

PENUNTUN MIKROBIOLOGI



SEMESTER GANJIL

biologi.fst.uinjambi 
Program Studi Biologi 



TIM PENYUSUN

Ketua : Latusi Anggriani, M.Si.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Modul Praktikum Mikrobiologi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu penyusunan modul praktikum ini khususnya kepada Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sulthan Thaha Saifuddin Jambi yang telah bersedia memberikan kesempatan kepada tim penyusun modul hingga tersusun modul ini dengan baik. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ketua Program Studi Biologi yang telah membantu dan memberikan dukungannya. Penulis juga menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan modul ini baik dari segi kualitas isi, bahasa maupun tampilan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap modul pembelajaran ini bermanfaat untuk semua pihak

Jambi, 27 Agustus 2024
Penyusun

Tim Dosen Mikrobiologi



DAFTAR ISI

	Hal.
HALAMAN JUDUL	
TIM PENYUSUN	1
LEMBAR PENGESAHAN	2
KATA PENGANTAR	3
DAFTAR ISI	4
FORMAT LAPORAN	5
TATA TERTIB PRAKTIKUM	6
TOPIK 1. Pengenalan Alat.....	
TOPIK 2. Teknik Sterilisasi Alat dan Bahan.....	
TOPIK 3. Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroba.....	
TOPIK 4. Teknik Isolasi Mikroba.....	
TOPIK 5. Teknik Pemurnian dan Peremajaan Mikroba.....	
TOPIK 6. Teknik Perhitungan Jumlah Koloni.....	
TOPIK 7. Teknik Pewarnaan Bakteri.....	
DAFTAR PUSTAKA	



FORMAT LAPORAN

- A. PENDAHULUAN
 - 1. Latar Belakang
 - 2. Tujuan
 - 3. Manfaat
- B. LANDASAN TEORI
- C. METODOLOGI
 - 1. Waktu dan Tempat Praktikum
 - 2. Alat dan Bahan
 - 3. Cara Kerja
- D. HASIL DAN PEMBAHASAN
 - 1. Hasil
 - 2. Pembahasan
- E. KESIMPULAN
- F. DAFTAR PUSTAKA
- G. LAMPIRAN



TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

A. Pendaftaran

Setiap mahasiswa yang akan melakukan praktikum mikrobiologi harus mendaftarkan diri di Laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi melalui Kepala Laboratorium/Laboran. Mahasiswa akan mendapatkan pengarahan tentang tata tertib penggunaan laboratorium.

B. Petunjuk Praktikum

Setiap praktikum disediakan petunjuk percobaan yang diberikan kepada mahasiswa praktikan bersangkutan pada awal perkuliahan. Mahasiswa harus melengkapi pengetahuan yang mendasari percobaan tersebut dari bahan kuliah, literatur-literatur yang sesuai baik teori maupun eksperimental. Mahasiswa wajib mengisi daftar kebutuhan alat pada setiap pertemuan berdasarkan arahan dari Kepala Laboratorium/Laboran. Setelah selesai praktikum mahasiswa wajib melaporkan kepada Kepala Laboratorium/Laboran.

C. Absensi

Mahasiswa diwajibkan datang tepat pada waktunya serta mengisi daftar hadir sesaat menjelang praktikum. Jika tidak mengisi daftar hadir, dianggap tidak hadir. Mahasiswa wajib mengikuti kegiatan praktikum dengan kehadiran 100%.

D. Keamanan dan Kebersihan

1. Tidak dibenarkan makan, minum dan/atau merokok di dalam laboratorium.
2. Jangan minum dari keran yang ada di laboratorium.
3. Berhematlah dengan zat-zat kimia dan air (aquades, aqua dm, aquabidest). Sisa pelarut organik hendaknya dikumpulkan dalam botol yang khusus disediakan untuk itu.
4. Sampah kertas dan benda keras (pecahan gelas, batu didih, dan sebagainya) tidak boleh dibuang di lantai atau dalam bak cuci, tetapi harus di dalam wadah yang telah disediakan.
5. Alat-alat dengan "*gelas joint*" (kerat buret, tutup erlenmeyer gelas dan sebagainya) supaya ditinggalkan dalam keadaan terbuka terlepas, dalam hal alat tersebut belum sempat dicuci karena tidak ada air.



6. Mahasiswa diwajibkan menggunakan jas laboratorium dari bahan katun. Sewaktu praktikum, Mahasiswa yang berambut panjang diwajibkan mengikat rambutnya dan memasukkan ke dalam jas lab. Selama praktikum tidak diperkenankan menggunakan topi dan sandal (wajib mengenakan sepatu!).

E. Pelaksanaan Praktikum

1. Sebelum praktikum diadakan, kuis tertulis atau tidak tertulis dilaksanakan selama lebih kurang 15 menit, yang berhubungan dengan objek praktikum yang dilakukan. Kuis tersebut memiliki bobot nilai tersendiri.
2. Jika menggunakan peralatan yang agak rumit, maka dosen akan menjelaskan prinsip kerja alat tersebut.
3. Dalam hal mahasiswa kurang mengetahui cara-cara penggunaan suatu alat tertentu, diharapkan segera menghubungi dosen terlebih dahulu, sebelum mencoba sendiri, mengingat peralatan praktikum mikrobiologi tergolong tidak murah.

F. Pengamatan Praktikum

1. Mahasiswa harus menyediakan buku catatan praktikum.
2. Semua pengamatan harus dicatat pada kertas yang telah disediakan.

G. Pelaporan

1. Mahasiswa wajib membuat laporan sesuai dengan format yang ditentukan
2. Laporan dibuat dan ditulis tangan menggunakan pena (Hitam atau Biru) di buku tulis jenis A5
3. Laporan dikumpulkan tepat waktu sesuai dengan kesepakatan di pertemuan pertama.



TOPIK 1

Pengenalan Alat

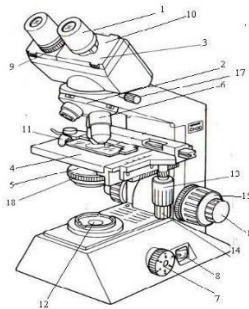
- A. Tujuan :**
1. Mahasiswa dapat mengenal dan mengetahui fungsi alat-alat yang umum digunakan pada praktikum mikrobiologi
 2. Mahasiswa mampu memahami prinsip-prinsip penting pada mekanisme kerja alat-alat yang umum digunakan pada praktikum mikrobiologi
 3. Mahasiswa mampu mengoperasikan dan memelihara alat yang digunakan pada praktikum mikrobiologi

B. Pendahuluan

Mikrobiologi adalah cabang ilmu biologi yang mempelajari mikroorganisme. Bakteri, fungi (jamur), serta archaeobacteria merupakan aspek kajian dalam bidang mikrobiologi. Beberapa ilmuwan juga berpendapat virus merupakan kajian dalam mikrobiologi, namun beberapa ilmuwan lain juga beranggapan bahwa virus tidak masuk dalam kajian bidang mikrobiologi karena bukan makhluk hidup. Kajian mikrobiologi mulai dilakukan sejak ditemukannya mikroskop dan menjadi salah satu kajian yang penting dalam bidang biologi setelah Louis Pasteur berhasil menjelaskan proses fermentasi anggur (*wine*) dan vaksin rabies. Dalam praktiknya mikrobiologi 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, spreader, pinset, skalpel, pH indikator universal.

C. Pengamatan

1. Mikroskop



Gambar 1.1 Mikroskop



Keterangan :

1. lensa okuler, untuk memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif
2. *revolving* (pemutar lensa objektif), untuk memutar lensa objektif sehingga mengubah perbesaran
3. tabung pengamatan/tabung okuler
4. *stage* (meja benda), spesimen diletakkan di sini
5. kondensator untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. lensa objektif, untuk memperbesar spesimen
7. *Brightness adjustment knob* (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu
8. tombol *on-off*
9. *Diopter adjustment ring* (cincin pengatur diopter) Untuk menyamakan focus antara mata kanan dan kiri
10. *Interpupillar 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 gelas
15. *Coarse focus knob* (sekrup fokus kasar) Menaik turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasardan 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 kondensator) untuk menaik-turunkan kondensator

2. Autoclave

Autoclave adalah alat yang digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi atau kajian biologi lain dengan prinsip penggunaan uap air panas bertekanan tinggi. Tekanan yang digunakan pada umumnya 1,5 atm- 2 atm dengan suhu 121°C dan lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15-20 menit. Bagian-bagian autoclave pada umumnya terdiri atas pengatur waktu, katup pengeluaran uap, pengatur tekanan, kelep pengaman, tombol on-off, lempeng sumber panas, sekrup pengaman, batas penambahan air, tabung aquades.



Gambar 1.2. Autoclave

Cara Pemakaian autoclave yaitu :

- a. Sebelum proses sterilisasi dilakukan pastikan banyaknya air dalam autoclave, jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas yang tertera pada autoclave. Gunakan air hasil destilasi/steril (aquades) untuk terhindar dari kerak dan karat.
- b. Masukkan alat dan bahan yang akan disterilisasi pada tabung autoclave.
- c. Pastikan autoclave telah tertutup rapat dan baut pengaman sudah terpasang kencang agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoclave.
- d. Hidupkan autoclave
- e. 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.
- f. 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.

3. Oven

Oven adalah alat yang digunakan untuk mensterilkan alat-alat dari kaca yang digunakan dalam mikrobiologi dengan prinsip udara kering sehingga disebut dengan sterilisasi kering. Suhu yang digunakan untuk sterilisasi biasanya adalah 170-180°C dan lama sterilisasi yang dilakukan selama 1,5-2 jam. Panel fungsi dari oven meliputi



pengaturan suhu, pengaturan waktu, tombol on-off, tombol konfirmasi pengaturan. Cara pemakaian biasanya bergantung dengan jenis oven yang digunakan. Namun, pada umumnya penggunaan oven sama saja hanya berbeda pada letak panel fungsi.



Gambar 1.3. Oven

4. Timbangan/Neraca Analitik

Neraca analitik merupakan alat penghitung satuan massa suatu benda dengan teknik digital dan tingkat ketelitian yang cukup tinggi. Neraca analitik digunakan untuk mengukur berat (terutama yang bermassa rendah) atau alat untuk menimbang suatu zat dengan ketepatan hingga 0,0001 gram. Alat ini biasanya diletakkan di laboratorium sebagai alat ukur dalam kegiatan penelitian. 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.



Gambar 1.4. 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. Ketepatan massa media harus setepat mungkin karena komposisi penyusun media yang tidak tepat akan mempengaruhi konsentrasi zat dalam media sehingga dapat menyebabkan terjadinya kekeliruan dalam hasil praktikum. Namun, neraca analitik memiliki batas maksimal yaitu 1 mg dan tidak dapat menggunakan sumber tegangan listrik yang besar, sehingga harus menggunakan stavolt.

5. Laminar Air Flow (LAF)

LAF adalah alat yang digunakan ketika akan bekerja secara aseptis karena mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga ruang kerja menjadi steril. Prinsip kerja LAF juga mengaplikasikan sinar UV beberapa jam sebelum digunakan. Cara menggunakan LAF pada umumnya :

- 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 alkohol 70 %
- e. Usap permukaan LAF dengan alkohol 70 % atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap
- f. masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (overload) karenamemperbesar resiko kontaminan
- g. Atur alat dan bahan yang telah dimasukkan sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerjadan tercipta areal yang benar-benar steril
- h. Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tapi gunakan yangberbahan 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 keluar dari LAF.



Gambar 1.5. Laminar Air Flow

6. Cawan Petri

Cawan Petri berfungsi sebagai tempat membiakkan (kultivasi) mikroba. Media tumbuh mikroba 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.



Gambar 1.6. Cawan Petri

7. Tabung Reaksi

Tabung reaksi dalam kajian mikrobiologi digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan menumbuhkan mikroba dan penyimpanan isolat karena resiko kontaminasi dan



rusak lebih rendah dibanding dalam media cawan. Tabung reaksi dapat diisi media padat (agar) 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 muluttabung karena memperbesar resiko kontaminasi.



Gambar 1.7. Tabung Reaksi

8. Bunsen

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). Lampu Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas, alkohol, spiritus.



Gambar 1.8. Bunsen

9. pH Indikator

pH Indikator Universal digunakan untuk mengukur/mengetahui pH suatu



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



Gambar 1.9 pH Indikator

10. Pinset

Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit, menjepit bahan yang akan diisolasi mikroba.



Gambar 1.10. Pinset

11. Skalpel

Skalpel berfungsi untuk mengiris, memotong, menyayat inang, bagian inang yang akan diisolasi mikroba.



Gambar 1.11. Skalpel

12. Jarum Ose

Jarum ose atau sering disebut sebagai jarum inokulum 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 inokulating 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).



Gambar 1.12. Jarum Ose

13. Spreader

Spreader adalah alat yang bermanfaat dalam proses inokulasi untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata.



Gambar 1.13. Spreader

14. Mikropipet dan tip

Mikropipet adalah alat untuk mengambil sampel dalam bentuk cairan yang



bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μl . Ada beberapa kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1 μl 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.



Gambar 1.14. Mikropiper dan tip

Cara penggunaan mikropipet antara lain :

- 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

Hasil Pengamatan

No	Gambar Alat	Nama Alat	Fungsi
----	-------------	-----------	--------



1			
2			
...			



TOPIK 2

TEORI STERILISASI ALAT DAN BAHAN

- A. Tujuan :**
1. Mahasiswa mampu memahami prinsip kerja sterilisasi alat dan bahan
 2. Mahasiswa dapat melakukan sterilisasi alat, bahan, dan melakukan kerja aseptis

B. Pendahuluan

Sterilisasi merupakan salah satu syarat utama dalam praktikum mikrobiologi. Prosedur ini dilakukan sebagai upaya untuk membebaskan alat maupun bahan dari jasad renik atau kontaminan. Semua perlengkapan untuk pembuatan, distribusi, dan penyimpanan media harus disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi. Sterilisasi dibedakan menjadi 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi. **Sterilisasi secara mekanik** atau disebut juga teknik filtrasi menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22μ atau 0.45μ) sehingga mikroba akan tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka terhadap panas atau tidak tahan panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik. **Sterilisasi secara fisik** dapat dilakukan dengan pemanasan (pemijaran dengan api langsung, panas kering menggunakan oven, dan uap air panas bertekanan menggunakan autoclave) dan penyinaran dengan UV. **Sterilisasi secara kimiawi** dapat dilakukan dengan memberikan cairan desinfektan misalnya alkohol.

C. Jenis-Jenis Sterilisasi

1. Panas kering

a. Flaming (membakar)

Digunakan nyala bunsen untuk sterilisasi ose, sterilisasi mulut tabung percobaan dan wadah gelas lainnya pada waktu menginokulasi media. Pada waktu memanaskan ose, mulailah dari pangkal kawat dan setelah terlihat merah berpijar, secara pelan-pelan pemanasan dilanjutkan ke ujung ose. Hal ini untuk mencegah terloncatnya sisa kuman akibat pemanasan langsung dan terlalu cepat pada mata ose.

b. Oven udara panas (hot air oven)

Digunakan untuk sterilisasi alat-alat laboratorium dari gelas seperti petri, tabung, pipet. Biasanya sterilisasi dikerjakan pada suhu 175°C selama 1,5 – 2 jam. Sebelum disterilkan, Labu dan tabung percobaan harus kering, ditutup dengan kapas, pipet dibungkus dengan kertas atau ditaruh dalam kaleng pipet.

2. Panas basah

a. Dengan merebus



Digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang berupa gunting, pinset, skalpel, jarum, spuit injeksi, dan lain-lain dengan cara direbus dalam keadaan mendidih selama 30-50 menit.

b. Dengan uap air panas

Terutama untuk mensterilkan media-media yang dapat rusak bila disterilkan dengan autoclave (uap air panas bertekanan). Sterilisasi dilakukan dengan pemanasan 1000 C selama 1 jam. Perlu diingatkan bahwa dengan cara tersebut, spora belum dapat dimatikan.

c. Dengan uap air bertekanan (autoclave)

Digunakan terutama untuk sterilisasi media yang tahan terhadap panas tinggi. Sterilisasi dikerjakan pada suhu 1200° C selama 10-30 menit, sesuai kebutuhan (biasanya selama 20 menit)

d. Pasteurisasi

Digunakan untuk sterilisasi suhu dan minuman beralkohol. Panas yang digunakan 61,70° C selama 30 menit.

3. Filtrasi

Cara ini dipakai untuk sterilisasi cairan yang akan rusak bila disterilkan dengan cara lain (pemanasan). Filtrasi lazim digunakan untuk sterilisasi sera, toksin, preparat antibiotik, enzim, vitamin, zat-zat labil lainnya. Kelemahan metode filtrasi, dapat ditembus oleh golongan virus.

Sterilisasi dengan penyaringan dilakukan untuk mensterilisasi cairan yang mudah rusak jika terkena panas atau mudah menguap (*volatile*). Cairan yang disterilisasi dilewatkan ke suatu saringan (ditekan dengan gaya sentrifugasi atau pompa vakum) yang berpori dengan diameter yang cukup kecil untuk menyaring bakteri. Virus tidak akan tersaring dengan metode ini. Sterilisasi dengan penyaringan dapat dilakukan dengan berbagai cara :

a. *Non-disposable filtration apparatus*

- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 20-1000 ml
- *Disposable filter cup unit*

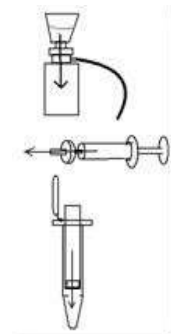
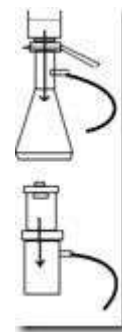
- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

b. *Disposable filtration unit* dengan botol penyimpan

- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

c. *Syringe filters*

- Ditekan seperti jarum suntik
- Volume 1-20 ml





d. *Spin filters*

- Ditekan dengan gaya setrifugasi
- Volume kurang dari 1 ml

4. Sterilisasi dengan penyinaran

Digunakan untuk sterilisasi ruang tertentu, misalnya kamar atau ruang inokulasi. Penyinaran selama beberapa jam sebelum digunakan dan lampu dimatikan bila ruang tersebut akan digunakan, misalnya untuk menyiapkan media, inokulasi bakteri, dan sebagainya. Jenis radiasi :

- Sinar ultra violet
- Sinar X
- Sinar gamma : untuk material yang tebal
- Sinar katoda : digunakan setelah pengepakan

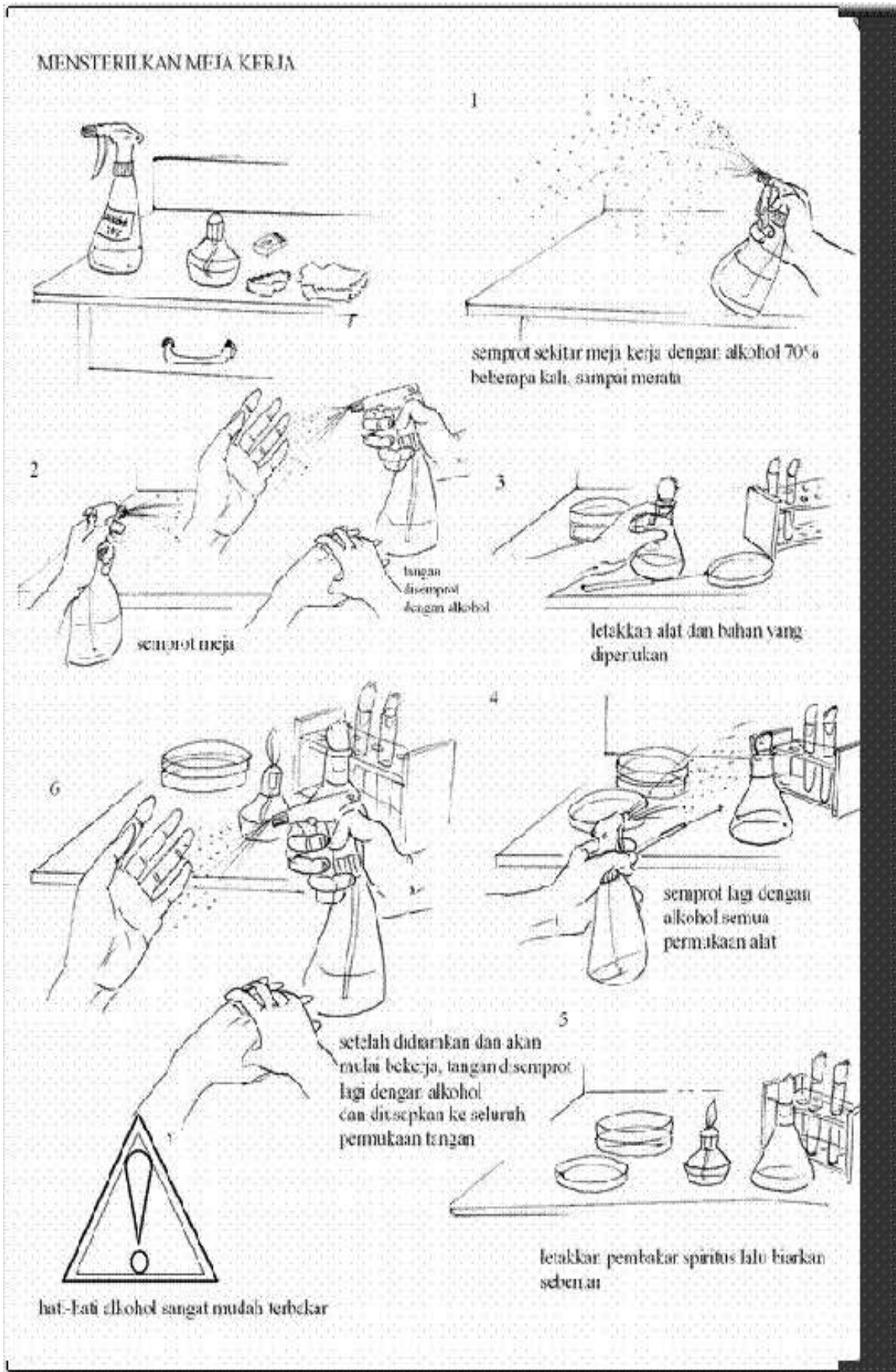
5. Desinfeksi dan Antiseptik (Cara Khemis)

Bahan yang sering digunakan :

- Fenol
- Alkohol (50 – 70%)
- Formaldehid (formalin)
- Detergen
- Halogen
- Logam berat (merkutokrom)
- Etilen oksid (gas sterilisator) mudah meledak dan toksik

6. Berbagai prosedur umum kerja dalam mikrobiologi yang membutuhkan teknik aseptik

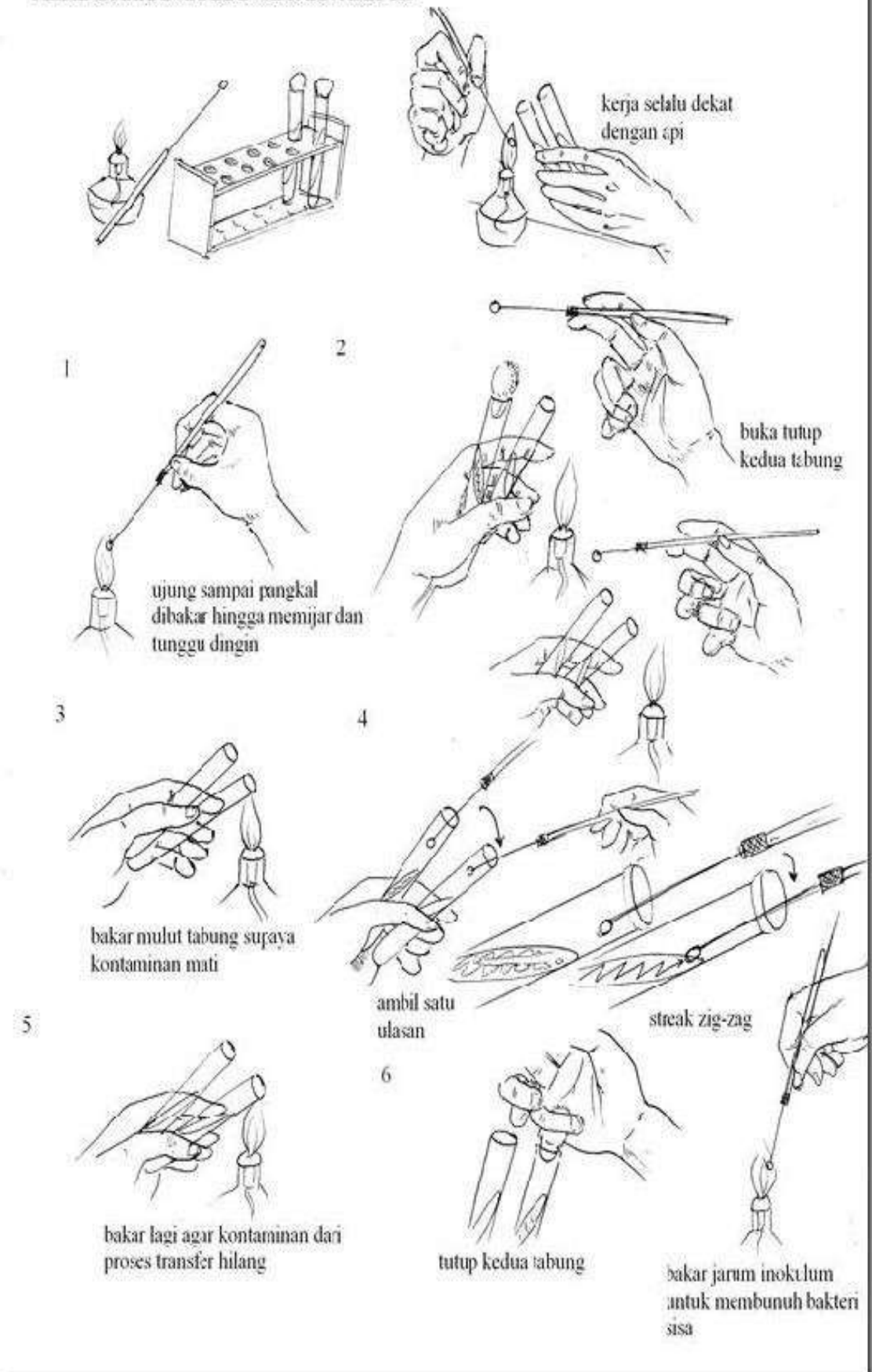
a. Desinfeksi meja kerja



Gambar 2.1. Prosedur desinfeksi meja kerja



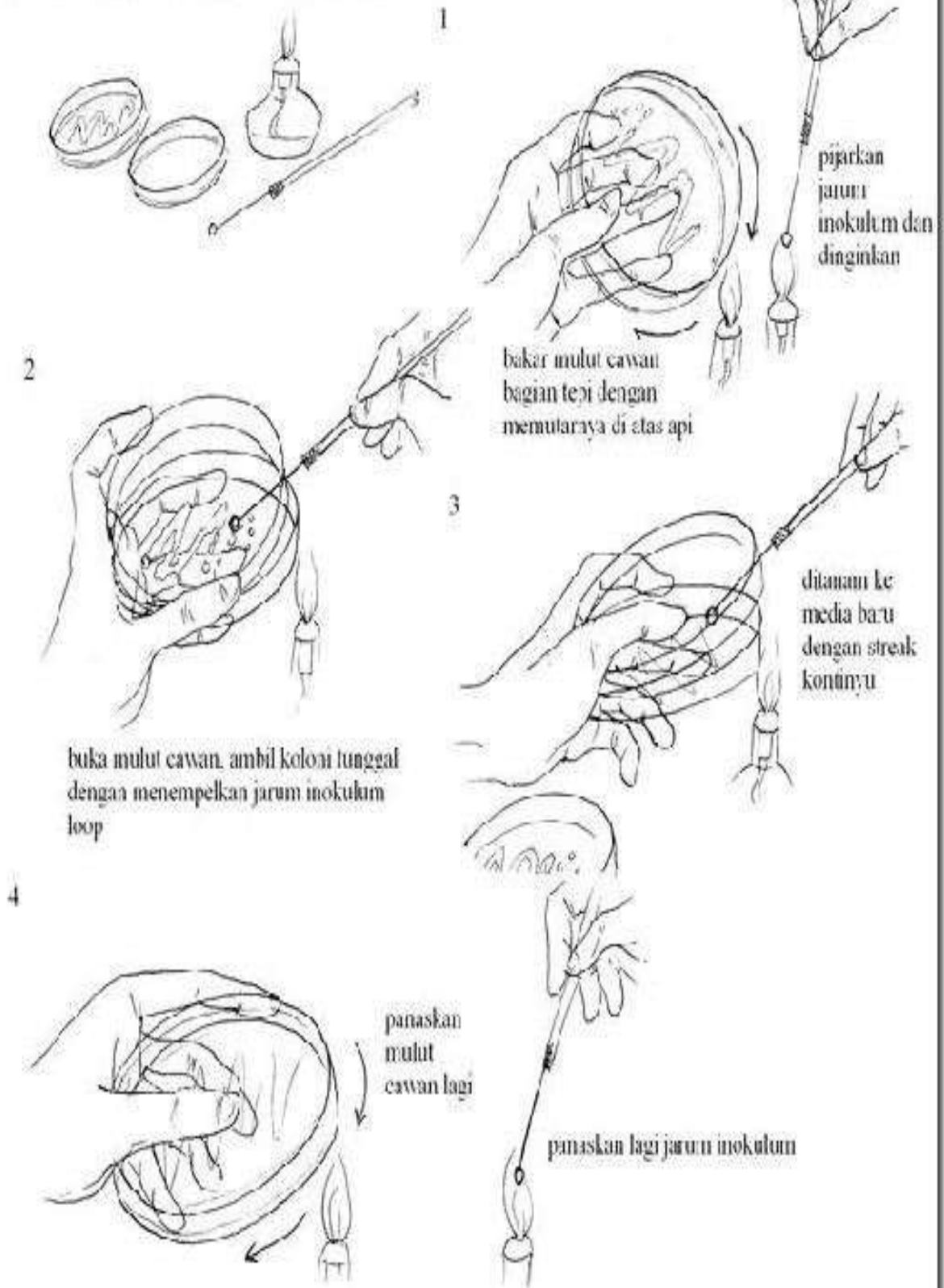
MEMINDAHKAN BIAKAN SECARA ASEPTIS



Gambar 2.2. Memindahkan biakkan secara aseptik



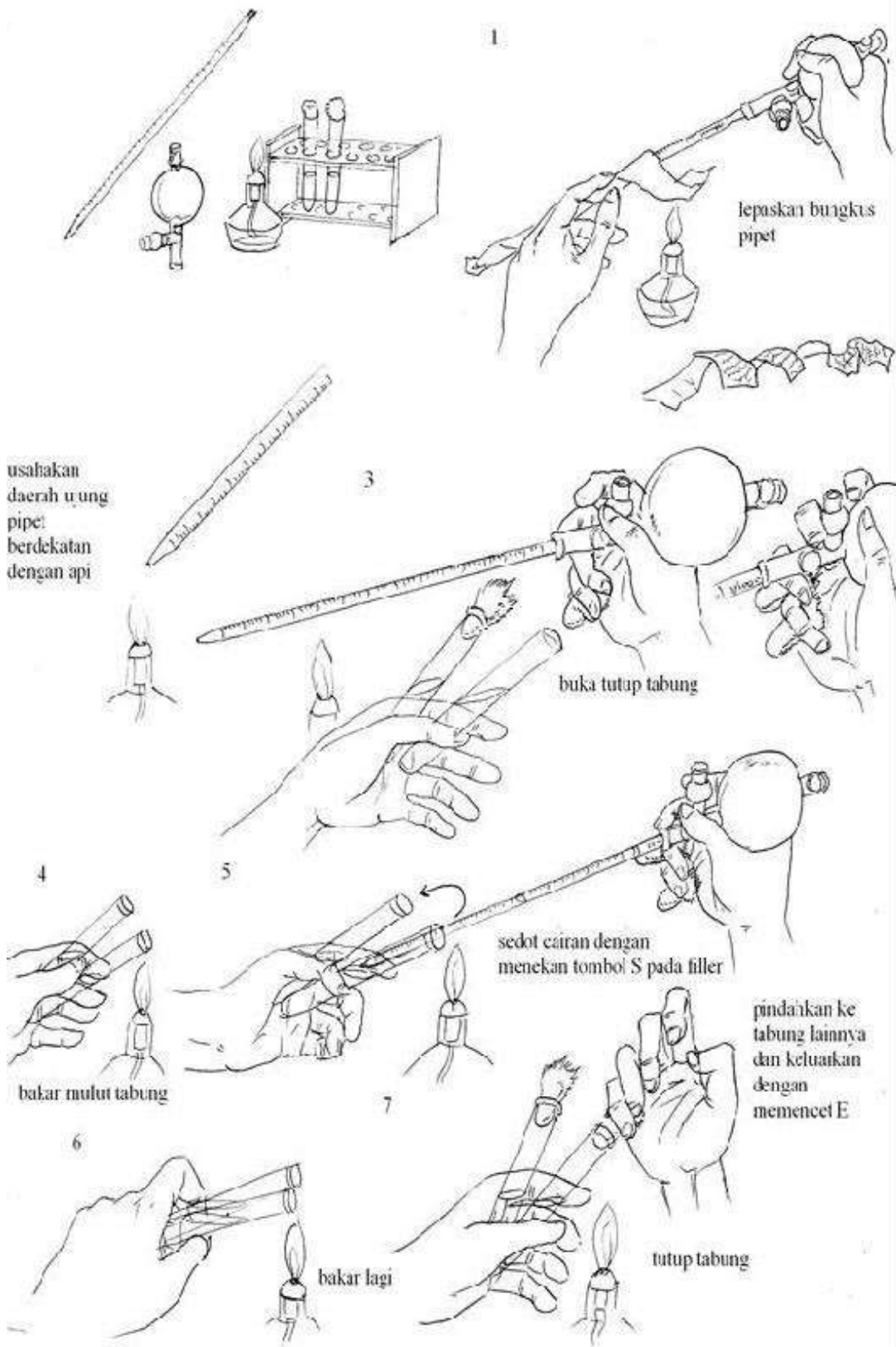
MEMINDAHKAN BIAKAN DARI CAWAN



Gambar 2.3. Memindahkan biakkan dari cawan



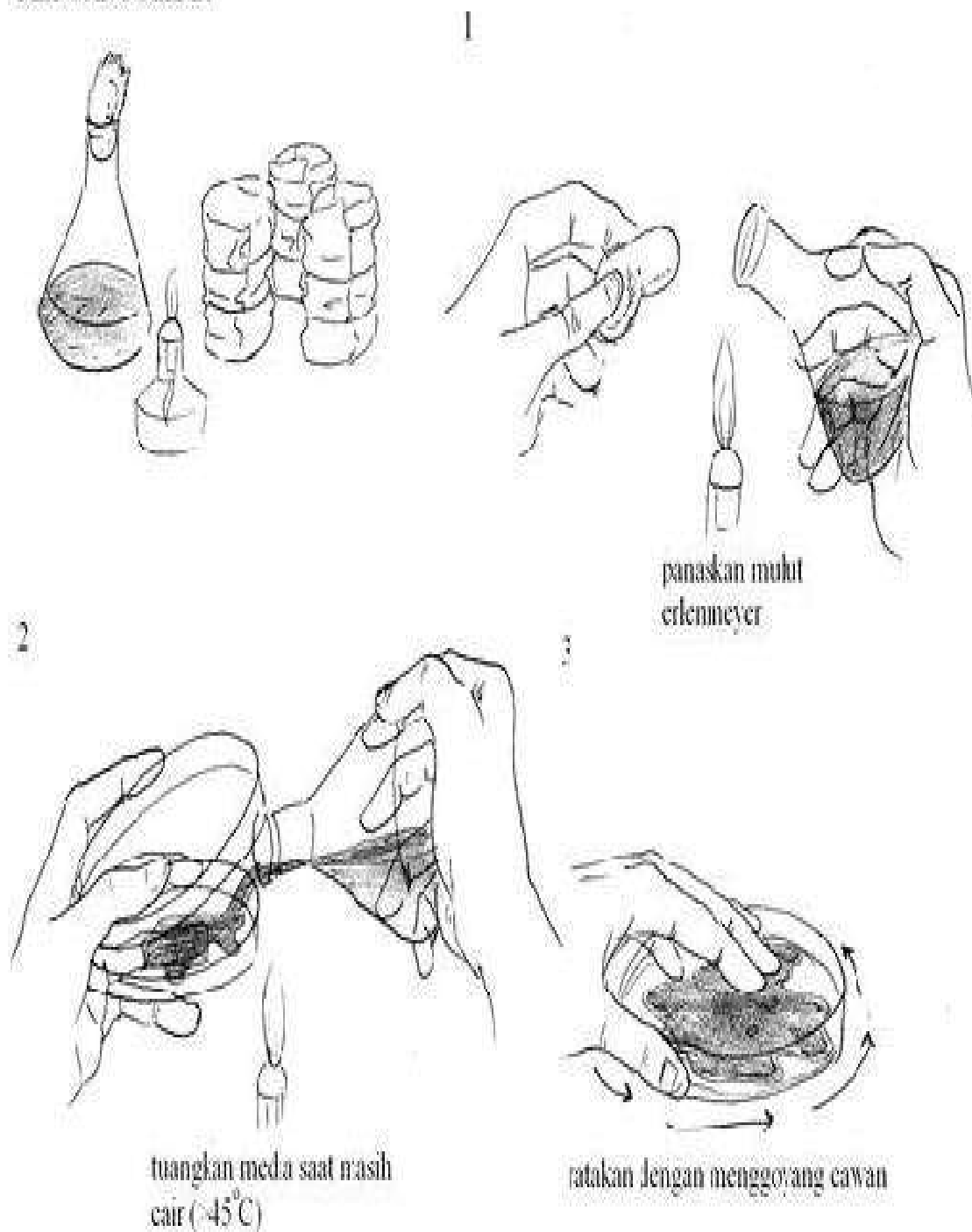
MEMINDAHKAN CAIRAN DENGAN PIPET



Gambar 2.4. Memindahkan cairan dengan pipet



MENUANG MEDIA



Gambar 2.5. Menuang media



Saran-saran kerja aseptis :

1. Sebelum membuka ruangan atau bagian steril di dalam tabung/cawan/erlenmeyer sebaiknya bagian mulut (bagian yang memungkinkan kontaminan masuk) dibakar/dilewatkan api terlebih dahulu.
2. Pinset, batang L, dll dapat disemprot dengan alkohol terlebih dahulu lalu dibakar.
3. Ujung jarum inokulum yang sudah dipijarkan harus ditunggu dingin dahulu atau dapat ditempelkan tutup cawan bagian dalam untuk mempercepat transfer panas yang terjadi.
4. Usahakan bagian alat yang diharapkan dalam kondisi steril didekatkan ke bagian api. Jika kerja di *Safety Cabinet* tidak perlu memakai pembakar bunsen tetapi jika di luar *Safety Cabinet* maka semakin banyak sumber api maka semakin terjamin kondisi aseptisnya.



TOPIK 3

PEMBUATAN MEDIA PERTUMBUHAN MIKROBA

- A. Tujuan :**
1. Mahasiswa mampu memahami prosedur pembuatan media pertumbuhan mikroba
 2. Mahasiswa mampu membuat media pertumbuhan mikroba dengan prinsip aseptis

B. Pendahuluan

Mikroorganisme membutuhkan nutrisi untuk hidupnya seperti makhluk hidup lain. Nutrisi ini didapat dari media tumbuh mikroba. Setiap jenis mikroba memiliki media tumbuh yang spesifik berdasarkan sumber energi dari mikroba tersebut. Oleh karena itu, pembuatan media pertumbuhan mikroba harus aseptis mulai dari medium hingga alat dan bahan-bahan lain agar terhindar dari mikroorganisme kontaminan. Secara umum media pertumbuhan bakteri dibedakan atas :

1. Medium alami
2. Medium semi buatan
3. Medium buatan

Sedangkan berdasarkan bentuknya media dibedakan atas :

1. Medium cair
2. Medium semi padat
3. Medium padat

Medium padat dan semi padat dibedakan lagi berdasarkan :

1. Medium agar tegak
2. Medium Agar miring
3. Medium agar cawan

Berdasarkan kegunaannya maka media dibedakan atas :

1. Medium umum
2. Medium Selektif
3. Medium differensial
4. Medium pengaya



C. Alat dan Bahan

1. Alat

No	Bahan	Jumlah
1	Media NA instan	10 gram
2	Media NB instan	10 gram
3	Daging sapi tanpa lemak*	500 gram
4	Pepton*	5 gram
5	Agar-agar plain*	7,5 gram
6	Aquades	1500 ml
7	NaCl 0,9%	30 ml
8	Alkohol 96%	1000 ml
9	Spiritus	250 ml

Ket : (*) Jika tidak ada NA dan NB instan

2. Bahan

No	Alat	Jumlah
1	Tabung Reaksi	20
2	Cawan Petri 10	10
3	Jarum Ose	1
4	Spreader	1
5	Erlenmeyer 500 ml	2
6	Tip mikropipet 1 ml	1 box
7	Kapas	500 gram
8	Kasa roll	1
9	Plastik wrap roll	1
10	Aluminium foil roll	1
11	Plastik anti panas 2 kg	1 pac
12	Kertas buram	1 rim
13	Karet gelang	1 pac
14	Botol semprot	1
15	Tisu kemasan 500 sheet	1
16	Bunsen	1



D. Cara Kerja

1. Penyiapan media

Pembuatan media manual

- a. Bersihkan daging dari lemak
- b. Potong daging menjadi ukuran kecil
- c. Rebus daging dengan aquades selama 25 menit dan volum akhir air 1000ml
- d. Saring air kaldu lalu endapkan selama 24 jam di dalam lemari pendingin
- e. Saring air kaldu hingga diperoleh filtrat yang jernih
- f. Masukkan kedalam 2 tabung erlenmeyer masing-masing 500 ml
- g. Tambahkan 7,5 gram agar-agar pada salah satu erlenmeyer
- h. Tambahkan 2,5 gram pepton ke dalam masing-masing erlenmeyer
- i. Aduk hingga homogen
- j. Tutup dengan aluminium foil dan lapisi dengan plastik lalu ikat dengan katep

Pembuatan media instan

- a. Timbang media NA dan NB masing-masing 10 gram (berdasarkan resep pada kemasan media)
 - b. NA dan NB masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi aquades 500 ml dan aduk hingga homogen dengan stirer
2. Masukkan media agar dan cair ke dalam 5 tabung reaksi masing-masing 5 ml dan tutup dengan sumbat kapas+kasa dan bungkus dengan plastik
 3. Bungkus cawan petri dengan kertas buram lalu masukkan ke dalam plastik
 4. Bungkus jarum ose, spreader, dan tip dengan plastik
 5. Masukkan semua bahan dan alat yang telah disiapkan ke dalam autoclave
 6. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit
 7. Keluarkan alat dan bahan dari autoclave setelah uap dari autoclave habis
 8. Miringkan media agar di dalam tabung reaksi dengan kemiringan 30° biarkan hingga membeku
 9. Hidupkan LAF selama 30 menit lalu masukkan cawan petri media agar ke dalam LAF dan tutup
 10. Tunggu hingga suhu media agar mencapai 45°C (belum membeku) lalu tuangkan



ke dalam cawan petri

11. Biarkan media cawan membeku
12. Simpan semua media pada suhu maksimal 4°C dan beri label
13. Simpan alat dan bahan lain di dalam tempat yang aseptis



TOPIK 4

TEKNIK ISOLASI MIKROBA

- A. Tujuan :**
1. Mahasiswa mampu melakukan teknik isolasi bakteri dari berbagai sumber
 2. Mahasiswa mampu melakukan pemurnian bakteri

B. Pendahuluan

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.

1. Teknik Pengambilan Sampel

Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel.

a. 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.

b. 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.

2. Isolasi Dengan Cara Pengenceran (*Dilution*)

a. Teknik Preparasi Suspensi Sampel

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 :

- 1) *Swab* (ulas), dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang

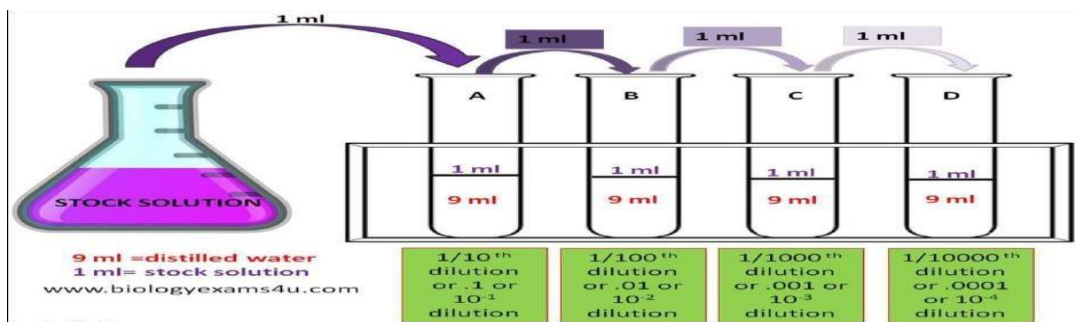


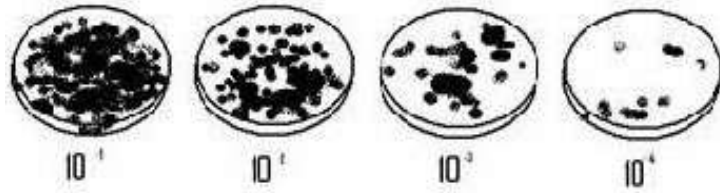
memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal *pepton water*.

- 2) *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*.
- 3) *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 antara lain bakso, biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi.

b. 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 mikroorganisma dari pengenceran sebelumnya.





Gambar 6 Teknik pengenceran sampel bertingkat

c. Teknik Kultur

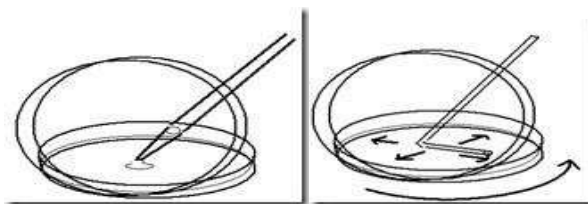
1) Teknik kultur dari suspensi sampel

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 (cawan sebar)**

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 (spreader) diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menggosokannya 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 mikroorganisme dapat mati karena panas.



Gambar. Skema Spread Plate

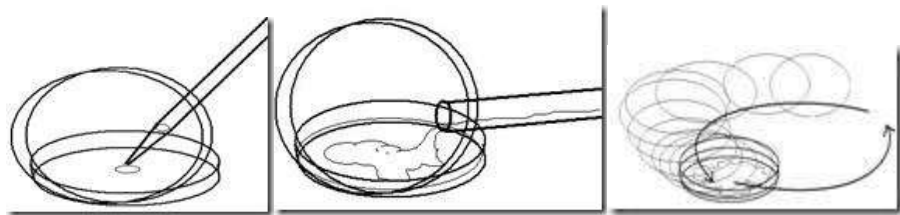


b) *Pour Plate* (cawan tuang)

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 O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen.

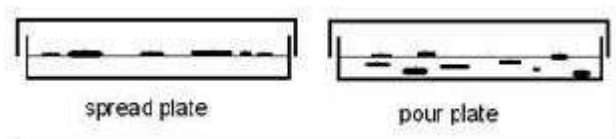
Prosedur kerja :

- 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 kedalam cawan kosong
- Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi.



Gambar. Skema *Pour Plate*

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*.

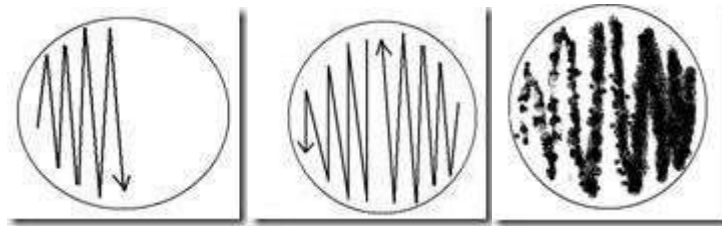
2) Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

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



a) Goresan Sinambung

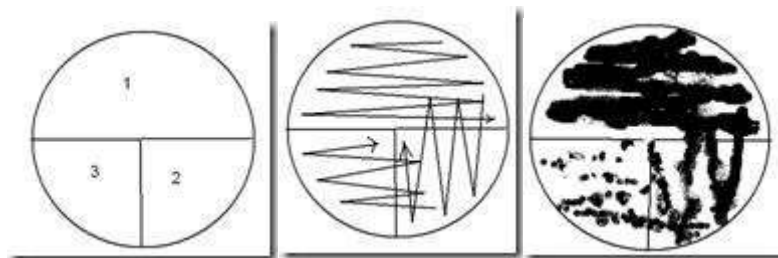
- Sentuhkan inokulum loop pada koloni dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar.
- Jangan pijarkan loop, lalu putar cawan 180°C lanjutkan goresan sampai habis.
- Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium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



Gambar . Skema gores sinambung

b) Goresan T

- 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



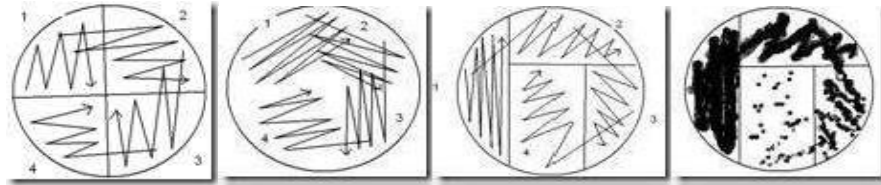
Gambar . Skema Gores T

c) Goresan Kuadran (*Streak quadrant*)

Caranya hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganisma. Goresan



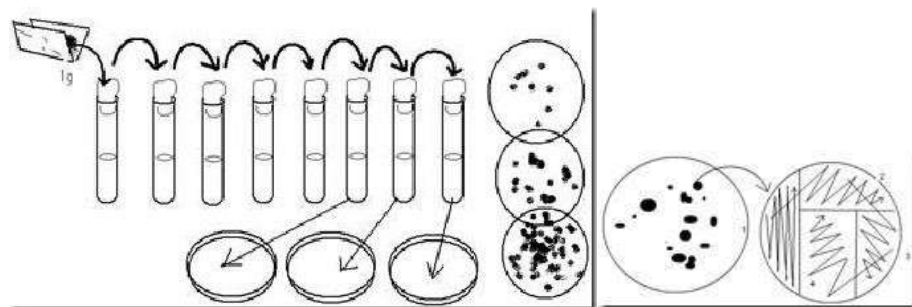
selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.



Gambar . Skema Gores Kuadran

3. Teknik 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.



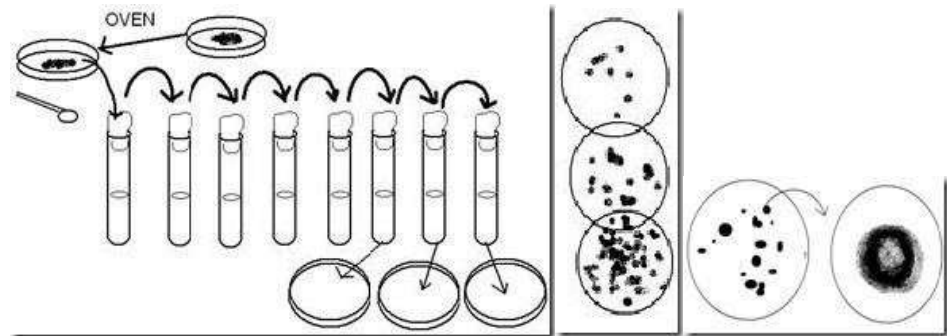
Gambar. Skema isolasi Bakteri

4. Cara 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



- c. Tiga pengenceran terakhir diambil untuk ditanama secara *spread plate* ke media PDA yang ditambah *streptomycin* atau *penicillin*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari
- d. Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada medium PDA baru,
- e. Inkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.



C. Alat dan Bahan

1. Alat

No	Bahan	Jumlah
1	Laminar	-
2	Cawan Petri	5
3	Tabung Reaksi	15
4	Jarum Ose	1
5	Spreader	1
6	Bunsen	1

2. Bahan

No	Alat	Jumlah
1	Air Sumur atau sungai / Tanah	1 ml / 1gr
2	Media NA	1000 ml
3	Larutan NaCl 0,9%	



D. Cara Kerja

Preparasi sampel

1. Siapkan sampel yang akan diisolasi bakteri, misalnya: swab lidah, air sumur/kran, air kolam.
2. Suspensikan sampel dalam tabung reaksi steril yang berisi 9 ml NaCl 0,9% (pengenceran 10^{-1}) secara aseptis, selanjutnya disebut suspensi sampel.

Penanaman sampel dengan metode gores dan metode sebar

1. Ambil 1 ose suspensi sampel, lalu ditanam pada media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan metode penanaman goresan T (*Streak T*). Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
2. Ambil 0,1 ml suspensi sampel, lalu ditanam pada media MHA dengan metode penanaman sebar (*spread plate*). Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
3. Amati pertumbuhan bakteri dari hasil penanaman gores dengan hasil penanaman metode sebar

Isolasi bakteri dari koloni tunggal

1. Pilih koloni tunggal yang relatif terpisah dari koloni lain atau disebut dengan koloni tunggal
2. Ambil salah satu koloni tunggal dari kedua media tersebut pada no 5 dengan ose lalu goreskan masing-masing pada media MHA baru dengan teknik goresan sinambung. Selanjutnya, diinkubasi pada 37°C selama 1x24 jam
3. Amati keseragaman morfologi dari biakan dan terbentuknya koloni tunggal.
Dokumentasikan hasil praktikum isolasi bakteri.



TOPIK 5

PEMURNIAN BAKTERI

A. TUJUAN

1. Mahasiswa mampu memurnikan bakteri hasil dari isolasi

B. PENDAHULUAN

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai jenis. Di dalam mikroba dari berbagai habitat dapat diisolasi dan dimurnikan menjadi biakan murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat fisiologi, biokimiawi dan dapat diidentifikasi jenisnya. Pemurnian mikroba umumnya dilakukan dengan memindahkan mikroba dari biakan campuran ke media tumbuh yang baru.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- a. Biakan hasil isolasi
- b. LAF
- c. Cawan Petri
- d. Tabung reaksi
- e. Jarum Ose
- f. Bunsen

2. Bahan

- a. Kultur bakteri
- b. Media NA (Miring dan cawan)
- c. Alkohol 70%
- d. Spiritus

D. CARA KERJA

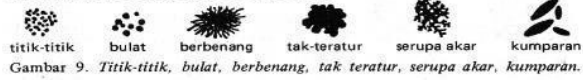
1. Ambil koloni menggunakan jarum Ose kemudian goreskan pada media NA dalam cawan Petri menggunakan teknik kuadran, T, atau sinambung
2. Goreskan pula pada media miring dengan cara menggerakkan jarum Ose yang



telah membawa koloni bakteri dari arah bawah tabung ke arah mulut tabung.

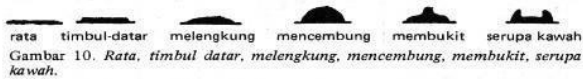
3. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar (28⁰C).
4. Amati hasil pemurnian yaitu bentuk, permukaan, tepi koloni, menggunakan panduan berikut :

1. Bentuk koloni; dilihat dari atas.



Gambar 9. Titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, kumparan.

2. Permukaan koloni, dilihat dari samping.



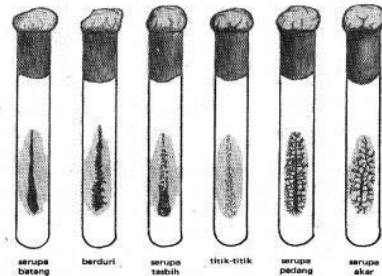
Gambar 10. Rata, timbul datar, melengkung, mencembung, membukit, serupa kawah.

3. Tepi koloni, dilihat dari atas.



Gambar 11. Utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.

4. Bentuk koloni pada agar-agar miring:



Gambar 12. Bentuk koloni serupa pedang, berduri, serupa tasbih, titik-titik, serupa batang, serupa akar.



TOPIK 6

TEKNIK PERHITUNGAN JUMLAH KOLONI

a. Tujuan

- Mahasiswa dapat melakukan menetapkan angka lempeng total (ALT) dengan cara

Total Plate Count

b. Teori

1. Penghitungan jumlah bakteri (enumerasi) hidup (tidak langsung)

a. *Plate Count* (hitungan cawan)

Metode *Plate count / viable count* didasarkan pada asumsi bahwa setiap sel mikroorganisme hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan lingkungan yang sesuai. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan merupakan perkiraan atau dugaan dari jumlah mikroorganisme dalam suspensi tersebut. Beberapa istilah untuk menggambarkan konsentrasi total mikroorganisme dalam sampel adalah APC (*Aerobic Plate Count*), TPC (*Total Plate Count*), SPC (*Standard Plate Count*), TVC (*Total Viable Count*), TAC (*Total Aerobic Count*), atau ALT (Angka Lempeng Total)

Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung membentuk kelompok atau berantai. Berdasarkan hal tersebut digunakan istilah *Coloni Forming Units* (CFU) per ml. koloni yang tumbuh berasal dari suspensi yang diperoleh menggunakan pengenceran bertingkat dari sebuah sampel yang ingin diketahui jumlah bakterinya.

1) Prosedur kerja metode *Plate Count*.

- Lakukan preparasi suspensi kepada sampel terlebih dahulu (swab, maserasi dan rinse) (jika perlu).

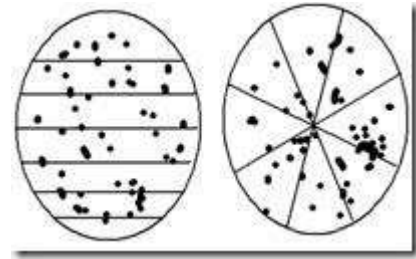


- Masukkan sampel ke tabung berisi 9 ml akuades untuk pengenceran pertama, selanjutnya diencerkan sampai tingkat pengenceran (misalnya sampai 10⁻⁸) tertentu.

- Dari 3 pengenceran terakhir diplating (ditanam) ke media NA (*Nutrient Agar*) atau PCA (*Plate Count Agar*) sebanyak dua kali tiap pengenceran (duplo). Plating dapat secara *Spread Plate* atau *Pour Plate*. Jika secara *Spread Plate*, dapat digunakan batang L atau glass beads.

- Inkubasi pada suhu 30° C selama 1-2 x 24 jam.

- Setelah tumbuh, koloni dihitung.



2) Penghitungan jumlah koloni

Penghitungan koloni pada cawan sebaiknya dibuat transek atau dibagi-bagi jika koloni yang tumbuh terlalu banyak. Transek dibuat dengan spidol/marker di bagian bawah cawan petri. Pola transek dapat dibuat bervariasi, tergantung kebutuhan. Penghitungan akan lebih mudah bila memakai *Colony Counter*.

Syarat koloni yang ditentukan untuk dihitung adalah sebagai berikut :

- Satu koloni dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni.
- Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni.
- Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni.
- Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah luas cawan) tidak dihitung
- Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni.



- 3). Cara menghitung konsentrasi sel mikroorganisme (CFU per ml) :

CFU / ml = jumlah koloni X faktor pengenceran

Misal : penanaman dilakukan sebanyak 0,1 ml sampel dari





tabung pengenceran 10^{-6} dengan metode *Spread Plate* dan *Pour Plate*.

Pada metode *Spread plate* (volume sampel 0,1 ml) :

Faktor pengenceran (Fp) =

$1/10^{-6} = 10^6$ Misal, jumlah

koloni = 50

Berarti konsentrasi sel = 50×10^6 CFU/0,1 ml

$$= 5 \times 10^8 \text{ CFU /ml}$$

Pada metode *Pour plate* (volume sampel 1 ml) :

Berarti konsentrasi sel = 50×10^6 CFU/1 ml

$$= 5 \times 10^7 \text{ CFU /ml}$$

- 4) Persyaratan dalam perhitungan konsentrasi sel mikroorganisme pada metode SPC

Koloni yang dipilih untuk dihitung menggunakan cara SPC memiliki syarat khusus berdasarkan statistic untuk memperkecil kesalahan dalam perhitungan. Perhitungan mengacu kepada standar atau peraturan yang telah ditentukan.

Syarat-syarat perhitungan pada SPC sebagai berikut :

- Pilih cawan yang ditumbuhi koloni dengan jumlah 30-300 koloni.
 - > 300 = TNTC (*Too Numerous To Count*) atau TBUD (Terlalu Banyak Untuk Dihitung).
 - < 30 = TFTC (*Too Few To Count*).

10^{-2}	10^{-5}	10^{-4}	SPC	Keterangan
234	20	5	$2,3 \times 10^4$	28 dan 5 < 30
650	127	10	$1,3 \times 10^5$	650 > 300
TNTC	TNTC	195	2×10^6	TNTC > 300

- Jumlah koloni yang dilaporkan terdiri dari 2 digit yaitu angka satuan dan angka sepersepuluh yang dikalikan dengan kelipatan 10 (eksponensial), missal $2,3 \times 10^4$, bukan $2,34 \times 10^4$. pembulatan keatas dilakukan pada angka seperseratus yang sama atau lebih besar dari lima, missal $2,35 \times 10^4$ menjadi $2,4 \times 10^4$, atau $2,34 \times 10^4$ menjadi $2,3 \times 10^4$



- Bila jumlah koloni kurang dari 30 dari semua level pengenceran, maka SPC hanya dihitung berdasarkan jumlah koloni pada pengenceran terendah.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
15	1	0	$1,5 \times 10^3$	Semua <30

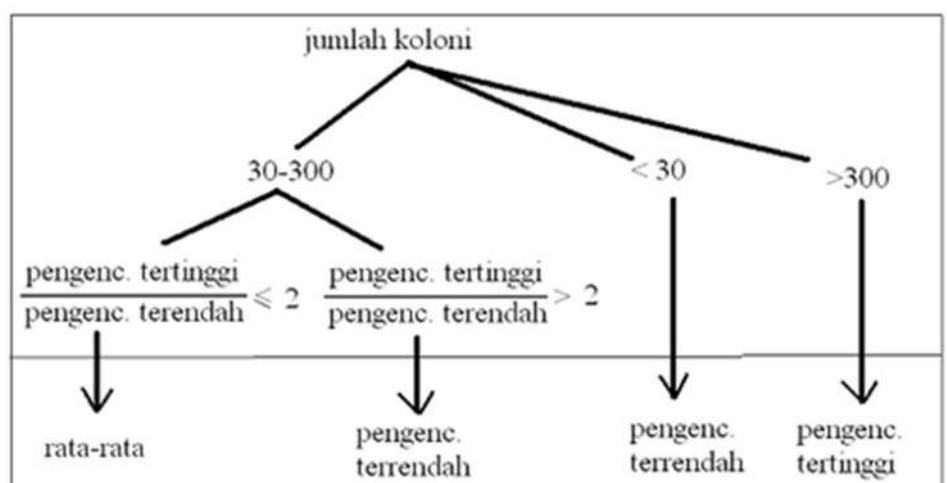
- Bila diperoleh perhitungan lebih dari 300 dari semua level pengenceran, maka SPC hanya dihitung berdasarkan jumlah koloni pada pengenceran tertinggi. Misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada $\frac{1}{4}$ bagian (transek) cawan kemudian hasilnya dikalikan empat. Hasil tersebut dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya faktor pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
TNTC	TNTC	358	$>3,0 \times 10^6$ ($3,6 \times 10^6$)	Pngc. trtgg (10^{-4})
TNTC	325	18	$>3,0 \times 10^5$ ($3,3 \times 10^5$)	Pngc. trtgg (10^{-3})

- Bila ada 2 cawan dengan level pengenceran yang berurutan memiliki jumlah koloni 30-300, maka perhitungan dilakukan berdasarkan hasil pembagian jumlah koloni pengenceran tertinggi dan terendah setelah masing-masing dikalikan faktor pengenceran. Bila hasil bagi ≤ 2 , maka SPC adalah nilai rata-ratanya. Jika hasil bagi > 2 maka SPC adalah hasil perhitungan dari pengenceran terendah.

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
295	40	5	$3,5 \times 10^4$	$40.000/29.500 < 2$
140	35	1	$1,4 \times 10^4$	$35.000/14.000 > 2$

- Apabila setiap pengenceran digunakan dua cawan Petri (duplo), maka jumlah angka yang digunakan adalah data dari kedua cawan, tidak boleh diambil salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat diantara 30-300. Data yang dilaporkan adalah rata-rata dari kedua cawan duplo tersebut.





Skema perhitungan jumlah koloni sel

metode SPC Contoh perhitungan SPC :

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	SPC	Keterangan
175 208	15 20	5 2	$(17.500+20.800)/2$ $= 1,9 \times 10^4$	15 dan 20 < 30
135 165	45 45	5 8	$= 1,5 \times 10^4$	$(135+165)/2=150$ $(45+45)/2=45$ maka $45.000/15.000=$ 3, >2 dilap. pengc. terendah
275 285	35 40	5 7	$(28.500+37.500)/2=$ 65.500 $6,6 \times 10^4$	$(275+285)/2=280$ $(35+40)/2=37,5$ maka $37500/28.000=$ 1,34, ?2 dilap. hasil rata- rata
290 305	25 28	5 0	$(29.000+30.000)/2 =$ 29.750 3×10^4	Rata-rata dari 10^{-2} meskipun $305 > 300$

b. Most Probable Number (MPN)

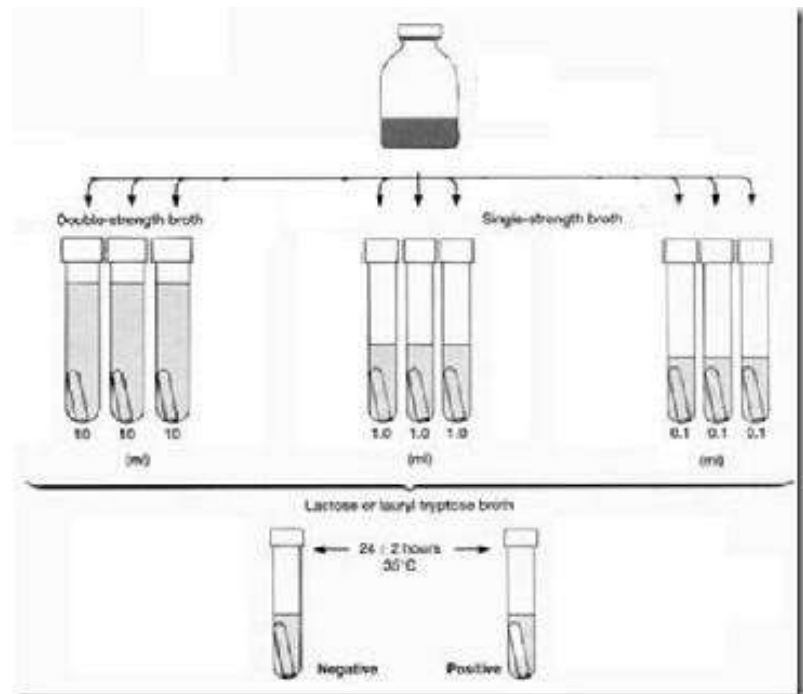
Pendekatan lain untuk enumerasi bakteri hidup adalah dengan metode MPN. MPN didasarkan pada metode statistik (teori kemungkinan). Metode MPN ini umumnya digunakan untuk menghitung jumlah bakteri pada air khususnya untuk mendeteksi adanya bakteri

koliform yang merupakan kontaminan utama sumber air minum. Ciri-ciri utamanya yaitu bakteri gram negatif, batang pendek, tidak membentuk spora, memfermentasi laktosa menjadi asam dan gas yang dideteksi dalam waktu 24 jam inkubasi pada 37° C. Sampel ditumbuhkan pada seri tabung sebanyak 3 atau 5 buah tabung untuk setiap kelompok. Apabila dipakai 3 tabung maka disebut seri 3, dan jika dipakai 5 tabung maka disebut 5 seri. Media pada tabung adalah *Lactose Broth* yang diberi indikator perubahan pH dan ditambah tabung Durham.



Pemberian sampel pada tiap seri tabung berbeda-beda. Untuk sampel sebanyak 10 ml ditumbuhkan pada media LBDS (*Lactose Broth Double Strength*) yang memiliki komposisi *Beef extract* (3 gr), *peptone* (5 gr), *lactose* (10 gr) dan *Bromthymol Blue* (0,2 %) per literinya. Untuk sampel 1 ml dan 0,1 ml dimasukkan pada media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*) yang berkomposisi sama tapi hanya kadar laktosa setengah dari LBDS yaitu 5 g.

Berdasar sifat coliform, maka bakteri ini dapat memfermentasikan laktosa menjadi asam dan gas yang dideteksi oleh berubahnya warna dan gas dalam tabung durham. Nilai MPN ditentukan dengan kombinasi jumlah tabung positif (asam dan gas) tiap serinya setelah diinkubasi.



Prosedur kerja metode MPN:

- Sediakan 3 tabung berisi LBDS (9 ml tiap tabung) dan 6 tabung berisi LBSS (9 ml tiap tabung) lengkap dengan tabung durham. Atur kesembilan tabung menjadi 3 seri (seperti di gambar).
- Kocok botol yang berisi air sampel.
- Pindahkan suspensi air sample sebanyak 10 ml ke masing-masing tabung seri pertama (3 tabung LBDS), secara aseptis.
- Pindahkan suspensi air sampel sebanyak 1 ml ke masing-masing tabung seri kedua (3 tabung LBSS), secara aseptis.
- Pindahkan suspensi air sampel sebanyak 1 ml ke masing-masing tabung seri ketiga (3 tabung LBSS), secara aseptis.

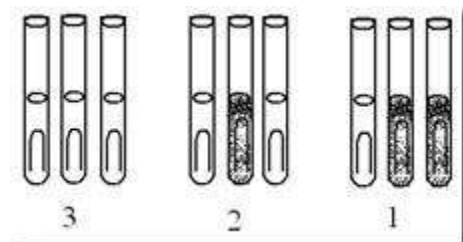


- Inkubasi semua tabung pada suhu 37° C selama 48 jam.
- Lihat tabung gas positif (asam dan gas ; harus ada keduanya), lalu hitung tabung positif untuk tiap seri. Tulis kombinasi tabung positif tiap seri (misal : 3 2 1). Kombinasi angka tersebut lalu dicocokkan dengan tabel MPN untuk seri 3 sehingga diperoleh jumlah mikroba sebenarnya.

nomor tabung yang positif			indeks MPN per 100 ml	95% batas kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		terendah	tertinggi
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	2	0	120	30	380
3	2	1	93	15	380
3	2	2	150	30	440
3	3	0	210	35	470
3	3	1	240	36	1300
3	3	2	460	71	2400
3	3	3	1100	150	4800

Misal :

didapatkan kombinasi jumlah tabung positif :
321 maka jumlah bakteri *coliform* adalah 150 sel/100 ml.



2. Penghitungan jumlah bakteri secara keseluruhan (langsung)

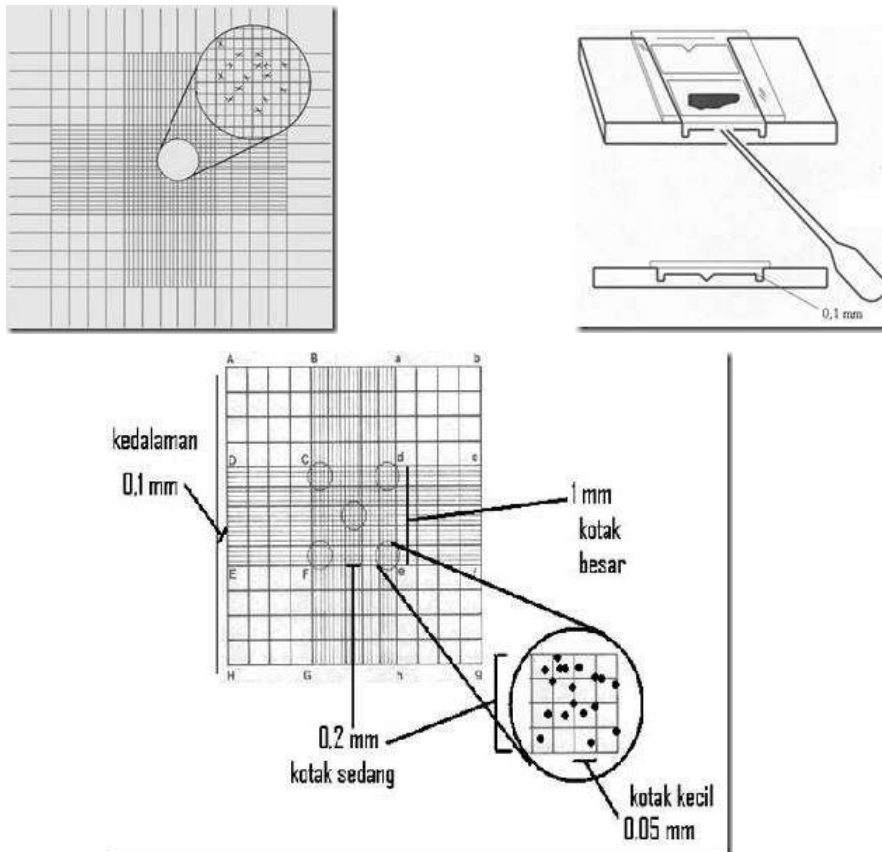
Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang



digunakan adalah

Petroff-Hauser Chamber atau *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu.

Ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel nakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.



Volume kotak sedang = panjang x lebar x tinggi

$$= 0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$$

Misalnya diperoleh ada 20 sel dalam satu

kotak sedang maka jumlah sel keseluruhan =

jumlah sel / 4×10^{-6} ml

$$= \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5 = 20 \times 2,5 \times 10^5$$



$$= 5 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

- Prosedur penghitungan sel
- Bersihkan Petroff-Hauser Counting Chamber atau Haemocytometer dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tissue.
- Letakkan cover glass di atas alat hitung.
- Tambahkan $\pm 50 \mu\text{l}$ suspensi sel yeast (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
- Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
- Letakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
- Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10.
- Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

c. Alat dan Bahan

1. Alat :

Spiritus, cawan petri, pipet ukur, tabung reaksi (iwaki pyrex), *beaker glass* (iwaki pyrex) rak tabung reaksi, mikropipet (biohit proline), *yellow tip* (gilson), *blue tip* (gilson), *spreader*, inkubator (heraus) dengan suhu 37°C, oven, autoklaf.

2. Bahan :

Sampel (dapat sampel cairan atau sampel padat yang akan dihitung jumlah mikroanya), NaCl 0,9 % b/v sebagai pengencer. Media PCA (Plate Count Agar).

d. Cara Kerja



1. Diambil sampel cair dengan volume tertentu (0,5 ml). untuk sampel padat ditimbang 0,5 gram sampel.
2. Masukkan sampel ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 4,5 ml NaCl 0,9 % steril (pengenceran 1:10). Kocok homogen
3. Dilakukan pengenceran 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 dengan NaCl 0,9 % steril.
4. Diambil 100 μ l tuangkan pada media PCA untuk masing-masing pengenceran. Kemudian diratakan dengan menggunakan spreader (metode cawan sebar).
5. Diinkubasi pada suhu 37 C selama 18-24 jam.
6. Dihitung jumlah koloni bakteri pada masing-masing petri pada berbagai pengenceran.
7. Hitunglah jumlah mikrba dalam sampel tersebut dengan metode SPC (CFU/ml untuk sampel cair dan CFU/g untuk sampel padat).



TOPIK 7 KARAKTERISASI BAKTERI

A. TUJUAN

1. Mahasiswa mampu menjelaskan bentuk-bentuk bakteri
2. Mahasiswa mampu melakukan karakterisasi bakteri berdasarkan sifat gram
3. Mahasiswa mampu membedakan jenis bakteri gram (+) dan gram (-)

B. PENDAHULUAN

Bakteri merupakan salah satu kelompok mikroba yang memperbanyak diri secara biner atau binary fussion, mempunyai bentuk dasar basil, kokus, spiral dengan bentuk variasinya seperti diplobasil, streptobasil, diplokokus, streptokokus dan lainnya. Morfologi bakteri juga menjadi salah satu karakteristik atau ciri yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri.

Mikroba merupakan organisme yang mempunyai sifat fisiologi dan biokimia tertentu di dalam metabolismenya. Kedua sifat tersebut dapat digunakan untuk identifikasi mikroba. Adapun beberapa sifat fisiologi dan biokimia yang umum dilakukan ialah uji Gram yang dilakukan menggunakan pewarnaan Gram dan KOH 3%, uji katalase, uji oksidase, uji oksidatif fermentatif, uji hidrolisa pati, uji hidrolisa gelatin, uji motilitas dan masih banyak yang lainnya.

Metode pengecatan ini ditemukan oleh Christian Gram pada tahun 1884. Dari sifat bakteri terhadap cat Gram, bakteri dapat digolongkan menjadi Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram tahan terhadap alkohol sehingga tetap mengikat cat pertama dan tidak mengikat cat kontras sehingga bakteri akan berwarna ungu. Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram tidak tahan alkohol sehingga warna cat yang pertama dilunturkan dan bakteri akan mengikat warna kontras tampak merah.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat
 - a. Jarum Ose
 - b. Mikroskop



- c. Botol semprot
 - d. Bunsen
 - e. Kaca preparat
 - f. Kaca Penutup
2. Bahan
- a. Biakan bakteri murni 24 jam
 - b. Alkohol 70%
 - c. Spiritus
 - d. Kristal violet (Gram A)
 - e. Larutan yodium (Gram B)
 - f. Alkohol/etanol 96% (Gram C)
 - g. Safranin (Gram D)
 - h. Air steril (aquades)

D. CARA KERJA

Pembuatan Preparat/Apusan Bakteri

1. Bahan diambil dengan ose steril dan digoreskan pada obyek gelas setipis mungkin. Panaskan obyek gelas di atas nyala api spiritus sambil disebar dengan jarum ose (jarak preparat sampai api spiritus, kira-kira 20 cm) sampai preparat tersebut kering (Fiksasi).

Pewarnaan Gram

1. Preparat yang telah siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit. Disini semua kuman yang pada pengecatan Gram dibedakan menjadi Gram positif dan negatif akan berwarna ungu sesuai dengan warna cat Gram A. setelah 1-3 menit cat dibuang, tanpa dicuci dengan air.
2. Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram B selama $\frac{1}{2}$ - 1 menit. Akibat pemberian Gram B maka pengikatan warna oleh bakteri menjadi lebih baik. Setelah itu cat dibuang dan preparat dicuci dengan air (leding).
3. Preparat kemudian ditetesi cat Gram C sampai warna cat tepat dilunturkan. Setelah pemberian cat Gram C maka akan terjadi :
 - a) Bakteri Gram positif : tahan terhadap alkohol (ikatan antara cacat dengan bakteri tidak dilunturkan oleh alkohol) sehingga bakteri akan tetap berwarna



ungu.

- b) Bakteri Gram negatif : tidak tahan terhadap alkohol, sehingga warna ungu dari cat dilunturkan dan bakteri menjadi tidak berwarna lagi.

4. Preparat digenangi dengan cat Gram D selama 1-2 menit Gram D berfungsi sebagai warna kontras. Akibat dari pemberian Gram D maka :

- a) Bakteri Gram positif oleh karena telah jenuh mengikat cat Gram A maka bakteri tidak mampu lagi untuk mengikat Gram D sehingga bakteri akan tetap berwarna ungu.
- b) Bakteri Gram negatif oleh karena warna cat yang sebelumnya telah dilunturkan oleh cat Gram C sehingga bakteri tidak berwarna lagi maka ia akan mengikat warna cat Gram D sehingga bakteri akan berwarna merah.

5. Setelah itu preparat dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar (dengan preparat dalam posisi miring) dan setelah itu diperiksa di bawah mikroskop dengan menggunakan pembesaran kuat.