

PANDUAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DASAR



Disusun Oleh :

**Zahrotul Luklukyah
Nadira Putri Sermalia
Tholibah Mujtahidah**

**PROGRAM STUDI AKUAKULTUR
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS TIDAR
2019**

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat, karunia, taufiq, hidayah serta inayah-Nya sehingga buku panduan praktikum **Mikrobiologi Dasar** Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar dapat terlaksana. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah SAW. Buku panduan ini merupakan arahan untuk penyelenggaraan praktikum mata kuliah **Mikrobiologi Dasar** pada Program Studi Akuakultur. Praktikum mempunyai kedudukan yang sangat penting dalam rangka capaian pembelajaran pada Program Studi Akuakultur. Capaian pembelajarannya meliputi mahasiswa mampu mengaplikasikan, mengkaji, membuat desain dan memanfaatkan IPTEK serta menyelesaikan masalah.

Panduan praktikum mata kuliah **Mikrobiologi Dasar** ini berisi tentang dasar teori, tujuan praktikum, bahan dan alat – alat yang dibutuhkan dalam praktikum serta prosedur kerja dalam praktikum. Penyusunan buku panduan praktikum ini bertujuan untuk mempermudah mahasiswa dan digunakan untuk acuan dalam pelaksanaan praktikum. Penyusunan buku panduan praktikum ini belum sempurna, masih sangat banyak kekurangannya. Untuk itu, kami mohon masukan dari para pembaca agar panduan praktikum ini selanjutnya tersusun dengan lebih baik. Semoga buku panduan praktikum ini dapat membantu memperlancar kegiatan praktikum mahasiswa.

Magelang, Oktober 2019

Penyusun



TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Peserta praktikum (praktikan) Mikrobiologi Dasar adalah mereka yang telah terdaftar di Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar.
2. Praktikan harus bersikap baik dalam menjalankan praktikum:
 - a) Berpakaian rapi, bersepatu, tidak diperkenankan memakai sandal kecuali dengan alasan yang dapat diterima.
 - b) Keluar masuk ruangan harus berdasar izin dari asisten praktikum yang sedang bertugas.
 - c) Menjaga kebersihan ruang praktikum dengan tidak membuang sampah sembarangan
3. Praktikan diwajibkan memakai jas lab dengan memakai pakaian yang sopan (kemeja atau kaos berkerah) dan rapi selama praktikum berlangsung (dilarang makan, memakai sandal dan atau kaos oblong serta tidak boleh merokok).
4. Sebelum pelaksanaan praktikum, hendaknya praktikan telah memahami dan menguasai acara praktikum yang akan dilaksanakan (akan diadakan test, baik bersifat pengetahuan umum maupun yang berhubungan dengan acara praktikum, sebelum atau sesudah praktikum).
5. Praktikan hadir tepat waktu, keterlambatan lebih dari 15 menit tidak diijinkan mengikuti praktikum.
6. Praktikan diwajibkan menjaga ketertiban, kebersihan dan memelihara alat-alat dan bahan yang digunakan dalam praktikum. Bagi yang merusakkan atau menghilangkan alat-alat diwajibkan untuk mengganti sesuai dengan *spec* semula.
7. Praktikan menyediakan sendiri alat tulis.
8. Seluruh acara praktikum yang ada harus dilakukan dengan sungguh-sungguh.
9. Laporan praktikum dibuat dalam bentuk tulis tangan.
 - a) Laporan sementara
Laporan dibuat tulis tangan, dan **WAJIB** dikumpulkan setiap akan melaksanakan praktikum. Laporan sementara terdiri atas : (Pendahuluan, Tinjauan Pustaka dan Metodologi).
 - b) Laporan hasil
Laporan dibuat tulis tangan, dan **WAJIB** dikumpulkan paling lambat satu minggu setelah acara praktikum dilaksanakan. Laporan hasil terdiri atas : (Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan dan Daftar Pustaka). Bagi yang mengumpulkan laporan terlambat akan dikenakan sanksi berupa pengurangan nilai.
10. Penilaian oleh asisten dalam praktikum meliputi keterampilan, test atau kuis, keaktifan (diskusi dan keaktifan bertanya), laporan (laporan sementara dan laporan hasil) dan responsi.
11. Ujian praktikum (responsi) berupa ujian tertulis.

12. Keterlambatan mengikuti praktikum hanya diberi toleransi selama 15 menit. Bila hadir setelah praktikum berlangsung lebih dari 15 menit, tidak diperkenankan mengikuti praktikum.
13. Bila tidak dapat mengikuti praktikum, mahasiswa diwajibkan membuat surat ijin atau menyerahkan surat keterangan dokter bila mahasiswa tidak dapat mengikuti praktikum karena sakit.
14. Acara praktikum susulan (**inhal**) **PADA PRINSIPNYA TIDAK ADA**, namun dengan alasan khusus, pelaksanaannya dapat bertukar jadwal dengan praktikan lain. Praktikan yang bertukar jadwal **HARUS** menyertakan surat tukar jadwal.
15. Praktikan yang dua kali berturut-turut tidak mengikuti acara praktikum tanpa alasan tepat, dinyatakan hilang hak praktikumnya.
16. Hal-hal yang belum diatur dalam tata tertib ini akan ditentukan kemudian.

DAFTAR ISI

	Judul Praktikum	Hal
Asistensi		
Acara Praktikum I	Pengenalan Alat dan Bahan Mikrobiologi	8
Acara Praktikum II	Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media NA & PDA (Manual)	25
Acara Praktikum III	Isolasi, Inokulasi dan Pembuatan Media NA & PDA (Instan)	32
Acara Praktikum IV	Pengamatan dan Perhitungan Bakteri	41
Responsi		

DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar	Judul Gambar	Hal
Gambar 1	<i>Laminar Air Flow</i> (LAF)	8
Gambar 2	Cara bekerja menggunakan <i>Laminar Air Flow</i>	9
Gambar 3	Mikroskop	9
Gambar 4	Autoklaf	9
Gambar 5	Kompor listrik	10
Gambar 6	<i>Magnetic stirrer</i>	10
Gambar 7	Penggunaan <i>magnetic stirrer</i>	10
Gambar 8	Timbangan analitik	10
Gambar 9	Jarum ose	11
Gambar 10	Jarum ose <i>disposable</i>	11
Gambar 11	Cawan petri kaca dan <i>disposable</i>	11
Gambar 12	Vortex	11
Gambar 13	Rak tabung reaksi	12
Gambar 14	Tabung reaksi	12
Gambar 15	Tabung reaksi tutup ulir	12
Gambar 16	<i>Colony counter</i>	12
Gambar 17	Mikro pipet	13
Gambar 18	Pipet tetes	13
Gambar 19	Pipet seukuran	13
Gambar 20	Pipet berukuran atau volume	14
Gambar 21	Pipet <i>filler</i> atau <i>rubber bulb</i>	14
Gambar 22	Inkubator	14
Gambar 23	Mortar atau <i>pestle</i>	15
Gambar 24	Spatula	15
Gambar 25	Batang pengaduk	15
Gambar 26	Batang penyebar (<i>bacterial cell spreader</i>)	16
Gambar 27	Penggunaan batang penyebar	16
Gambar 28	Bunsen	16
Gambar 29	<i>Beaker glass</i>	17
Gambar 30	Gelas ukur	17
Gambar 31	Erlenmeyer	17
Gambar 32	Botol cuci	18
Gambar 33	Sentrifuge	18
Gambar 34	Kaca benda dan kaca penutup	19
Gambar 35	Indikator kertas pH universal	19
Gambar 36	Alumunium foil dan kapas	19
Gambar 37	Karet	20
Gambar 38	Kertas sampul coklat	20
Gambar 39	Alkohol 70%	20
Gambar 40	Spirtus	21
Gambar 41	Aquades	21
Gambar 42	Nutrien Agar (NA)	21
Gambar 43	Potato Dextrose Agar (PDA)	22

Nomor Gambar	Judul Gambar	Hal
Gambar 44	Arah putaran saat melakukan <i>swab</i> pada sampel	35
Gambar 45	Preparasi sampel daun dengan teknik <i>rinse</i>	35
Gambar 46	Preparasi sampel berupa padatan dengan mortar	36
Gambar 47	Pengenceran bertingkat	37
Gambar 48	Cara tebar atau sebar (<i>spread plate method</i>)	38
Gambar 49	Cara penuangan (<i>pour plate method</i>)	39
Gambar 50	<i>Streak plate</i> dengan metode goresan sinambung	39
Gambar 51	<i>Streak plate</i> dengan goresan T	40
Gambar 52	<i>Streak plate method</i> dengan goresan banyak sektor	40
Gambar 53	Contoh hasil isolasi dengan <i>streak plate method</i>	40



ACARA PRAKTIKUM I

PENGENALAN ALAT DAN BAHAN MIKROBIOLOGI

DASAR TEORI

Kajian bidang akuakultur memiliki berbagai aspek yang dapat dikaji. Salah satunya adalah dalam bidang mikrobiologi, dimana dalam proses melakukan pekerjaannya harus dilakukan secara aseptik. Bekerja secara aseptik adalah prinsip yang paling utama dalam aktivitas pengamatan yang berhubungan dengan mikrobial. Kesterilan ruangan, pengguna, alat, dan bahan-bahan mutlak dibutuhkan karena mikrobial tersebut berukuran sangat kecil, tidak kasat mata, mudah tersebar, dapat hidup dimana saja sehingga dibutuhkan suatu keadaan yang benar-benar steril. Hal tersebut dilakukan guna mengurangi terjadinya kontaminasi. Steril sendiri merupakan syarat mutlak keberhasilan kerja dalam laboratorium mikrobiologi. Teknik-teknik tertentu diperlukan agar sterilisasi dapat dilakukan secara sempurna, dalam arti tidak ada mikroorganisme lain yang mengkontaminasi media.

Sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada atau di dalam suatu benda. Sebagai contoh, hal-hal yang dilakukan ketika pertama kalinya melakukan pemindahan biakan bakteri secara aseptik, sesungguhnya hal tersebut telah menggunakan salah satu cara sterilisasi, yaitu dengan cara pembakaran (Hadioetomo, 1985). Artinya, pada bahan atau peralatan yang akan digunakan harus bebas dari mikroorganisme yang tidak diinginkan yang dapat merusak media atau koloni suatu mikroorganisme yang ditumbuhkan. Setelah mengetahui dan memahami pentingnya bekerja secara aseptik, perlu diketahui pula peralatan laboratorium dan bahan yang merupakan unsur penting yang harus ada dalam praktek mikrobiologi. Peralatan laboratorium dan bahan yang umum digunakan antara lain :

1) *Laminar air flow (LAF)*

Alat yang berfungsi sebagai ruangan untuk pengerjaan secara aseptik. Prinsip peng-aseptisan suatu ruangan berdasarkan aliran udara keluar dengan kontaminasi udara dapat diminimalkan.



Gambar 1. *Laminar Air Flow (LAF)*





Gambar 2. Cara bekerja menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF)

2) Mikroskop

Alat bantu yang digunakan untuk melihat benda-benda atau jasad renik yang tidak dapat terlihat secara kasat mata.



Gambar 3. Mikroskop

3) Autoklaf

Alat yang hampir mirip dengan panci atau dandang, alat ini berfungsi untuk sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan untuk pekerjaan mikrobiologi.



Gambar 4. Autoklaf

4) Kompor Listrik

Alat yang digunakan untuk memanaskan media atau bahan lain yang akan digunakan dalam praktek mikrobiologi.



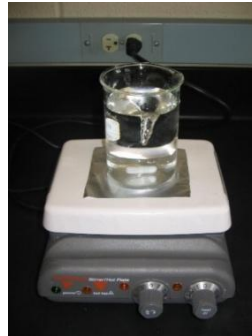
Gambar 5. Kompor listrik

5) *Magnetic Stirrer*

Alat yang berfungsi menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan.



Gambar 6. *Magnetic stirrer*



Gambar 7. Penggunaan *magnetic stirrer* dalam menghomogenkan larutan

6) Timbangan Analitik

Alat yang berfungsi untuk menimbang bahan yang akan digunakan dalam praktikum dengan tingkat ketelitian yang tinggi.



Gambar 8. Timbangan analitik

7) Jarum Ose

Alat yang digunakan untuk menginokulasi mikroba yang akan dipindahkan ke medium lain dan untuk mengambil media yang padat.



Gambar 9. Jarum ose



Gambar 10. Jarum ose disposable

8) Cawan Petri (*Petri Dish*)

Alat untuk meletakkan media tanam mikroba.



Gambar 11. Cawan petri kaca (kiri) dan cawan petri *disposable* (kanan)

9) Vortex

Alat yang berfungsi untuk menghomogenkan suspensi sampel.



Gambar 12. Vortex

10) Rak Tabung Reaksi

Alat yang berfungsi untuk meletakkan tabung reaksi.



Gambar 13. Rak tabung reaksi

11) Tabung Reaksi

Alat ntuk meletakkan sampel atau larutan.



Gambar 14. Tabung reaksi



Gambar 15. Tabung reaksi tutup ulir

12) *Colony Counter*

Alat yang berfungsi untuk menghitung jumlah koloni yang tumbuh dalam cawan petri.



Gambar 16. *Colony counter*

13) Mikro pipet

Alat yang berfungsi untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μ l.



Gambar 17. Mikro pipet

14) Pipet Tetes

Alat untuk mengambil larutan dalam ukuran yang sedikit (kurang teliti pengukurannya dalam bentuk tetes). Ukuran pipet tetes beragam, ada yang berukuran kecil dan pendek, ada pula yang berukuran besar dan panjang.



Gambar 18. Pipet tetes

15) Pipet Seukuran

Alat yang digunakan untuk mengambil cairan dalam jumlah tertentu secara tepat, bagian tengahnya menggelembung.



Gambar 19. Pipet seukuran

16) Pipet Berukuran atau Pipet Volume

Berupa pipa kurus dengan skala di sepanjang dindingnya. Berguna untuk mengukur dan memindahkan larutan dengan volume tertentu secara tepat.



Gambar 20. Pipet berukuran atau volume

17) Pipet Filler atau Rubber Bulb

Alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur.



Gambar 21. Pipet filler atau rubber bulb

18) Inkubator

Alat yang berfungsi untuk menumbuhkan mikroorganisme yang ingin ditumbuhkan (untuk menginkubasi).



Gambar 22. Inkubator

19) Mortar atau *Pestle*

Terbuat dari porselen, kaca atau batu granit yang dapat digunakan untuk menghancurkan dan mencampurkan padatan kimia.



Gambar 23. Mortar atau *pestle*

20) Spatula

Berupa sendok panjang dengan ujung atasnya datar, terbuat dari stainless steel atau aluminium. Fungsi dari spatula antara lain :

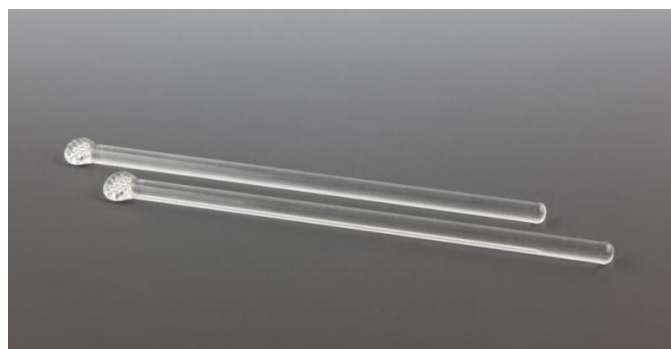
- a. Untuk mengambil bahan kimia yang berbentuk padatan
- b. Dipakai untuk mengaduk larutan



Gambar 24. Spatula

21) Batang Pengaduk

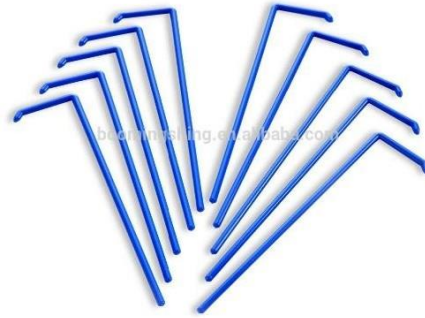
Terbuat dari kaca tahan panas, digunakan untuk mengaduk cairan di dalam gelas kimia.



Gambar 25. Batang pengaduk

22) Batang Penyebar (*Bacterial Cell Spreader*)

Alat yang digunakan untuk menyebarkan biakan bakteri yang terdapat pada wadah pembiakan .



Gambar 26. Batang penyebar (*bacterial cell spreader*)



Gambar 27. Penggunaan batang penyebar

23) Bunsen

Alat yang berfungsi untuk sterilisasi dengan pemanasan.



Gambar 28. Bunsen

24) *Beaker Glass*

Alat yang digunakan untuk meletakkan dan mengukur suatu larutan.



Gambar 29. *Beaker Glass*

25) Gelas Ukur

Sebagai alat ukur volume cairan yang tidak memerlukan ketelitian yang tinggi.



Gambar 30. Gelas ukur

26) Erlenmeyer

Alat yang digunakan untuk meletakkan larutan atau untuk meletakkan bahan yang akan dicampurkan dalam bentuk cair.



Gambar 31. Erlenmeyer

27) Botol Cuci

Berupa botol tinggi bertutup yang terbuat dari plastik. Berfungsi sebagai tempat menyimpan aquades. Cara menggunakannya dengan menekan badan botol sampai airnya keluar.



Gambar 32. Botol cuci

28) Sentrifuge (*Centrifuge*)

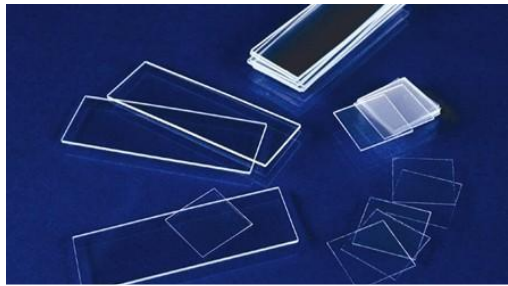
Berfungsi untuk mengendapkan dan memisahkan padatan dari larutan, Efektif dalam menghilangkan partikel tersuspensi yang terlalu kecil untuk disaring.



Gambar 33. Sentrifuse

29) Kaca Benda dan Kaca Penutup (*Object Glass* dan *Cover Glass*)

Kaca benda berguna untuk meletakkan objek pengamatan mikroskopik. Kaca penutup berguna untuk menutup objek pengamatan mikroskopis yang akan diamati.



Gambar 34. Kaca benda dan kaca penutup

30) Indikator Kertas pH Universal

Merupakan campuran dari bermacam-macam *indikator* yang dapat menunjukkan *pH* suatu larutan dari perubahan warnanya.



Gambar 35. Indikator kertas pH universal

Selain beberapa alat laboratorium di atas, diperlukan juga pengetahuan mengenai bahan-bahan yang biasanya digunakan dalam kerja mikrobiologi, antara lain :

1) Alumunium Foildan Kapas

Untuk menutup bagian mulut alat-alat yang berupa kaca, untuk membungkus sampel bahan. Biasanya untuk alat seperti tabung reaksi (yang berisi cairan atau media), ditambahkan kapas terlebih dahulu sebelum dilakukan sterilisasi.



Gambar 36. Alumunium foil dan kapas

2) Karet

Untuk mengikat erat tutup gelas kaca agar tidak terkontaminasi. Bisa juga digunakan untuk mengikat aluminium foil pada alat yang akan disterilisasi.



Gambar 37. Karet

3) Kertas Sampul Coklat

Untuk membungkus cawan petri, pipet atau alat lain yang akan disterilisasi.



Gambar 38. Kertas sampul coklat

4) Alkohol 70%

Untuk sterilisasi dan kerja aseptis.



Gambar 39. Alkohol 70%

5) Spirtus

Untuk pengisi api bunsen.



Gambar 40. Spirtus

- 6) Aquades
Untuk pelarut media dan alkohol.



Gambar 41. Aquades

- 7) Nutrient Agar (NA)
Media yang digunakan untuk media pertumbuhan bakteri.



Gambar 42. Nutrient Agar (NA)

- 8) Potato Dextrose Agar (PDA)
Media yang digunakan untuk media pertumbuhan jamur.



Gambar 43. Potato Dextrose Agar (PDA)

TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilaksanakan praktikum pengenalan alat dan bahan mikrobiologi antara lain :

- 1) Mengenal dan mengetahui macam-macam alat dan bahan dalam pemeriksaan mikrobiologi,
- 2) Mengetahui cara menggunakan alat-alat laboratorium dalam pemeriksaan mikrobiologi,
- 3) Mempelajari cara menyiapkan alat dan bahan dalam pemeriksaan mikrobiologi,
- 4) Mengetahui metode aseptis yang harus dilakukan saat melakukan pemeriksaan mikrobiologi, dan
- 5) Memiliki keterampilan dasar bekerja secara aseptis.

ALAT DAN BAHAN

Alat

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 1) Mikroskop + <i>object & cover glass</i> | 14) Pipet seukuran |
| 2) Autoklaf | 15) Pipet beukuran / pipet volume |
| 3) Kompor listrik | 16) Pipet filler / <i>rubber bulb</i> |
| 4) Magnetic stirrer | 17) Inkubator |
| 5) Timbangan analitik | 18) Mortar / <i>pestle</i> |
| 6) Jarum ose | 19) Spatula & batang pengaduk |
| 7) Cawan petri | 20) Indikator kertas pH |
| 8) Vortex | 21) Batang penyebar |
| 9) Rak tabung reaksi | 22) Bunsen |
| 10) Tabung reaksi | 23) <i>Beaker glass</i> |
| 11) <i>Colony counter</i> | 24) Gelas ukur |
| 12) Mikro pipet | 25) Erlenmeyer |
| 13) Pipet tetes | 26) Botol cuci |

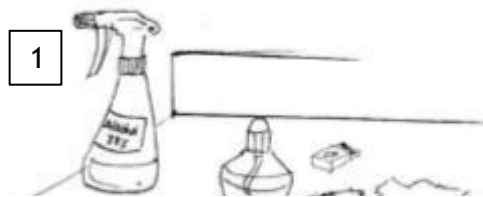
Bahan

- 1) Aluminium foil
- 2) Karet dan kertas sampul coklat
- 3) Alkohol 70% , spirtus
- 4) Aquades
- 5) Nutrient Agar (NA)
- 6) Potato Dextrose Agar (PDA)

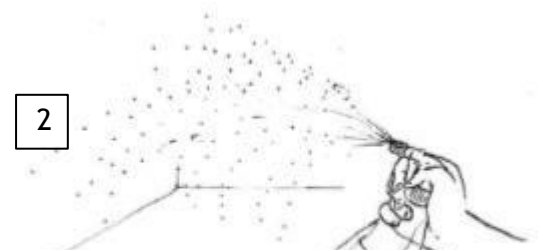
PROSEDUR PRAKTIKUM

1) Bekerja dengan Teknik Aseptis

- a. Rapihkan meja dari alat-alat dan bahan yang masih ada di atasnya,
- b. Lakukan penyemprotan sekitar meja kerja dengan alkohol 70% beberapa kali sampai merata,
- c. Semprotkan meja dan tangan dengan alkohol 70% (semprotkan ke tangan dan usapkan ke seluruh permukaan tangan),
- d. Gunakan sarung tangan (*gloves*) (jika tangan sudah kering dari alkohol),
- e. Letakkan alat dan bahan yang diperlukan di atas meja yang sudah disterilkan,
- f. Semprotkan semua permukaan alat dengan alkohol 70%,
- g. Letakkan pembakar bunsen, nyalakan dan tunggu beberapa saat,
- h. Apabila tidak menggunakan *gloves*, sebelum memulai melakukan pekerjaan, semprotkan kembali alkohol 70% ke tangan dan usapkan ke seluruh permukaan tangan, dan
- i. Mulailah melakukan pekerjaan.



1 Rapihkan meja kerja dari alat-alat yang ada di atasnya.



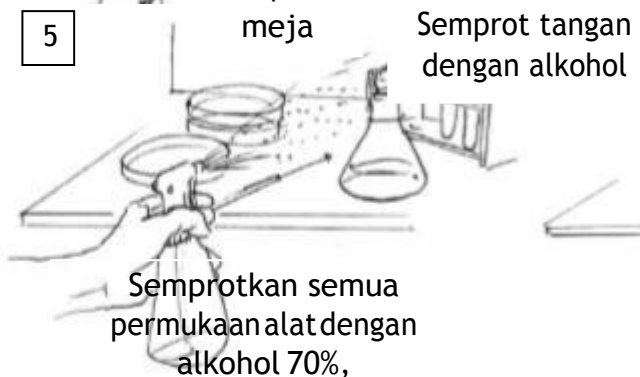
2 Lakukan penyemprotan sekitar meja kerja dengan alkohol 70%



3 Semprot meja
Semprot tangan dengan alkohol



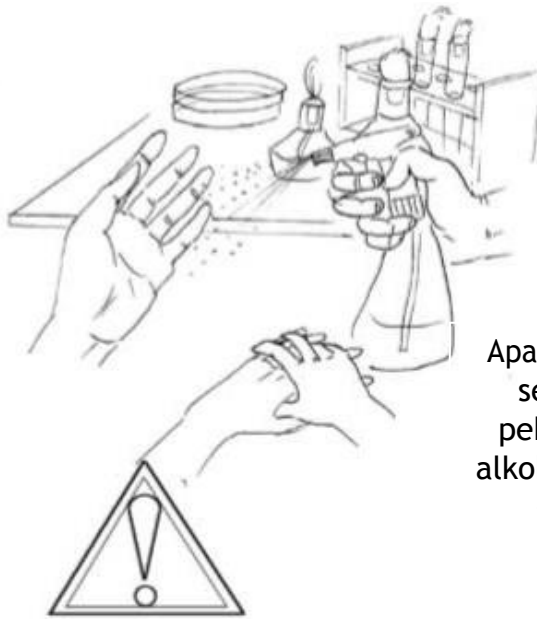
4 Letakkan alat dan bahan yang diperlukan di atas meja



5 Semprotkan semua permukaan alat dengan alkohol 70%,



6 Letakkan pembakar Bunsen, nyalakan, dan diamkan beberapa saat.



Apabila tidak menggunakan *gloves*, sebelum memulai melakukan pekerjaan, semprotkan kembali alkohol 70% ketangan dan usapkan ke seluruh permukaan tangan

Hati-hati menggunakan alkohol, karena alkohol mudah terbakar !!

2) Pengenalan Alat dan Bahan

- a. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan,
- b. Letakkan alat dan bahan di atas meja kerja yang sudah dibersihkan,
- c. Perhatikan dan catat penjelasan asisten,
- d. Gambar atau foto alat dan bahan (kemudian cantumkan di laporan hasil)

ACARA PRAKTIKUM II

STERILISASI ALAT DAN PEMBUATAN MEDIA NA & PDA (MANUAL)

DASAR TEORI

1. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu cara atau teknik yang dilakukan untuk mendapatkan suatu kondisi bebas mikroorganisme atau setiap proses yang dilakukan baik secara fisika, kimia, dan mekanik untuk membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Dalam bidang mikrobiologi, baik dalam pengerjaan penelitian atau praktikum, keadaan steril merupakan syarat utama berhasil atau tidaknya pekerjaan dilaboratorium. Berdasarkan hal tersebut, maka setiap proses (baik fisika, kimia maupun mekanik) yang membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme disebut dengan sterilisasi. Adanya pertumbuhan mikroorganisme menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri masih berlangsung dan tidak sempurnanya proses sterilisasi, artinya sudah terjadi kontaminasi di dalamnya dan pengujian atau pekerjaan yang dilakukan tidak *valid*. Jika sterilisasi berlangsung sempurna, maka spora bakteri yang merupakan bentuk paling resisten dari kehidupan mikroorganisme.

Metode utama yang dilakukan dalam praktek sterilisasi yaitu terdiri atas metode fisik dan metode kimia (Madigan *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 2002; Volk dan Wheeler, 1988; Williamson, 1973), antara lain :

1) Metode fisik

Misalnya metode sterilisasi dengan panas, meliputi penggunaan panas lembab (menggunakan autoklaf atau uap bertekanan dan uap langsung), dan penggunaan panas kering (menggunakan oven atau udara panas dan pembakaran). Secara umum, panas merupakan metode sterilisasi yang paling praktis dan efisien. Jumlah panas yang diperlukan untuk mematikan berbeda dari satu organisme ke organisme lain. Oleh karena itu, hal yang perlu diperhatikan adalah banyaknya panas atau suhu yang harus dipergunakan dan lamanya waktu yang diperlukan. Kesulitan yang dihadapi dalam sterilisasi panas antara lain adalah adanya endospora bakteri yang merupakan bentuk kehidupan paling resisten.

a. Sterilisasi panas lembab

Sterilisasi panas lembab sangat efektif meskipun pada suhu yang tidak begitu tinggi, karena uap air berkondensasi pada bahan-bahan yang disterilkan, dilepaskan panas sebanyak 636 kalori per gram uap air pada suhu 121°C. Panas ini mendenaturasikan atau mengkoagulasikan protein pada organisme hidup dan dengan demikian memamatkannya. Sterilisasi panas lembab dapat dilakukan

dengan penggunaan autoklaf (uap bertekanan) dan penggunaan uap langsung (tindalisasi atau sterilisasi fraksi).

b. Sterilisasi panas kering

Sterilisasi panas kering kurang efisien dan membutuhkan suhu lebih tinggi serta waktu yang lebih lama untuk sterilisasi. Hal ini disebabkan karena tanpa kelembaban tidak ada panas laten (panas yang diperlukan untuk merubah fasa atau wujud benda, tetapi temperaturnya tetap). Sterilisasi panas kering dapat dilakukan dengan menggunakan oven (udara panas) dan pembakaran.

2) Metode kimia

Sterilisasi dengan menggunakan metode kimia dilakukan dengan menggunakan agen-agen kimia. Untuk beberapa sterilisasi benda atau alat, banyak digunakan pula desinfektan. Sterilisasi kimia ini dapat lebih selektif dibandingkan dengan metode fisik, sehingga dikenal berbagai substansi kimia yang bertindak sebagai bakterisida, sporosida, virisida dan fungisida. Formaldehida dan metil bromide merupakan contoh agen-agen kimia yang cukup banyak digunakan untuk aplikasi sterilisasi dengan metode kimia. Formaldehida merupakan agen kimia berupa cairan yang larut air tak berwarna, membuat pedih atau iritasi terhadap mata dan membrane mucous, digunakan terutama untuk pengendalian fungi. Metil bromide merupakan agen kimia berupa gas (fumigasi), bersifat letal terhadap manusia dan hewan tetapi tidak berbahaya untuk tanaman, digunakan untuk pengendalian nematode, fungi, insekta, dan juga benih rumput-rumputan.

2. Media

Semua makhluk hidup memerlukan bahan makanan untuk keperluan hidupnya. Bahan makanan ini diperlukan untuk sintesis bahan sel dan untuk mendapatkan energi. Demikian pula dengan mikroorganisme, untuk kehidupannya membutuhkan bahan-bahan organik dan anorganik dari lingkungannya. Bahan-bahan tersebut disebut dengan nutrient (zat gizi), sedangkan proses penyerapannya disebut proses nutrisi. Peran utama nutrient untuk mikroorganisme adalah sebagai sumber energi, bahan pembangun sel dan sebagai aseptor elektron dalam reaksi bioenerjik (reaksi yang menghasilkan energi). Oleh karenanya, bahan makanan yang diperlukan terdiri dari air, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron, sumber mineral, faktor pertumbuhan dan nitrogen.

Mikroorganisme dapat ditumbuhkan dan dikembangkan pada suatu substrat yang disebut medium (jamak : media) . Dengan adanya medium pertumbuhan, aktivitas mikrobial dapat dipelajari dan dengan medium tumbuh dapat dilakukan isolasi mikrobial dengan kultur murni, perbanyakan,

pengujian sifat fisiologis, dan perhitungan jumlah mikrobial. Keragaman yang luas dalam tipe nutrient untuk mikrobial yaitu diimbangi dengan oleh tersedianya berbagai media yang banyak macamnya untuk kultivasinya. Media yang biasa digunakan yaitu seperti pepton, ekstrak daging, ekstrak khamir dan agar. Bahan yang paling umum digunakan untuk membuat medium menjadi padat dapat dipakai agar (Sutedjo, 1991).

Media adalah substansi dengan kadar tertentu dalam bentuk cair, setengah padat atau padat yang mengandung bahan alami dan atau buatan untuk mendukung perkembangbiakan mikroorganisme (Andrews *et al*, 2004). Media yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroorganisme harus sesuai susunannya dengan kebutuhan mikroorganisme yang bersangkutan. Pada media itulah mikroorganisme akan melakukan aktivitas pertumbuhannya. Untuk pertumbuhan mikroorganisme, diperlukan campuran beberapa bahan yang mengandung nutrien. Nutrien tersebut dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikrobial. Nutrien tersebut berupa molekul carbon (C), hydrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N) dan beberapa mineral serta vitamin untuk pertumbuhan, reproduksi dan memproduksi hasil metabolisme.

Berdasarkan komposisi kimianya, media dapat dibedakan menjadi media sintetik yaitu media yang susunan kimianya diketahui dengan pasti, medium ini biasanya digunakan untuk mempelajari kebutuhan makanan mikroba. Media non sintetik (kompleks) yaitu media yang susunan kimianya tidak dapat diketahui dengan pasti, media ini digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari taksonomi mikroba. Berdasarkan konsistensinya media dapat dibedakan menjadi : media cair, media padat, dan media padat yang dapat dicairkan (Lay, 1994; Jutono dkk, 1980; Jawetz dkk, 1996). Pembuatan media memerlukan bahan-bahan yang dapat disediakan dari bahan alami atau yang sudah dibuat secara teknis. Pada dasarnya, bahan-bahan untuk pembuatan media dikelompokkan menjadi 3 macam, yaitu bahan dasar (air dan agar atau bahan sejenisnya), unsur-unsur makanan (sumber karbon, sumber nitrogen, garam/mineral serta vitamin) dan bahan tambahan (indikator serta antibiotik). Macam-macam media pertumbuh mikroorganisme antara lain :

1) Media berdasarkan berdasarkan konsistensi atau kepadatannya :

a. Medium cair (*broth / liquid medium*)

Yaitu medium yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (*Nutrient Broth*), LB (*Lactose Broth*). Medium cair akan memberi kesempatan kepada bakteri untuk menyebar dan tercampur dengan seluruh nutrient, sehingga lebih cocok untuk mengoptimalkan pertumbuhan mikroba. Medium cair dapat juga digunakan untuk mengetahui karakter suatu mikroba berdasarkan kebutuhan oksigen.

- b. Medium setengah padat (*semi solid medium*)
Yaitu medium yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat dan tidak begitu cair. Medium *semi solid* dibuat dengan tujuan agar mikroba dapat menyebar ke seluruh media namun tidak mengalami pencampuran sempurna jika dilakukan agitasi atau penggoyangan.
 - c. Medium padat (*solid medium*)
Medium *semi solid* dan *solid* menggunakan bahan pematat (seperti amilum, gelatin, selulosa dan agar-agar). Untuk medium padat / *solid*, dapat menggunakan agar-agar dengan kadar 1,5 % - 1,8 % (15 g agar / 1 liter aquades). Fungsi medium padat untuk memudahkan penghitungan koloni mikroba.
- 2) Media berdasarkan berdasarkan komposisi bahannya :
- a. Media sintetik / media terdefinisi (*synthetic media / defined media*)
Adalah media yang seluruh komposisinya diketahui, contohnya adalah media yang telah diproduksi oleh pabrik yang telah memiliki komposisi media yang telah rinci dan jelas. Media sintetik digunakan dalam penelitian mengenai uji metabolisme suatu mikroorganisme. Banyak jenis mikroorganisme kemoorganotrof heterotrof dapat tumbuh pada media sintetik dengan glukosa sebagai sumber karbon dan *ammonium salt* sebagai sumber nitrogen (Prescott ,2002).
 - b. Media kompleks (*complex media*)
Adalah media yang sebagian komposisinya tidak diketahui dengan pasti, contohnya adalah media yang telah dibuat secara mandiri dengan bahan-bahan tertentu namun pembuat tidak mengetahui pasti komposisi dari bahan-bahan tersebut secara pasti dan rinci. Media ini dapat mengandung bahan yang tidak diketahui pasti komposisinya seperti *peptone*, *meat extract* dan *yeast extract*. Contoh media kompleks, adalah *nutrient broth*, *tryptic soy broth* dan MacConkey agar (Prescott, 2002).
- 3) Media berdasarkan berdasarkan tujuannya :
- a. Media isolasi
Adalah media umum yang digunakan untuk mengisolasi suatu mikroba menjadi kultur murni. Media isolasi biasanya mengandung semua kebutuhan mikroba untuk tumbuh dan tergantung tujuan isolasinya, misalnya Blood agar atau Chocolate agar, NA, NB, PDA, TEA, PCA (Barrow and Feltham, 1993).
 - b. Media selektif (*selective or inhibitory media*)
Berfungsi untuk menumbuhkan mikroba target atau yang diinginkan dan menekan pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (*background flora*). Umumnya media selektif menseleksi mikroba target berdasarkan kelompok, genus atau spesiesnya, misalnya EMBA untuk seleksi E.

coli, Baird parker untuk isolasi *S. aureus*; MRS untuk bakteri asam laktat (Barrow and Feltham, 1993).

c. Media pengaya (*enrichment media*)

Media pengaya termasuk media selektif namun lebih berfungsi untuk memperbanyak mikroba target sehingga saat dilakukan pengkulturan, mikroba yang tidak diinginkan tidak dalam jumlah besar. Media pengaya harus dalam bentuk cair dan digunakan di awal tahap analisa. Misalnya untuk memisahkan bakteri penyakit tifus (*Salmonella typhi*) dari bahan tinja atau kotoran manusia .salah satu contoh media pengkaya adalah media *baird parker water* (BPW) (Barrow and Feltham, 1993).

d. Media peremajaan kultur (*maintenance of cultures media*)

Media peremajaan kultur mengandung nutrisi sehingga mempercepat pertumbuhan, misalnya Nutrient Agar (NA) (Barrow and Feltham, 1993).

TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilaksanakan praktikumpembuatan media, sterilisasi serta isolasi dan inokulasi antara lain :

- 1) Mengenal berbagai jenis media pertumbuhan mikroba,
- 2) Mempelajari cara-cara pembuatan media pertumbuhan mikroba,
- 3) Mengenal berbagai fungsi media pertumbuhan mikroba,
- 4) Mengetahui dan mempelajari acam-macam teknik sterilisasi dalam kerja mikrobiologi,

ALAT DAN BAHAN

Alat

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1) Autoklaf | 13) Timbangan analitik |
| 2) Pembakar bunsen | 14) Kompor listrik / penangas air |
| 3) Tabung reaksi dan rak tabung | 15) <i>Magnetic stirrer</i> |
| 4) Cawan petri | 16) Karet gelang |
| 5) <i>Colony counter</i> | 17) Alumunium foil |
| 6) <i>Beaker glass</i> | 18) Kapas |
| 7) Batang pengaduk | 19) Gelas ukur |
| 8) Erlenmeyer | 20) Kertas pembungkus |
| 9) Pipet berukuran / volume | 21) Jarum ose |
| 10) <i>Filler (Ruber bulb)</i> | 22) Batang penyebar |
| 11) Kertas pH universal | 23) Botol kaca |
| 12) Mortar atau <i>pestle</i> | 24) Vortex |

Bahan

- 1) Medium Nutrient Agar (NA)
Beef extract 3 g, *peptone* 5 g, agar-agar 15 g, aquades 1000 ml, pH 7,2.
- 2) Medium Potato Dextrose Agar (PDA)
Kentang 200 g, *dextrose* 20 g, agar-agar 15 g dan aquades 1000 ml.

PROSEDUR PRAKTIKUM

1) Persiapan melakukan sterilisasi alat

1. Siapkan semua alat yang akan digunakan pada saat kerja.
2. Bungkuslah semua alat (yang terbuat dari gelas kaca dan yang tahan terhadap pemanasan) menggunakan kertas sampul coklat , beberapa alat menggunakan aluminium foil dan kemudian ikat kencang menggunakan karet.
3. Masukkan semua alat yang sudah terbungkus rapat ke dalam autoklaf.
4. Nyalakan autoklaf dan lakukan proses sterilisasi (dengan suhu 121°C , tekanan 2 atm , selama 15 menit).
5. Setelah selesai proses sterilisasi, keluarkan semua alat dan letakkan di tempat yang bersih (ingat , keluarkan alat apabila suhu di autoklaf sudah menunjukkan angka nol 0).
6. Jangan membuka pembungkus jika alat tersebut belum akan digunakan (bungkus dibuka hanya apabila alat tersebut akan digunakan. Hal ini dilakukan sebagai upaya untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terhadap alat-alat yang sudah steril).

2) Pembuatan Media

1. Medium Nutrient Agar (NA)
 - a. Timbanglah semua bahan, masukkan ke dalam erlenmeyer atau *beaker glass* atau wadah lain, tambahkan aquades dan aduk dengan pengaduk gelas sampai larut.
 - b. Panaskan larutan media tersebut dalam penangas air sampai homogeny (ditandai dengan tidak ada gumpalan media seikitpun) sambil sering diaduk-aduk sampai semua agar-agar larut (perhatikan dengan baik, jangan sampai tumpah karena suhu terlalu panas).
 - c. Masukkan media yang sudah larut dan homogen tersebut ke dalam botol kaca , kemudian tutup rapat. Jika tidak menggunakan botol kaca, bisa menggunakan erlenmeyer. Kemudian tutuplah erlenmeyer tersebut menggunakan kapas, kemudian dilapisi aluminium foil dan ikatlah kencang menggunakan karet.
 - d. Berikan label pada botol kaca atau erlenmeyer yang sudah berisi media.

- e. Sterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121° C selama 15 menit. Jika tidak ada autoklaf, dapat diganti dengan *pressure cooker* (panci presto).
 - f. Bila waktu sterilisasi sudah selesai dan suhu pada autoklaf sudah menunjukkan angka nol (0), keluarkan media dan letakkan di tempat yang bersih.
 - g. Perhatikan media jangan sampai menjendal.
 - h. Media sudah dapat digunakan (suhu jangan terlalu panas dan jangan terlalu rendah, suhu optimal pada saat akan digunakan antara 45-50°C).
2. Medium Potato Dextrose Agar (PDA)
- a. Buang kulit kentang, cuci, lalu potong-potong kecil. Rebus dengan 1000 ml aquades sampai kentang matang, tetapi jangan terlalu lama memasaknya.
 - b. Saring air rebusan kentang menggunakan kain saring atau penyaring teh/santan, dan tambahkan aquades sampai 1000 ml.
 - c. Tambahkan 20 g *dextrose* dan 15 g agar-agar, aduk hingga homogen, masukkan ke dalam penangas air mendidih, ditutup, sambil sering diaduk-aduk selama 30 menit sampai semua agar-agar larut.
 - d. Masukkan media yang sudah larut dan homogen tersebut ke dalam botol kaca, kemudian tutup rapat. Jika tidak menggunakan botol kaca, bisa menggunakan erlenmeyer. Kemudian tutuplah erlenmeyer tersebut menggunakan kapas, kemudian dilapisi aluminium foil dan ikatlah kencang menggunakan karet.
 - e. Berikan label pada botol kaca atau erlenmeyer yang sudah berisi media.
 - f. Sterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Jika tidak ada autoklaf, dapat diganti dengan *pressure cooker* (panci presto).
 - g. Bila waktu sterilisasi sudah selesai dan suhu pada autoklaf sudah menunjukkan angka nol (0), keluarkan media dan letakkan di tempat yang bersih.
 - h. Perhatikan media jangan sampai menjendal.
 - i. Media sudah dapat digunakan (suhu jangan terlalu panas dan jangan terlalu rendah, suhu optimal pada saat akan digunakan antara 45-50°C).

ACARA PRAKTIKUM III

ISOLASI, INOKULASI DAN PEMBUATAN MEDIA NA & PDA (INSTAN)

DASAR TEORI

Isolasi dan Inokulasi

Isolasi atau tindakan mengisolasi suatu mikroba ialah memisahkan mikroba tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Untuk isolasi harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroba pada medium biakan serta syarat-syarat lain untuk pertumbuhannya (Jutono dkk, 1980). Selain istilah isolasi, kita mengenal pula istilah inokulasi. Inokulasi berbeda dengan isolasi, jika isolasi merupakan upaya memisahkan mikroba, sedangkan inokulasi merupakan pekerjaan memindahkan mikroba dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Dengan kata lain, inokulasi adalah suatu upaya untuk menanamkan mikroba. Jadi antara isolasi dengan inokulasi memiliki arti yang berbeda.

Sebelum melakukan kegiatan isolasi dan inokulasi, biasanya dilakukan terlebih dahulu kegiatan pembuatan pengenceran bertingkat. Menurut (Wasteson and Hornes, 2009) tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Sehingga memudahkan dalam proses penghitungan jumlah mikrobia. 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.

Mikroba jarang terdapat di alam dalam keadaan murni. Kebanyakan merupakan campuran bermacam-macam spesies mikroba. Macam-macam cara isolasi dan inokulasi mikrobia adalah antara lain :

1) Cara tebar atau sebar (*spread plate method*)

Teknik *spread plate* merupakan teknik dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikrobia yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung (Jutono dkk, 1980).

2) Cara penuangan (*pour plate method*)

Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahayang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan

terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980).

3) Cara gores (*streak plate method*)

Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980). Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994).

TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilaksanakan praktikum isolasi dan inokulasi antara lain :

- 1) Mengetahui dan mempelajari cara pembuatan pengenceran bertingkat dalam kerja mikrobiologi,
- 2) Mengetahui dan mempelajari teknik isolasi dan inokulasi mikroba, dan
- 3) Melihat sifat pertumbuhan dan berbagai bentuk koloni mikroba.

ALAT DAN BAHAN

Alat

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1) Pembakar bunsen | 13) Erlenmeyer |
| 2) Cawan petri | 14) Mortar atau pestle |
| 3) Colony counter | 15) Karet gelang |
| 4) Beaker glass | 16) Aluminium foil |
| 5) Gelas ukur | 17) Plastik |
| 6) Rak tabung | 18) Kertas pembungkus |
| 7) Tabung reaksi | 19) Kapas |
| 8) Mikro pipet | 20) Botol kaca |
| 9) Blue/white tip | 21) Inkubator |
| 10) Batang penyebar | 22) Cotton bud |
| 11) Batang pengaduk | 23) Vortex |
| 12) Jarum ose | |

Bahan

- 1) Serbuk Nutrient Agar (NA)
- 2) Serbuk Potato Dextrose Agar (PDA)
- 3) Aquades
- 4) Spirtus

PROSEDUR PRAKTIKUM

1) Pembuatan Media NA dan PDA Instan

Pembuatan Media NA

1. 20.0 gram Nutrien Agar (NA) ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beker.
2. Ditambahkan 1000 ml aquades.
3. Dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen.
4. Tuangkan di erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil.
5. Dimasukkan dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media PDA

1. 39.0 gram *Potato Dextrose Agar* (PDA) ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beker.
2. Ditambahkan 1000 ml aquades.
3. Dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen.
4. Tuangkan di erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil.
5. Dimasukkan dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

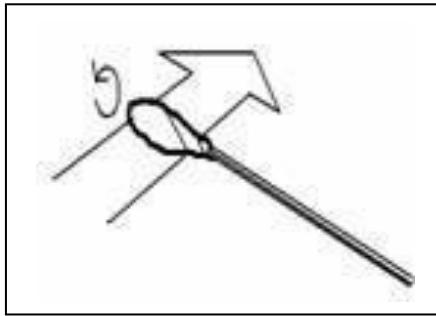
2) Isolasi Mikroorganisme dengan Cara Pengenceran (*Dillution*)

Teknik isolasi dengan cara pengenceran ini merupakan salah satu teknik preparasi suspensi. Teknik ini dilakukan dengan cara mengambil sampel kemudian disuspensikan dalam aquades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam aquades sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

1. *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, potongan daging dan lain-lain. *Swab* dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Siapkan *cotton bud* steril,
- b. Usapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel, dan
- c. *Swab* akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal *pepton water*.

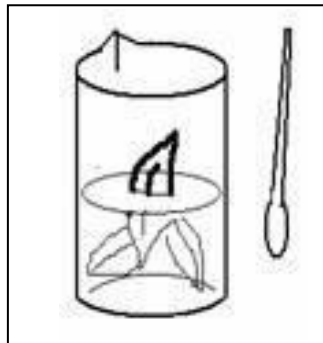


Gambar 44. Arah putaran saat melakukan *swab* pada sampel

2. *Rinse* (bilas)

Ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun, bunga dan lain-lain. *Rinse* dilakukan dengan tahapan berikut :

- a. Celupkan sampel ke dalam aquades steril dengan perbandingan 1 : 9 (w/v), dan
- b. Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan aquades 45 ml yang terdapat dalam *beaker glass*.



Gambar 45. Preparasi sampel daun dengan teknik *rinse*

3. *Maseration* (penghancuran)

Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar atau *pestle* sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam aquades. Contoh sampelnya antara lain bakso, biji, buah dan lain-lain. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tidak perlu dimaserasi. *Maseration* dapat dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

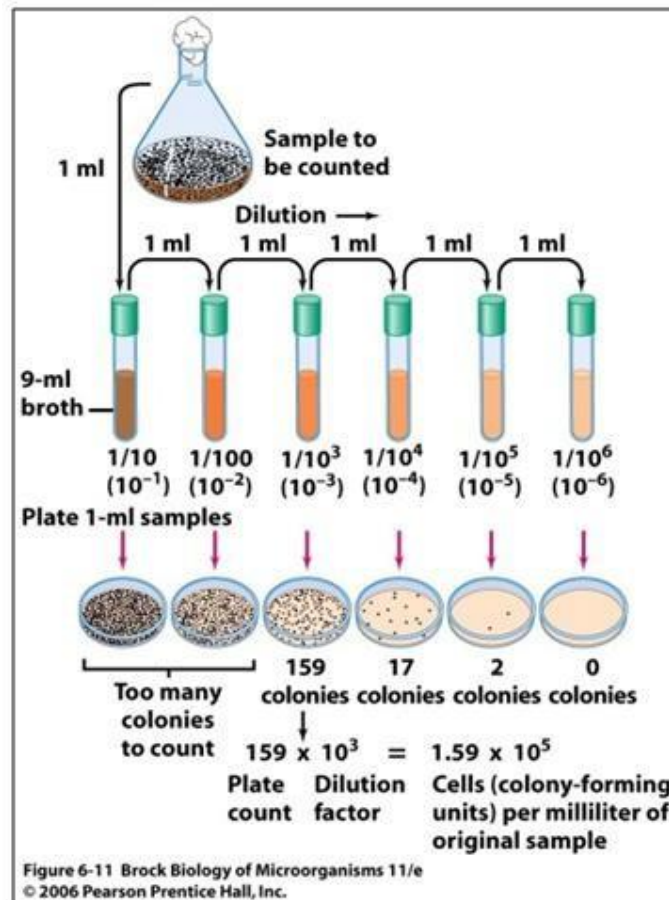
- a. Masukkan sampel ke dalam mortar atau *pestle*,
- b. Hancurkan sample menggunakan mortar, dan
- c. Sampel siap untuk diencerkan dan digunakan.



Gambar 46. Preparasi sampel berupa padatan menggunakan mortar

3) Teknik Pengenceran Bertingkat

1. Sampel yang mengandung mikroorganisme dimasukan ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan **ingat aquades yang digunakan jika memakai teknik *rinse* dan *swab* sudah termasuk pengencer 10^{-1}** . Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya.
2. Diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen (idealnya adalah dihomogenkan menggunakan vortex).
3. Lanjutkan pemindahan hingga tabung pengenceran terakhir (cukup sampai pengenceran 10^{-6}) 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.



Gambar 47. Pengenceran bertingkat

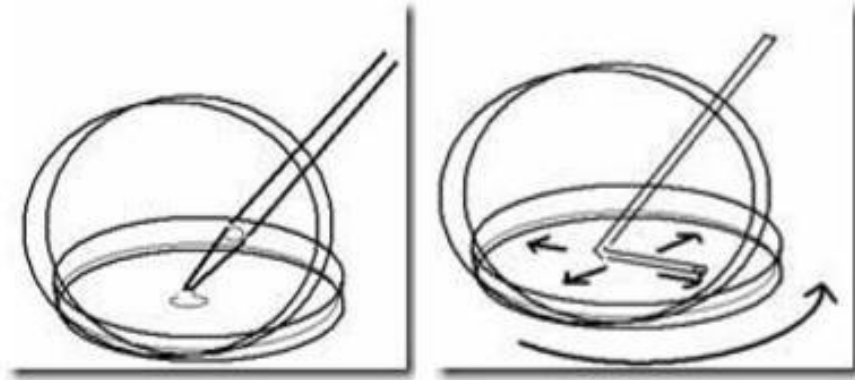
4) Teknik Inokulasi

Teknik 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 (pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6}).

1. Cara tebar atau sebar (*spread plate method*)

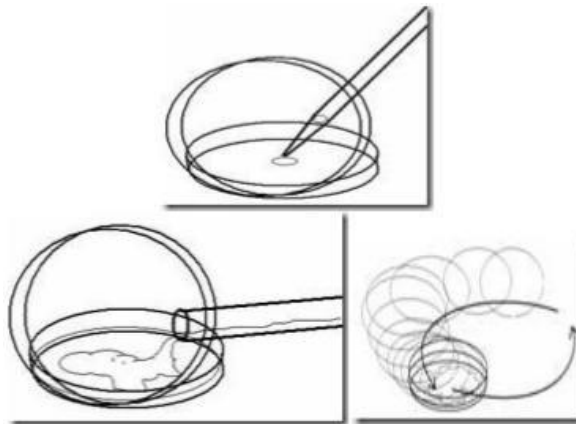
- Buatlah pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} dari kultur murni bakteri dengan larutan pengencer,
- Ambil tabung reaksi yang mengandung kultur murni bakteri, buka dan bakar leher tabung,
- Pindahkan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media NA dalam cawan petri,
- Bakar *spreader* yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol, biarkan dingin (jika batang *spreader* terbuat dari plastik, jangan lakukan pembakaran),
- Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan *spreader* secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering (lihat Gambar 48),

- f. Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar dan amati pertumbuhannya, dan
- g. Bandingkan pertumbuhan dari tiap-tiap pengenceran.



Gambar 48. Cara tebar atau sebar (*spread plate method*)

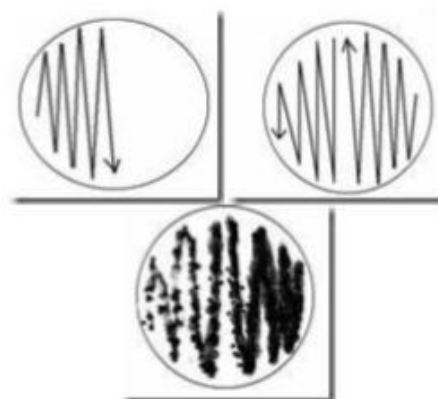
2. Cara penuangan (*pour plate method*)
 - a. Dinginkan media NA dalam tabung reaksi sampai suhu $\pm 45 - 50^{\circ}\text{C}$ (cirinya : terasa hangat di kulit),
 - b. Buka tutup tabung yang mengandung kultur murni bakteri, dan bakar leher botol,
 - c. Pindahkan 1 ml kultur murni bakteri ke dalam tabung reaksi yang mengandung NA secara aseptis,
 - d. Bakar leher tabung di atas bunsen, dan tuangkan media NA yang telah mengandung kultur murni bakteri ke dalam cawan petri,
 - e. Goyangkan perlahan-lahan untuk mencampur kultur bakteri dengan NA sampai homogen. Penggoyangan petri jangan terlalu kuat (goyangkan membentuk seperti angka 8). Pada saat penuangan media, petri bisa diletakkan dalam radius maksimal 20 cm dari sumber api (zona steril),
 - f. Setelah agar memadat diinkubasi terbalik pada suhu yang berbeda-beda, yaitu pada suhu kamar, suhu 37°C , 40°C , 50°C selama 48 – 72 jam. Inkubasi dengan posisi terbalik dilakukan setelah agar memadat,
 - g. Amati pertumbuhannya dan lakukan perhitungan koloni menggunakan *colony counter*,
 - h. Jumlah koloni per $1\text{ cm}^2 = \frac{1}{4} \times 5 \times \text{jumlah koloni per cawan} \times 1 / \text{faktor pengenceran}$,
 - i. Faktor pengenceran = pengenceran x volume yang diencerkan.



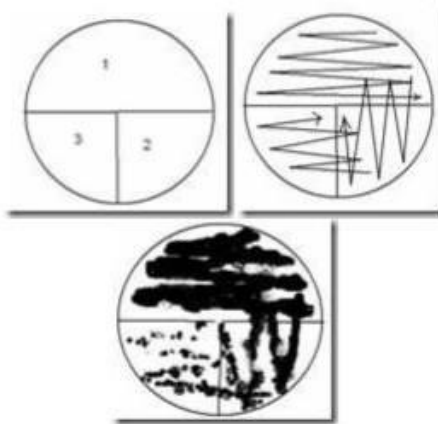
Gambar 49. Cara penuangan (*pour plate method*)

3. Cara gores (*streak plate method*)

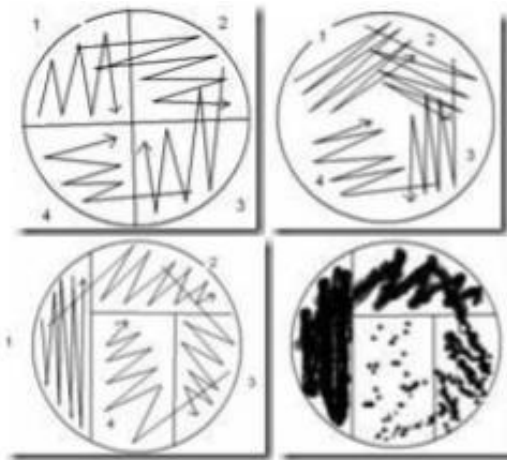
- a. Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri (jika jarum ose yang digunakan terbuat dari plastic atau jarum ose disposable, tidak perlu dipanaskan di atas Bunsen),
- b. Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada permukaan media agar dimulai pada satu ujung. Perhatikan teknik penggoresan! (lihat Gambar 50, 51, 52). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar,
- c. Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin, dan
- d. Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar selama 24 jam dan amati pertumbuhannya.



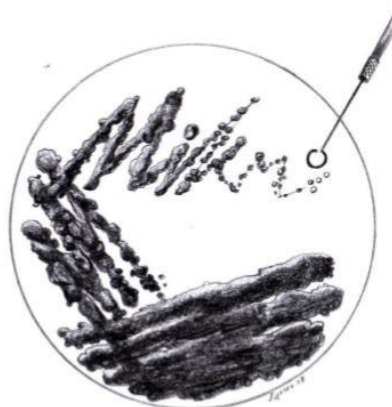
Gambar 50. *Streak plate method* dengan goresan sinambung



Gambar 51. *Streak plate method* dengan goresan T



Gambar 52. *Streak plate method* dengan goresan banyak sektor



Gambar 53. Contoh hasil isolasi dengan *Streak plate method*

ACARA PRAKTIKUM IV PENGAMATAN DAN PERHITUNGAN BAKTERI

DASAR TEORI

Pertumbuhan dapat didefinisikan secara umum yaitu sebagai penambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup. Pada organisme multiseluler, (bersel satu), pertumbuhan adalah penambahan jumlah sel, yang juga berarti penambahan jumlah organisme yang membentuk populasi atau satu biakan. Pada organisme seonostik (aseluler), selama pertumbuhan ukuran sel menjadi besar, tetapi tidak terjadi pembelahan sel (Dwidjoseputro, 2005).

Untuk mengetahui perkembangan atau pertumbuhan suatu bakteri membutuhkan pembuatan media dengan metode perhitungan bakteri yang ada dalam media. Ada banyaknya metode yang digunakan dalam menghitung jumlah bakteri secara kuantitatif dari suatu populasi bakteri. Koloni adalah kumpulan dari mikrobial yang memiliki kesamaan sifat-sifat seperti bentuk, susunan, permukaan, dan sebagainya. Sifat-sifat yang perlu diperhatikan pada koloni yang tumbuh di permukaan medium adalah (Dwidjoseputro, 2005) :

1. Besar kecilnya koloni. Ada koloni yang hanya serupa suatu titik, namun ada pula yang melebar sampai menutup permukaan medium.
2. Bentuk. Ada koloni yang bulat, ada yang memanjang. Ada yang tepinya rata, ada yang tidak rata.
3. Kenaikan permukaan. Ada koloni yang rata saja dengan permukaan medium, ada pula yang timbul yaitu menjulang tebal di atas permukaan medium.
4. Halus kasarnya permukaan. Ada koloni yang permukaannya halus, ada yang permukaannya kasar dan tidak rata.
5. Wajah permukaan. Ada koloni yang permukaannya mengkilat, ada yang permukaannya suram.
6. Warna. Kebanyakan koloni bakteri berwarna keputihan atau kekuningan.
7. Kepekatan. Ada koloni yang lunak seperti lendir, ada yang keras dan kering.

Koloni yang tumbuh pada media agar dapat dilihat secara visual dan dihitung. Secara kuantitatif koloni bakteri dapat dihitung dengan cara menghitung populasinya secara umum atau dengan kata lain menghitung seluruh sel bakteri yang ada dalam media termasuk sel yang mati, dan menghitung sel bakteri hidup dengan menggunakan teori pendekatan.

Menurut Jutono, dkk (1980) ada 2 cara perhitungan jumlah mikrobial yaitu perhitungan secara langsung (*direct method*) dan secara tidak langsung (*indirect method*).

1. Perhitungan secara langsung

Perhitungan jumlah mikrobial secara langsung, dipakai untuk menentukan jumlah mikrobial keseluruhan baik yang mati maupun yang hidup. Berbagai cara perhitungan mikroba secara langsung menggunakan (Dwidjoseputro, 2005) :

- a. Menggunakan cara pengecatan dan pengamatan mikroskopis
 Pada cara ini mula-mula dibuat preparat mikroskopik pada gelas benda, suspensi bahan atau biakan mikroba yang telah diketahui volumenya diratakan diatas gelas benda pada suatu luas tertentu. Setelah itu preparat dicat dan dihitung jumlah rata-rata sel mikroba tiap bidang pemandangan mikroskopik. Luas bidang pemandangan mikroskopik dihitung dengan mengukur garis tengahnya.
 - b. Menggunakan filter membrane (*miliphore filter*)
 Suspensi bahan mula-mula disaring sejumlah volume tertentu kemudian disaring dengan filter membrane yang telah disterilkan terlebih dahulu. Dengan menghitung jumlah sel rata-rata tiap kesatuan luas pada filter membran dapat dihitung jumlah sel dari volume suspensi yang disaring (Jutono dkk, 1980).
 - c. Menggunakan *counting chamber*
 Dasar perhitungannya ialah dengan menempatkan satu tetes suspense bahan atau biakanmikroba pada alat tersebut ditutup dengan gelas penutup kemudian diamati dengan mikroskop yang perbesarannya tergantung pada besar kecilnya mikroba. Perhitungan ini dapat menggunakan hemositometer. Peteroff Hauser Bacteria Counter atau alat-alat lain yang sejenis.
2. Perhitungan secara tidak langsung
- Jumlah mikroba dihitung secara keseluruhan baik yang mati atau yang hidup atau hanya untuk menentukan jumlah mikroba yang hidup saja, ini tergantung cara-cara yang digunakan. Untuk menentukan jumlah mikroba yang hidup dapat dilakukan setelah larutan bahan atau biakan mikroba diencerkan dengan factor pengenceran tertentu dan ditumbuhkan dalam media dengan cara-cara tertentu tergantung dari macam dan sifat-sifat mikroba.
- Menurut Hadietomo (1990) menyatakan bahwa perhitungan secara tidak langsung dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu:
- a. Penentuan volume total
 Cara ini adalah semacam modifikasi penentuan hematokrit pada pengukuran volume total butir-butir darah, misalnya 10 ml biakan dimasukkan ke dalam tabung reaksi khusus (tabung hopklins) yang bagian bawahnya berupa silinder dan bergaris ukuran.
 - b. Metode turbidometri
 Teknik ini sudah dipakai sebagai cara mengukur keker han suspensi atas dasar penyerapan dan pemencaran cahaya yang dilintaskan, sehingga yang mengandung lebih dari 10⁷-10⁸ sel/ml, tampak lebih keruh oleh mata telanjang. Suatu volume biakan yang telah ditakar ditempatkan dalam tabung khusus yang jernih dengan diameter tertentu.

Perhitungan jumlah bakteri secara tidak langsung memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya adalah dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri, bakteri yang dihitung adalah bakteri yang hidup. Sedangkan kekurangannya adalah perhitungannya kurang akurat karena ada kemungkinan beberapa sel bertumpuk, ada kemungkinan terjadi spreader, waktu yang dibutuhkan cukup lama, bahan yang digunakan relatif banyak.

TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilaksanakan praktikum perhitungan bakteri antara lain:

1. Agar mahasiswa dapat melakukan perhitungan sel mikroba secara langsung
2. Agar mahasiswa dapat melakukan perhitungan sel mikroba secara hitung

ALAT DAN BAHAN

Alat dan bahan yang diperlukan dalam praktikum perhitungan bakteri yaitu alat tulis dan media inokulasi yang telah diinkubasi.

PROSEDUR PRAKTIKUM

- 1) Bukalah kertas pembungkus cawan petri yang berisi inokulum.
- 2) Ambil dan amati mikroba yang tumbuh.
- 3) Hitunglah jumlah koloni yang ada pada media.
- 4) Catat jumlah koloni dan hitung menggunakan rumus yang telah ditetapkan.
Pour Plate (Jumlah koloni per 1 cm²) = $\frac{1}{4} \times 5 \times$ jumlah koloni per cawan x 1/ faktor pengenceran.
Spread Plate = Jumlah koloni per cawan x 1/ faktor pengenceran.

DAFTAR REFERENSI

- Andrews, A. H., R. W. Blowey, H. Boyd, dan R. G. Eddy. 2004. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle Second Edition*. Blackwell Science. UK.
- Barrow, G.I., and R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition*. Syndicate of the University of Cambridge. United Kingdom.
- Dwijoseputro, D. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Gramedia. Jakarta.
- Hadioetomo, R. 1990. *Mikrobiologi Dasar-Dasar Dalam Praktek*. Jakarta : Gramedia.
- Jawetz, and Melnick. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., Suhadi D., 1980, *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta*. UGM Press. Yogyakarta.
- Lay, B., 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms. Ninth Ed*. Prentice Hall International, Inc. New Jersey. 991pp.
- Perry JJ, Staley JT, Lory S. 2002. *Microbial Life*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 811 pp.
- Prescott, L.M. 2002. *Prescott-Harley-Klein's: Microbiology, 5th ed.*, 553. The McGraw-Hill Companies .New York.
- Sutedjo. 1991. *Mikrobiologi Tanah*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Volk, W.A. dan M.F. Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar. Jilid 1. Edisi Kelima*. 396 pp. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Wasteson, Y, and Hornes, E. 2009. Pathogenic Escherichia Coli Found in Food. *International Journal Of Food Microbiology*. 12, 103-114.
- Williamson, C.E. 1973. Control of Soil Inhabiting Pest of The Garden. dalam : Lunt, H.A. (Ed). *Handbook on Soils. Special Printing of Plants & Garden*, 12(1), 51-59.