

Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi

Drs. Lestanto Unggul Widodo, M.S.



PENDAHULUAN

Dalam melaksanakan Kegiatan Praktikum Modul 1 ini, Anda akan dikenalkan beberapa dasar dalam praktik mikrobiologi, antara lain: tata cara penggunaan mikroskop, macam-macam cara sterilisasi, dan teknik kerja aseptis. Selain itu, akan diperkenalkan juga tata cara pembuatan media pertumbuhan mikroba, dan akan diakhiri dengan kegiatan praktikum isolasi mikroba untuk mendapatkan kultur murni dengan berbagai media (kultur cair, agar miring/agar tegak, agar cawan, dan agar tuang).

Setelah melaksanakan kegiatan praktikum ini, Anda diharapkan dapat:

1. menyebutkan dan menggunakan alat-alat praktikum Mikrobiologi dengan baik dan benar;
2. melakukan sterilisasi dan bekerja secara aseptis;
3. membuat berbagai media pertumbuhan mikroba; dan
4. memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapatkan kultur murni.

Agar pelaksanaan praktikum berjalan dengan lancar, terlebih dahulu Anda membaca teori Buku Materi Pokok/BMP (modul) Mikrobiologi (BIOL4223) yang berkaitan dengan praktikum ini. Sebelum Anda melakukan pemeriksaan terhadap bakteri, khamir, dan kapang, berikut ini akan dijelaskan kembali tata cara penggunaan mikroskop.

KEGIATAN PRAKTIKUM 1

Pengenalan Alat

Sebelum Anda melangkah ke kegiatan praktikum yang lebih jauh maka yang pertama kali harus Anda kenali adalah alat-alat yang digunakan beserta fungsinya masing-masing. Berikut ini adalah alat-alat yang umum digunakan di laboratorium Mikrobiologi.

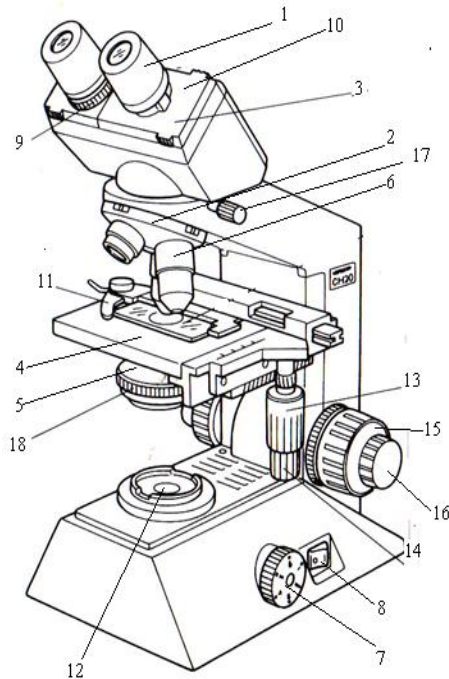
A. ALAT-ALAT ELEKTRIK**1. Mikroskop Cahaya**

Salah satu alat untuk melihat sel mikroba adalah mikroskop cahaya. Dengan mikroskop dapat diamati sel bakteri yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Pada umumnya, mata tidak mampu membedakan benda dengan diameter lebih kecil dari 0,1 mm. Berikut merupakan uraian tentang cara penggunaan, bagian-bagian, dan spesifikasi mikroskop cahaya merek Olympus CH20, sebagai contoh model mikroskop pada praktikum ini (Gambar 1.1).

a. Bagian-bagian mikroskop:

- 1) *Eye piece/oculars* (lensa okuler), untuk memper-besar bayangan yang dibentuk lensa objektif.
- 2) *Revolving nosepiece* (pemutar lensa objektif), untuk memutar objektif sehingga mengubah perbesaran.
- 3) *Observation tube* (tabung pengamatan/tabung okuler)
- 4) *Stage* (meja benda), untuk menempatkan spesimen.
- 5) *Condenser* (condenser), untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif.
- 6) *Objective lense* (lensa objektif), untuk memperbesar spesimen.
- 7) *Brightness adjustment knob* (pengatur kekuatan lampu), untuk memperbesar dan memperkecil cahaya lampu.
- 8) *Main switch* (tombol *on-off*).
- 9) *Diopter adjustmet ring* (cincin pengatur diopter), untuk menyamakan fokus antara mata kanan dan kiri.
- 10) *Interpupillar distance adjustment knob* (pengatur jarak interpupillar).

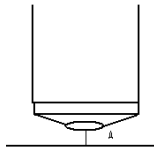
- 11) Spesimen holder (penjepit spesimen), untuk menjepit spesimen agar tidak bergerak/berubah tempat.
- 12) *Illuminator* (sumber cahaya).
- 13) *Vertical feed knob* (sekrup pengatur vertikal), untuk menaikkan atau menurunkan *object glass*.
- 14) *Horizontal feed knob* (sekrup pengatur horizontal), untuk menggeser ke kanan/kiri objek *glass*.
- 15) *Coarse focus knob* (sekrup fokus kasar), untuk menaikturunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat.
- 16) *Fine focus knob* (sekrup fokus halus), untuk menaikturunkan meja benda secara halus dan lambat.
- 17) *Observation tube securing knob* (sekrup pengencang tabung okuler).
- 18) *Condenser adjustment knob* (sekrup pengatur kondenser), untuk menaikturunkan kondenser.



Gambar 1.1.
Bagian-bagian Mikroskop

b. *Prosedur operasi*

- 1) Menyalakan lampu
 - a) Tekan tombol *on* (8).
 - b) Atur kekuatan lampu dengan memutar bagian (7).
- 2) Menempatkan spesimen pada meja benda
 - a) Letakkan *object glass* di atas meja benda (4) kemudian dijepit (11). Jika meja benda belum turun, diturunkan dengan sekrup kasar (15).
 - b) Cari bagian dari *object glass* yang terdapat preparat ulas (dicari dan diperkirakan memiliki gambar yang jelas) dengan memutar sekrup vertikal dan horizontal (13) dan (14).
- 3) Memfokuskan
 - a) Putar *Revolving nosepiece* (2) pada perbesaran objektif 4x lalu putar sekrup kasar (15) sehingga meja benda bergerak ke atas untuk mencari fokus.
 - b) Setelah fokus perbesaran 4×10 didapatkan maka putar (2) pada perbesaran selanjutnya, yaitu perbesaran objektif 10x, kemudian putar sekrup halus (16) untuk mendapatkan fokusnya.
 - c) Lakukan hal yang sama jika menggunakan perbesaran yang lebih tinggi (Gambar 1.2).



Gambar 1.2.
Jarak antar Spesimen dengan Lensa Objektif

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

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

Catatan:

Setelah mendapatkan fokus pada perbesaran tertentu, misal 40x dan ingin memutar objektif ke perbesaran 100x maka meja benda tidak perlu diturunkan dan tidak perlu khawatir bahwa lensa objektif akan

menggesek *cover glass* karena terdapat sisa jarak A yang lebih kecil antara *cover glass* dengan lensa objektif (lihat tabel di atas).

4) Tambahan

- a) Jika perlu *interpupillar distance adjustment knob* (10) dapat digeser, hal ini akan mengubah dua bayangan yang akan diterima oleh 2 mata menjadi gambar yang tunggal sehingga sangat membantu dalam mengatasi kelelahan mata.
- b) Jika perlu *diopter adjustment knob* (9) dapat diatur untuk memperoleh bayangan fokus yang seimbang antara mata kanan dan kiri.
- c) Pengaturan *condenser* (5) akan memperjelas bayangan yang tampak dengan *mensetting* pada posisi tertinggi (cahaya penuh).

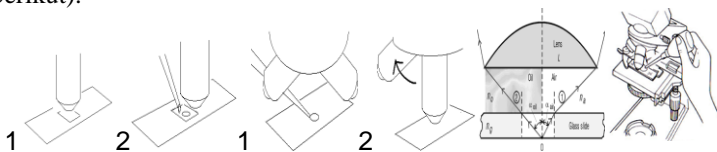
c. *Perbesaran total*

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

d. *Penggunaan minyak imersi*

Semakin kecil nilai daya pisah, akan semakin kuat kemampuan lensa untuk memisahkan dua titik yang berdekatan pada preparat sehingga struktur benda terlihat lebih jelas. Daya pisah dapat diperkuat dengan memperbesar indeks bias atau menggunakan cahaya yang memiliki panjang gelombang (λ) pendek. Biasanya dapat digunakan minyak imersi untuk meningkatkan indeks bias pada perbesaran 10×100 (Gambar 1.3).

- 1) Jika fokus pada perbesaran 10×40 telah didapatkan maka putar ke perbesaran objektif 100x.
- 2) Tetesi minyak imersi 1-2 tetes dari sisi lensa.
- 3) Jika telah selesai menggunakan mikroskop, lensa objektif 100x dibersihkan dengan kertas lensa yang dibasahi *xylol* (lihat Gambar berikut).

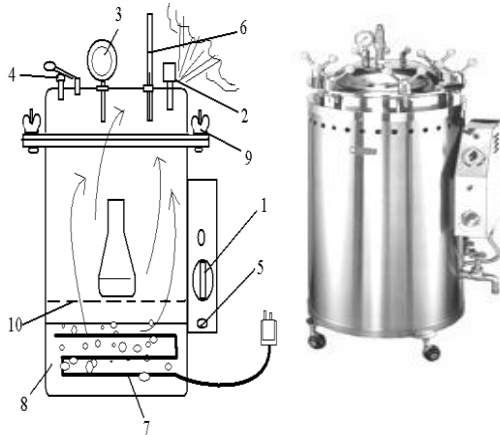


Gambar 1.3.
Prosedur Penggunaan Minyak Imersi

2. Autoklaf elektrik

Diagram autoklaf vertikal (Gambar 1.4.):

1. Tombol pengatur waktu mundur (*timer*)
2. Katup pengeluaran uap
3. Pengukur tekanan
4. Klep pengaman
5. Tombol *on-off*
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas
8. Aquades (dH_2O)
9. Sekrup pengaman
10. Batas penambahan air



Gambar 1.4.
Bagian-bagian Autoklaf

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi, tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi² (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121°C .

Cara penggunaan autoklaf yaitu sebagai berikut.

- a. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
- b. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol bertutup ulir maka tutup harus dikendurkan.
- c. Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
- d. Autoklaf dinyalakan, diatur *timer* dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C .
- e. Ditunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep

pengaman ditutup (dikencangkan) dan ditunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15 menit dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.

- f. Jika alarm tanda selesai berbunyi maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *preissure gauge* menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

3. Incubator

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroba pada suhu yang terkontrol. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu untuk inkubator produksi Heraeus B5042 misalnya, adalah 10-70°C (Gambar 1.5).



Gambar 1.5.
Inkubator

4. Hot Plate dan Stirrer Bar

Hot plate dan *Stirrer bar* (*magnetic stirrer*) berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (*plate*) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Pengadukan dengan bantuan batang magnet *Hot plate* dan *magnetic stirrer* seri SBS-100 dari SBS[®], misalnya mampu menghomogenkan sampai 10 L, dengan kecepatan sangat lambat sampai 1.600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425°C (Gambar 1.6).



Gambar 1.6.
Hot Plate dan *Stirrer Bar*

5. Colony Counter

Alat ini berguna untuk mempermudah penghitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan karena adanya kaca pembesar. Selain itu, alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni yang sangat banyak. Jumlah koloni pada

cawan Petri dapat ditandai dan dihitung secara otomatis yang dapat di-*reset* (Gambar 1.7).



Gambar 1.7.
Colony Counter

6. Biological Safety Cabinet (BSC)

BSC atau dapat juga disebut *Laminar Air Flow* (LAF) adalah alat yang berguna untuk bekerja secara aseptis karena BSC mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga menjadi steril dan aplikasi sinar UV beberapa jam sebelum digunakan. Contoh model BSC yang digunakan adalah BSC seri 36212, Purifier™ dari LABCONCO (Gambar 1.8) dengan prosedur penggunaan sebagai berikut.



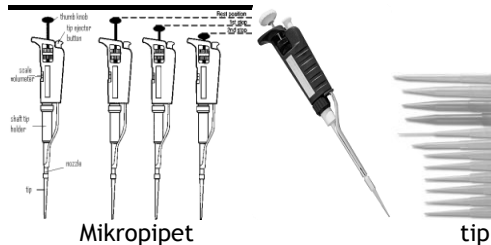
Gambar 1.8.
Laminar Air Flow

- Hidupkan lampu UV selama 2 jam, selanjutnya segera dimatikan sebelum mulai bekerja.
- Kaca penutup dipastikan terkunci dan pada posisi terendah.
- Lampu neon dan blower dinyalakan dan dibiarkan selama 5 menit.
- Tangan dan lengan dicuci dengan sabun gemisidal/alkohol 70%.
- Permukaan interior BSC diusap dengan alkohol 70% atau desinfektan yang cocok dan dibiarkan menguap.
- Alat dan bahan yang akan dikerjakan dimasukkan, jangan terlalu penuh (*overload*) karena memperbesar risiko kontaminan.
- Alat dan bahan yang telah dimasukkan ke BSC diatur sedemikian rupa sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril.
- Jangan menggunakan pembakar Bunsen dengan bahan bakar alkohol tetapi gunakan yang berbahan bakar gas.

- i. Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja.
- j. Setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan tidak keluar dari BSC.
- k. Permukaan interior BSC diusap dengan alkohol 70% dan dibiarkan menguap, kemudian tangan dibasuh dengan desinfektan.
- l. Lampu neon dan blower dimatikan.

7. Mikropipet

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1.000 μl . Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1-20 μl atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (*fixed volume pipette*) misalnya mikropipet 5 μl . Penggunaan mikropipet memerlukan tip (Gambar 1.9).



Gambar 1.9.
Mikropipet dan Tip

Cara penggunaan yaitu sebagai berikut.

- a. Sebelum digunakan *Thumb Knob* sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
- b. Tip bersih dimasukkan ke dalam *Nozzle*/ujung mikropipet.
- c. *Thumb Knob* ditekan sampai hambatan pertama/*first stop*, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
- d. Tip dimasukkan ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
- e. Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian tekanan dari *Thumb Knob* dilepaskan maka cairan akan masuk ke tip.
- f. Ujung tip dipindahkan ke tempat penampung yang diinginkan.

- g. *Thumb Knob* ditekan sampai hambatan kedua/*second stop* atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
- h. 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.

B. ALAT-ALAT GELAS DAN KERAMIK

1. Cawan Petri (*Petri Dish*)

Cawan petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroba. Media dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa digunakan berdiameter 15 cm dan dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml (Gambar 1.10).



Gambar 1.10.
Cawan Petri

2. Pipet Ukur (*Measuring Pipette*)

Pipet ukur merupakan alat untuk memindahkan larutan dengan volume yang diketahui. Tersedia berbagai macam ukuran kapasitas pipet ukur, di antaranya pipet berukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml. Cara penggunaannya adalah cairan disedot dengan pipet ukur dengan bantuan *filler* sampai dengan volume yang diinginkan. Volume yang dipindahkan dikeluarkan mengikuti skala yang tersedia (dilihat bahwa skala harus tepat sejajar dengan meniskus cekung cairan) dengan cara menyamakan tekanan *filler* dengan udara sekitar (Gambar 1.11).



Gambar 1.11.
Pipet Ukur

3. Pipet Tetes (*Pasteur Pippete*)

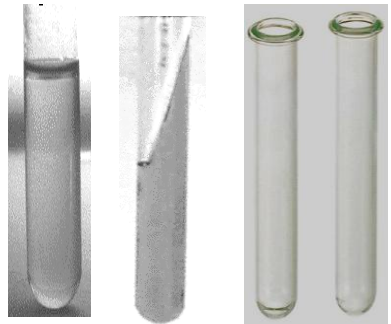
Fungsinya sama dengan pipet ukur, namun volume yang dipindahkan tidak diketahui. Salah satu penerapannya adalah dalam menambahkan HCl/NaOH saat mengatur pH media dan penambahan reagen dalam uji biokimia (Gambar 1.12).



Gambar 1.12.
Pipet Tetes

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

Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik, atau aluminium foil. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Pembuatan media agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media, yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar risiko kontaminasi. Media yang ditambahkan dalam pembuatan agar miring cukup berkisar 10-12 ml tiap tabung, agar lebih efisien (Gambar 1.13).



Gambar 1.13.
Tabung Reaksi

5. Labu Erlenmeyer (*Erlenmeyer Flask*)

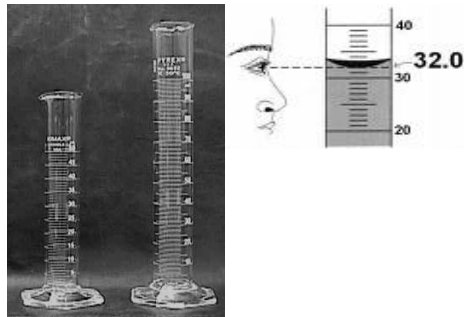
Labu Erlenmeyer berfungsi untuk menampung larutan, bahan, atau cairan (Gambar 1.14). Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, dan kultivasi mikroba dalam kultur cair. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya, yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, dan 1.000 ml.



Gambar 1.14.
Labu Erlenmeyer

6. Gelas Ukur (*Graduated Cylinder*)

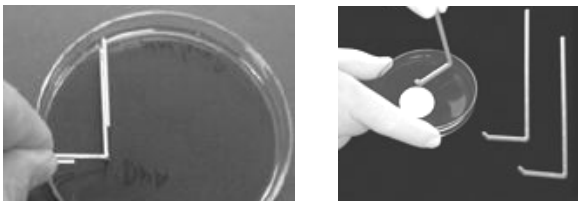
Berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu erlenmeyer. Gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan (Gambar 1.15).



Gambar 1.15.
Gelas Ukur

7. Batang L (*L Rod*)

Batang L bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut *spreader* (Gambar 1.16).



Gambar 1.16.
Batang L

8. Mortar dan *Pestle*

Mortar dan penumbuk (*pestle*) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut (Gambar 1.17).



Gambar 1.17.
Mortar dan Pestle

9. Beaker Glass

Beaker glass merupakan alat yang memiliki banyak fungsi. Di dalam mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media media, menampung akuades, dan sebagainya (Gambar 1.18).



Gambar 1.18.
Beaker Glass

10. Pembakar Bunsen (*Bunsen Burner*)

Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar bunsen. Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya dalam sterilisasi jarum ose atau yang lain adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Perubahan bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas atau metanol (Gambar 1.19).



Gambar 1.19.
Pembakar Bunsen

11. Tabung Durham

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

C. ALAT-ALAT NON-GELAS

1. Jarum Inokulum

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nichrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) dan disebut ose atau *inoculating loop/transfer loop*, dan yang berbentuk lurus disebut *inoculating needle/transfer needle*. *Inoculating loop* cocok untuk melakukan *streak* di permukaan agar, sedangkan *inoculating needle* cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*). Jarum inokulum ini akan sangat bermanfaat saat membelah agar untuk preparasi *Heinrich's Slide Culture* (Gambar 1.20).



Gambar 1.20.
Jarum Inokulum

2. Pinset

Pinset memiliki banyak fungsi, di antaranya untuk mengambil benda dengan menjepit, misalnya saat memindahkan cakram antibiotik (Gambar 1.21).



Gambar 1.21.
Pinset

3. pH Indikator Universal

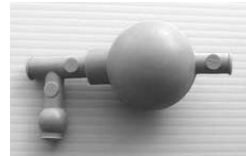
Kegunaan pH ini untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna, kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan (Gambar 1.22).



Gambar 1.22.
pH Indikator Universal

4. Pipet Filler/Rubber Bulb

Filler adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan *filler* merupakan karet yang resisten bahan kimia. *Filler* memiliki 3 saluran, yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (*aspirate*) berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (*suction*) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (*exhaust*) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur (Gambar 1.23).



Gambar 1.23.
Pipet Filler



LATIHAN

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Apakah fungsi dari penggunaan minyak imersi saat mengamati objek di bawah mikroskop?
- 2) Sebutkan beberapa alat elektrik beserta fungsinya masing-masing!
- 3) Sebutkan beberapa alat gelas dan fungsinya masing-masing!
- 4) Sebutkan beberapa alat non-gelas beserta fungsinya masing-masing!
- 5) Jelaskan fungsi tabung Durham!

Petunjuk Jawaban Latihan

Baca kembali uraian teori di atas dan cermati tentang penggunaan dan fungsi mikroskop cahaya, berbagai macam alat elektrik, serta alat-alat gelas dan non-gelas yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi.



RANGKUMAN

Kegiatan praktikum ini dimulai dengan acara pengenalan alat beserta fungsinya yang dibagi dalam tiga kelompok, yaitu alat-alat elektrik, alat-alat gelas dan keramik, serta alat-alat non-gelas. Masing-masing alat memiliki komponen penyusun yang khusus dibuat sesuai

dengan tujuan (kegunaan) sehingga dalam praktik mikrobiologi selanjutnya semua alat dapat dipakai sesuai fungsi dengan tepat.



TES FORMATIF 1 _____

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Di dalam mikroskop yang berfungsi untuk memperbesar spesimen sehingga menghasilkan bayangan nyata adalah
 - A. condenser
 - B. okuler
 - C. lensa objektif
 - D. *resolving nosepiece*

- 2) Alat untuk memeram mikroba pada suhu tertentu adalah
 - A. *colony counter*
 - B. inkubator
 - C. *autoklaf*
 - D. *hot plate*

- 3) Berikut adalah alat non-gelas, *kecuali*
 - A. jarum ose
 - B. pinset
 - C. pembakar bunsen
 - D. pH indikator universal

- 4) Alat yang digunakan untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan dengan menggunakan uap air panas bertekanan adalah
 - A. autoklaf
 - B. *colony counter*
 - C. inkubator
 - D. BSC

- 5) Berikut adalah alat-alat yang terbuat dari bahan gelas
 - A. mikropipet
 - B. *hot plate*
 - C. *colony counter*
 - D. batang L

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali

80 - 89% = baik

70 - 79% = cukup

< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan Kegiatan Praktikum 2. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 1, terutama bagian yang belum dikuasai.

Praktikum

A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Alat, Bahan, dan Cara Kerja

- a. Alat
Semua alat gelas, elektrik, gelas, dan non-gelas.
- b. Bahan
Media agar atau cair atau bahan lainnya yang mendukung penjelasan penggunaan masing-masing alat tersebut.
- c. Cara kerja
 - 1) Semua alat yang diperlukan disiapkan dan dibagi dalam 3 kelompok, yaitu alat-alat elektrik, alat-alat gelas, dan alat-alat non-gelas.
 - 2) Tiap kelompok didampingi instruktur/asisten masing-masing yang bertugas memberikan penjelasan tentang komponen, fungsi, dan cara kerja dari tiap-tiap alat.

B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN PRAKTIKUM

1. Penulisan Laporan Praktikum

Laporan Praktikum berisikan seperti berikut.

- a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
- b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
- c. Alat, bahan, dan cara kerja: berisikan alat dan bahan yang digunakan, serta prosedur yang dilakukan.
- d. Hasil dan pembahasan: berisikan hasil-hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil-hasil penelitian terdahulu.
- e. Kesimpulan.
- f. Daftar Pustaka.

2. Penyerahan Laporan

Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

KEGIATAN PRAKTIKUM 2

Sterilisasi

Salah satu tahapan penting yang harus dilakukan dan merupakan aturan standar selama melaksanakan praktikum atau kerja mikrobiologi adalah **sterilisasi**. Sterilisasi adalah proses atau kegiatan membebaskan suatu bahan atau benda dari semua bentuk kehidupan. Sterilisasi dapat dilakukan tergantung dari bahan atau alat yang akan disteril. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu sebagai berikut.

A. MACAM- MACAM STERILISASI

Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu cara mekanik, cara fisik, dan cara kimiawi.

1. Sterilisasi cara mekanik (filtrasi) menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22 mikron atau 0.45 mikron) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.
2. Sterilisasi secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran.
 - a. Pemanasan
 - 1) Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat pada api secara langsung, contoh alat: jarum inokulum (jarum ose), pinset, batang L.
 - 2) Panas kering: sterilisasi dengan oven kira-kira 60-180°C. Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca, misalnya erlenmeyer, tabung reaksi, cawan.
 - 3) Uap air panas: konsep ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi.
 - 4) Uap air panas bertekanan: menggunakan autoklaf.
 - b. Penyinaran dengan Ultra Violet (UV)

Sinar UV juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan interior *Safety Cabinet* dengan disinari lampu UV.

3. Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan, antara lain alkohol.

B. TEKNIK KERJA ASEPTIS

Apabila akan bekerja di atas meja maka persiapan yang harus dilakukan sebelum bekerja secara aseptis adalah mensterilkan tempat bekerja (meja). Caranya dengan menyemprotkan alkohol 70% di permukaan meja dan udara di sekitar meja secara merata. Kemudian bersihkan meja dengan menggunakan kapas/tisu dengan cara digosok satu arah saja. Setelah itu, letakkan alat dan bahan yang diperlukan di atas meja yang telah bersih. Semprot lagi semua permukaan alat dengan alkohol, kemudian semprot kedua tangan hingga merata, diamkan hingga kering, dan siap bekerja secara aseptis.

Perlu diingat bahwa untuk mengurangi terjadinya kontaminasi maka harus selalu bekerja dekat dengan api dari pembakar bunsen. Apabila akan memindahkan biakan dari tabung reaksi atau erlenmeyer dan cawan petri ke tabung reaksi atau cawan petri lain, pastikan untuk membuka tutupnya dekat dengan api. Sebelum menutup kembali, mulut tabung reaksi dan erlenmeyer dibakar terlebih dahulu. Begitu pula setelah menutup cawan petri, bibir cawan dibakar.

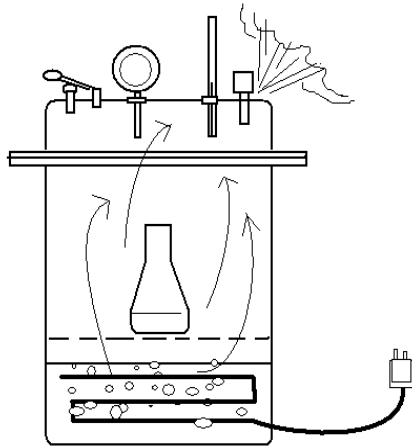
Jarum ose yang digunakan untuk memindahkan biakan, sebelum dan sesudah digunakan juga harus dibakar pada api bunsen. Apabila menggunakan pinset dan batang L maka sebelum dan setelah pemakaian dapat dicelupkan pada alkohol kemudian dibakar pada api bunsen.

C. PRINSIP KERJA STERILISASI MENGGUNAKAN AUTOKLAF

Seperti yang telah dijelaskan pada bahasan pengenalan alat, autoklaf adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang menggunakan tekanan 15 psi (2 atm) dan suhu 121°C. Suhu dan tekanan tinggi yang diberikan kepada alat dan media yang disterilisasi memberikan kekuatan yang lebih besar untuk membunuh sel dibanding dengan udara panas. Biasanya untuk mensterilkan media digunakan suhu 121°C dan tekanan 15 lb/in² (SI = 103,4 Kpa) selama 15 menit. Alasan digunakan suhu 121°C atau 249,8°F adalah karena air mendidih pada suhu tersebut jika digunakan tekanan 15 psi. Pada tekanan 0 psi dengan ketinggian di

permukaan laut (*sea level*) air mendidih pada suhu 100°C , sedangkan untuk autoklaf yang diletakkan di ketinggian sama, menggunakan tekanan 15 psi maka air akan mendidih pada suhu 121°C . Ingat kejadian ini hanya berlaku untuk sea level, jika di laboratorium terletak pada ketinggian tertentu maka pengaturan tekanan perlu *disetting* ulang. Misalnya autoklaf diletakkan pada ketinggian 2700 kaki dpl maka tekanan dinaikkan menjadi 20 psi supaya tercapai suhu 121°C untuk mendidihkan air. Semua bentuk kehidupan akan mati jika dididihkan pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

Pada saat sumber panas dinyalakan, air dalam autoklaf lama kelamaan akan mendidih dan uap air yang terbentuk mendesak udara yang mengisi autoklaf. Setelah semua udara dalam autoklaf diganti dengan uap air, katup uap/udara ditutup sehingga tekanan udara dalam autoklaf naik. Pada saat tercapai tekanan dan suhu yang sesuai, maka proses sterilisasi dimulai dan *timer* mulai menghitung waktu mundur. Setelah proses sterilisasi selesai, sumber panas dimatikan dan tekanan dibiarkan turun perlahan hingga mencapai 0 psi. Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekanan mencapai 0 psi (Gambar 1.24).



Gambar 1.24.
Proses Sterilisasi

Autoklaf bekerja dengan sempurna dapat dideteksi dengan menggunakan mikroba penguji yang bersifat termofilik dan memiliki endospora yaitu *Bacillus stearothermophilus*, lazimnya mikroba ini tersedia secara komersial dalam bentuk *spore strip*. Kertas *spore strip* ini dimasukkan dalam autoklaf dan disterilkan. Setelah proses sterilisasi lalu ditumbuhkan pada media. Jika media tetap bening maka menunjukkan autoklaf telah bekerja dengan baik.

Beberapa media atau bahan yang tidak disterilkan dengan autoklaf adalah sebagai berikut.

1. Bahan tidak tahan panas, seperti serum, vitamin, antibiotik, dan enzim.

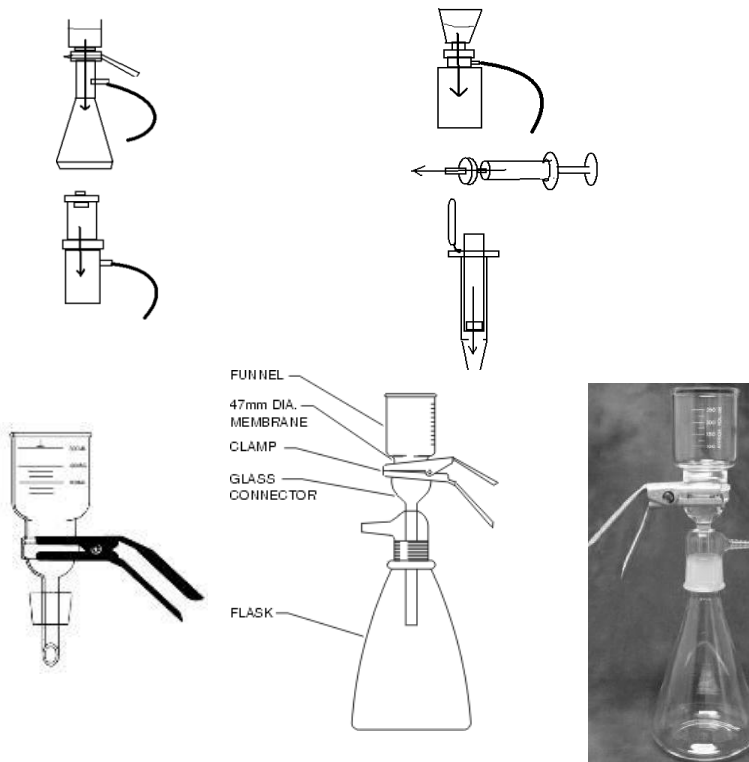
2. Pelarut organik, seperti fenol.
3. Buffer dengan kandungan detergen, seperti SDS.

D. STERILISASI DENGAN PENYARINGAN (FILTRASI)

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 (Gambar 1.25) yaitu sebagai berikut.

1. *Non-disposable filtration apparatus*
 - a. Disedot dengan pompa vakum
 - b. Volume 20-1.000 ml
2. *Disposable filter cup unit*
 - a. Disedot dengan pompa vakum
 - b. Volume 15-1.000 ml
3. *Disposable filtration unit* dengan botol penyimpanan
 - a. Disedot dengan pompa vakum
 - b. Volume 15-1.000 ml
4. *Syringe filters*
 - a. Ditekan seperti jarum suntik
 - b. Volume 1-20 ml
5. *Spin filters*
 - a. Ditekan dengan gaya setrifugasi
 - b. Volume kurang dari 1 ml



Gambar 1.25
Berbagai Alat Sterilisasi dengan Penyaringan

E. TYNDALISASI

Konsep kerja metode ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air dan tidak tahan tekanan atau suhu tinggi lebih tepat disterilkan dengan metode ini, misalnya susu yang disterilkan dengan suhu tinggi akan mengalami koagulasi dan bahan yang berpati disterilkan pada suhu bertekanan pada kondisi pH asam akan terhidrolisis.

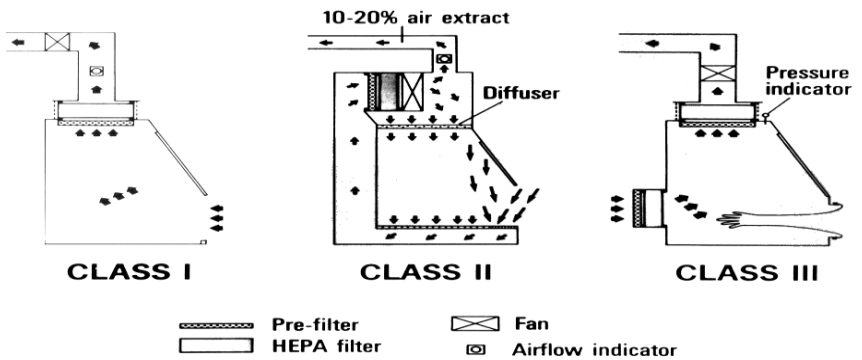
F. STERILISASI DENGAN UDARA PANAS

Sterilisasi dengan metode ini biasanya digunakan untuk peralatan gelas, seperti cawan petri, pipet ukur, dan labu erlenmyer. Alat gelas yang disterilisasi dengan udara panas tidak akan timbul kondensasi sehingga tidak ada tetes air (embun) di dalam alat gelas.

G. PRINSIP KERJA *BIOLOGICAL SAFERTY CABINET* (BSC)

BSC merupakan kabinet kerja yang disterilkan untuk kerja mikrobiologi. BSC memiliki suatu pengatur aliran udara yang menciptakan aliran udara kotor (dimungkinkan ada kontaminan) untuk disaring dan diresirkulasi melalui filter.

BSC juga disebut *biosafety hood*, dan juga dikenal dengan *Laminar flow hood* atau *Class II vertical flow cabinet* yang menyediakan alat filtrasi dan aliran udara yang bersirkulasi di dalam ruang kerja. Aliran udara diatur untuk menghambat udara luar masuk dan udara di dalam keluar, untuk mencegah kontaminasi dari luar dan pencemaran bakteri dari ruang BSC. Udara yang keluar disaring melewati penyaring sehingga sel-sel yang berbahaya tidak lepas keluar ke ruangan lain. BSC juga dilengkapi dengan lampu UV yang berfungsi sebagai pembunuh mikroba yang berada pada interior BSC (Gambar 1.26).



Gambar 1.26.
Prinsip Kerja BSC



LATIHAN

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Jelaskan pengertian dari sterilisasi!
- 2) Sebutkan jenis sterilisasi yang terbaik untuk digunakan!
- 3) Bagaimana prinsip kerja secara aseptis? Jelaskan!
- 4) Sebutkan beberapa cara sterilisasi dengan filtrasi!
- 5) Jelaskan bagaimana mekanisme kerja BSC!

Petunjuk Jawaban Latihan

Pelajari kembali uraian teori pada bagian yang relevan tentang pengertian sterilisasi, macam-macam cara sterilisasi suatu bahan atau alat, teknik kerja aseptis, sterilisasi dengan penyaringan, dan mekanisme kerja BSC.



RANGKUMAN

Sterilisasi yaitu proses atau kegiatan membebaskan suatu bahan atau benda dari semua bentuk kehidupan. Sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu cara mekanik, fisik, dan kimiawi. Sterilisasi cara mekanik, yaitu menggunakan penyaring (filtrasi), sedangkan cara fisik dapat dilakukan penyinaran dan pemanasan pada suhu dan lama waktu tertentu. Sterilisasi cara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan, antara lain menggunakan alkohol.



TES FORMATIF 2

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Bahan yang mengandung air dan tidak tahan tekanan atau suhu tinggi lebih tepat disterilkan dengan metode
 - A. filtrasi
 - B. uap air panas bertekanan
 - C. tyndalisasi
 - D. udara panas

- 2) Enzim, antibiotik, dan serum disterilkan menggunakan metode
 - A. tyndalisasi
 - B. filtrasi
 - C. uap panas
 - D. pemijaran

- 3) Sterilisasi menggunakan senyawa desinfektan termasuk sterilisasi cara....
 - A. biologis
 - B. fisik
 - C. mekanik
 - D. kimiawi

- 4) Salah satu proses yang dilakukan dalam sterilisasi fisik antara lain
 - A. filtrasi
 - B. penyinaran
 - C. desinfeksi
 - D. penyaringan

- 5) Berikut berbagai cara yang digunakan dalam sterilisasi dengan filtrasi, *kecuali*
 - A. *disposable filter cup unit*
 - B. *syringe filter*
 - C. *tyndalisasi*
 - D. *spin filter*

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 2.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali

80 - 89% = baik

70 - 79% = cukup

< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan Kegiatan Praktikum 3. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 2, terutama bagian yang belum dikuasai.

Praktikum

A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

1. Penggunaan Autoklaf

- a. Alat: Autoklaf elektrik.
- b. Bahan
 - 1) Media agar.
 - 2) Media cair.
- c. Cara Kerja

Prosedur kerja dilakukan seperti telah dijelaskan pada Kegiatan Praktikum 1 (Pengenalan Alat), yaitu pada bagian cara penggunaan autoklaf listrik.

2. Sterilisasi dengan Penyaringan (*Filtrasi*)

- a. Alat
 - 1) Saringan Bekerfeld, Chamberland, dan Zeitz.
 - 2) Kertas saring.
 - 3) Erlenmeyer.
 - 4) Pompa vakum.
 - 5) Ruang steril.
 - 6) Autoklaf.
- b. Bahan
 - 1) Ekstrak enzim.
 - 2) Media cair.
- c. Cara kerja menggunakan *non-disposable filtration apparatus*
 - 1) Saringan disterilkan (dapat menggunakan saringan Bekerfeld, Chamberland, dan Zeitz), dan membran penyaring (kertas saring) secara Tyndalisasi, sedangkan erlenmeyer menggunakan autoklaf.
 - 2) Alat-alat tersebut dipasang atau dirakit secara aseptis (sesuai gambar), kemudian corong diisi dengan larutan yang akan disterilkan. Praktikum ini dicontohkan menggunakan ekstrak enzim atau media cair.
 - 3) Katup erlenmeyer dihubungkan dengan pompa vakum kemudian pompa dihidupkan.
 - 4) Setelah semua larutan melewati membran filter dan tertampung di erlenmeyer maka larutan dapat dipindahkan ke dalam gelas

penampung lain yang sudah steril dan ditutup dengan kapas atau aluminium foil yang steril.

3. Tyndalisasi

a. Alat

- 1) Erlenmeyer.
- 2) Aluminium foil/ kapas.
- 3) *Arnold Steam Sterilizer* atau dandang.
- 4) Termometer (bila menggunakan dandang).

b. Bahan

- 1) Susu atau ekstrak buah dan sayur.
- 2) Media cair.

c. Cara kerja

- 1) Bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer atau botol dan ditutup rapat dengan sumbat atau aluminium foil.
- 2) Erlenmeyer/botol kemudian dimasukkan ke dalam alat sterilisasi (alat standar menggunakan *Arnold Steam Sterilizer*/dandang).
- 3) Sumber panas dinyalakan dan ditunggu hingga termometer menunjukkan suhu 100°C kemudian waktu dihitung mundur hingga 30 menit (uap panas yang terbentuk akan mematikan mikroba).
- 4) Setelah selesai, alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan.
- 5) Setelah 24 jam, bahan tersebut disterilkan lagi dengan cara yang sama, waktu ini dimaksudkan untuk memberi kesempatan spora atau sel vegetatif yang belum mati untuk tumbuh sehingga mudah dibunuh.

4. Sterilisasi dengan Udara Panas

a. Alat: Oven.

b. Bahan

- 1) Erlenmeyer.
- 2) Tabung reaksi.
- 3) Cawan petri.
- 4) Beaker glass.
- 5) Pipet.

c. Cara kerja

- 1) Alat-alat gelas dibungkus dengan kertas payung atau aluminium foil.
- 2) Pengatur suhu oven diatur menjadi 180°C dan alat disterilkan selama 2-3 jam.

5. *Biological Safety Cabinet (BSC)*

a. Alat

- 1) *Biological Safety Cabinet*.
- 2) Tisu atau kapas.

b. Bahan: Alkohol.

c. Cara kerja

Cara kerja dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah dijelaskan pada Kegiatan Praktikum 1 (Pengenalan Alat: BSC), yaitu pada bagian cara penggunaan BSC.

B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN

1. Penulisan laporan Praktikum

Laporan Praktikum berisikan:

- a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
 - b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
 - c. Alat, bahan, dan cara kerja: berisikan alat dan bahan yang digunakan, serta prosedur yang dilakukan.
 - d. Hasil dan pembahasan: berisikan hasil-hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil-hasil penelitian terdahulu.
 - e. Kesimpulan.
 - f. Daftar Pustaka.
- ### 2. Penyerahan Laporan
- Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

KEGIATAN PRAKTIKUM 3

Pembuatan Media

Medium pertumbuhan bakteri merupakan elemen penting dalam praktik mikrobiologi yang harus Anda ketahui karena dengan menggunakan media pertumbuhan maka dapat dipelajari aktivitas mikroba yang tumbuh di situ. Aktivitas mikroba akan mengakibatkan perubahan pada media pertumbuhan yang digunakan sehingga dapat dipelajari. Bahan-bahan media dapat berupa bahan-bahan yang sudah jadi, bahan-bahan asli, atau bahan alami. Pada dasarnya bahan-bahan untuk pembuatan media dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu bahan dasar, nutrisi, dan bahan tambahan.

A. PENGERTIAN DAN FUNGSI MEDIA PERTUMBUHAN

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

B. BAHAN-BAHAN MEDIA PERTUMBUHAN

1. Bahan Dasar

- a. Air (H_2O) sebagai pelarut.
- b. Agar-agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematid media. Agar sulit didegradasi oleh mikroba pada umumnya dan mencair pada suhu $45^{\circ}C$.
- c. Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding agar.
- d. *Silica gel*, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematid media. *Silica gel* khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroba autotrof obligat.

2. Nutrisi atau Zat Makanan

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

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

3. Bahan Tambahan

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke media dengan tujuan tertentu, misalnya *phenol red* (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba nontarget/kontaminan.

C. MACAM-MACAM MEDIA PERTUMBUHAN

1. Media berdasarkan Sifat Fisik

- a. Media padat, yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat.
- b. Media setengah padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan: 1) supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media, tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya, bakteri yang tumbuh pada media *Nitrogen free Bromthymol Blue* (NfB) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. 2) untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media *Nitrate Broth*, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat, tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata di seluruh media.
- c. Media cair, yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah *Nutrient Broth* (NB), *Lactose Broth* (LB).

2. Media berdasarkan Komposisi

- a. Media sintesis, yaitu media yang komposisi zat kimianya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya *Glucose Agar*, *Mac Conkey Agar*.
- b. Media semi sintesis, yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang mengandung agar, dekstrosa, dan ekstrak kentang. Bahan ekstrak kentang, tidak dapat diketahui secara detail tentang komposisi senyawa penyusunnya.
- c. Media nonsintesis, yaitu media yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya *Tomato Juice Agar*, *Brain Heart Infusion Agar*, *Pancreatic Extract*.

3. Media berdasarkan Tujuan

- a. Media untuk isolasi (media umum).
Media ini mengandung semua senyawa esensial untuk pertumbuhan mikroba, misalnya *Nutrient Broth*, *Blood Agar*.
- b. Media selektif/penghambat.
Media yang selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Contohnya, media Luria Bertani yang ditambah Amphisilin untuk merangsang *E. coli* resisten antibiotik dan menghambat kontaminan yang peka Amphisilin. *Salt broth* yang ditambah NaCl 4% untuk membunuh *Streptococcus agalactiae* yang toleran terhadap garam.
- c. Media diperkaya (*enrichment*).
Media diperkaya adalah media yang mengandung komponen dasar untuk pertumbuhan mikroba dan ditambah komponen kompleks, seperti darah, serum, dan kuning telur. Media diperkaya juga bersifat selektif untuk mikroba tertentu. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media ini tidak hanya membutuhkan nutrisi sederhana untuk berkembang biak, tetapi membutuhkan komponen kompleks, misalnya *Blood Tellurite Agar*, *Bile Agar*, *Serum Agar*.
- d. Media untuk peremajaan kultur.
- e. Media umum atau spesifik yang digunakan untuk peremajaan kultur.
- f. Media untuk menentukan kebutuhan nutrisi spesifik.

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

- g. Media untuk karakterisasi bakteri.

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

- h. Media diferensial.

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



LATIHAN

Kerjakanlah latihan berikut untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Jelaskan bahan-bahan dasar yang biasa digunakan dalam media pertumbuhan!
- 2) Mengapa agar-agar dipakai sebagai bahan dasar dalam media pertumbuhan mikroba?
- 3) Media berdasarkan sifat fisik dibagi menjadi berapa macam? Sebut dan jelaskan!
- 4) Sebutkan beberapa contoh media yang tergolong non-sintetis!
- 5) Apa yang dimaksud dengan media selektif?

Petunjuk Jawaban Latihan

Latihan soal tersebut dapat dijawab, apabila Anda mempelajari kembali uraian teori tentang jenis bahan media pertumbuhan dan macam-macam media pertumbuhan.

**RANGKUMAN**

Media pertumbuhan mikroba adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroba untuk pertumbuhannya. Bahan-bahan yang diperlukan untuk media pertumbuhan adalah bahan dasar, nutrisi, dan bahan tambahan. Media pertumbuhan dibagi tiga kelompok berdasarkan sifat fisik, komposisi, dan tujuan.

**TES FORMATIF 3**

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Fungsi asam amino dalam media pertumbuhan mikroba antara lain sebagai
 - A. sumber karbon
 - B. sumber nitrogen
 - C. sumber energi
 - D. sumber elektron

- 2) Media pertumbuhan mikroba yang mengandung agar-agar dengan konsentrasi 0,3-0,4% termasuk media
 - A. padat
 - B. sintetis
 - C. cair
 - D. setengah padat

- 3) Nutrient Agar (NA) dan Nutrient Broth (NB) termasuk contoh media pertumbuhan
 - A. media diperkaya
 - B. media diferensial
 - C. media umum
 - D. media selektif

- 4) Bahan dasar yang secara khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroba autotrof obligat adalah
 - A. agar-agar
 - B. silica gel
 - C. gelatin
 - D. *trace element*

- 5) Media yang ditambahkan dengan zat tertentu yang bertujuan untuk dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan adalah
- A. diperkaya
 - B. diferensial
 - C. selektif
 - D. isolasi

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 3 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 3.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali
80 - 89% = baik
70 - 79% = cukup
< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan Kegiatan Praktikum 4. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 3, terutama bagian yang belum dikuasai.

Praktikum

A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

1. Alat dan Bahan

a. Alat

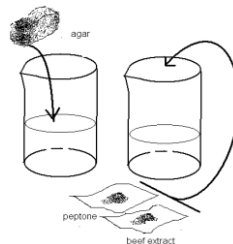
- | | |
|---|--------------------|
| 1) Timbangan analitik. | 7) Autoklaf. |
| 2) Gelas ukur. | 8) Cawan petri. |
| 3) Beaker glass. | 9) Tabung reaksi. |
| 4) Batang pengaduk. | 10) Pisau. |
| 5) <i>Hot plate</i> dan batang stirrer. | 11) Kertas saring. |
| 6) pH meter/pH indikator. | 12) Erlenmeyer. |

b. Bahan

- 1) Resep media sintetis NA.
- 2) Resep media sintetis PDA.

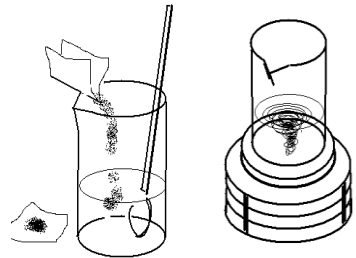
c. Cara Kerja Pembuatan NA

- 1) Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut.
 - a) Beef extract 3 g
 - b) Peptone 5 g
 - c) Agar 15 g
 - d) Akuades s.d 1000 ml
- 2) Akuades sebanyak 100 ml dibagi menjadi dua satu bagian untuk melarutkan *Beef extract* dan peptone dan sebagian lagi untuk melarutkan agar. Sebaiknya air untuk melarutkan agar jumlahnya lebih banyak.



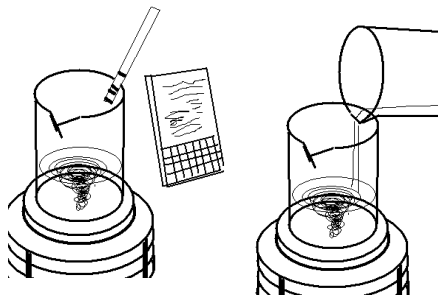
Gambar 1.27.
Proses Pelarutan Beef Extract dan Peptone

- 3) Agar dilarutkan pada sebagian air tersebut dengan mengaduk secara konstan sambil dipanaskan (Gambar 1.28). Dapat menggunakan kompor gas atau hot plate stirrer (jangan sampai *overheat* karena akan terbentuk busa dan memuai sehingga tumpah).



Gambar 1.28.
Proses Pelarutan dan Pemanasan Agar

- 4) Sementara itu sebagian akuades digunakan untuk melarutkan peptone dan *beef extract*, cukup dengan pengadukan.
- 5) Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen. Kemudian pH media diukur dengan mencelupkan kertas pH indikator. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH (Gambar 1.29).



Gambar 1.29.
Pengukuran pH Media

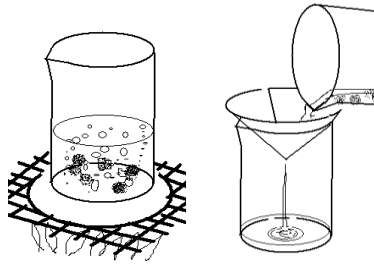
- 6) Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf.
- 7) Tuang media steril ke cawan petri steril secara aseptis. Jika diinginkan media tegak atau miring pada point ke-5, media langsung dituang ke tabung kemudian disterilisasi.

d. Cara Kerja Pembuatan Nutrient Broth (NB)

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

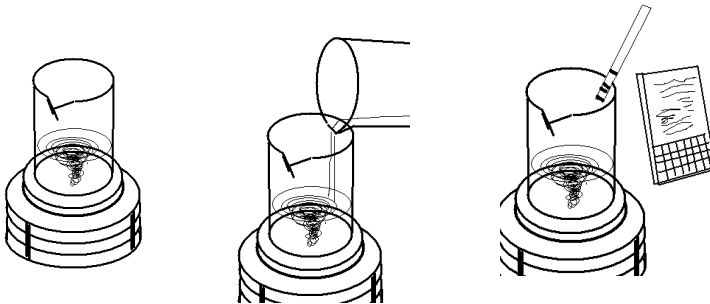
e. Cara Kerja Pembuatan Potato Dextrose Agar (PDA)

- 1) Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut.
 - a) Potato/kentang 3 g
 - b) *Peptone* 5 g
 - c) Agar 15 g
 - d) Akuades s.d 1.000 ml
 - e) Sebelum ditimbang, sebaiknya kentang dikupas dan diiris kecil-kecil.
- 2) Kentang direbus dalam sebagian akuades tadi selama 1-3 jam sampai lunak, kemudian diambil ekstraknya dengan menyaring dan memerasnya menggunakan kertas saring lalu ditampung di *beaker glass* baru (Gambar 1.30).



Gambar 1.30.
Perebusan dan Penyaringan

- 3) Agar dilarutkan dengan *Hot Plate Stirrer* dalam 50 ml akuades. Setelah larut dapat ditambahkan dekstrosa dan dihomogenkan lagi.
- 4) Setelah semua larut, ekstrak kentang dan agar-dekstrosa dicampur dan dihomogenkan. pH media diatur menjadi 5-6 dengan meneteskan HCl/NaOH (Gambar 1.31).



Gambar 1.31.
Pengukuran pH Media

- 5) Media dituang ke dalam erlenmeyer atau ke tabung reaksi kemudian siap untuk disterilisasi.

B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN

1. Penulisan laporan Praktikum, laporan praktikum berisikan:
 - a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
 - b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
 - c. Alat, bahan, dan cara kerja: berisikan alat dan bahan yang digunakan, serta prosedur yang dilakukan.
 - d. Hasil dan pembahasan: berisikan hasil-hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil-hasil penelitian terdahulu.
 - e. Kesimpulan.
 - f. Daftar Pustaka.
2. Penyerahan Laporan
Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

KEGIATAN PRAKTIKUM 4

Isolasi Mikroba

Pada lingkungan alami mikroba tidak hidup sendiri melainkan bersama-sama baik itu dari spesies yang berbeda maupun dari jenis makhluk hidup yang bukan kelompok mikroba. Jenis mikroba tersebut dapat diketahui, dengan melakukan pemisahan dari makhluk hidup lainnya, yang dikenal dengan istilah **isolasi**. Mikroba dapat diisolasi dari berbagai sumber, seperti tanah, air, makanan, minuman atau sumber lain (misalnya sumber air panas atau bahkan air bersuhu dingin). Adapun cara yang umum digunakan untuk isolasi adalah **cara suspensi**. Cara suspensi maksudnya adalah sampel mikroba yang telah diambil, dibuat suspensi baru kemudian suspensi itu ditumbuhkan pada media agar tertentu. Cara ini bertujuan agar pertumbuhan mikroba dari sampel pada saat ditumbuhkan pada media agar, tidak terlalu menumpuk (*crowded*).

Isolat murni dapat diperoleh, bila dilakukan isolasi secara bertahap menggunakan media yang tepat, misal: Nutrient Agar untuk bakteri dan Potato Dextrose Agar untuk mengisolasi khamir dan kapang. Setiap pertumbuhan koloni yang menunjukkan kenampakan berbeda harus ditumbuhkan ulang pada media agar baru dan dilakukan isolasi kembali (reisolasi).

A. PENGERTIAN ISOLASI

Isolasi adalah proses atau kegiatan memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapatkan kultur murni.

B. TEKNIK PENGAMBILAN SAMPEL

Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel. Berikut merupakan prosedur pengambilan sampel. Botol atau alat gelas lain yang digunakan untuk mengambil sampel hendaknya disterilkan lebih dahulu.

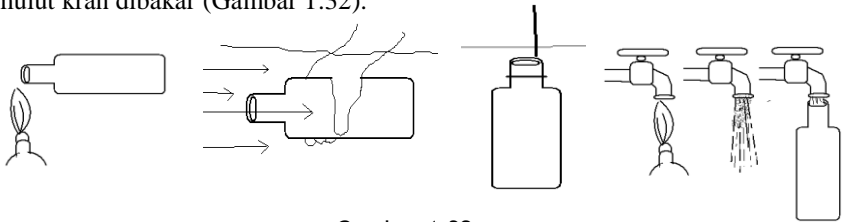
1. Sampel Tanah

Jika mikroba yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah maka cara pengambilannya disesuaikan dengan tujuan dan kebutuhan. Misalnya,

apabila yang diinginkan mikroba rhizosfer maka sampel diambil dari sekitar perakaran dekat permukaan hingga ujung perakaran.

2. Sampel Air

Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air. Apabila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan dengan tali, jika ingin mengambil sampel dari air kran maka sebelumnya kran dialirkan dulu beberapa saat dan mulut kran dibakar (Gambar 1.32).



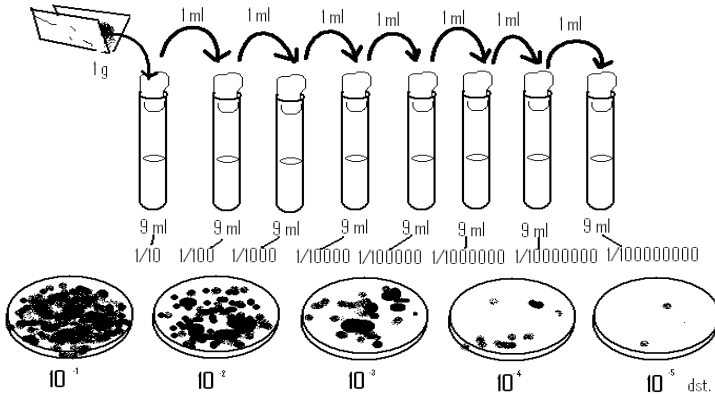
Gambar 1.32.
Pengambilan Sampel Air

C. ISOLASI DENGAN CARA PENGECERAN

1. Preparasi Suspensi

Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya.

2. Teknik Pengenceran Bertingkat (Gambar 1.33)



Gambar 1.33.
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, selanjutnya sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroba dari pengenceran sebelumnya.

3. Teknik Penanaman

a. Teknik penanaman dari suspensi

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

1) *Spread Plate* (agar tabur ulas)

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni.

2) *Pour Plate* (agar tuang)

Teknik ini menggunakan agar yang belum padat ($> 45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri 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 di permukaan agar yang kaya O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak begitu banyak mengandung oksigen.

b. Teknik penanaman dengan goresan (*streak*)

Bertujuan untuk mengisolasi mikroba dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam media baru.

- 1) Goresan Sinambung.
- 2) Goresan T.
- 3) Goresan Kuadran (*streak quadrant*).

**LATIHAN**

Kerjakanlah latihan berikut, untuk memperdalam pemahaman Anda terhadap materi di atas!

- 1) Apakah yang dimaksud dengan kultur murni?
- 2) Apakah tujuan dilakukan pengenceran bertingkat dalam isolasi mikroba?
- 3) Sebutkan beberapa cara yang dapat digunakan untuk mendapatkan koloni tunggal dari biakan campuran yang berbentuk suspensi!
- 4) Jelaskan bagaimana teknik pengambilan sampel air!
- 5) Bagaimana teknik penanaman kultur pada media *Pour Plate*?

Petunjuk Jawaban Latihan

Latihan soal tersebut di atas dapat dijawab, apabila Anda baca kembali tentang cara mengisolasi atau memecah mikroba dari campurannya serta teknik pengenceran untuk mempermudah mendapatkan jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan.



RANGKUMAN

Isolasi adalah proses memisahkan mikroba dari campurannya sehingga didapatkan kultur murni. Ada beberapa cara untuk melakukan pemurnian mikroba termasuk preparasinya, yaitu swab, rinse, dan maserasi yang dilanjutkan dengan teknik pengenceran bertingkat. Metode penanaman bakteri atau kapang pada media pertumbuhan dari sediaan berbentuk suspensi dapat menggunakan metode tuang (*pour plate*) dan metode sebar (*spread plate*). Teknik penanaman lanjutan pada proses isolasi yaitu metode goresan (*streak*) yang meliputi goresan sinambung, goresan T, dan goresan kuadran.



TES FORMATIF 4

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Beberapa cara/teknik penggoresan untuk mendapatkan kultur murni *kecuali*
 - A. goresan kuadran
 - B. goresan L
 - C. goresan T
 - D. goresan sinambung
- 2) Pada sampel yang berbentuk padat, sebelum isolasi, dapat dilakukan preparasi berupa
 - A. maseration
 - B. rinse
 - C. swab
 - D. penimbangan
- 3) Media Potato Dextrose Agar yang digunakan untuk mengisolasi kapang, ditambahkan bahan tertentu untuk mencegah pertumbuhan bakteri, yaitu
 - A. vitamin
 - B. *methyl red*
 - C. antibiotik
 - D. *phenol red A*
- 4) Proses pemisahan mikroba dari campurannya untuk mendapatkan kultur murni disebut
 - A. sterilisasi
 - B. tyndalisasi

- C. filtrasi
D. isolasi
- 5) Teknik penanaman mikroba agar diperoleh jenis mikroba yang memerlukan sedikit oksigen adalah
- A. *spread plate*
B. *streak quadrant*
C. *pour plate*
D. *streak T*

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 4 yang terdapat di bagian akhir modul ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Praktikum 4.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali

80 - 89% = baik

70 - 79% = cukup

< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan dengan modul selanjutnya. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Praktikum 4, terutama bagian yang belum dikuasai.

Praktikum

A. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

1. Preparasi Suspensi

a. Alat

- 1) *Cotton bud*.
- 2) *Beaker glass*.
- 3) Mortar.
- 4) Pestle.
- 5) Timbangan.

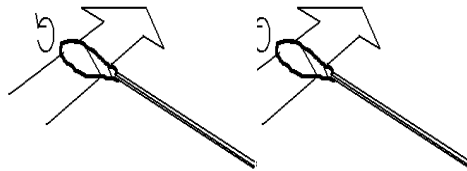
b. Bahan

- 1) Pepton water.
- 2) Alkohol 70%.
- 3) Daun tanaman (untuk metode bilas).
- 4) Akuades steril.
- 5) Bakso atau tanah (untuk metode penghancuran).
- 6) Permukaan meja kotor (untuk metode ulas).

c. Cara kerja

Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel:

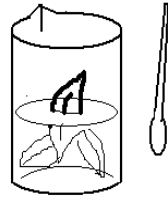
- a. *Swab* (ulas), dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut, contohnya meja, batu, batang kayu. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan, misal *pepton water* (Gambar 1.34).



Gambar 1.34.
Ulas dengan *Cotton Bud*

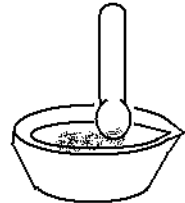
- b. *Rinse* (bilas) ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tetapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga. Rinse merupakan prosedur kerja dengan

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* (Gambar 1.35).



Gambar 1.35.
Rinse atau Pembilasan

- c. *Maseration* (pengancuran), sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada di permukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya, antara lain bakso, biji, buah. Perbandingan antarberat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1:9 (w/v). Sampel dari tanah tidak perlu dimaserasi (Gambar 1.36).



Gambar 1.36.
Maseration

2. Teknik Pengenceran Bertingkat

a. Alat

- 1) Tabung reaksi.
- 2) Beaker glass.
- 3) Cawan petri.

b. Bahan

- 1) Sampel (misalnya: tanah).
- 2) Media Nutrien Agar.
- 3) Akuades.
- 4) Pipet seukuran.

c. Cara kerja

- 1) Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan 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 akuades 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. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

3. Teknik Penanaman: *Spread Plate* (Agar Tabur Ulas)

a. Alat

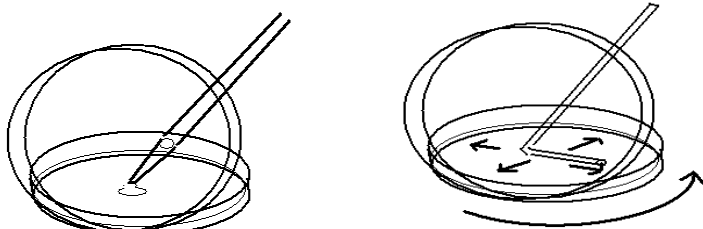
- 1) Pipet seukuran.
- 2) Cawan petri.
- 3) Batang L atau Drugalsky.
- 4) Bunsen.

b. Bahan

- 1) Media Nutrien Agar.
- 2) Alkohol.
- 3) Sampel hasil pengenceran dalam tabung reaksi.

c. Cara kerja

- 1) Sampel hasil pengenceran dalam tabung reaksi dan agar cawan disiapkan.
- 2) Suspensi cairan diambil sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian diteteskan di atas permukaan agar cawan.
- 3) Batang L atau batang drugalsky diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar di atas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- 4) Kemudian disebar dengan menggosokkannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar (Gambar 1.37).
- 5) Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroba dapat mati karena panas.



Gambar 1.37.
Teknik *Spread Plate*

4. Teknik Penanaman: *Pour Plate* (Agar Tuang)

a. Alat

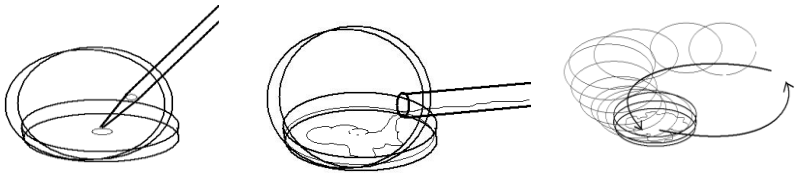
- 1) Cawan petri.
- 2) Tabung reaksi.
- 3) Pipet seukuran.
- 4) Bunsen.

b. Bahan

- 1) Media Nutrient Agar cair.
- 2) Alkohol 70%.
- 3) Sampel hasil pengenceran dalam tabung reaksi.

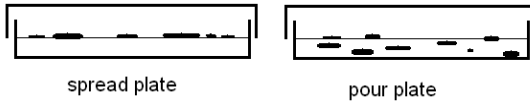
c. Cara kerja

- 1) Disiapkan cawan steril, sampel hasil pengenceran dalam tabung reaksi yang akan ditanam, dan media padat yang masih cair ($> 45^{\circ}\text{C}$).
- 2) Diteteskan 1 ml suspensi sel secara aseptis ke dalam cawan kosong steril.
- 3) Media yang masih cair dituangkan ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi (Gambar 1.38).



Gambar 1.38.
Teknik *Pour Plate*

Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk *spread plate* dan 1 ml untuk *pour plate* karena *spread plate* ditujukan untuk menumbuhkan di permukaannya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak daripada *spread plate* (Gambar 1.39).



Gambar 1.39.
Perbedaan Teknik *Spread* dan *Pour Plate*

5. Teknik Penanaman: Goresan Sinambung

a. Alat

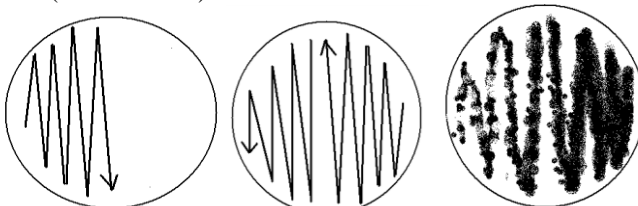
- 1) Jarum inokulasi (ose).
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.

b. Bahan

- 1) Media Nutrien Agar.
- 2) Isolat *Bacillus subtilis*.
- 3) Alkohol 70%.

c. Cara kerja

- 1) Jarum ose disentuhkan pada koloni dan gores secara kontinu sampai setengah permukaan agar.
- 2) Jangan pijarkan ose, lalu putar cawan 180° lanjutkan goresan sampai habis.
- 3) Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau media baru (Gambar 1.40).



Gambar 1.40.
Teknik Goresan Sinambung

6. Teknik Penanaman: Goresan T

a. Alat

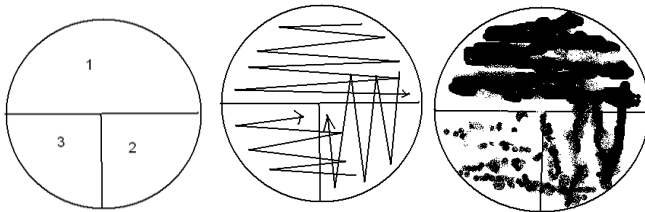
- 1) Jarum inokulasi (ose).
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.

b. Bahan

- 1) Media Nutrien Agar.
- 2) Isolat *Bacillus subtilis*.
- 3) Alkohol 70%.

c. Cara kerja

- 1) Cawan dibagi menjadi 3 daerah menggunakan spidol marker.
- 2) Daerah 1 diinokulasi dengan streak zig-zag.
- 3) Jarum inokulan dipanaskan dan tunggu dingin, kemudian streak zig-zag dilanjutkan pada daerah 2 (*streak* pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna.
- 4) Lakukan hal yang sama pada daerah 3 (Gambar 1.41).



Gambar 1.41.
Teknik Goresan T

7. Teknik Penanaman: Goresan Kuadran (*Streak Quadran*)

a. Alat

- 1) Jarum inokulasi (ose).
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.

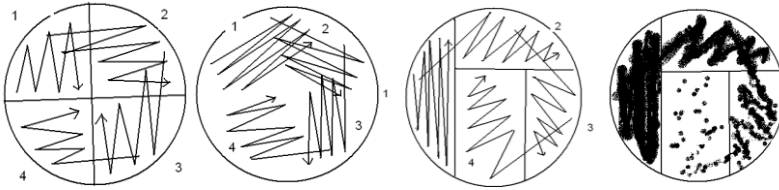
b. Bahan

- 1) Media Nutrien Agar.
- 2) Isolat *Bacillus subtilis*.
- 3) Alkohol 70%.

c. Cara kerja

Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat daerah. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga

masih mengandung banyak sel mikroba. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal (Gambar 1.42).



Gambar 1.42.
Teknik Goresan Kwadran

8. Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah

a. Alat

- 1) Pipet seukuran.
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.
- 4) Timbangan analitik.
- 5) Batang L atau Drugalsky.
- 6) Jarum inokulasi (ose).
- 7) Tabung reaksi.
- 8) Inkubator.

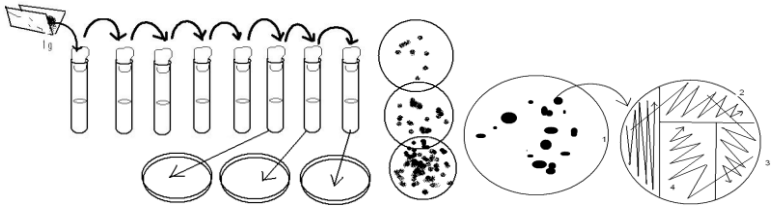
b. Bahan

- 1) Media Nutrien Agar.
- 2) Sampel dari tanah.
- 3) Alkohol 70%.
- 4) Akuades.

c. Cara kerja

- 1) Tanah seberat 1g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-8} .
- 2) Tiga pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara *spread plate* pada media NA, setelah selesai, diinkubasi pada 37°C selama 1×24 jam.

- 3) Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut kemudian dipilih koloni yang relatif terpisah dari koloni lain dan koloni yang mudah dikenali.
- 4) Koloni yang terpilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA baru dengan teknik streak kuadran.
- 5) Diinkubasi selama 1×24 jam (Gambar 1.43).



Gambar 1.43.

Isolasi Bakteri Sampel Tanah

9. Isolasi Kapang dari Tanah

a. Alat

- 1) Jarum inokulasi (ose).
- 2) Cawan petri.
- 3) Bunsen.
- 4) Oven.
- 5) Tabung reaksi.
- 6) Batang L atau Drugalsky.
- 7) Timbangan analitik.
- 8) Pipet seukuran.

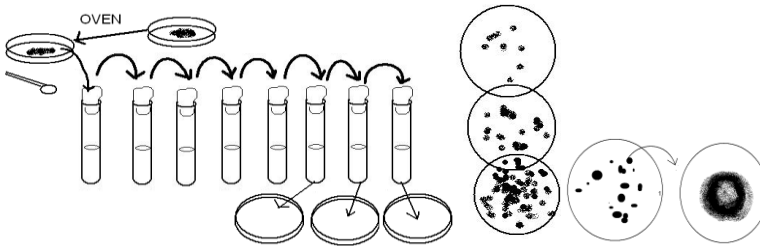
b. Bahan

- 1) Media Potato Dextrose Agar.
- 2) Sampel tanah.
- 3) Alkohol 70%.
- 4) Akuades.

c. Cara kerja

- 1) Tanah dalam cawan petri dipanaskan dengan oven pada suhu 80°C selama 30 menit untuk membunuh sel vegetatif tetap bertahan.
- 2) Tanah yang telah dioven diambil 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung pengenceran bertingkat.

- 3) Tiga pengenceran terakhir diambil untuk ditanam secara *spread plate* ke media PDA yang ditambah *streptomycin* atau *penicillin*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.
- 4) Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada media PDA baru.
- 5) Diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari (Gambar 1.44).



Gambar 1.44.
Isolasi Kapang Sampel Tanah

B. PETUNJUK PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap 8-10 mahasiswa membentuk satu kelompok dalam melakukan kegiatan praktikum.

C. PETUNJUK PENULISAN LAPORAN PRAKTIKUM

1. Laporan Praktikum berisikan:
 - a. Pendahuluan: memuat latar belakang dan tujuan praktikum.
 - b. Tinjauan pustaka: memuat teori praktikum yang telah diketahui hingga saat ini.
 - c. Alat, bahan, dan cara kerja: berisikan alat dan bahan yang digunakan, serta prosedur yang dilakukan.
 - d. Hasil dan pembahasan: berisikan hasil-hasil yang diperoleh dan membandingkan hasil-hasil penelitian terdahulu.
 - e. Kesimpulan.
 - f. Daftar pustaka.
2. Penyerahan Laporan

Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan oleh instruktur.

Kunci Jawaban Tes Formatif

Tes Formatif 1

- 1)
 - A. Salah, condenser berfungsi untuk mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif.
 - B. Salah, okuler berfungsi memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif.
 - C. Benar, lensa objektif merupakan salah satu bagian mikroskop untuk memperjelas spesimen.
 - D. Salah, *resolving nosepiece* berfungsi untuk memutar objektif.
- 2)
 - A. Salah, *colony counter* adalah alat hitung.
 - B. Benar, inkubator merupakan alat elektrik yang berfungsi sebagai pemeram mikroba dengan pengaturan suhu H^+ .
 - C. Salah, autoklaf adalah alat sterilisasi.
 - D. Salah, *hot plate* adalah alat untuk menghomogenkan larutan.
- 3)
 - A. Salah, jarum ose merupakan alat non-gelas.
 - B. Salah, pinset merupakan alat non-gelas.
 - C. Benar, pembakar Bunsen merupakan alat gelas agar kerja mikrobiologi dapat dilakukan secara aseptis.
 - D. Salah, pH indikator universal merupakan alat non-gelas.
- 4)
 - A. Benar, autoklaf merupakan alat yang digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan dengan menggunakan uap air panas bertekanan.
 - B. Salah, *colony counter* adalah alat hitung.
 - C. Salah, inkubator merupakan alat elektrik yang berfungsi sebagai pemeram mikroba dengan pengaturan suhu H^+ .
 - D. Salah, BSC alat yang berguna untuk bekerja secara aseptis.
- 5)
 - A. Salah, mikropipet adalah alat yang terbuat dari non-gelas.
 - B. Salah, hot plate adalah alat yang terbuat dari non-gelas.
 - C. Salah, *colony counter* adalah alat yang terbuat dari non-gelas.
 - D. Benar, batang L merupakan salah satu alat yang terbuat dari gelas.

Tes Formatif 2

- 1)
 - A. Salah, filtrasi adalah sterilisasi untuk bahan yang peka panas.
 - B. Salah, uap air panas bertekanan merupakan sterilisasi yang pada prinsipnya sama dengan autoklaf.
 - C. Benar, tyndalisasi merupakan alat sterilisasi untuk bahan yang tidak tahan terhadap perlakuan faktor fisik.
 - D. Salah, udara panas merupakan sterilisasi untuk peralatan gelas.
- 2)
 - A. Salah, tyndalisasi merupakan alat sterilisasi untuk bahan yang tidak tahan terhadap perlakuan faktor fisik.
 - B. Benar, filtrasi merupakan cara sterilisasi untuk bahan yang mudah rusak.
 - C. Salah, uap panas merupakan sterilisasi untuk bahan yang mengandung air, agar tidak terjadi dehidrasi.
 - D. Salah, pemijaran merupakan sterilisasi dengan menggunakan api langsung.
- 3)
 - A. Salah, biologis bukan merupakan salah satu cara sterilisasi.
 - B. Salah, fisik merupakan cara sterilisasi yang dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran.
 - C. Salah, mekanik merupakan cara sterilisasi dengan menggunakan saringan.
 - D. Benar, bahan yang berfungsi sebagai antimikroba dalam bentuk desinfektan merupakan cara sterilisasi secara kimiawi.
- 4)
 - A. Salah, filtrasi bukan merupakan salah satu sterilisasi fisik melainkan mekanik.
 - B. Benar, penyinaran merupakan salah satu proses yang dilakukan dalam sterilisasi secara fisik.
 - C. Salah, desinfeksi bukan merupakan salah satu sterilisasi fisik melainkan kimiawi.
 - D. Salah, penyaringan bukan merupakan salah satu sterilisasi fisik melainkan mekanik.
- 5)
 - A. Salah, *disposable filter cup unit* merupakan salah satu sterilisasi filtrasi.
 - B. Salah, *syringe filter* merupakan salah satu sterilisasi filtrasi.
 - C. Benar, tyndalisasi bukan merupakan sterilisasi dengan penyaringan/ filtrasi.
 - D. Salah, *spin filter* merupakan salah satu sterilisasi filtrasi.

Tes Formatif 3

- 1)
 - A. Salah, yang berperan sebagai sumber karbon dalam media pertumbuhan adalah glukosa/karbohidrat.
 - B. Benar, fungsi asam amino dalam media pertumbuhan mikroba sebagai sumber energi.
 - C. Salah.
 - D. Salah, fungsi utama asam amino dalam pertumbuhan mikroba adalah sebagai sumber nitrogen bukan sebagai sumber elektron.
- 2)
 - A. Salah, media padat mengandung agar 15%.
 - B. Salah, media sintesis adalah pembagian media berdasarkan komposisi.
 - C. Salah, media cair merupakan media yang tidak mengandung agar.
 - D. Benar, media setengah padat merupakan media pertumbuhan mikroba yang mengandung konsentrasi agar 0,3-0,4%.
- 3)
 - A. Salah, salah satu contoh media diperkaya adalah Serum Agar.
 - B. Salah, salah satu contoh media diferensial adalah TSIA.
 - C. Benar, media NA dan NB merupakan media umum berdasarkan tujuan penggunaannya (media isolasi).
 - D. Salah, salah satu contoh media selektif adalah Lurian Bertani + Amphisilin.
- 4)
 - A. Salah, agar-agar berfungsi sebagai pematat yang sulit didegradasi mikroba.
 - B. Benar, silica gel merupakan bahan pematat yang secara khusus digunakan untuk menumbuhkan mikroba autotrof obligat.
 - C. Salah, gelatin hampir sama dengan agar-agar.
 - D. Salah, *trace element* bukan merupakan bahan dasar tetapi merupakan nutrisi/zat makanan.
- 5)
 - A. Salah, media diperkaya merupakan media yang mengandung komponen dasar ditambah komponen kompleks
 - B. Salah, media diferensial merupakan media yang bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari campurannya.
 - C. Benar, media selektif merupakan media yang ditambahkan dengan zat tertentu yang ditujukan untuk menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan.
 - D. Salah, isolasi merupakan teknik memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lainnya.

Tes Formatif 4

- 1)
 - A. Salah, goresan kuadran merupakan salah satu teknik penggoresan untuk mendapatkan kultur murni.
 - B. Benar, goresan L merupakan teknik penanaman. .
 - C. Salah, goresan T merupakan salah satu teknik penggoresan untuk mendapatkan kultur murni.
 - D. Salah, goresan sinambung merupakan salah satu teknik penggoresan untuk mendapatkan kultur murni.
- 2)
 - A. Benar, maseration merupakan preparasi terhadap sampel bentuk padat yang perlu dilakukan penghancuran. .
 - B. Salah, *rinse* merupakan pembilasan yang bertujuan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel.
 - C. Salah, *swab* merupakan teknik ulas
 - D. Salah, penimbangan bukan merupakan salah satu kegiatan preparasi.
- 3)
 - A. Salah, vitamin merupakan suatu nutrisi yang ditujukan tidak untuk mencegah pertumbuhan bakteri.
 - B. Salah, *methyl red*
 - C. Benar, antibiotik merupakan bahan antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diharapkan.
 - D. Salah, *phenol red* merupakan bahan tambahan untuk indikator perubahan pH.
- 4)
 - A. Salah, sterilisasi proses membebaskan suatu bahan/benda dari semua bentuk kehidupan.
 - B. Salah, tyndalisasi sterilisasi untuk bahan yang tidak tahan terhadap perlakuan faktor fisik.
 - C. Salah, filtrasi merupakan sterilisasi cara mekanik.
 - D. Benar, isolasi merupakan proses atau kegiatan untuk memisahkan mikroba dan campurannya sehingga diperoleh kultur murni.
- 5)
 - A. Salah, *spread plate* merupakan teknik menanam dengan menyebarkan suspensi di permukaan agar diperoleh kultur murni.
 - B. Salah, *streak quadrant* merupakan teknik goresan yang bertujuan untuk mengisolasi.
 - C. Benar, *pour plate* merupakan teknik penanaman untuk mendapatkan mikroba yang memerlukan sedikit air.
 - D. Salah, *streak T* merupakan teknik goresan yang bertujuan untuk mengisolasi.

Daftar Pustaka

- Benson, H.J. (1973). *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*. 2nd ed. Iowa: W.M.C. Brown Co. Publ. Dubuque.
- Brooks G. F, *et al.* (2005). Jawetz, Melnick & Adelberg's. *Medical Microbiology*. Twenty Second. Ed. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.
- Diliello, L.R. (1982). *Methods in Food and Dairy Microbiology*. Connecticut: Avi Publ. Co. Inc. Westport.
- Fardiaz, S. (1994). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Frazier, W.C.; Merth, E.H.; and Deibel, R.H. (1968). *Laboratory Manual for Food Microbiology*. 4th ed. Minneapolis, Burgess Publ. Co.
- Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; and Krieg, N.R. (1976). *Microbiology*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Presscott, *et al.* (2002). *Microbiology*. 5th Edition. Mc. Graw Higher Edition Company.
- Salle, A.J. (1961). *Fundamental Principles of Bacteriology*. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Seeley, Jr., H.W.; and Demark, P.J.V. (1972). *Selected Exercises from Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology*. 2nd ed. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Stainer, R.Y.; Adelberg, E.A.; and Ingraham, J. (1976). *The Microbial World*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.