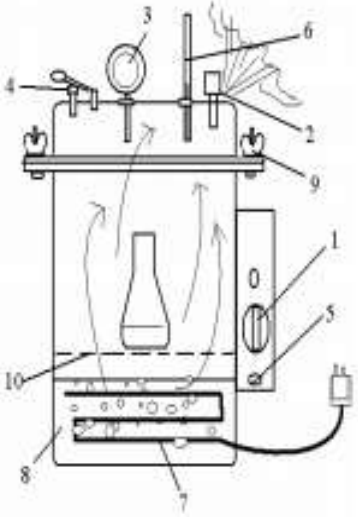
Halaman	
Kata Pengantar	i
Tata Tertib Praktikum	ii
Daftar Isi	iii
Materi I Pengenalan Alat	1
Materi II Sterilisasi Alat	12
Materi III Media Pertumbuhan Mikroba.....	14
Materi IV Isolasi Mikroba	17
Materi V Pemurnian dan Pengenalan Koloni.....	23

PERCOBAAN I PENGENALAN ALAT

1. **Tujuan Percobaan :** Mahasiswa mengenal dan mengetahui fungsi alat-alat yang umum digunakan pada praktikum mikrobiologi

2. **Pendahuluan :** Praktikum mikrobiologi merupakan praktikum yang berhubungan dengan mikroba sehingga memerlukan beberapa alat yang mendukung pelaksanaannya seperti autoclave, mikroskop, dll. Berikut beberapa alat-alat mikrobiologi yang perlu dikenal : mikroskop, autoclave, laminar air flow (LAF), cawan Petri, tabung reaksi, gelas Beaker, Erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, lampu Bunsen, batang L, jarum inokulum, pinset, skalpel, pH indikator universal


	<p>Keterangan :</p> <ol style="list-style-type: none">1. Lensa okuler, untuk memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif2. Revolving (pemutar lensa objektif), untuk memutar lensa objektif sehingga mengubah perbesaran3. Tabung pengamatan/tabung okuler4. Stage (meja benda), spesimen diletakkan di sini5. Condenser untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif6. Lensa objektif), untuk memperbesar spesimen7. Brightness adjustment knob (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu8. Tombol on-off9. Diopter adjustmet ring (cincin pengatur diopter) Untuk menyamakan focus antara mata kanan dan kiri10. Interpupillar distance adjustment knob (pengatur jarak interpupillar11. Specimen holder (penjepit
--	--

	<p>spesimen)</p> <p>12. Illuminator (sumber cahaya)</p> <p>13. Vertical feed knob (sekrup pengatur vertikal) Untuk menaikkan atau menurunkan object glass</p> <p>14. Horizontal feed knob (sekrup pengatur horizontal) Untuk menggeser ke kanan / kiri objek glas</p> <p>15. Coarse focus knob (sekrup fokus kasar) Menaik turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat</p> <p>16. Fine focus knob (sekrup fokus halus) Menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat</p> <p>17. Observation tube securing knob (sekrup pengencang tabung okuler)</p> <p>18. Condenser adjustment knob (sekrup pengatur kondenser) untuk menaik-turunkan kondenser</p>
 <p>The diagram shows a cross-section of an autoclave. At the top, there is a lid with several components: a timer knob (1), a steam release valve (2), a pressure gauge (3), a locking mechanism (4), a thermometer (6), and a heating plate (7). On the right side, there is an on-off switch (5). Inside the chamber, there is a water reservoir (8) with a water level indicator (10) and a glass flask (9) sitting on a tray. The bottom of the chamber contains a heating element.</p>	<p>Keterangan :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tombol pengatur waktu (timer) 2. Katup pengeluaran uap 3. Pengukur tekanan 4. Kelep pengaman 5. Tombol on-off 6. Termometer 7. Lempeng sumber panas 8. Aquades (H₂O) 9. Sekrup pengaman 10. 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 1,5 atm- 2 atm dengan suhu 121oC dan lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15-20 menit.

Cara Pemakaian : 1. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoclave, jika air dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas

tersebut. Gunakan air hasil destilasi/steril untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat. 2. Masukkan alat dan bahan. 3. Tutup dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoclave dan nyalakan. 4. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi seluruh bagian autoclave, klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15-20 menit dimulai sejak tekanan mencapai 1,5-2 atm dan nyalakan timer. 5. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada pressure gauge/penunjuk tekanan menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isinya dengan hati-hati.

	<p>Oven adalah alat untuk mensterilkan alat-alat dari kaca yang digunakan dalam mikrobiologi, menggunakan udara kering. Suhu 170-180oC dan lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 1,5-2 jam</p>
--	---

Cara Pemakaian : 1. Masukkan alat-alat yang telah siap ke dalam oven 2. Tutup oven dan tutup tombol pengatur tekanan dan nyalakan tombol 3. Atur suhu pada termometer dengan cara memutar pengatur suhu sesuai suhu oven 4. Hitung waktu sterilisasi selama 1,5-2 jam dan dimulai ketika suhu sudah mencapai 170-1800C 5. Matikan tombol setelah 1,5-2 jam, tunggu sampai suhu turun dan oven dingin selanjutnya alat-alat dapat dikeluarkan.

	<p>Alat untuk mengukur berat (terutama yang berukuran kecil) atau alat untuk menimbang suatu zat. alat ini biasanya diletakkan di laboratorium sebagai alat ukur dalam kegiatan penelitian. Alat penghitung satuan massa suatu benda dengan teknik digital dan tingkat ketelitian yang cukup tinggi. Prinsip kerjanya yaitu dengan penggunaan sumber tegangan listrik yaitu stavolt dan dilakukan peneraan terlebih dahulu sebelum digunakan kemudian bahan diletakkan pada neraca lalu dilihat angka yang tertera pada layar, angka itu merupakan berat dari bahan yang ditimbang</p>
---	--

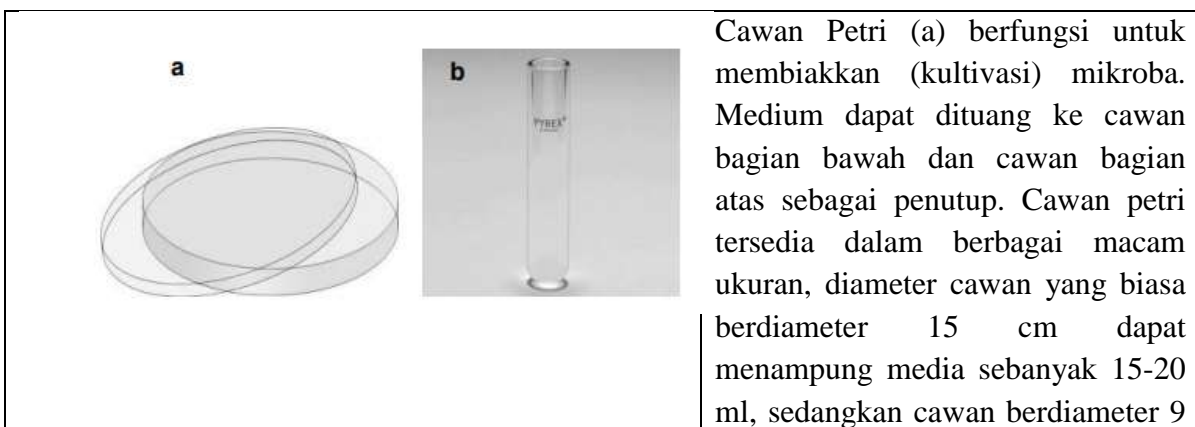
Manfaat neraca analitik Alat ini berfungsi untuk menimbang bahan yang akan digunakan pada pembuatan media untuk bakteri, jamur atau media tanam kultur jaringan dan mikrobiologi dalam praktikum dengan tingkat ketelitian yang tinggi. Komposisi

penyusun media yang tidak tepat akan berpengaruh terhadap konsentrasi zat dalam media sehingga dapat menyebabkan terjadinya kekeliruan dalam hasil praktikum.



Kekurangan neraca analitik Alat ini memiliki batas maksimal yaitu 1 mg, jika melewati batas tersebut maka ketelitian perhitungan akan berkurang, tidak dapat menggunakan sumber tegangan listrik yang besar, sehingga harus menggunakan stavolt. Jika tidak, maka benang di bawah pan akan putus, harga yang mahal. Kelebihan neraca analitik Memiliki tingkat ketelitian yang cukup tinggi dan dapat menimbang zat atau benda sampai batas 0,0001 g atau 0,1 mg, penggunaannya tidak begitu rumit jika dibandingkan dengan timbangan manual.




Cara Pemakaian : 1. Hidupkan lampu UV selama 2 jam, selanjutnya matikan segera sebelum mulai bekerja 2. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah 3. Nyalakan lampu neon dan blower, biarkan selama 5 menit. 4. Cuci tangan dan lengan dengan alkohol 70 %. 6. Usap permukaan LAF dengan alkohol 70 % atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap 7. masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (overload) karena memperbesar resiko kontaminan. 8. Atur alat dan bahan yang telah dimasukan sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril 9. Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tapi gunakan yang berbahan bakar gas. 10. Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja 11. Setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan keluar dari LAF.



	<p>cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.</p> <p>Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi (b) digunakan untuk uji-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.</p>
	<p>Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar Bunsen (a). Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk a b a b 14 sterilisasi jarum Ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Lampu Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas, alkohol, spiritus. pH Indikator Universal (b) berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH</p>

	<p>pada medium berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.</p>
	<p>Pinset (a) memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit, menjepit bahan yang akan diisolasi mikroba. Skalpel (b) berfungsi untuk mengiris, memotong, menyayat inang, bagian inang yang akan diisolasi mikroba.</p>
	<p>Batang L (a) bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut spreader. Jarum inokulum (b) berfungsi untuk memindahkan biakan yang akan ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nikrom 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 berbentuk 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)</p>

	<p>thumb knob searah jarum jam dan ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.</p>
	<p>Mortar dan penumbuk (pastle) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal : daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.</p>

PERCOBAAN II

METODE ASEPTIS DAN STERILISASI ALAT DAN BAHAN

I. TUJUAN PERCOBAAN

1. Mahasiswa memahami prinsip sterilisasi
2. Mahasiswa mampu mempersiapkan alat dan bahan yang akan disterilisasi dengan autoklaf
3. Mahasiswa mampu melakukan sterilisasi alat, media mikroorganisme, dan bahan yang digunakan dalam uji mikrobiologi dengan menggunakan autoklaf

II. DASAR TEORI

Kultur murni adalah kultur yang terdiri dari satu jenis spesies mikroba. Apabila kultur murni telah dimasuki jenis mikroba lain, kultur tersebut dikatakan telah terkontaminasi, atau disebut kultur campuran. Kemungkinan terjadinya kontaminasi ini perlu diperhatikan karena akan mempengaruhi hasil pengujian.

Metode yang digunakan untuk memelihara kultur murni atau bekerja dengan kultur murni disebut **metode aseptis** (Gunaserakan, 2005). Prosedur umum yang digunakan setiap bekerja dengan kultur murni adalah:

1. Medium pertumbuhan dan tempatnya harus steril.
2. Tempat pertumbuhan harus selalu ditutup untuk mencegah masuknya debu yang membawa mikroba.
3. Peralatan (ose dan pipet) dan larutan yang digunakan untuk pekerjaan harus steril.
4. Ose yang telah dipakai harus disterilkan terlebih dahulu.
5. Area tempat kerja juga harus tetap dijaga agar tidak terkontaminasi dengan kultur yang digunakan.

Sterilisasi adalah proses destruksi atau proses mematikan mikroorganisme yang mungkin ada pada suatu benda. Pemilihan teknik sterilisasi didasarkan pada bahan atau material yang akan digunakan dan jenis mikroba yang terlibat (Gunasekaran, 2005).

1. Sterilisasi Tanpa Panas

- a. **Filtrasi** : Ditujukan untuk bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik. Dikerjakan dalam suhu ruang menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22 mikron atau 0.45 mikron) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut.
- b. **Sterilisasi kimia**: Digunakan pada alat atau bahan yang tidak tahan panas atau untuk kondisi aseptis (sterilisasi meja kerja dan tangan). Bahan kimia yang dapat digunakan adalah Alkohol, asam parasetat, formaldehid dll.

2. Sterilisasi Dengan Panas

- a. **Api langsung (direct flame)** Cara yang paling sederhana untuk sterilisasi panas adalah dengan api langsung, yaitu dengan membakar obyek yang akan disterilkan

pada nyala api. Cara ini dapat mencegah adanya kontaminasi mikroba dari udara pada saat pemindahan kultur karena panas dan gas yang ditimbulkan oleh api Bunsen dapat membunuh mikroba pada permukaan alat sehingga tidak bisa masuk ke dalam alat dan mencegah kontaminasi. Nyala api dengan suhu tinggi ini akan membunuh seluruh mikroba yang ada pada obyek. Metode api langsung ini biasanya digunakan untuk sterilisasi ose, forceps, mulut tabung reaksi saat memindahkan kultur secara aseptis (Wheelis, 2008). Metode api langsung biasanya dikombinasikan dengan penggunaan cairan alkohol 70% sebagai larutan pembilas.

- b. Panas kering (oven udara kering).** Panas kering ini biasanya digunakan untuk sterilisasi pipet, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas piala dan instrumen kedokteran (untuk operasi). Suhu yang digunakan untuk sterilisasi panas kering adalah 160C selama 90 menit sampai 3 jam (Gunasekaran, 2005). Obyek yang akan disterilkan ditempatkan pada oven udara panas dan dibakar sampai seluruh mikroba terbunuh. Panas kering dapat membunuh mikroba karena terjadi oksidasi struktur sel dan makromolekul. Panas kering tidak dapat digunakan untuk sterilisasi cairan (seperti media cair) karena kebanyakan cairan akan mendidih pada suhu 100° C, dan selama mendidih temperaturnya tidak akan naik. Pendidihan belum tentu dapat mensterilkan obyek, karena beberapa spora bakteri tetap bertahan dengan pendidihan selama berjam-jam pada suhu 100°C.
- c. Uap Panas:** Konsep ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi. Penggunaan Uap Panas Bertekanan (Autoclaving) Alat yang digunakan adalah autoclave. Cara kerja alat ini adalah menggunakan uap panas dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Sterilisasi uap tergantung pada : (1) alat/bahan harus dapat ditembus uap panas secara merata tanpa mengalami kerusakan (2) Kondisi steril harus bebas udara (vacum) (3) Suhu yang terukur harus mencapai 121°C dan dipertahankan selama 15 menit. Bahan/alat yang tidak dapat disterilisasi dengan uap panas adalah serum, vitamin, antibiotik, dan enzim, pelarut organik, seperti fenol, buffer dengan kandungan detergen, seperti SDS. Erlenmeyer hanya boleh diisi media maksimum $\frac{3}{4}$ dari total volumenya.

III. ALAT DAN BAHAN

Alat : Botol semprot, autoklaf, bunsen, *glass ware*

Bahan : Alkohol 70%, spiritus, kapas, kertas payung, karet, plastik

IV. CARA KERJA

Cara kerja autoklaf digital

- a) Alat dicuci lalu dikeringkan
- b) Alat yang telah kering ditutup dengan menggunakan kapas (pipet serologis)
- c) Ditancapkan saklar pada listrik
- d) Bila air dalam autoklaf kurang, maka tambah dengan air sampai menutupi elemen pemanas
- e) Dimasukkan alat-alat yang akan disterilisasi dalam keranjang
- f) Ditutup dan dikunci secara diagonal
- g) Diatur suhu 121°C

- h)** Dinyalakan tombol ON
- i)** Diatur waktu 15 menit
- j)** Ditunggu hingga autoklaf berbunyi (0,1 Mpa) selama 15-20 menit
- k)** Dibuka klep uap perlahan-lahan
- l)** Ditunggu sampai tekanan 0 Mpa
- m)** Dibuka tutup
- n)** Dikeluarkan alat yang disterilisasi
- o)** Didinginkan
- p)** Diamati

PERCOBAAN III

PEMBUATAN MEDIA TUMBUH

I. TUJUAN PERCOBAAN

1. Mengetahui berbagai macam media pertumbuhan mikroorganisme dan fungsinya.
2. Mempelajari pembuatan media Nutrient Agar.

II. DASAR TEORI

Media tumbuh adalah suatu substrat yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah bakteri, dimana dalam proses pembuatannya harus disterilisasi dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media. Komposisi media tumbuh bervariasi tergantung pada jenis mikroorganisme yang akan ditumbuhkan, akan tetapi semua mikroorganisme mempunyai kebutuhan dasar yang sama dalam media tumbuhnya, yaitu air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh. Derajat keasaman (pH) media sangat menentukan pertumbuhan mikroorganisme, pada umumnya mikroorganisme hidup pada kisaran pH netral (7), tetapi mikroorganisme patogen biasanya hidup pada pH basa.

Media dapat diklasifikasikan berdasarkan atas susunan kimia, konsistensi, dan fungsinya. **Berdasarkan susunan kimianya**, media dibagi menjadi medium organik (tersusun atas bahan organik), medium anorganik (tersusun dari bahan anorganik), medium sintesis (media yang dibuat dari campuran bahan kimia dengan kemurnian tinggi dan jumlahnya diketahui dengan pasti), dan medium non sintetis (media yang susunan kimianya tidak dapat ditentukan dengan pasti). Sedangkan, media kultur **berdasarkan konsistensinya** dibedakan menjadi 3 macam, yaitu:

- a) **Media cair** (*liquid medium*) adalah media berbetuk cair yang digunakan untuk tujuan menumbuhkan atau membiakan mikroba, penelaah fermentasi, dan uji-uji lainnya.
Contohnya : Nutrient Broth (NB), lactose broth (LB), dan kaldu sapi.
- b) **Media semi padat** (*semi solid medium*) adalah media yang digunakan untuk uji mortalitas (pergerakan) mikroorganisme dan kemampuan fermentasi, contohnya : agar dengan konsentrasi rendah 0,5%
- c) **Media padat** (*solid medium*) adalah media yang berbetuk padat yang dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba dipermukaan sehingga membentuk koloni yang dapat dilihat, dihitung dan diisolasi.
Contohnya : Nutrient Agar (NA), Plate Count Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA), gelatin, dan silika gel.

Sedangkan klasifikasi media **berdasarkan komposisi atau susunan bahannya** adalah sebagai berikut:

- a) **Media sintesis** adalah media yang mempunyai kandungan dari isi bahan yang telah diketahui secara terperinci.
- b) **Media non-sintesis** adalah media yang mengandung bahan-bahan yang tidak diketahui secara pasti baik kadar maupun susunannya.
- c) **Media semi sintesis** misalnya cairan hanks yang ditambah serum .

Ditinjau dari fungsinya, media dibedakan menjadi enam, yaitu:

- a) **Medium diperkaya** (enriched medium), yakni medium yang ditambah zat-zat tertentu misalnya (serum, darah, ekstrak tumbuh-tumbuhan dan lain-lain), sehingga dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba heterotrof tertentu.
- b) **Medium selektif** (selective medium), yakni medium yang ditambah zat kimia tertentu yang bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroba lain, misalnya medium yang mengandung kristal violet pada kadar tertentu dapat mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif tanpa mempengaruhi bakteri Gram negatif.
- c) **Medium diferensial** (differential medium), yakni medium yang ditambah zat kimia tertentu yang menyebabkan suatu mikroba membentuk pertumbuhan atau mengadakan perubahan tertentu sehingga dapat dibedakan antara bakteri himolitik dan non himolitik.
- d) **Medium penguji**, yakni medium dengan susunan tertentu yang digunakan untuk pengujian vitamin, asam amino, antibiotik dan lain-lain.
- e) **Medium untuk perhitungan jumlah mikroba** adalah medium spesifik yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu bahan misalnya medium untuk menghitung jumlah bakteri Actinomycetes dan lain-lain.
- f) **Medium khusus** adalah medium untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan-perubahan kimia tertentu.

Mikroorganisme dapat tumbuh pada media berbentuk cair, setengah padat atau padat. Bahan padat media yang umum digunakan adalah agar-agar, gelatin, atau silika gel. Salah satu media yang termasuk kedalam media serbaguna adalah Nutrient Agar (NA). Rumus pembuatan media NA

$$\frac{28}{1000} \times \sum \text{Cawan yang Dipakai} \times 20 \text{ ml} = \dots \text{ gram NA}$$

III. ALAT DAN BAHAN

- Alat : Autoclave, Erlenmeyer, Hot Plate Stirer, Neraca Analitik
- Bahan : Nutrient Agar, Aquadest

IV. CARA KERJA

1. Timbang Nutrient Agar serbuk sebanyak 28 gram.

2. Siapkan 1 Liter Aquadest.
3. Campurkan Nutrient Agar dan Aquadest ke dalam Erlenmeyer.
4. Campuran tersebut dipanaskan di atas Hot Plate sampai mendidih, sambil diaduk.
5. Sterilkan media dengan Autoclave.

Komposisi dari 28 gram Nutrient Agar (NA) serbuk adalah : Agar 15 gram, Peptone 5 gram, NaCl 5 gram, Ekstrak Yeast 2 gram, Ekstrak Beef 1 gram, dan Aquadest 1 Liter.

PERCOBAAN IV TEKNIK ISOLASI DAN PERHITUNGAN KOLONI

I. TUJUAN PERCOBAAN

1. Memahami cara pemisahan jenis mikroba melalui berbagai teknik isolasi.
2. Dapat melakukan perhitungan koloni metode cawan.

II. DASAR TEORI

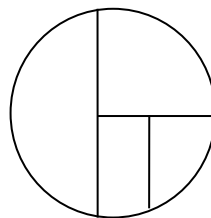
Kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan tetap hidup merupakan suatu hal yang penting untuk diketahui. Istilah pertumbuhan yang digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme biasanya mengacu pada perubahan didalam hasil panen (pertumbuhan massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari beberapa fase yaitu fase adaptasi, pertumbuhan awal, pertumbuhan logaritmik, pertumbuhan lambat, pertumbuhan tetap (stationer), menuju kematian, serta fase kematian. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan adalah nutrien, air, pH, suhu dan oksigen.

Isolasi bakteri adalah proses mengambil bakteri dari medium atau lingkungan asalnya dan menumbuhkannya di medium buatan sehingga diperoleh biakan yang murni (Singleton dan Sainsbury, 2006). Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lain yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroba. Tujuan dari isolasi adalah dapat mengidentifikasi jenis bakteri tertentu baik dari kelimpahan maupun morfologinya. Isolasi dapat dilakukan dengan tiga metode yaitu metode gores (streak plate), metode tuang (pour plate) dan metode permukaan (spread plate).

1. Metode gores (streak plate)

Prinsipnya yaitu dengan menggoreskan satu ose kultur pada media agar padat. Ada beberapa cara menggoreskannya:

- Goresan langsung
- Goresan kuadran
- Goresan radian



2. Metode tuang (pour plate)

Isolasi bakteri dengan penuangan bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri yang hidup dalam suatu cairan. Hasil perhitungan jumlah bakteri pada metode tuang dinyatakan dalam koloni. Prinsipnya bahan pangan yang diperkirakan mengandung mikroba dan telah diencerkan, kemudian dituang ke dalam cawan lalu dituangkan medium agar cair steril yang bersuhu 47-50°C dan dikocok membentuk angka 8 kemudian diinkubasi.

3. Metode permukaan (spread plate)

Prinsipnya adalah media (agar) steril dituangkan terlebih dahulu ke dalam cawan dan dibiarkan memadat. Kemudian sampel yang telah diencerkan dipipet ke permukaan tersebut dan digunakan alat spreader untuk meratakan, selanjutnya diinkubasi.

Metode cawan adalah metode yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni yang ditumbuhkan dalam media di cawan petri. Prinsip dari metode cawan ini adalah apabila terdapat sel mikroba yang masih hidup dan ditumbuhkan pada suatu medium agar, sel mikroba akan melakukan pertumbuhan dan perkembangbiakan serta membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan menggunakan mata telanjang tanpa menggunakan mikroskop (Suharni, 2006).

Suatu sampel yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba per ml, per g, atau per cm permukaan, memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah antara 30 – 300.

III. ALAT DAN BAHAN

Alat : ose (jarum loop), bunsen, cawan petri

Bahan : kultur murni, media NA

IV. CARA KERJA

A. Teknik Isolasi

1. Panaskan jarum loop di atas bunsen
2. Ambil 1 sel bakteri dengan jarum loop
3. Goreskan pada medium isolasi dengan metode zig-zag
4. Cawan petri yang sudah berisi media dan sampel dibungkus dengan koran dan diikat dengan tali
5. Inkubasi dalam incase selama 24 jam

B. Perhitungan koloni

1. Ambil cawan petri yang berisi medium dan sampel dari incase
2. Hitung koloni bakteri dengan *TPC*

PERCOBAAN IV

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI

I. TUJUAN PERCOBAAN

1. Melakukan pengecatan gram pada bakteri uji
2. Menentukan Gram positif atau negatif bakteri yang diuji

II. DASAR TEORI

Mikroorganisme sulit dilihat dengan mikroskop cahaya, karena tidak mengadsorpsi ataupun membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganismekarena zat warna mengadsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras mikroorganisme dengan lingkungannya ditingkatkan.

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial yang banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi guna pencirian dan identifikasi bakteri. Pewarnaan gram memilahkan bakteri menjadi kelompok Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu karena bakteri tersebut mengikat kompleks zat warna kristal ungu-iodium, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena mengikat zat warna sekunder yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan ini disebabkan perbedaan struktur dinding sel bakteri dan perbedaan kandungan asam ribonukleat antara bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Pewarnaan dengan zat warna yang mengandung yodium menyebabkan amilopektin berwarna biru atau keunguan, sedangkan glikogen berwarna merah kecoklatan atau merah keunguan. Dengan melakukan pewarnaan sangat memungkinkan kita untuk melihat bakteri dengan jelas, tetapi tidak dapat membedakan jenis-jenis bakteri yang berbeda dengan morfologi yang sama.

III. ALAT DAN BAHAN

Alat : Kaca preparat, kaca penutup, pipet tetes, ose, mikroskop, bunsen

Bahan : Kultur, reagensia-1, reagensia-2, reagensia-3 , aquades, spiritus, alkohol 70%

IV. CARA KERJA

1. Ambil bakteri yang telah diisolasi dengan menggunakan jarum loop
2. Gesekkan jarum loop yang berisi bakteri pada kaca obyek
3. Fiksasi kaca obyek tersebut di atas bunsen
4. Preparat yang telah difiksasi ditetesi dengan reagensia-1 dan didiamkan selama 1 menit
5. Bilas dengan aquades/ air kran yang mengalir dan tiriskan.
6. Tetesi dengan reagensia-2 didiamkan selama 1 menit
7. Bilas dengan aquades/ air kran yang mengalir dan tiriskan, kemudian cuci dengan menggunakan alkohol 70% sampai warna tidak luntur lagi

8. Bilas dengan aquades/ air kran yang mengalir dan tiriskan kembali, kemudian tetesi dengan reagensia-3 dan diamkan selama 1 menit
9. Bilas dengan aquades/ air kran yang mengalir dan tiriskan sampai kering, kemudian amati preparat di bawah mikroskop

V. HASIL

Gram positif berwarna biru

Gram negatif berwarna merah

DAFTAR PUSTAKA

Buckle, K., 2009. *Ilmu Pangan*. Jakarta : UI Press

Harley. 2007. *Pengertian Pewarnaan Gram*. Jakarta : Gramedia

Savada. 2008. *Bakteri*. Jakarta : Gramedia

Sumarsih, 2011. *Mikrobiologi Umum*. Jakarta : UI Press.