



## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat yang telah dilimpahkan kepada penulis, sehingga penulis mampu menyelesaikan modul ini. Modul ini diharapkan bisa digunakan oleh berbagai pihak yang berkaitan dengan ilmu mikrobiologi, terutama penggunaan dalam praktek dasar mikrobiologi.

Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dan terlibat dalam penyusunan modul ini. Semoga modul ini dapat dimanfaatkan dengan baik. Sehubungan dengan itu, kritik dan saran juga penulis harapkan demi perbaikan kedepannya.

Padang, April 2018  
Penulis,

WSM

## DAFTAR ISI

<b>Kata Pengantar</b> .....	1
<b>Daftar Isi</b> .....	2
<b>Daftar Gambar</b> .....	3
I. Sterilisasi Bahan dan Peralatan.....	4
II. Pembuatan Media Dasar.....	14
III. Teknik Pengambilan Sampel.....	18
IV. Teknik Pengenceran.....	21
V. Kuantitatif Mikroba.....	24
VI. Uji Coliform (dengan Metode MPN).....	29
VII. Isolasi Bakteri .....	32
VIII. Penggunaan Mikroskop.....	35
IX. Pewarnaan Gram dan Spora.....	40
<b>Daftar Pustaka</b> .....	44

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Pemijaran.....	5
Gambar 2.	Sterilisasi dengan Jilatan Api .....	6
Gambar 3.	Oven untuk Sterilisasi.....	7
Gambar 4.	Waterbath .....	8
Gambar 5.	Autoklave .....	10
Gambar 6.	Mikrofilter .....	11
Gambar 7.	Teknik Pengambilan Sampel Air.....	19
Gambar 8.	Pengenceran.....	22
Gambar 9.	Pola Gores Isolasi .....	33
Gambar 10.	Pola Tumbuh Koloni .....	34
Gambar 11.	Mikroskop Cahaya.....	35
Gambar 12.	Cara Kerja Mikroskop .....	36
Gambar 13.	Ukuran Pembesaran Lensa Objektif dan Lensa Okuler.....	37
Gambar 14.	Proses Pengikatan Zat Warna oleh Sel Bakteri .....	41

## **I. STERILISASI BAHAN DAN PERALATAN**

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda (alat ataupun bahan). Tujuan sterilisasi dalam mikrobiologi adalah mematikan, menghambat pertumbuhan dan menyingkirkan semua mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan yang akan digunakan dalam suatu pekerjaan guna menciptakan suasana aseptis.

Secara umum sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 metode: mekanis, fisis dan ataupun secara kimia. Sterilisasi mekanis diantaranya menggunakan microfillter, fisis terbagi menjadi 2 penyinaran dan pemanasan, sedangkan kimia adalah dengan menggunakan bahan kimia (desinfektan).

Bahan, alat dan meja kerja yang akan digunakan dalam praktek di laboratorium mikrobiologi harus melalui tahap sterilisasi terlebih dahulu, hal ini bertujuan supaya pekerjaan dikerjakan secara aseptis atau terbebas dari mikroba pencemar yang tidak diinginkan. Adapun sterilisasi yang sering digunakan dalam praktek dasar mikrobiologi adalah sterilisasi secara fisis dengan pemanasan, yang dibagi menjadi sterilisasi kering dan sterilisasi basah.

#### **A. Sterilisasi secara Fisis**

##### 1. Pemanasan

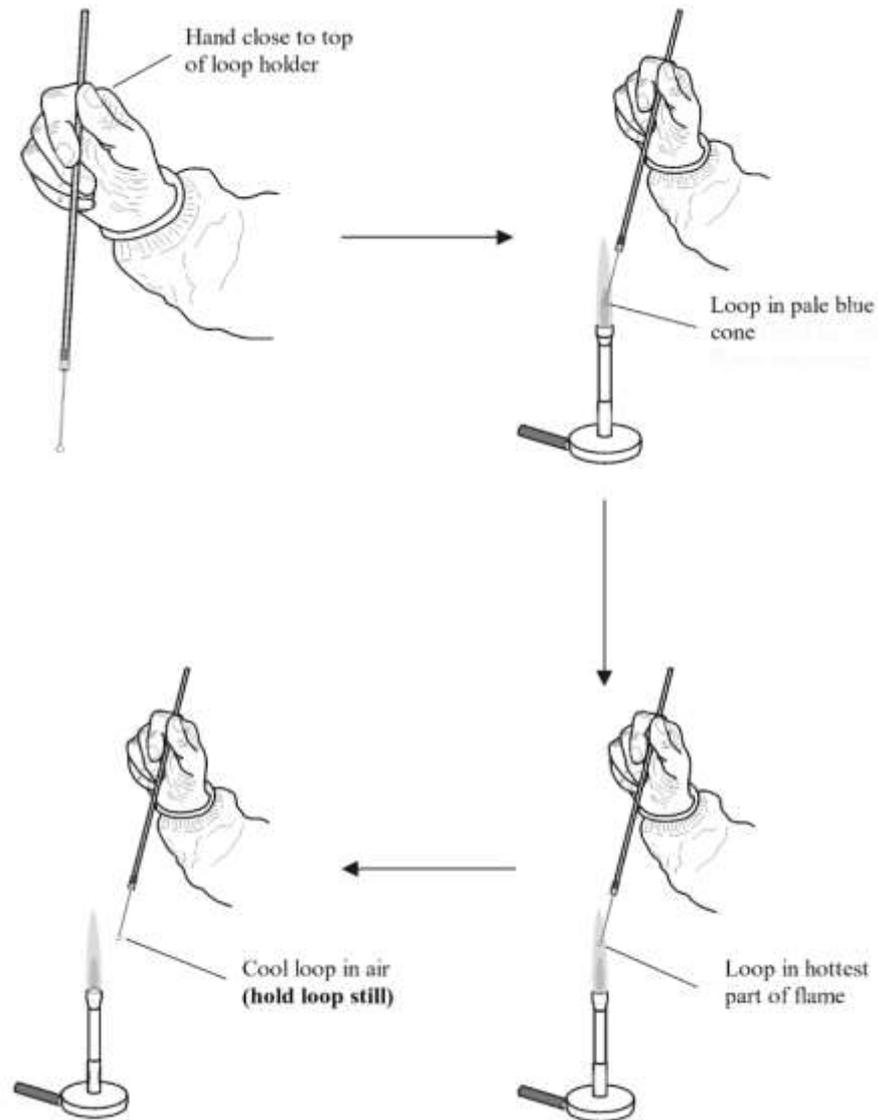
##### a. Sterilisasi Kering (Panas Kering)

Beberapa cara yang dapat dilakukan pada sterilisasi kering adalah:

##### 1. Pemijaran

Pemijaran merupakan suatu kegiatan membakar langsung alat-alat seperti ujung ose, ujung pinset, ujung spatula yang berbahan logam. Pemijaran dilakukan sampai alat-alat tersebut berwarna merah pijar. Gambar pemijaran seperti gambar

1.



Gambar 1. Pemijaran

## 2. *Flaming* (Jilatan Api)

Alat-alat seperti kaca objek, cawan petri yang telah berisi media, mulut erlenmeyer yang berisi media dan jarum cukup dilakukan jilatan api atau melewati alat tersebut pada nyala api bunsen. Artinya alat-alat tersebut hanya mengalami jilatan api dan tidak sampai memijar. Gambar sterilisasi dengan jilatan api dapat dilihat pada Gambar 2.



menjamin efektivitas proses sterilisasi perlu diperhatikan muatan (jumlah alat yang dimasukkan ke dalam oven) agar tersedia cukup ruangan untuk Bergeraknya aliran udara panas. Oven yang digunakan untuk sterilisasi seperti gambar 3.



Gambar 3. Oven untuk sterilisasi

b. Sterilisasi Basah (Panas Basah)

Sterilisasi basah dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya:

1. Uap Mengalir

Merupakan sterilisasi dengan menggunakan uap pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  yang dialirkan pada benda yang disterilkan secara berulang-ulang (tiga sampai empat kali beberapa menit) dengan selang waktu 24 jam. Atau sterilisasi dengan uap mengalir ini juga disebut dengan sterilisasi bertingkat atau *tyndalisasi*. Cara ini dikenalkan oleh John Tyndall (1820-1893).

Keuntungan cara ini ialah tidak membutuhkan alat khusus. Namun kerugiannya membutuhkan waktu yang lama, selain itu waktu selang antara aliran uap mengalir tersebut memungkinkan spora yang resisten atau dorman (non aktif) menjadi aktif kembali menjadi sel vegetatif. Cara ini digunakan untuk media

gelatin, susu, dan karbohidrat, karena bahan-bahan tersebut akan mengalami *hidrolisis* bila dipakai suhu yang lebih tinggi atau waktu yang lebih lama.

## 2. Penggodogan dalam Air

Penggodogan dilakukan untuk mematikan mikroorganisme yang tidak berspora. Penggodogan dalam air mendidih atau mencapai suhu  $100^{\circ}\text{C}$ , hanya selama 5 menit biasanya sudah cukup mensterilkan untuk peralatan rumah tangga, asalkan air benar-benar kontak secara langsung dengan alat tersebut, tidak hanya bagian luar atau permukaan saja tetapi sampai ke bagian dalam. Akan tetapi sterilisasi dengan cara ini dapat dilakukan dengan waktu yang lebih lama, tergantung tingkat kontaminasi alat yang disterilkan. Keadaan steril yang tidak dapat dicapai dengan penggodogan dalam air panas selama 1 jam dapat dilanjutkan dengan uap mengalir. Penggodogan dapat dilakukan dengan *waterbath*. Gambar *waterbath* seperti gambar 4.



Gambar 4. *Waterbath*

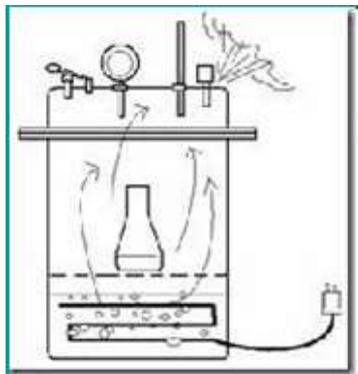
## 3. Uap Bertekanan

Autoklaf merupakan alat yang digunakan dalam sterilisasi menggunakan uap dalam tekanan. Dalam autoklaf uap berada dalam keadaan jenuh, dan peningkatan tekanan mengakibatkan suhu yang tercapai menjadi lebih tinggi. Sterilisasi cara ini menggunakan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm. Tekanan yang lebih besar akan dibutuhkan pada tempat-tempat yang lebih tinggi dari

permukaan laut. Udara yang berada dalam autoklaf harus dikeluarkan semuanya untuk memperoleh suhu yang diinginkan ( $121^{\circ}\text{C}$ ).

Alat dan bahan yang disterilkan dengan cara ini akan dilewati oleh uap panas selama proses sterilisasi berlangsung. Sehingga bahan-bahan yang disterilkan dengan cara ini harus yang bersifat permeabel terhadap uap panas dan tidak rusak pada suhu  $110\text{-}121^{\circ}\text{C}$ . Panas lembab sangat efektif untuk mensterilkan bahan dan alat meskipun pada suhu yang tidak terlalu tinggi, karena ketika uap air berkondensasi pada bahan dan alat yang disterilkan, dilepaskan panas sebanyak 686 kalori per gram uap air pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Sterilisasi cara ini efektif untuk semua mikroorganisme, baik vegetatif maupun spora.

Beberapa hal yang menjadi prinsip pada sterilisasi dengan autoklaf adalah: 1). Sterilisasi bergantung pada uap, sehingga udara harus benar-benar dikosongkan dari sterilisator. 2). Semua bagian bahan yang disterilkan harus benar-benar dilalui oleh uap panas, sehingga labu kosong dan tabung sebaiknya diletakkan dengan posisi tidur agar udara tidak terperangkap di dasarnya. 3). Bahan-bahan yang berpori atau yang berbentuk cair harus permeabel terhadap uap. 4). Suhu harus mencapai  $121^{\circ}\text{C}$  dan dipertahankan selama 15-20 menit. Gambar autoklaf terdapat pada gambar 5.



a. Autoklaf konvensional



b. Autoclave Modren (Hirayama)

Gambar 5. Autoklaf

## 2. Penyinaran

Sterilisasi secara fisis dapat juga dilakukan dengan penyinaran sinar UV (*ultra violet*). Biasanya *safety cabinet* akan dilengkapi dengan lampu UV guna mensterilkan permukaan interior *safety cabinet* tersebut, atau untuk mencegah kontaminasi selama proses penurunan suhu media atau alat-alat yang baru dikeluarkan dari oven atau autoklave sebelum digunakan. Selain itu lampu UV juga bisa dipasang dalam sebuah ruangan untuk mensterilkan ruangan.

### **B. Sterilisasi Kimiawi**

Biasanya digunakan senyawa desinfektan antara lain: 1). Peralatan besar dengan menggunakan HCl, HgCl<sub>2</sub>, Formalin, Phenol, Chlorin dan alkohol. 2). Lingkungan dengan menggunakan pestisida dan antiseptis. 3). Media dengan Na-Thiosulfat. Biasanya yang paling banyak digunakan adalah alkohol, baik untuk mensterilkan alat, tangan pekerja ataupun meja kerja.

### **C. Sterilisasi Mekanik**

Sterilisasi secara mekanik dengan menggunakan saringan berpori yang sangat kecil, biasanya berkisar (0.22 - 0.45 mikron), sehingga mikroba tertahan pada

saringan tersebut. Alat yang dikenal dengan mikrofilter tersebut berkerja dengan gaya sentrifugasi atau pompa vakum. Dimana pada sterilisasi ini: bakteri tertahan disaringan, virus tidak dapat tersaring, dan digunakan untuk bahan yang tidak tahan panas dan mudah menguap, seperti vitamin, larutan enzim dan antibiotik, mikrofilter dapat dilihat pada gambar 6.

**Macam-macam mikrofilter:**

*1. Non-disposable filtration apparatus*

- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 20-1000 ml

*2. Disposable filter cup unit*

- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

*3. Disposable filtration unit dengan botol penyimpan*

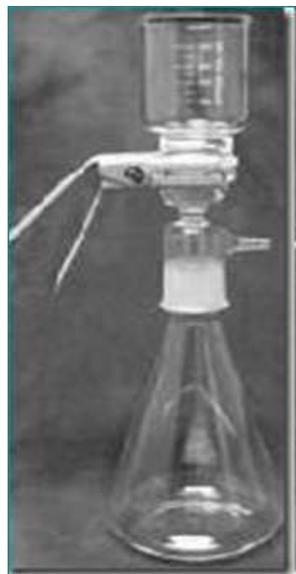
- Disedot dengan pompa vakum
- Volume 15-1000 ml

*4. Syringe filters*

- Ditekan seperti jarum suntik
- Volume 1-20 ml

*5. Spin filters*

- Ditekan dengan gaya setrifugasi
- Volume kurang dari 1 ml



Gambar 6. Mikrofilter (*Non-disposable filtration apparatus*)

**Cara kerja Mikrofilter (*Non-disposable filtration apparatus*):**

1. Sterilkan saringan, membran penyaring, dan wadah penampung (erlenmeyer)
2. Rakit alat-alat sesuai ketentuannya secara aseptis, isi corong dengan larutan yang akan disterilkan
3. Hubungkan katup erlenmeyer dengan pompa vakum lalu hidupkan pompa
4. Setelah larutan melewati membran dan tertampung di erlenmeyer seluruhnya, lalu tutup erlenmeyer dengan kapas atau aluminium foil.

**PELAKSANAAN PRAKTEK**

**a. Autoklaf Konvensional**

1. Siapkan autoklaf
2. Tuang air ke dalam tubuh sterilisator hingga 2/3 dasar keranjang
3. Tata alat dan media yang akan di sterilisasi didalam tabung sehingga tersedia ruangan untuk pergerakan uap air.
4. Tutup sterilisator dengan cara mempertemukan lubang baut, sambil diputar untuk lebih rapat
5. Buka klep pengatur pengamanan, hidupkan api atau listrik
6. Bila uap mulai keluar (bunyi mendesis), tutup klep pengaman, tekanan didalam akan naik dan baca pada alat ukur tekanan sampai 1 Atm (121 °C)
7. Jika sudah tercapai, pertahankan selama 15 menit dengan cara membuka klep pengukur tekanan untuk mengurangi panas
8. Pada akhir proses, matikan api dan tunggu tekanan hingga nol, suhu dibawah 100 °C
9. Keluarkan keranjang serta alat dan bahan dari dalam sterilisator

**b. Autoklaf Hirayama**

1. Siapkan autoklaf
2. Tuang air ke dalam tubuh sterilisator hingga 2/3 dasar jirigen
3. Hidupkan sterilisator, buka kunci penutup dengan menggeser ke arah kanan, lalu buka penutup sterilisator

4. Tata alat dan media yang akan di sterilisasi didalam keranjang pada autoklaf sehingga tersedia ruangan untuk pergerakan uap air.
5. Tutup sterilisator kemudian kunci dengan menggeser kearah kiri
6. Atur suhu dan waktu yang diinginkan ( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 menit)
7. Tunggu hingga suhu dan waktu tercapai, kemudian biarkan suhu kembali turun sekitar dibawah  $70^{\circ}\text{C}$  atau hingga kunci penutup sterilisator bisa dibuka
8. Buka penutup sterilisator dengan hati-hati, karena uap panas bisa jadi akan keluar, biarkan hingga memungkinkan untuk mengeluarkan keranjang dari dalam sterilisator
9. Keluarkan keranjang serta alat dan bahan dari dalam sterilisator

**c. Oven**

1. Siapkan oven
2. Untuk penggunaan oven, cukup dengan menyetel pada suhu yang diinginkan ( $160^{\circ}\text{C}$ ) set *stopwatch* selama 2 jam, setelah alat-alat yang akan disterilkan disusun sedemikian rupa (tetap menyediakan ruang untuk udara panas)
3. Keluarkan alat yang disterilisasi dan masukkan ke dalam desikator sampai suhu stabil (stabilkan hingga suhu kamar)

## **II. PEMBUATAN MEDIA DASAR**

### **TUJUAN**

Mengetahui bahan yang digunakan dalam pembuatan media dasar (NA dan PDA) serta memahami proses pembuatannya

### **PENDAHULUAN**

Media merupakan bahan yang terdiri dari zat-zat makanan (nutrient) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Sedangkan larutan pengencer adalah larutan yang digunakan untuk memperkecil jumlah mikroorganisme yang tersuspensi.

Media dapat memanipulasi tempat tumbuhnya biakan atau menjadikan media sebagai isolat tempat tumbuhnya, dan sekaligus memanipulasi komposisi media pertumbuhannya. Media terdiri dari bahan dasar, nutrient dan ataupun bahan tambahan. Media dapat dibedakan berdasarkan sifat fisis, komposisi dan berdasarkan tujuannya.

Media sebelum digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu, sterilisasi yang digunakan adalah sterilisasi panas basah (autoklaf).

### **ALAT DAN BAHAN**

#### **Alat**

1. Botol semprot
2. Petridish
3. Erlenmeyer 250 ml dan 500 ml
4. Mikro pipet
5. Gelas piala 250 ml, 500 ml dan 1000 ml
6. Pipet mili 10 ml dan 25 ml
7. Timbangan analitik
8. Hot plate
9. Spatula
10. Batang pengaduk

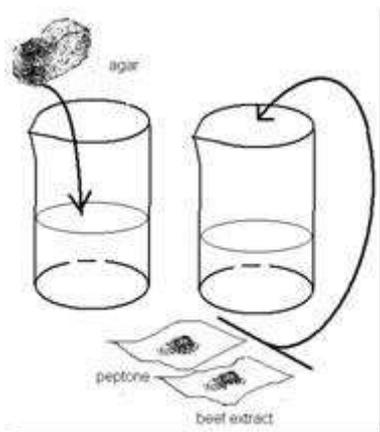
11. pH meter
12. Gelas ukur 10 ml, 100 ml dan 250 ml

### **Bahan**

1. Kapas
2. Tissue gulung
3. Spiritus
4. Alkohol
5. Aluminium foil
6. Kertas label
7. Aquades
8. Agar
9. Ekstrak daging
10. Pepton
11. Dextrosa
12. Ekstrak kentang

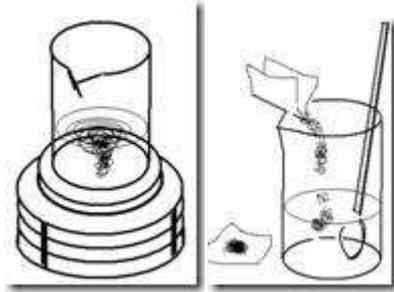
### **PELAKSANAAN PRAKTEK**

#### **Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)**



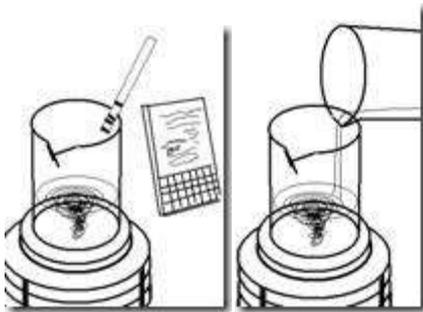
1. Timbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut:
  - a. Ekstrak daging 3 g
  - b. *Peptone* 5 g
  - c. Agar 15 g
  - d. Akuades 1000 ml
2. Akuades sebanyak 1000 ml dibagi menjadi dua, 400 ml untuk melarutkan Ekstrak daging dan *peptone* dan 600 ml

untuk melarutkan agar. (Sebaiknya air untuk melarutkan agar lebih banyak).



3. Larutkan agar dengan mengaduk secara konstan diatas *hot plate stirrer* (jangan sampai *overheat*, karena akan terbentuk busa dan memuai sehingga tumpah)

4. Larutkan *peptone* dan ekstrak daging, cukup dengan pengadukan.



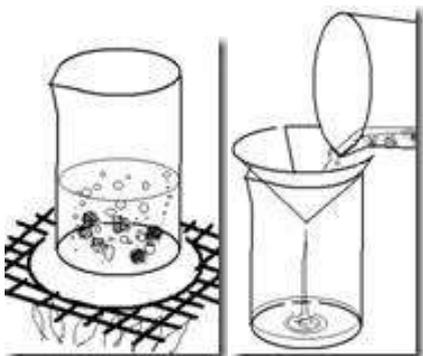
5. Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen.

6. Ukur pH media. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH.

7. Masukkan media ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf.

8. Tuang media steril ke cawan petri steril secara aseptis.

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



1. Timbang komponen media sesuai dengan komposisi berikut:

a. Potato/kentang 3 g

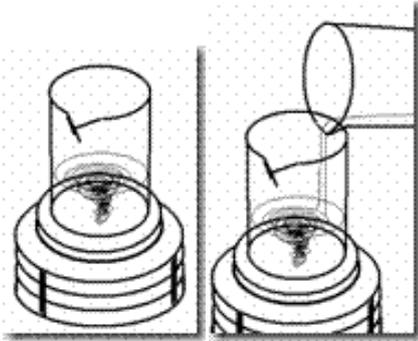
b. *Dextrosa* 5 g

c. Agar 15 g

d. Akuades s.d 1000 ml

(sebelum ditimbang, sebaiknya kentang dikupas dan diiris kecil-kecil)

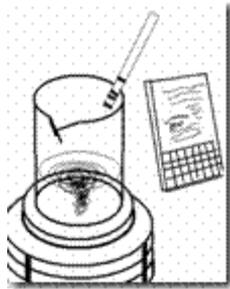
2. Rebus kentang dalam sebagian akuades selama 1-3 jam sampai lunak, kemudian diambil ekstraknya dengan menyaring dan memerasnya menggunakan kertas saring lalu ditampung di gelas piala.



3. Agar dilarutkan dengan *Hot Plate Stirrer* dalam 500 ml aquades, setelah larut dapat ditambahkan dekstrosa dan dihomogenkan lagi.

4. Atur pH media menjadi 5-6 dengan meneteskan HCl/NaOH

5. Media dituang ke dalam Erlenmeyer atau ke tabung reaksi kemudian siap untuk disterilisasi.



### **III. TEKNIK PENGAMBILAN SAMPEL**

#### **TUJUAN**

Mahasiswa mengetahui teknik pengambilan sampel dari berbagai sumber dan mampu melaksanakannya untuk tujuan pengujian lebih lanjut.

#### **TEORI**

##### **A. Teknik Pengambilan Sampel**

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

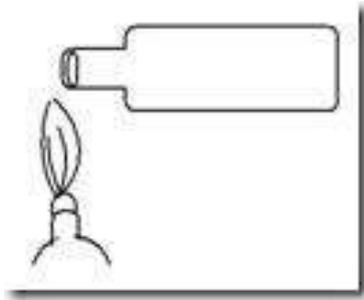
##### **1. Sampel tanah**

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

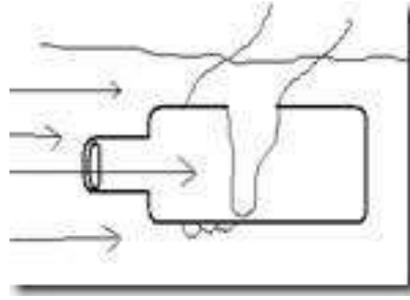
##### **2. Sampel air**

Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air 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 disterilisasi.

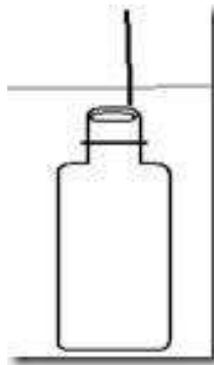
Teknik pengambilan sampel air dapat dilihat pada Gambar 7.



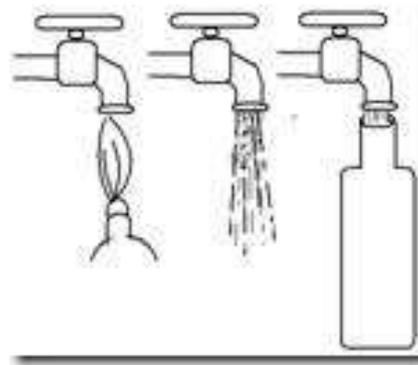
a. Sterilisasi botol



b. Pengambilan sampel dari air mengalir



c. Pengambilan sampel dari air tenang

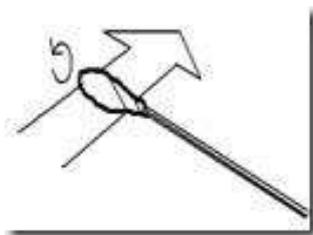


d. Pengambilan sampel dari air kran

Gambar 7. Teknik Pengambilan Sampel Air

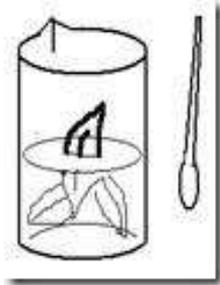
### Teknik Preparasi Suspensi

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



a. *Swab* (ulas), dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu, piring, gelas, sendok, dll. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar

sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika cotton bud dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal *pepton water*.



- b. *Rinse* (bilas) ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. Rinse merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam akuades dengan perbandingan 1 : 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan akuades 45 ml yang terdapat dalam *beaker glass*



- c. *Maseration* (pengancuran), sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya 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

## IV. TEKNIK PENGECERAN

### Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan pengenceran bahan yang mengandung mikroba sebelum ditumbuhkan dalam medium.

- a. Mahasiswa mengetahui tujuan dari pengenceran

### Teori

Bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba per ml, per gram atau per cm permukaan, memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan dalam media. Tujuan pengenceran adalah setelah inkubasi terbentuk koloni pada cawan yang berisi media dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlahnya antara 30 dan 300 (Fardiaz, 1993).

Mikroba dapat hidup pada beberapa kondisi tertentu, sehingga medium pengencer yang digunakan pun berbeda-beda. Pada analisis suatu mikroba terdapat beberapa pilihan medium pengenceran yang dapat digunakan untuk mikroba tertentu. Misalnya jenis medium pengencer yang digunakan untuk mikroba anaerobic, medium pengencer yang digunakan untuk mikroba osmofilik dan halofilik, serta medium pengencer untuk sampel cair atau sampel padat dengan partikel halus dan lainnya (Winiati dan Nurwitri, 2012).

Larutan pengencer yang dapat digunakan untuk tujuan tertentu diatas, yaitu:

- a. Pengencer umum (*general purpose diluents*): 0,1 % pepton ditambah 0,85% natrium klorida (NaCl). Hal ini sesuai dengan standar ISO.
- b. Pengenceran untuk mikroba anaerobic

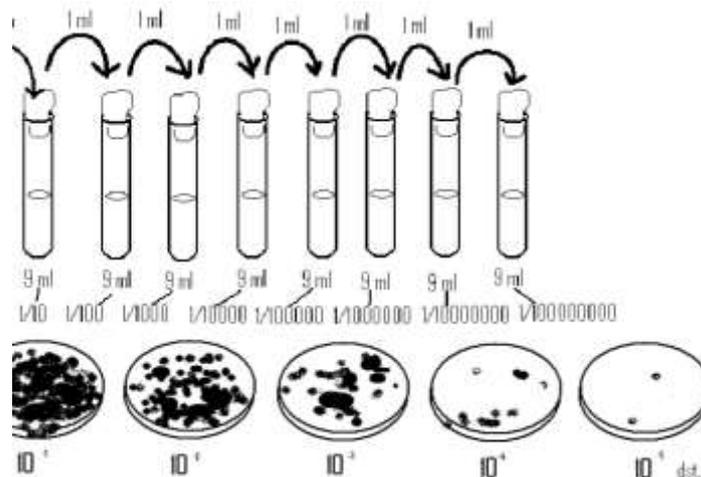
Pada metode ini untuk pertumbuhan mikroba anaerobic diperlukan pengencer yang mampu untuk menjaga potensial oksidasi-reduksi pengencer tetap rendah. Mikroba anaerobic sangat rentan terhadap oksigen sehingga perlu penggunaan teknik khusus seperti aplikasi teknik *hungate* atau penggunaan ruang anaerob.

- c. Pengenceran untuk mikroba osmofilik dan halofilik

Pengenceran yang digunakan untuk mikroba osmofilik adalah larutan pengenceran yang mengandung 20% larutan sukrosa steril. Pengenceran yang

digunakan untuk mikroba halofilik adalah larutan pengenceran yang mengandung 15 % NaCl steril (Winiati dan Nurwitri, 2012).

Pengenceran biasanya dilakukan secara decimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000 dan seterusnya. Pengambilan contoh dilakukan secara aseptik dan pada setiap kali pengenceran dilakukan pengocokan kira-kira sebanyak 25 kali untuk memisahkan sel-sel mikroba yang bergabung menjadi satu (Fardiaz, 1993). Pengenceran yang dilakuka biasanya adalah pengenceran bertingkat yang bertujuan untuk 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. Berikut contoh pengenceran pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengenceran

#### ALAT DAN BAHAN

**Alat :** pipet ukur 1 ml

Tabung reaksi

Erlenmeyer 100 mL

Timbangan analitik

Vortex

**Bahan :** Garam Fisiologis atau NaCl 0,85 % steril, sampel yang akan diencerkan.

## **CARA KERJA**

### **a. Untuk Sampel Padat**

1. Sediakan garam fisiologis steril sebanyak 45 ml dalam erlemeyer 100 ml dan 9 ml garam fisiologis steril dalam tabung reaksi.
2. Timbang sampel yang akan diencerkan sebanyak 5 gram.
3. Campurkan 5 gram sampel ke dalam 45 ml garam fisiologis steril ( $10^{-1}$ )
4. Homogenisasikan sampel hingga larut dalam garam fisiologis
5. Pipet 1 ml sampel dari larutan di atas masukan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml garam fisiologis ( $10^{-2}$ ) homogenkan. Lakukan pengenceran selanjutnya dengan cara yang sama sampai pengenceran yang dibutuhkan.
6. Pipet 1 ml atau 0,1 ml sampel dari pengenceran yang akan dihitung dan ditanam di cawan petri yang berisi media.

### **b. Untuk Sampel Cair**

1. Sediakan garam fisiologis steril sebanyak 9 ml garam fisiologis steril dalam tabung reaksi.
2. Pipet sampel yang akan diencerkan sebanyak 1 mL.
3. Campurkan 1 mL sampel ke dalam 9 ml garam fisiologis steril ( $10^{-1}$ )
4. Homogenisasikan sampel hingga larut dalam garam fisiologis
5. Pipet 1 ml sampel dari larutan di atas masukan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml garam fisiologis ( $10^{-2}$ ) homogenkan. Lakukan pengenceran selanjutnya dengan cara yang sama sampai pengenceran yang dibutuhkan.
6. Pipet 1 ml atau 0,1 ml sampel dari pengenceran yang akan dihitung dan ditanam di cawan petri yang berisi media.

## **V. KUANTITATIF MIKROBA**

### **Teknik Hitungan Mikroba dengan Metode Cawan**

#### **Tujuan**

- a. Mahasiswa mampu melakukan teknik hitungan mikroba dengan metode cawan
- b. Mahasiswa mampu membedakan metode hitungan cawan tuang dan cawan permukaan
- c. Mahasiswa mampu menghitung jumlah mikroba dalam pangan dengan menggunakan metode cawan

#### **Teori**

Prinsip metode perhitungan cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode cawan merupakan cara yang paling sensitive untuk menghitung jumlah mikroba karena alasan-alasan sebagai berikut :

1. Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung
2. Beberapa jenis mikroba terhitung sekaligus
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba (Fardiaz, 1993)

Sedangkan kelemahan dari metode hitung cawan adalah :

1. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel yang sebenarnya
2. Medium dan kondisi yang berbeda akan menghasilkan hasil yang berbeda
3. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium yang padat dan membentuk koloni kompak dan jelas, tidak menyebar
4. Memerlukan waktu inkubasi beberapa hari (Fardiaz, 1993)

Metode cawan dapat dibedakan menjadi :

- a. Metode Cawan permukaan

Metode cawan permukaan merupakan metode perhitungan dengan yang terlebih dahulu dituangkan media agar steril dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna , kemudian sebanyak 0,1 ml contoh yang telah

diencerkan dipipet ke permukaan agar, selanjutnya diratakan dengan menggunakan *hockey stick* (batang gelas melengkung yang steril).

#### b. Metode Cawan Tuang

Metode cawan tuang merupakan metode perhitungan mikroba yang pengenceran dan medianya disediakan lebih dahulu. Pengenceran yang dipipet sebanyak 1 ml atau 0,1 ml (Winiati dan Nurwiti, 2012). Pada metode cawan ini sampel terlebih dahulu dipipet ke dalam cawan petri kemudian baru dimasukan media agar.

#### **Alat dan Bahan**

**Alat :** Cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur 1 ml dan 0,1 ml, Bunsen, *hockey stick*

**Bahan :** Media PCA, Garam fisiologis, Alkohol, Spritus dan sampel yang akan diuji jumlah mikrobanya

#### **Cara Kerja**

##### **a. Metode Cawan Permukaan**

1. Sebanyak 1 ml sampel diencerkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis sampai pengenceran yang diperlukan.
2. Tuang Media PCA steril sebanyak 15-20 ml ke dalam cawan petri dan biarkan membeku
3. Pipet sebanyak 0,1 ml sampel yang telah diencerkan ke PCA yang telah beku
4. Jumlah koloni pada cawan petri dihitung dengan *colony counter*, sedangkan Jumlah bakteri asam laktat didalam contoh dihitung dengan metode SPC

##### **b. Metode Cawan Tuang**

1. Sebanyak 1 ml sampel diencerkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis sampai pengenceran yang diperlukan.
2. Pipet sebanyak 1 ml sampel (dari pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dst) yang telah diencerkan kedalam cawan petri steril, kemudian tambahkan 15-20 ml

media PCA cair steril. Supaya sampel menyebar merata cawan petri digoyang mendatar.

3. Setelah agar membeku, inkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 2 hari
4. Jumlah koloni pada cawan petri dihitung dengan *colony counter*, sedangkan Jumlah bakteri asam laktat didalam contoh dihitung dengan metode SPC

### Cara perhitungan jumlah koloni dengan metode SPC

Data yang dilaporkan sebagai SPC harus mengikuti peraturan-peraturan sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama didepan koma dan angka kedua dibelakang koma.
2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan meghasilkan angka <30 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai <30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
<b>16</b>	1	0	<3.0 x 10 <sup>3</sup> (1.6 x 10 <sup>3</sup> )	Hitung pengenceran 10 <sup>-2</sup>

Faktor pengenceran = Pengenceran x Jumlah yang ditumbuhkan

$$= 10^{-2} \times 1.0$$

$$= 10^{-2}$$

Jumlah koloni = Jumlah koloni per cawan x 1/Faktor pengenceran

$$= 16 \times 1/10^{-2}$$

$$= 1.6 \times 10^3$$

3. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan angka >300 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai <300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
TBUD	TBUD	<b>355*</b>	<3.0 x 10 <sup>6</sup> (3.6 x 10 <sup>6</sup> )	Hitung pengenceran 10 <sup>-4</sup>
TBUD	<b>325*</b>	20	<3.0 x 10 <sup>5</sup> (3.3 x 10 <sup>5</sup> )	Hitung pengenceran 10 <sup>-3</sup>

4. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghaiikan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dsri kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Dan jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil pengenceran yang terkecil.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
<b>293*</b>	<b>41*</b>	4	3.5 x 10 <sup>4</sup>	Hitung rata-ratanya karena 41000/29300=1.4 (<2)
<b>140*</b>	<b>32*</b>	2	1.4 x 10 <sup>4</sup>	Hitung pengenceran 10 <sup>-2</sup> karena 32000/14000=2.3 (>2)

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu saja, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat diantara 30 dan 300.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
13 8	42 43	2 4	1.5 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup> karena perbandingan antara pengenceran 10 <sup>-2</sup> dan 10 <sup>-3</sup> adalah 2.4
290 280	36 32	4 1	3.1 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup> dan 10 <sup>-3</sup> karena perbandingan antara kedua pengenceran adalah 1.2
291 305	25 27	3 0	3.0 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup> meskipun 305 > 300 (angka yang lain < 30)

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
17 20	16 17	1 0	1.9 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup>

## VI. UJI COLIFORM (DENGAN METODE MPN)

### Tujuan

1. Mahasiswa mampu mengetahui cara pengujian dan penghitungan bakteri coliform dengan metode MPN
2. Mahasiswa mengetahui adanya bakteri coliform dalam sampel air dengan metode MPN

### Teori

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 (Fardiaz, 1993).

### Alat dan Bahan:

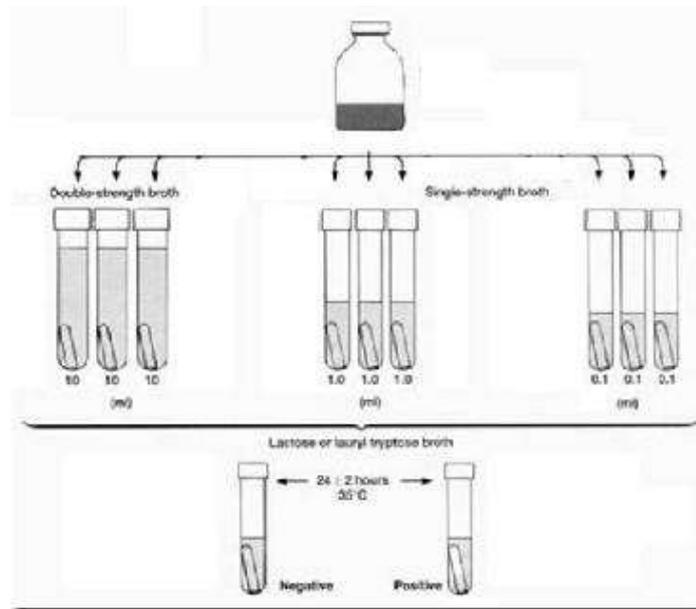
**Alat :** Testube dengan pemetupnya, Tabung Durham, Pipet 1 ml, Pipet 0,1 ml, Pipet 10 mL, Inkubator

**Bahan :** Air sungai dan air limbah Tahu

### c. Cara kerja :

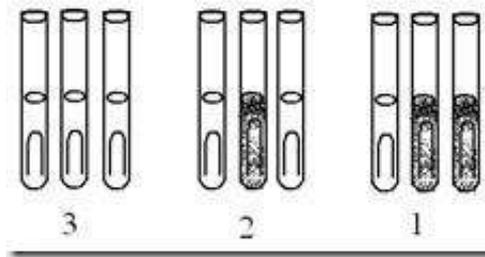
1. Sediakan 3 tabung berisi LBDS (9 ml tiap tabung) dan 6 tabung berisi LBSS (9 ml tiap tabung) lengkap dengan tabung durham. Atur kesembilan tabung menjadi 3 seri (seperti di gambar).
2. Kocok botol yang berisi air sampel.
3. Pindahkan suspensi air sample sebanyak 10 ml ke masing-masing tabung seri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

6. Inkubasi semua tabung pada suhu 37° C 24 jam
7. 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	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Misal :



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

## VII. ISOLASI BAKTERI

### Tujuan

1. Mengetahui metoda isolasi dan pemurnian mikroba menggunakan teknik gores.
2. Memahami dan bisa melakukan isolasi biakan menggunakan teknik gores.

### Teori

Isolasi mikroba adalah langkah pertama menuju identifikasi mikroba. Fungsi kegiatan isolasi adalah memisahkan sebuah kultur yang memiliki banyak jenis mikroba (*mixed culture*) menjadi hanya satu jenis mikroba (*pure culture*). Metoda yang umum digunakan adalah metode gores kuadran.

Metode gores kuadran menggunakan prinsip memperkecil jumlah mikroba yang terbawa selama proses gores. Cawan petri dibagi atas empat area yang digores secara melingkar dan berakhir di tengah. Proses menggores tersebut dilakukan secara berurutan sehingga pada area terakhir diharapkan jumlah koloni mikroba yang tumbuh menjadi relatif jarang. Jumlah koloni yang sedikit akan memudahkan untuk diamati dan dipisahkan antara jenis yang berbeda, menuju proses selanjutnya.

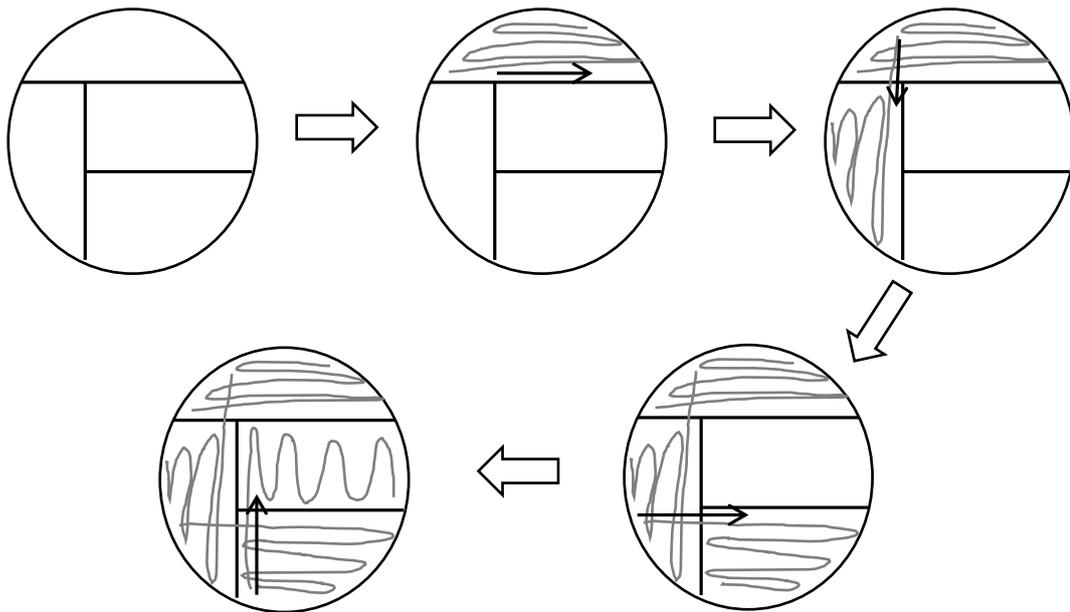
Metoda gores sering kali dikombinasikan dengan penggunaan media selektif. Media selektif memiliki komposisi yang memudahkan pertumbuhan kelompok mikroba tertentu sembari menghambat pertumbuhan kelompok mikroba lainnya. Sering kali media selektif juga mengkondisikan pertumbuhan koloni mikroba tertentu sehingga koloni tersebut menunjukkan ciri khusus.

### Alat dan Bahan

- ✓ Alat yang diperlukan antara lain cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur, bunsen, jarum ose dan spidol *all surface marker*.
- ✓ Bahan yang digunakan adalah yoghurt yang mengandung kultur bakteri asam laktat, akuades steril, media *De Mann Rogosa and Sharpe (MRS) Agar* dan *plastic wrap* yang telah dipotong sesuai ukuran.

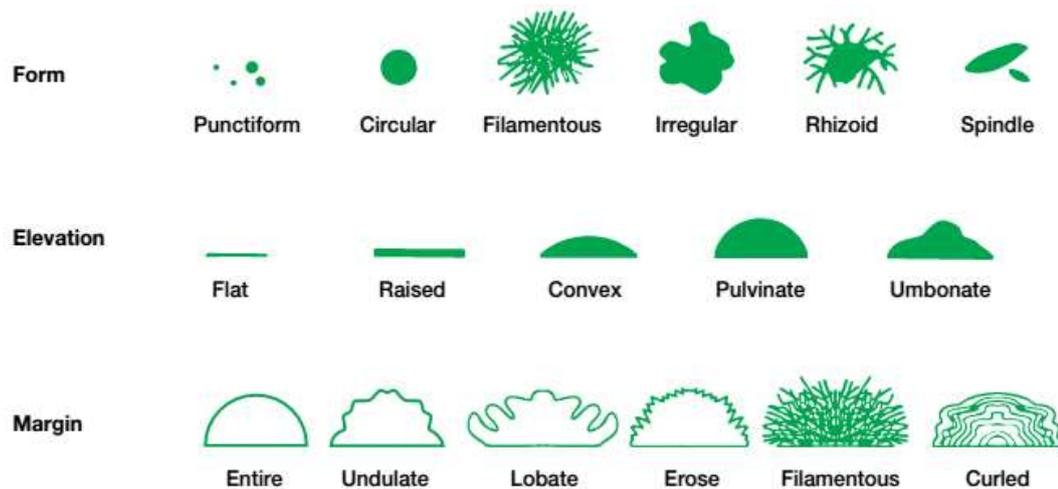
## Cara Kerja

1. Transfer 1 ml yoghurt ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril secara aseptis, kemudian vorteks selama lebih kurang 5 detik dengan kecepatan tinggi.
2. Secara aseptis, ambil 1 ose dari tabung reaksi dan gores sesuai pola berikut (Gambar 9) pada cawan petri yang telah berisi media MRS. Sebelumnya, tandai permukaan bagian bawah cawan petri dengan spidol *all surface*.



Gambar 9. Pola Gores Isolasi

3. Tutup sisi cawan petri menggunakan *plastic wrap*.
4. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam.
5. Lakukan pengamatan terhadap ciri koloni sesuai kriteria sebagai berikut (Gambar 10).



Gambar 10. Pola Tumbuh Koloni

Pengamatan tambahan dapat berupa warna dan konsistensi koloni (kering, basah, berlendir, permukaan kering sementara isi berupa lendir, dll.)

6. Berikan deskripsi koloni yang anda temukan kemudian tulis pada *log book*.

Catatan:

- ✓ Berikan jeda sekitar 10 detik setelah pembakaran jarum ose sebelum digunakan, atau tempelkan pada agar sampai berhenti mendesis.
- ✓ Selalu balik cawan petri, baik sebelum isolasi atau setelahnya untuk menghindari kondensasi di permukaan agar yang akan merusak hasil gores.
- ✓ Istilah 'gores' pada teknik gores bukan berarti membuat robekan pada agar sesuai pola. Pada teknik ini agar tidak boleh luka/ robek. Goresan jarum ose hanya membuat pola pada permukaan agar.
- ✓ Teknik gores memerlukan gerakan jari yang luwes dan gerakan siku minimal, begitu pula pergelangan tangan. Oleh karena itu berlatihlah dahulu sebelum praktek pada agar. Gerakan yang tidak luwes akan menyebabkan agar robek.

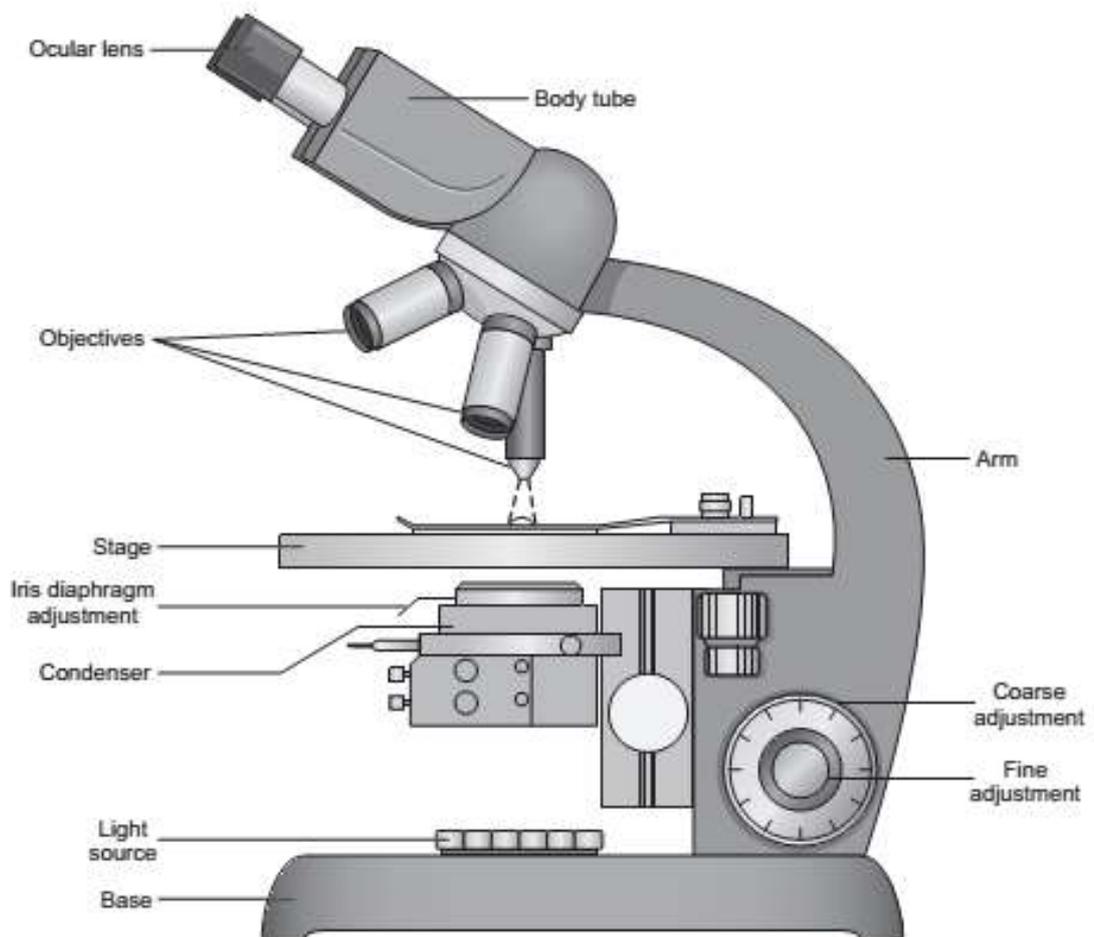
## VIII. PENGGUNAAN MIKROSKOP

### Tujuan

1. Mengetahui bagian-bagian mikroskop cahaya beserta fungsinya.
2. Mengetahui cara menggunakan mikroskop cahaya secara baik dan benar.
3. Mampu menggunakan mikroskop cahaya untuk pengamatan bakteri dan jamur, dengan baik dan benar.

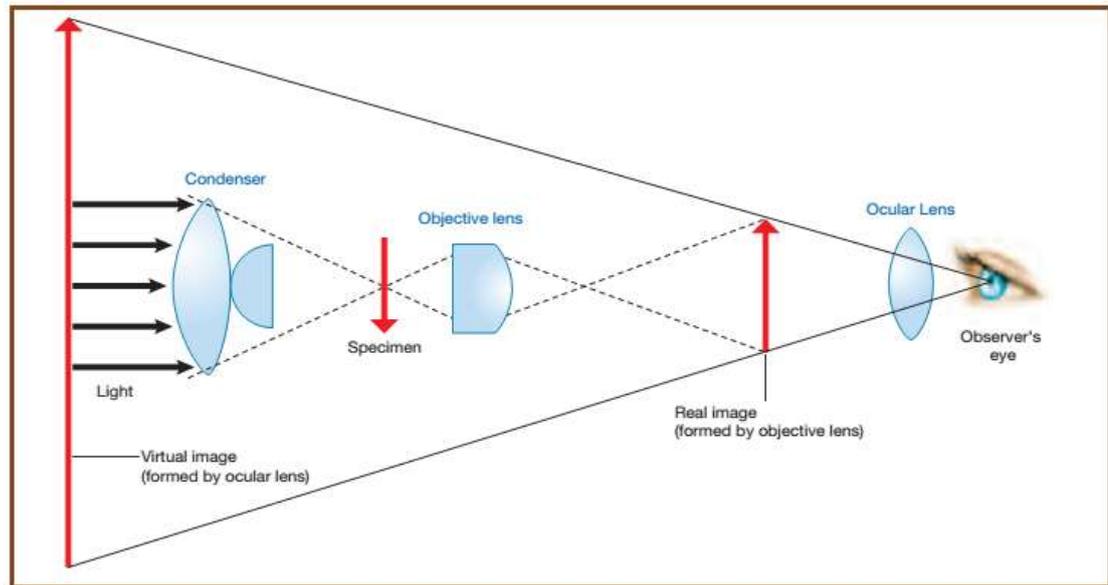
### Teori

Mikroskop yang umum digunakan saat ini untuk keperluan laboratorium adalah mikroskop cahaya medan terang. Pada mikroskop tersebut, cahaya dilewatkan pada objek sehingga objek terlihat seperti bayangan atau tampak lebih gelap dari latar. Berikut bagian-bagian mikroskop standar (Gambar 11).



Gambar 11. Mikroskop Cahaya

Mikroskop bekerja menggunakan prinsip yang hampir sama dengan alat optik lain, yaitu berdasarkan perbedaan indeks bias. Ketika cahaya melewati bahan dengan kerapatan yang lebih besar, maka kecepatannya akan berubah. Cahaya kemudian merambat dengan arah yang berbeda dari sebelumnya. Hal tersebut memberikan kesan bahwa benda memiliki ukuran yang lebih besar atau berada lebih dekat. Cara kerja mikroskop dapat dilihat pada Gambar 12 berikut.



Gambar 12. Cara Kerja Mikroskop

Mikroskop memiliki dua jenis lensa yaitu objektif dan okuler yang bekerja untuk memperbesar imej. Ada empat ukuran perbesaran lensa objektif yang umum dimiliki mikroskop, yaitu perbesaran 4 kali, 10 kali, 40 kali dan 100 kali. Keempat lensa tersebut dapat digunakan bergantian dengan memutar piringan di atasnya sampai posisi lensa sejajar dengan tabung menuju lensa okuler. Sementara untuk lensa okuler, ukuran magnifikasi yang umum ada adalah perbesaran 5 kali, 10 kali dan 15 kali. Namun demikian, perubahan perbesaran lensa hanya bisa dilakukan dengan membuka lensa dan menggantinya dengan ukuran sesuai yang diinginkan. Ukuran perbesaran yang mampu dipenuhi lensa biasanya tertulis pada bingkai atau dinding tabung lensa seperti yang terlihat pada Gambar 13 berikut.



Gambar 13. Ukuran Perbesaran Lensa Objektif dan Lensa Okuler

Tingkat perbesaran yang dilakukan mikroskop bisa dihitung dengan mengalikan tingkat perbesaran yang dihasilkan oleh lensa objektif dengan lensa okuler. Dalam kasus pengamatan bakteri, sering kali perbesaran maksimum oleh mikroskop cahaya masih belum mampu menghasilkan imej dengan ukuran yang layak untuk diamati. Dalam hal ini, perbesaran bisa ditingkatkan dengan penambahan minyak imersi. Minyak imersi mempunyai indeks bias setara lensa. Pada umumnya minyak imersi memiliki kekuatan perbesaran maksimum sebesar 115 kali.

Untuk menghasilkan imej yang jelas dan tajam, dibutuhkan manipulasi terhadap jarak kondensor di bawah pentas dengan sumber cahaya, dan kenop penajam imej. Kegiatan manipulasi ini sangat mempengaruhi hasil pengamatan, oleh karena itu harus dilakukan dengan telaten. Pergerakan tombol dan pentas hanya bisa dilakukan dengan sangat perlahan untuk mendapatkan imej yang bersih dan tajam, mengingat mikroba dalam keadaan hidup tidaklah berwarna (mendekati transparan).

### **Alat dan Bahan**

- ✓ Alat yang digunakan adalah mikroskop cahaya, kaca objek beserta *cover glass*, labu semprot, jarum ose, dan bunsen.
- ✓ Bahan yang digunakan adalah biakan bakteri/jamur, tisu, etanol 70% dan akuades steril.

### **Cara Kerja**

Bersihkan kaca objek dengan menyemprotkan etanol 70% pada permukaan kaca dan mengelapnya dengan tisu. Pastikan tidak ada kotoran dan jejak-jejak seperti sidik jari.

1. Gambar lingkaran bagian bagian bawah-tengah dari kaca objek dengan spidol non permanen.
2. Ambil secara aseptis satu ose akuades steril. Taruh akuades pada bagian atas yang telah ditandai lingkaran tersebut.
3. Secara aseptis, cuplik 1 ose koloni bakteri dan goreskan pada permukaan kaca objek yang telah diberi air tadi.
4. Campurkan dengan mengaduk pelan secara melingkar. Hindari memperbesar lingkaran, cairan harus terkonsentrasi pada titik tak lebih besar dari 1 cm.
5. Tutup dengan hati-hati menggunakan *cover glass*. Metoda menutup adalah dengan menjatuhkan dari jarak dekat satu sisi *cover glass* sehingga cairan menutup celah antar kaca, kemudian lepaskan *cover glass* secara perlahan. Ini untuk menghindari terperangkapnya gelembung udara.
6. Laporkan hasil kerja pada asisten. Kelompok yang memiliki hasil preparat dengan banyak gelembung udara harus mengulangi pekerjaan hingga berhasil.
7. Amati hasil kerja menggunakan mikroskop.

Prosedur kerja mikroskop adalah sebagai berikut.

- a. Mikroskop harus dibawa dengan kedua belah tangan. Posisi memegang adalah pada dasar mikroskop dan bagian penyangga tabung menuju lensa okuler.
- b. Lensa mikroskop harus dibersihkan dengan hati-hati sebelum dan setelah digunakan, dengan mengelapnya secara hati-hati. Tidak dibenarkan untuk membuka-buka lensa okuler dan bagian mikroskop lainnya.
- c. Mulailah pengamatan dengan perbesaran objektif terendah. Naikkan pentas sampai kira-kira 5 mm dari lensa, kemudian mulai naikkan pentas perlahan sambil mengamati dari lensa okuler. Ketika imej telah mulai terlihat, mulai pertajam dengan penajam imej.
- d. Pilihlah bagian yang akan diamati atau sebagai titik fokus.

- e. Turunkan pentas ke titik awal, ubah lensa ke tingkat perbesaran lebih tinggi, dan mulai pengamatan kembali. Lakukan hal yang sama sampai perbesaran objektif 100 kali.
  - f. Gunakan minyak imersi hanya pada pengamatan untuk perbesaran lensa objektif tertinggi. Penggunaannya adalah dengan meneteskan secara perlahan di atas *cover glass* sebelum pengamatan menggunakan lensa objektif perbesaran 100 kali. Pastikan tidak terdapat gelembung udara pada tetesan tersebut. Sisa minyak imersi pada lensa harus dibersihkan dengan mengelapnya menggunakan tisu dengan perlahan dan hati-hati agar tidak menggores lensa. Sisa minyak yang tidak bersih akan menyebabkan lensa ditumbuhi kapang.
  - g. Turunkan pentas ke posisi awal dan arah lensa menuju lensa objektif perbesaran terkecil, lalu matikan cahaya mikroskop setelah selesai menggunakan.
8. Gambar hasil pengamatan mikroskopis dalam *log book*. Diameter lingkaran bingkai gambar tidak boleh kurang dari 8 cm.

### **Catatan**

- ✓ Putar penajam imej dengan perlahan, memutar dengan kasar akan merusak mikroskop hingga tidak bisa digunakan lagi.
- ✓ Pengamat rabun jauh/ dekat tidak perlu menggunakan kaca mata ketika memakai mikroskop. Jika menggunakan kaca mata, jauhkan dari lensa okuler karena berpotensi menggores lensa.
- ✓ Menghasilkan imej yang bagus untuk kultur hidup membutuhkan kesabaran karena umumnya bakteri bersifat motil (bergerak) dan berbentuk transparan.

## **IX. PEWARNAAN GRAM DAN SPORA**

### **Tujuan**

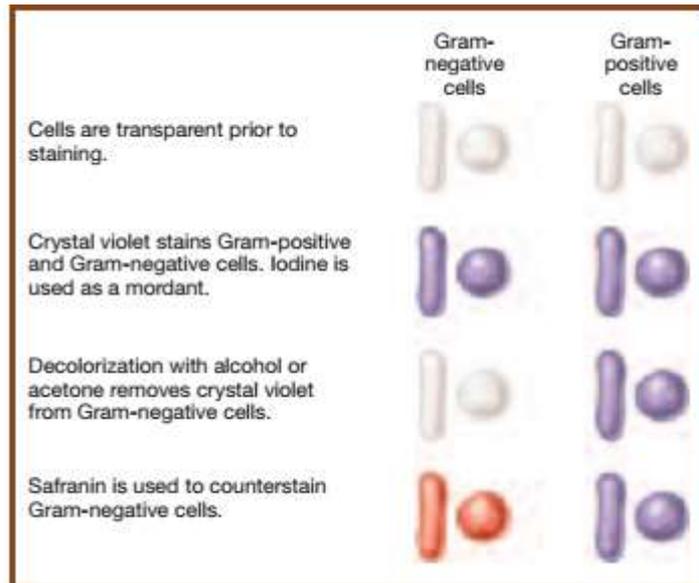
1. Mengetahui kegunaan pewarnaan gram dan spora serta prosedur pengerjaannya.
2. Mampu melakukan proses pewarnaan gram dan spora dengan hasil yang baik.

### **Teori**

Kegiatan memberikan warna pada sel bakteri bertujuan untuk memperjelas bentuk bakteri di bawah mikroskop, diferensiasi kelompok dan menunjukkan produksi endospora. Untuk berbagai tujuan, terdapat bermacam-macam jenis pewarnaan, seperti pewarnaan sederhana, pewarnaan negatif, pewarnaan asam, pewarnaan flagel, pewarnaan kapsul, pewarnaan Gram dan pewarnaan spora. Setiap jenis pewarnaan memiliki zat pewarna yang relatif berbeda.

Pewarnaan Gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang berfungsi mengelompokkan bakteri atas dua jenis, yaitu Gram negatif dan Gram positif. Sampai saat ini, pewarnaan Gram masih digunakan untuk menjadi salah satu ciri identifikasi bakteri. Teknik pewarnaan ini memiliki bermacam metode, namun demikian memiliki dasar yang hampir sama.

Pewarna primer yang digunakan adalah kristal violet. Warna yang dihasilkan akan diperkuat oleh Iodin. Warna yang tidak berikatan dengan dinding sel akan dibersihkan oleh alkohol atau aseton. Sel yang tidak mengikat warna kemudian diberikan pewarna lain, yaitu Safranin. Sel dengan Gram positif akan berwarna ungu, sementara Gram negatif akan berwarna merah muda. Gambaran sederhana dapat dilihat dari ilustrasi berikut.



Gambar 14. Proses Pengikatan Zat Warna oleh Sel Bakteri

Pengikatan zat warna oleh sel bakteri berkaitan dengan komposisi dinding sel. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dan ikatan silang (*crosslinking*) yang rapat, sehingga zat warna dengan mudah terperangkap pada jaringan. Sementara bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang sangat tipis dan lapisan lipid yang tebal. Lapisan lipid yang tebal menghasilkan pori dinding sel yang relatif besar. Oleh sebab itu dinding sel kesulitan untuk mempertahankan warna dari kristal violet.

Pewarnaan spora adalah pewarnaan bakteri yang mengambil fokus pada menandai endospora yang dihasilkan oleh bakteri. Endospora merupakan struktur berbentuk elips atau bulat yang dihasilkan oleh jenis bakteri tertentu. Struktur tersebut sangat stabil dan tahan terhadap kondisi yang tidak mendukung pertumbuhan, untuk kemudian berkembang menjadi bakteri baru saat keadaan lingkungan telah menjadi lebih baik.

Pewarnaan spora bisa dilakukan dengan dua cara yaitu metoda Schaeffer-Fulton dan metoda Wirtz – Conklin. Untuk praktikum ini digunakan metoda pertama. Metoda tersebut menggunakan pewarna utama hijau malachite dan pewarna lawan berupa Safranin. Dalam proses pewarnaan digunakan uap panas untuk mempermudah masuknya zat warna ke dalam sel bakteri menuju permukaan spora, dan akuades untuk melunturkan warna. Spora adalah benda yang sulit untuk

diwarnai, namun ketika telah diwarnai, akan mampu mempertahankan warna dengan baik.

### **Alat dan Bahan**

- ✓ Alat yang diperlukan antara lain kaca objek, bunsen, jarum ose, pipet Pasteur, *waterbath* dan mikroskop.
- ✓ Bahan yang digunakan adalah kultur bakteri, safranin, kristal violet, iodin, etanol, akuades.

### **Cara Kerja**

1. Persiapkan olesan sampel sesuai langkah-langkah berikut.
  - a. Ambil akuades dengan menggunakan jarum ose kemudian taruh di permukaan kaca objek yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70 %.
  - b. Ambil contoh dari koloni yang diinginkan dengan menggunakan jarum ose.
  - c. Campurkan contoh dari koloni dengan akuades di atas kaca objek. Jaga agar tidak mengambil contoh terlalu banyak, atau hanya sampai membuat akuader sedikit keruh.
  - d. Biarkan olesan kering-udara.
2. **Pewarnaan Gram**
  - a. Teteskan pewarna kristal violet pada olesan kemudian biarkan selama satu menit.
  - b. Bilas objek dengan akuades.
  - c. Tetesi olesan dengan iodin, putar-putar kemudian miringkan ke kanan dan kiri untuk mengeringkan. Teteskan kembali iodin dan biarkan selama 1 menit.
  - d. Bilas kembali dengan akuades.
  - e. Teteskan alkohol pada olesan secara merata, putar-putar dan miringkan kaca objek ke kanan dan kiri. Lanjutkan penambahan alkohol sampai mengalir dari kaca objek. Proses ini harus dilakukan pada kisaran waktu 5 – 10 detik. Penggunaan alkohol

berlebihan atau alokasi waktu yg kurang akan memberikan hasil yang keliru.

- f. Segera bilas dengan akuades.
- g. Teteskan safranin dan biarkan selama lebih kurang 30 detik.
- h. Bilas dengan akuades.
- i. Keringkan secara perlahan dengan menggunakan tisu.

### 3. Pewarnaan Spora

- a. Basahi kaca objek dengan pewarna hijau malachite 10 %.
- b. Taruh di atas air mendidih selama lebih kurang 5 menit. Jaga agar pewarna tidak mengering.
- c. Dinginkan olesan kemudian bilas dengan akuades.
- d. Teteskan Safranin kemudian biarkan selama 1 menit.
- e. Bilas dengan akuades kemudian keringkan perlahan menggunakan kertas tisu.

4. Amati dengan menggunakan mikroskop.

Catatan :

- ✓ Lakukan prosedur pewarnaan sesuai tahapan dengan waktu yang sesuai. Terutama ketika melakukan pembilasan menggunakan alkohol.
- ✓ Olesan yang terlalu tebal akan menyebabkan hasil yang tidak bagus, morfologi bakteri akan sulit untuk diamati.

## DAFTAR PUSTAKA

- Elida, M. 2009. Buku Kerja Praktek Mahasiswa (BKPM) Mikrobiologi Pangan. Politeknik Pertanian Payakumbuh.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Hogg, Stuart. Essential Microbiology. 2005. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Leboffe, MJ and Pierce BE. 2011. A Photographic Atlas for The Microbiology Laboratory 4<sup>th</sup> Edition. Morton Publishing. Colorado.
- Pollack, Roberta et al. 2009. Laboratory Exercises in Microbiology. John Wiley & Sons Inc. New Jersey.
- Prescott, LM, Harley, JP and Klein, DA. Laboratory Exercises in Microbiology 5<sup>th</sup> Edition. 2002. The McGraw Hill Company. USA.
- Tim Laboratorium Mikrobiologi Fakultas biologi Universitas Jendral Sudirman. 2008. *Petunjuk Pratikum Mikrobiologi Dasar*. Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto
- Winiati dan Nurwitri. 2012. *Mikrobiologi Pangan*. IPB Press. Bogor.