

Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi

Ir. Trimurti Artama, M.Si.



PENDAHULUAN

Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi adalah mempelajari ilmu tentang mikroorganisme dengan menggunakan suatu alat bantu mikroskop yang dapat digunakan untuk melihat sel mikroorganisme yang sedemikian kecil ukurannya melalui suatu sistem lensa pembesar.

Modul ini terbagi dalam 4 kegiatan praktikum, sebagai berikut.

Kegiatan Praktikum 1 : Mikroskop.

Kegiatan Praktikum 2 : Persiapan Media dan Larutan Pengencer.

Kegiatan Praktikum 3 : Kultur Mikroorganisme dan Cara Inokulasi.

Kegiatan Praktikum 4 : Pewarnaan Bakteri.

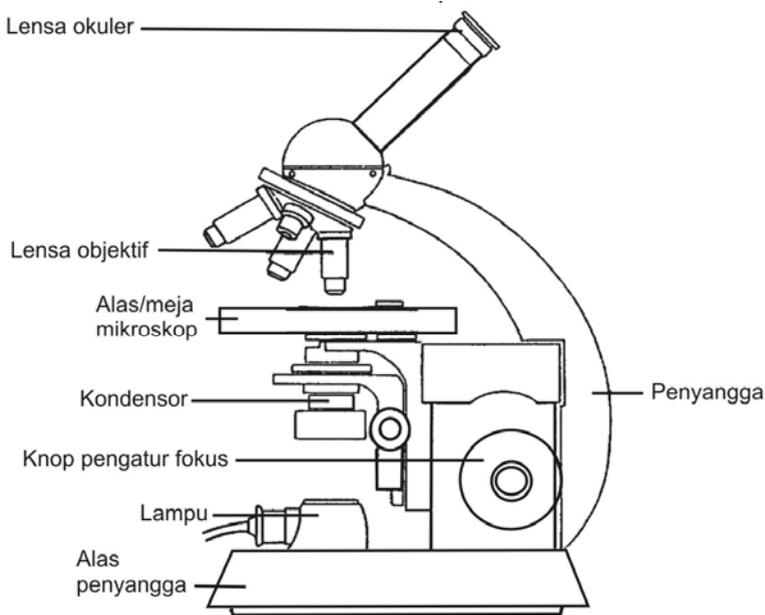
Dalam mempelajari praktikum di atas, Anda akan mengenal penggunaan mikroskop, persiapan media dan larutan pengencer, kultur mikroorganisme dan cara inokulasi dan pewarnaan bakteri.

Setelah melaksanakan praktikum, Anda akan mengenal/mengetahui dasar-dasar praktikum mikrobiologi sehingga lancar melaksanakan praktikum berikutnya.

Kegiatan Praktikum1

Mikroskop

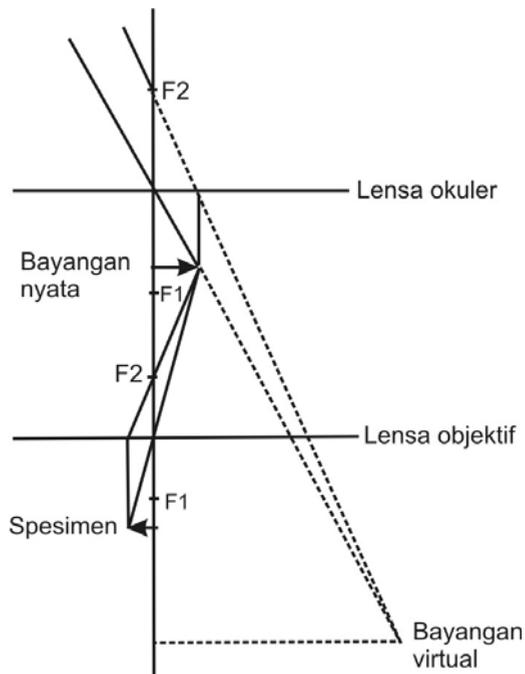
Mikrobiologi adalah suatu ilmu mengenai makhluk hidup yang mempunyai ukuran sedemikian kecilnya sehingga setiap individu selnya tidak mungkin dapat dilihat langsung oleh mata. Oleh karena itu, ilmu mengenai mikrobiologi dimulai dari penemuan suatu alat yang disebut mikroskop yang dapat digunakan untuk melihat sel mikroba yang sedemikian kecil ukurannya melalui suatu sistem lensa pembesar. Mikroskop dibedakan atas beberapa jenis, tetapi mekanisme bekerjanya pada prinsipnya sama, yaitu terdiri dari sistem *optikal* atau sistem pembesaran, dan sistem iluminasi yang menyebabkan terlihatnya spesimen atau objek. Bagian-bagian mikroskop dapat dilihat pada Gambar 1.1.



Gambar 1.1.
Bagian-bagian Mikroskop Sederhana (Brock, 1974).

A. LENS A DAN PEMBESARAN

Pembesaran oleh mikroskop merupakan hasil dari dua sistem lensa, yaitu *lensa objektif* yang terletak di dekat spesimen, dan *lensa okuler* (*eyepiece lens*) yang terletak di atas di dekat mata yang melihatnya. Seperti terlihat pada Gambar 1.2, lensa objektif mengatur fokus sinar lampu pada spesimen yang ditempatkan di belakang titik focal F_1 dan memperbesar spesimen sehingga menghasilkan *bayangan nyata* (*real image*) yang diproyeksikan pada bidang focal dari lensa okuler. Bayangan nyata yang terletak di depan titik focal F_1 dari lensa okuler diperbesar oleh lensa okuler sehingga membentuk *bayangan virtual* yang dapat dilihat oleh mata. Dengan demikian, total pembesaran merupakan hasil dari pembesaran lensa objektif dan lensa okuler. Lensa objektif terdiri dari kombinasi lensa konveks dan lensa konkaf.



Gambar 1.2.
Pembentukan Bayangan oleh Lensa Objektif dan Okuler pada Mikroskop.

Untuk memperoleh berbagai tingkat pembesaran, setiap mikroskop biasanya dilengkapi dengan 3 buah lensa objektif yang dipasang pada “*nosepiece*” yang dapat diputar, yaitu: (1) lensa objektif berkekuatan rendah (*low power*, 16 mm) yang ditandai dengan angka 10× pada bagian luarnya dan mempunyai jarak kerja 5 – 8,3 mm, (2) lensa objektif berkekuatan tinggi (*high dry*, 4 mm) yang ditandai dengan angka 40×, 43×, 44×, atau 45×, dan mempunyai jarak kerja 0,46 – 0,72 mm, (3) lensa objektif minyak imersi (*immersion oil*, 1,8 mm) yang ditandai dengan angka 95×, 97×, atau 100× dan mempunyai jarak kerja 0,13 – 0,14 mm. Angka 16 mm, 4 mm dan 1,8 mm menunjukkan panjang fokal dari masing-masing lensa, yaitu jarak antara lensa dengan titik fokal lensa (F1 dan F2). Gambar 1.3 menunjukkan hubungan antara jarak kerja lensa objektif dengan pengaturan diafragma iris. Semakin pendek jarak kerja lensa, diafragma akan semakin terbuka. Jika lensa okuler mempunyai pembesaran 10× maka total pembesaran dengan menggunakan lensa berkekuatan rendah adalah 100×, dengan lensa berkekuatan tinggi pembesaran adalah 400×, 430×, 440×, atau 450×, dan pembesaran dengan lensa minyak imersi adalah 950×, 970×, atau 1000×.

Untuk mengatur fokus dari sistem lensa pada spesimen, digunakan dua buah knop yang dapat diputar yaitu knop pengatur kasar yang mengatur jarak antara lensa dengan spesimen, dan knop pengatur halus yang menggerakkan tabung penyangga lensa secara halus sehingga menghasilkan fokus yang tepat.

B. RESOLVING POWER

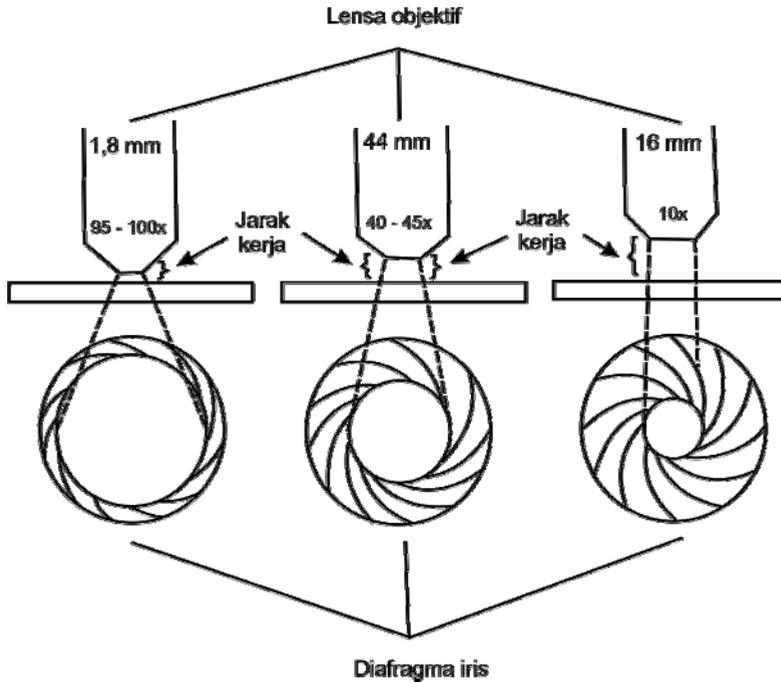
Karena total pembesaran merupakan hasil dari pembesaran dua buah sistem lensa maka seharusnya total pembesaran dapat dinaikkan dengan cara menambah lebih banyak lensa. Tetapi, sebenarnya tidak demikian halnya, karena suatu lensa dibatasi oleh sifatnya yang disebut “*resolving power*”. “*Resolving power*” adalah kemampuan dari suatu lensa untuk melihat dua buah objek yang berdekatan sebagai objek yang terpisah secara jelas. Sebagai contoh, “*resolving power*” dari mata pada jarak 25 cm adalah 0,1 mm (100 mikron). Sifat dari lensa ini tergantung pada panjang gelombang sinar dan “*numerical aperture*” (NA) dari lensa. NA merupakan fungsi dari indeks refraksi dan sudut apertur dari lensa objektif, di mana $NA = n \sin \theta$, dan $\theta = 1/2 \alpha$.

$$\begin{aligned} \text{“Resolving power”} &= \text{diameter dari objek terkecil yang terlihat} \\ &= \frac{\text{panjang gelombang}}{\text{“numerical aperture”}} \end{aligned}$$

“*Resolving power*” berbanding terbalik dengan resolusi, oleh karena itu resolusi dapat dipertinggi dengan cara menggunakan sinar dengan panjang gelombang yang lebih pendek, menaikkan indeks refraksi antara objek (spesimen) dan lensa objektif, dan menaikkan sudut apertur (α) dari lensa objektif. Jadi, penggunaan sinar biru yang mempunyai panjang gelombang pendek lebih baik daripada sinar merah yang mempunyai panjang gelombang lebih panjang. Akan tetapi, karena spektrum dari sinar yang dapat dilihat (*visible*) relatif sempit maka usaha menaikkan resolusi dengan cara menurunkan panjang gelombang merupakan suatu cara yang sangat terbatas. Salah satu cara untuk menaikkan NA dari lensa adalah dengan menggunakan suatu *kondenser*. *Kondenser* yang baik akan menghasilkan persamaan sebagai berikut:

$$\text{“Resolving power”} = \frac{\text{panjang gelombang}}{\text{“}2\text{NA”}}$$

Udara mempunyai indeks refraksi ($n = 1$) lebih kecil daripada gelas, oleh karena itu sinar lampu yang datang melalui gelas objek ke udara akan direfraksi atau dibelokkan. Sinar yang hilang ini menurunkan NA dan resolusi dari lensa objektif. Jika di antara gelas objek dan lensa objektif diberi minyak imersi yang mempunyai indeks refraksi ($n = 1.5$) sama dengan gelas “*crown*” yang digunakan untuk membuat lensa, kehilangan sinar dapat dicegah. Akibatnya, resolusi akan lebih tinggi dan bayangan dapat lebih jelas. Akibat lain dari penggunaan minyak imersi adalah panjang fokal menjadi diperkecil sehingga sudut apertur semakin besar. Oleh karena itu, jarak antara lensa objektif dan spesimen harus diperpendek. Gambar 1.3 menunjukkan cara kerja minyak imersi dalam mengurangi jumlah sinar yang tidak dapat ditangkap oleh lensa objektif.



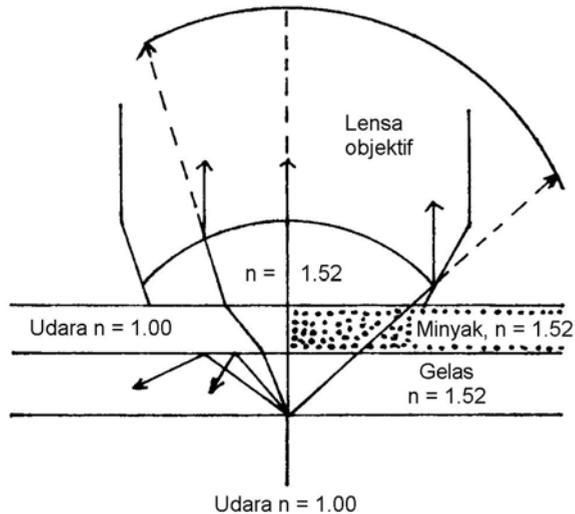
Gambar 1.3.

Hubungan antara Jarak Kerja Lensa Objektif dengan Pengaturan Diafragma Iris

C. ILUMINASI

Di samping lensa objektif dan okuler, dua elemen lainnya yang penting dalam mikroskop adalah lampu dan lensa kondensor. Walaupun sebagai sumber sinar untuk mikroskop dapat digunakan sinar matahari, tetapi biasanya digunakan sinar dari lampu tungsten karena warna, suhu, dan intensitasnya bersifat stabil dan dapat dengan mudah dikontrol. Adanya lampu dan kondensor akan mengatur iluminasi dari spesimen secara tepat. Besarnya sinar yang melalui lensa objektif berbeda untuk setiap jenis lensa. Jika pembesaran lensa objektif naik, jarak kerja lensa menurun, dan sudut apertur dari objektif bertambah. Oleh karena itu, dengan bertambahnya pembesaran, bertambah banyak sinar yang harus masuk ke lensa objektif. Besarnya sinar yang masuk diatur oleh diafragma iris yang terletak di antara kondensor dan lensa. Dengan lensa objektif berkekuatan rendah dan tinggi,

diafragma iris tidak terbuka penuh (Gambar 1.3) karena pada pembesaran ini spesimen akan terlihat jelas jika sinar tidak terlalu pekat. Tetapi, jika digunakan lensa objektif minyak imersi yang mempunyai pembesaran $95\times$ atau lebih maka jarak kerja adalah yang terpendek, dan diafragma iris akan lebih terbuka.



Gambar 1.4.
Cara Kerja Lensa Minyak Imersi dalam Mikroskop Sederhana
(Pelczar dan Reid, 1972).

D. PEMERIKSAAN BAKTERI, KHAMIR, KAPANG, KAPANG PADA KULTUR CAWAN

1. Bahan dan Alat

a. Bahan

Suspensi khamir.

Suspensi bakteri.

Kapang yang ditumbuhkan pada media agar di cawan petri.

Larutan gliserol 10%.

Potato Dextrose Agar (PDA)/Malt Ex.

b. *Alat*

Mikroskop medan terang.

Gelas objek.

Gelas penutup.

Cawan petri (1 – 2 cawan/kelompok).

Batang gelas berbentuk U atau V (1 – 2 batang/kelompok).

Kertas saring.

Otoklaf.

E. PROSEDUR KERJA

1. Pemeriksaan Bakteri dan Khamir

Setiap mahasiswa harus berlatih cara menggunakan mikroskop dengan memilih salah satu atau lebih bahan di atas, dan membuat suatu preparat basah. Dengan menggunakan jarum Ose loop yang telah dipijarkan, teteskan suspensi bakteri atau khamir ke atas gelas objek, kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*) dengan cara sedemikian rupa sehingga tidak ada gelembung udara di antara gelas objek dan gelas penutup.

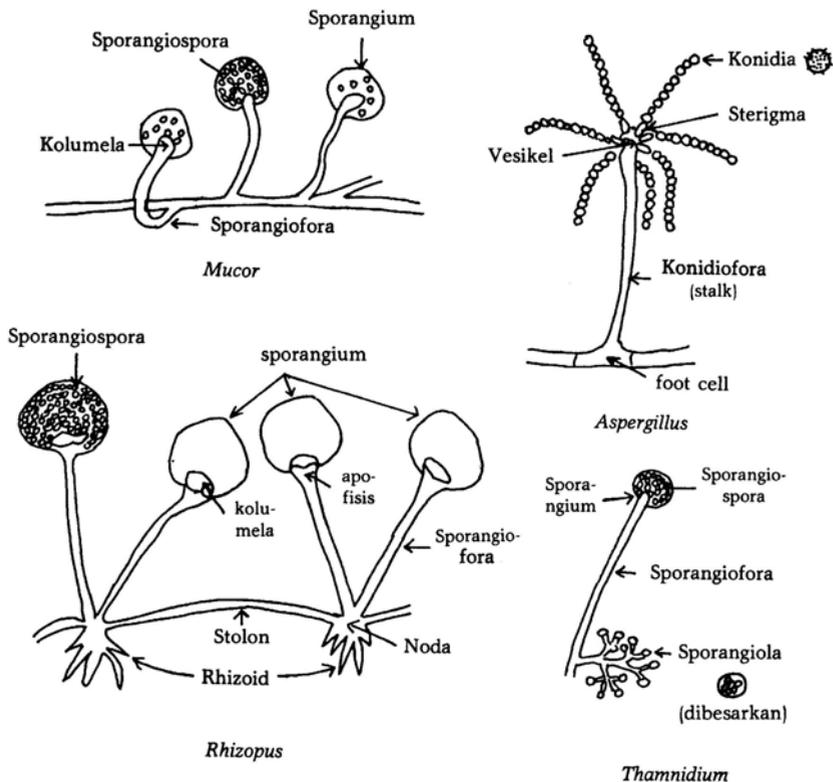
Letakkan preparat basah tersebut pada alas/meja mikroskop, tepat di bagian tengah di bawah lensa. Nyalakan lampu mikroskop dan atur sedemikian rupa sehingga jumlah sinar yang melalui spesimen semaksimal mungkin. Dengan menggunakan lensa objektif *berkekuatan rendah*, turunkan tabung penyangga lensa menggunakan knop pengatur kasar sehingga jarak antara lensa dan spesimen kira-kira 0,5 cm. Spesimen dilihat melalui lubang untuk mata (*eyepiece*), dan dengan hati-hati lensa objektif dinaikkan menggunakan *knop pengatur kasar* sehingga spesimen tepat pada fokus. Gunakan *knop pengatur halus* untuk menajamkan fokus. Setelah spesimen tepat pada fokus, atur kaca dan diafragma iris sehingga terlihat bayangan yang paling jelas. *Jangan sekali-kali memegang lensa dengan tangan.* Untuk memperoleh gambar yang tepat, gelas objek dapat digeser ke kiri, ke kanan, ke depan atau ke belakang, dengan mengatur menggunakan knop penyangga spesimen. Kemudian gunakan lensa objektif berkekuatan tinggi (*high dry*) dengan cara memutar lensa objektif. Cara selanjutnya sama dengan penggunaan lensa berkekuatan rendah.

Penggunaan lensa objektif *minyak imersi* harus lebih berhati-hati. Mula-mula spesimen harus diatur lokasinya menggunakan lensa berkekuatan rendah. Perlu diingat bahwa semakin tinggi pembesaran, areal objek yang

dapat dilihat di bawah mikroskop akan semakin sempit. Mula-mula tabung penyangga lensa dinaikkan, kemudian putarlah lensa minyak imersi sehingga tepat di atas spesimen. Teteskan minyak imersi di atas gelas penutup yang terletak di atas gelas objek, dan dengan melihat dari samping, turunkan lensa perlahan-lahan sampai menyentuh minyak tetapi, jangan menyentuh gelas objek. Gunakan pengatur halus untuk menepatkan fokus. *Jangan sekali-kali menurunkan tabung penyangga lensa sewaktu melihat melalui “eyepiece” karena lensa dapat membentur gelas objek.*

2. Pemeriksaan Kapang

Berilah setetes larutan gliserol 10% atau larutan laktofenol di atas gelas objek. Dengan sepasang jarum yang lebih tebal daripada jarum Ose, ambillah pertumbuhan kapang pada agar secara hati-hati, dengan cara mengambil seluruh pertumbuhan kapang mulai dari pertumbuhan di bawah agar sampai dengan miseliumnya. Usahakan jangan sampai ada yang rusak atau terputus-putus. Tutup dengan gelas penutup, dan amati di bawah mikroskop seperti pada bakteri dan khamir. Laporkan bentuk miselium (septat, nonseptat, bentuk cabang), bentuk spora aseksual (konidia, sporangiospora, arthrospora) serta besar dan warnanya, dan ciri-ciri lainnya seperti stolon, rhizoid, “foot cell”, kolumela, apofisis, vesikal, sklerotia, klamidospora, spora seksual, dan sebagainya (Gambar 1.5).

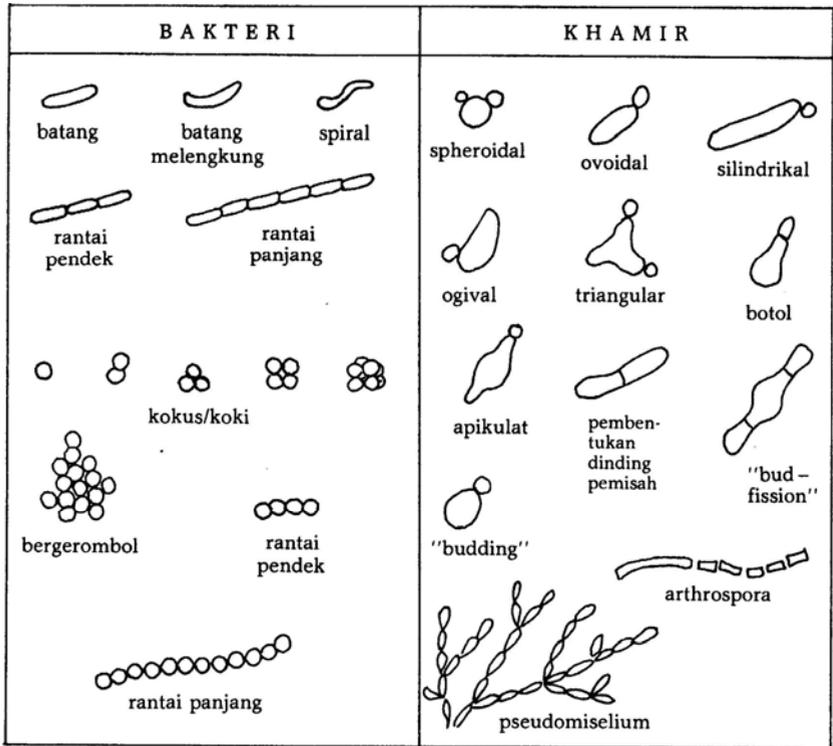


Gambar 1.5.
Diagram Bentuk Beberapa Kapang

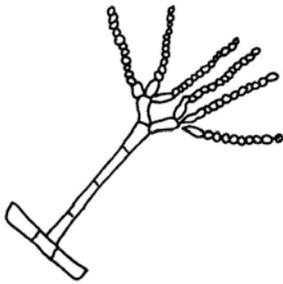
3. Pemeriksaan Kapang pada Kultur Cawan

Cara pemeriksaan kapang seperti prosedur sebelumnya (pada gelas objek) agak sukar dilakukan karena dalam mengambil kultur sering rusak sehingga struktur kapang tidak utuh lagi.

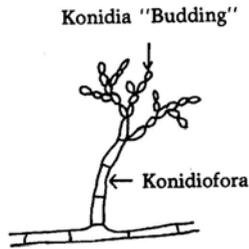
Cara yang lebih mudah adalah dengan mengamati pertumbuhan kapang langsung pada agar cawan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran yang terendah. Setelah difokuskan pada bagian pinggir koloni, letakkan gelas penutup di atas koloni tersebut, dan struktur kapang diamati dengan pembesaran yang lebih tinggi (*high dry*). Perlu diingat bahwa struktur kapang yang dapat dilihat dengan jelas di bawah mikroskop hanya pada bagian tepi koloni.



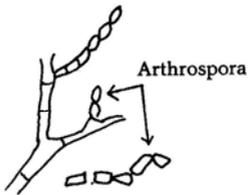
Gambar 1.6.
Bentuk dan Cara Pengelompokan Bakteri, serta Bentuk dan Cara Reproduksi



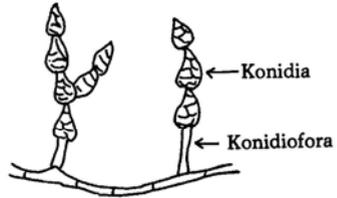
Penicillium



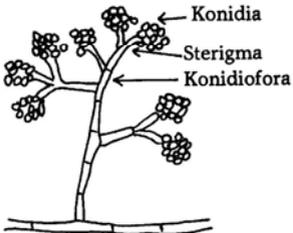
Neurospora (Monilia)



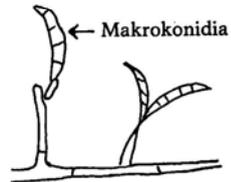
Geotrichum



Alternaria



Trichoderma



Fusarium

Gambar 1.7.
Diagram Bentuk Beberapa Kapang (Lanjutan)



LATIHAN

Untuk memperdalam pemahaman Anda mengenai materi di atas, kerjakanlah latihan berikut!

- 1) Sebutkan masing-masing 3 (tiga) macam bahan pangan yang sering ditumbuhi oleh ketiga mikroorganismenya yang Saudara amati!
- 2) Apakah keuntungan pemeriksaan kapang menggunakan kultur cawan dibandingkan dengan pembuatan preparat basah (*wet mount*)?

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk dapat menjawab soal-soal latihan di atas, Anda harus mempelajari kembali Kegiatan Belajar 1 tentang metode-metode/cara penggunaan mikroskop dengan baik.



RANGKUMAN

Mikroskop adalah alat untuk mengamati objek berukuran kecil yang tidak dapat dilihat mata. Pembesaran oleh mikroskop merupakan hasil dari dua sistem lensa yaitu lensa objektif yang terletak di dekat spesimen dan lensa okuler yang terletak di atas di dekat mata yang melihatnya.

Total pembesaran mikroskop adalah hasil kali pembesaran lensa okuler dan objektif. *Resolving Power* (RP) adalah kemampuan suatu lensa untuk melihat dua titik sebagai objek yang terpisah dengan jelas, sifat dari lensa ini tergantung pada panjang gelombang sinar dan "*Numerical Aperture*" (NA) dari lensa.

Mikroorganismenya dapat diamati langsung dengan mikroskop dengan menyiapkan preparat *wet mount* atau melalui pewarnaan.

Di samping lensa objektif dan okuler, dua elemen lainnya yang penting dalam mikroskop adalah lampu dan lensa kondensor. Adanya lampu dan kondensor akan mengatur dominasi dari spesimen secara tepat.



TES FORMATIF 1

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Sistem optik pada mikroskop cahayanya adalah
 - A. lensa
 - B. kondensor
 - C. sinar tampak
 - D. sinar fluorescent

- 2) Suatu lensa memiliki Resolving Power (RP) 2 mikron artinya lensa
 - A. memiliki pembesaran 2x
 - B. dapat membedakan titik bergerak 2 mikron atau lebih
 - C. objektif
 - D. berdiameter 2 mikron

- 3) Jika $L = 550 \text{ nm}$ (nano meter), $\sin \theta = 0,6$ maka RP sama dengan
 - A. 0,280 mikron
 - B. 0,419 mikron
 - C. 0,559 mikron
 - D. 0,599 mikron

- 4) Semakin tinggi nilai Numerical Apertur (NA) suatu lensa
 - A. semakin baik resolusinya karena RP nya kecil
 - B. semakin bawah resolusinya karena RP nya besar
 - C. makin besar jarak dua titik yang dapat dibedakan dengan jelas
 - D. tidak berpengaruh terhadap RP

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 Belajar 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 Belajar 2. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Belajar 1, terutama bagian yang belum dikuasai.

Kegiatan Praktikum 2

Persiapan Media dan Larutan Pengencer

Pupukan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba di laboratorium disebut medium (tunggal) atau media jamak). Medium dibedakan atas tiga macam yaitu: (1) *medium cair* yang dapat digunakan untuk berbagai tujuan termasuk menumbuhkan atau membiakkan mikroba, fermentasi, dan uji-uji lainnya, misalnya Nutrient Broth, Glucose Broth, dan sebagainya, (2) *medium padat*, misalnya Nutrient Agar, Plate Count Agar, atau Potato Dextrose Agar, yang dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba pada permukaannya sehingga membentuk koloni yang dapat dilihat, dihitung, atau diisolasi, dan (3) *medium setengah padat (semi solid)* yang mempunyai konsistensi di antara medium cair dan medium padat.

A. KOMPOSISI MEDIA

Untuk menstimulir pertumbuhan mikroba, medium yang digunakan harus mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan oleh mikroba tersebut. Kebutuhan dasar dari mikroba termasuk air, karbon, energi, nitrogen, mineral, dan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan beberapa asam amino. Mikroba juga mempunyai pH minimum, maksimum, dan optimum untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, dalam mempersiapkan medium perlu dilakukan pengaturan pH sehingga tercapai pH optimum untuk pertumbuhan mikroba yang diinginkan.

Medium yang dipersiapkan dengan cara mencampurkan komponen-komponen kimia murni dalam jumlah tertentu sehingga komposisinya dapat diketahui dengan pasti disebut *medium sintetik*. Medium lainnya yang mengandung beberapa bahan dengan komposisi yang tidak tetap disebut medium *non-sintetik*. Contoh dari medium *non-sintetik* misalnya *nutrient broth* yang mengandung ekstrak daging sapi (*beef extract*) dan pepton, di mana komposisi kimianya tidak tetap.

Pembuatan medium dapat dilakukan dengan cara menimbang masing-masing komponen bahan kimia secara teliti, kemudian mencampurkannya, melarutkannya di dalam air, mengatur pH-nya, memasukkannya ke dalam tabung, dan mensterilkan menggunakan otoklaf pada suhu dan waktu yang

ditetapkan, misalnya suhu 121°C (tekanan 15 lb.) selama 15 – 20 menit. Bermacam-macam medium telah diperdagangkan dalam bentuk campuran lengkap dalam keadaan kering, sehingga dalam penggunaannya hanya tinggal melarutkannya di dalam air dan mensterilisasi. Air yang digunakan untuk melarutkan medium adalah air destilata, atau sebaiknya air yang telah dideionisasi.

Medium padat mengandung bahan pematat seperti agar, gelatin atau silika gel. Yang paling sering digunakan adalah agar yang merupakan bahan yang diperoleh dari ganggang laut dan telah diperdagangkan dalam bentuk murni dan kering. Biasanya agar dicampurkan ke dalam medium sebelum sterilisasi. Selama pemanasan, agar akan mencair pada suhu 97 – 100°C, dan setelah sterilisasi dan kemudian didinginkan kembali agar akan mulai memadat pada suhu kira-kira 42°C. Medium yang disimpan dalam keadaan telah memadat, misalnya di lemari es, dapat dicairkan kembali dengan cara memanaskan wadah yang berisi medium di dalam panci yang berisi air mendidih selama beberapa menit, atau menggunakan otoklaf. Medium yang akan diinokulasikan dengan mikroba tertentu sebelum memadat harus didinginkan terlebih dahulu sampai suhu 47 – 50°C. Jika medium yang diinokulasikan terlalu panas maka sebagian mikroba yang diinginkan untuk tumbuh mungkin akan mati.

Struktur kimia agar terdiri dari galaktan, yaitu polimer dari molekul-molekul galaktosa yang tidak dapat dipecah oleh kebanyakan bakteri. Konsentrasi yang digunakan biasanya 1,5% tetapi, jika akan dilakukan goresan pada permukaan agar dapat digunakan konsentrasi 1,8-2,0% sehingga dapat diperoleh agar yang lebih keras setelah memadat. Medium setengah padat mengandung agar dalam jumlah lebih sedikit daripada medium padat, biasanya sekitar 0,5%, dan sering digunakan untuk uji pergerakan mikroba (*motilitas*). Di dalam medium agar tidak digunakan sebagai bahan makanan oleh mikroba, melainkan hanya sebagai bahan pematat.

Bahan pematat lainnya yaitu gelatin dengan konsentrasi 12 – 15%. Gelatin jarang digunakan karena akan mencair pada suhu di atas 25°C, sehingga tidak dapat diinkubasikan pada suhu tinggi. Selain dari itu, gelatin dapat dihidrolisa oleh berbagai jenis bakteri. Silika gel adalah suatu bahan pematat yang digunakan di dalam medium untuk menumbuhkan mikroba yang bersifat ototrof dengan bahan-bahan organik tidak boleh terdapat di dalam medium.

B. BENTUK DAN JUMLAH MEDIUM

Jumlah medium yang akan digunakan di dalam suatu percobaan harus diperhitungkan sedemikian rupa untuk menghindari pembuatan medium yang berlebihan karena pada umumnya medium untuk pekerjaan mikrobiologi mahal harganya. Jumlah medium yang dibutuhkan dapat ditentukan berdasarkan bentuk medium yang digunakan dan jumlah pekerjaan/ contohnya, sebagai berikut.

<u>Bentuk medium</u>	<u>Jumlah medium/wadah</u>
Agar cawan	15–20 ml/cawan petri (Ø 10 cm)
Agar tegak	± 8–9 ml/tabung reaksi (Ø 16 mm)
Agar miring	± 6–7 ml/tabung reaksi (Ø 16 mm)
Medium cair	± 9–10 ml/tabung reaksi (Ø 16 mm)
Medium cair berisi	± 9 ml/tabung reaksi tabung durham (Ø 16 mm)

C. LARUTAN PENGECER

Seperti halnya medium, larutan yang digunakan untuk mengencerkan contoh biasanya mengandung bufer untuk menjaga keseimbangan ion dari mikroba. Bufer yang biasa digunakan dalam pembuatan medium dan larutan pengencer adalah *fosfat* karena merupakan satu-satunya komponen anorganik yang mempunyai sifat bufer pada kisaran pH sekitar normal, yaitu kisaran pH yang dapat mempertahankan keseimbangan fisiologi dari mikroba. Selain dari itu, fosfat tidak bersifat racun terhadap mikroba, dan dapat menjadi sumber fosfor untuk pertumbuhan mikroba. Garam fosfat yang sering digunakan sebagai bufer adalah kalium monohidrogen fosfat (K_2HPO_4) dan/atau kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4). Sebagai larutan pengencer, selain larutan yang mengandung bufer fosfat, dapat juga digunakan larutan garam fisiologi (0,85%) atau larutan Ringer.

Larutan pengencer dapat ditempatkan di dalam tabung-tabung reaksi dalam jumlah 9 ml untuk membuat pengenceran 1:10 (1 ml atau 1 gr contoh di dalam 9 ml), di dalam botol pengencer dalam jumlah 90 ml untuk membuat pengenceran 1:10 (10 ml atau 10 gr contoh di dalam 90 ml), atau dalam jumlah 99 ml untuk membuat pengenceran 1:10 (11 ml atau 11 gr contoh di dalam 99 ml) dan pengenceran 1:100 (1 ml atau 1 gr contoh di dalam 99 ml). Larutan pengencer dapat pula ditempatkan di dalam tabung

erlenmeyer dalam jumlah 225 ml atau 450 ml untuk membuat pengenceran 1:10 (25 gr di dalam 225 ml atau 50 gr di dalam 450 ml), yaitu untuk contoh yang kurang seragam sehingga dibutuhkan contoh dalam jumlah besar. Sterilisasi di dalam tabung atau botol dilakukan seperti pada sterilisasi medium.

D. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Nutrient Broth (NB)
Plate Count Agar (PCA) atau
Potato Dextrose Agar (PDA) NaCl
Kapas

2. Alat

Tabung reaksi (5 tabung/kelompok)
Cawan petri steril (6 cawan/kelompok)
Panci berisi air dan batang gelas atau pemanas listrik dengan pengaduk
Magnit
Otoklaf
Penangas air dengan suhu 50°C

E. PROSEDUR KERJA

Setiap kelompok harus membuat

1. 5 buah tutup tabung dari kapas,
2. 6 buah agar cawan (PCA/PDA, jumlahnya 100 ml),
3. 5 tabung larutan pengencer (0,85% NaCl a 9 ml), atau
4. 5 tabung medium cair (NB, jumlahnya 50 ml).

Setiap mahasiswa harus mempelajari cara menggunakan otoklaf, baik otoklaf listrik yang otomatis, maupun otoklaf manual menggunakan api gas. Cara-cara tersebut akan dijelaskan oleh asisten.

1. Pembuatan Medium/Media

Timbanglah sejumlah medium untuk volume agar yang ditentukan sesuai dengan yang tertera pada botol, dan dilarutkan ke dalam air destilata sebanyak volume yang ditetapkan, di dalam tabung erlenmeyer atau gelas piala. Medium cair tidak memerlukan pemanasan pendahuluan, sedangkan medium agar memerlukan pemanasan untuk melarutkan agar. Selama pemanasan, harus selalu diaduk dengan batang gelas, atau dengan pengaduk magnet jika pemanasan dilakukan di atas “*hot plate*” yang dilengkapi dengan pengaduk. Tanpa pengadukan, agar pada bagian bawah tabung akan hangus. Setelah semua agar larut, ukurlah pH-nya menggunakan kertas pH atau pH meter. Jika pH-nya belum tepat, atur pH yang dikehendaki menggunakan larutan NaOH atau HCl (1N atau 0,1N). Untuk membuat *medium cair*, *agar miring* dan *agar tegak*, masukkan medium ke dalam tabung-tabung reaksi seperti yang ditetapkan di atas. Sterilisasi dilakukan di dalam otoklaf pada suhu 121°C (15 lb.) selama 15 menit. Untuk membuat *agar miring*, letakkan tabung reaksi yang berisi medium agar yang telah steril pada *posisi miring* yang dikehendaki, dan biarkan membeku.

Untuk membuat agar cawan, sterilisasi medium dilakukan di dalam tabung erlenmeyer, kemudian setelah didinginkan sampai suhu kira-kira 50°C, masukkan ke dalam cawan petri steril dengan jumlah kira-kira setebal 4 – 5 mm, dan dibiarkan membeku. Medium yang telah siap dan tidak akan segera digunakan, sebaiknya disimpan di dalam lemari/ruang pendingin dengan suhu 10°C untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

2. Pembuatan Larutan Pengencer

Timbanglah bahan-bahan kimia yang dibutuhkan seperti pada Lampiran 3. Setelah dilarutkan di dalam air destilata dan diatur pH-nya, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi dengan jumlah 9 ml. Lakukan sterilisasi seperti pada pembuatan medium.



LATIHAN

Untuk memperdalam pemahaman Anda mengenai materi di atas, kerjakanlah latihan berikut!

- 1) Jelaskan fungsi dari masing-masing komponen di bawah ini di dalam medium:
 - a. pepton
 - b. ekstrak sapi
 - c. agar
 - d. glukosa
 - e. NaCl
 - f. biru metilen

- 2) Jelaskan perbedaan masing-masing medium di bawah ini berdasarkan komposisinya (sintetik atau nonsintetik), dan fungsinya (pertumbuhan umum atau selektif).
 - a. Plate Count Agar (PCA).
 - b. Eosin Methylene Blue (EMB) agar.
 - c. Nutrient Agar.
 - d. Laktosa Broth.
 - e. Acidified Potato Dextrose Agar (APDA).

- 3) Berikan urutan-urutan yang tepat dari tahap-tahap di bawah ini jika saudara akan membuat suatu agar miring.
 - a. Pengaturan pH.
 - b. Sterilisasi.
 - c. Penutupan tabung.
 - d. Penimbangan medium.
 - e. Pengisian ke dalam tabung reaksi.
 - f. Pemanasan untuk melarutkan medium.
 - g. Penambahan air.
 - h. Meletakkan tabung reaksi pada posisi miring.

- 4) Sebutkan kegunaan dari masing-masing bentuk medium di bawah ini:
 - a. Agar cawan.
 - b. Agar miring.
 - c. Agar tegak.
 - d. Medium cair.

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk dapat menjawab soal latihan di atas, Anda harus mempelajari Kegiatan Belajar 2 tentang komposisi medium, bentuk dan jumlah medium, serta larutan pengencer.



RANGKUMAN

Media pemupukan mikroorganisme di laboratorium disebut media tunggal dan media jamak. Media dibedakan atas tiga macam, yaitu: media cair, media padat, dan media setengah padat (semi solid).

Jumlah media yang akan digunakan di dalam suatu percobaan harus diperhitungkan sedemikian rupa untuk menghindari pembuatan media yang berlebihan karena media untuk pekerjaan mikrobiologi mahal harganya.

Seperti halnya media, larutan yang digunakan untuk mengencerkan contoh biasanya menggunakan bufer untuk menjaga keseimbangan ion dari mikroorganisme. Bufer yang digunakan adalah fosfat karena mempunyai sifat bufer pada kisaran pH maksimal.



TES FORMATIF 2

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Medium atau media untuk pemupukan mikroorganisme sebagai berikut, *kecuali* medium
 - A. cair
 - B. padat
 - C. setengah padat (semi padat)
 - D. beku

- 2) Untuk menstimulir pertumbuhan mikroba media yang dibutuhkan oleh mikroba sebagai berikut, *kecuali*
 - A. air
 - B. karbon (C)
 - C. karbon dioksida (CO₂)
 - D. mineral

- 3) Bufer yang biasa digunakan dalam pembuatan media dan larutan pengencer adalah
- A. fosfat
 - B. karbonat
 - C. natrium
 - D. kalsium

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 Belajar 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 Belajar 3. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Belajar 2, terutama bagian yang belum dikuasai.

Kegiatan Praktikum 3

Kultur Mikroba dan Cara Isolasi

Secara alamiah, mikroba terdapat dalam bentuk campuran dari berbagai jenis. Sebagai contoh, berbagai jenis mikroba terdapat di dalam makanan, tanah, air, udara, sampah, dan sebagainya. Untuk mempelajari sifat-sifat dari masing-masing mikroba termasuk sifat pertumbuhan, morfologi dan sifat fisiologinya, masing-masing mikroba tersebut harus dipisahkan satu dengan yang lainnya sehingga terbentuk suatu *kultur murni* yaitu suatu biakan yang terdiri dari sel-sel dari satu spesies atau satu galur mikroba. Untuk tujuan ini digunakan medium yang telah disterilisasi, baik berupa medium cair maupun medium padat, dan pekerjaan dilakukan *secara aseptik* untuk mencegah kontaminasi.

A. CARA ASEPTIK DALAM INOKULASI

Cara aseptik yang harus dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi merupakan suatu cara kerja di mana terjadinya kontaminasi oleh mikroba lain yang tidak dikehendaki dicegah semaksimal mungkin, sedangkan mikroba yang dikehendaki dipertahankan semaksimal mungkin. Untuk memindahkan sel-sel mikroba dari satu medium ke medium lainnya digunakan suatu kawat yang diberi batang pemegang pada bagian pangkalnya, yang disebut jarum ose atau loop. Loop harus dipijarkan sampai berwarna merah sesaat sebelum dan setelah digunakan. Dengan cara ini, bagian jarum dari loop tersebut menjadi steril untuk sementara karena mikroba yang terdapat pada permukaan loop akan mati. Selama pemijaran, jarum Ose harus dipegang sedemikian rupa di atas api sehingga seluruh ujung loop sampai pada bagian di dekat tangkai pemegang menyala secara bersamaan. Sebelum digunakan untuk inokulasi, loop yang telah menyala harus didinginkan dalam waktu beberapa detik untuk mencegah kematian mikroba yang akan diinokulasikan.

Selama pemindahan kultur, tabung dipegang dengan tangan kiri, kemudian tutup tabung dibuka dengan tangan kanan dengan cara menjepit tutup tersebut di antara jari-jari tangan kanan. Jangan sekali-kali meletakkan tutup tabung di atas meja karena hal ini akan mengakibatkan kontaminasi pada tutup tabung. Segera setelah tabung dibuka, mulut dan leher tabung

dipanaskan sebentar di atas api. Pemanasan tidak boleh terlalu lama untuk mencegah kematian kultur mikroba yang akan diambil. Kemudian kultur mikroba diambil dengan menggunakan loop yang telah dipijarkan. Setelah selesai, mulut dan leher tabung dipanaskan lagi, kemudian ditutup kembali. Sel-sel mikroba yang terbawa pada ujung loop dapat dipindahkan pada medium cair lainnya, atau digoreskan pada agar cawan atau agar miring. Sebelum disimpan, loop harus dipijarkan sekali lagi untuk membunuh sisa sel-sel mikroba yang terdapat pada loop. Pekerjaan secara aseptik seperti tersebut di atas, harus dilakukan dengan hati-hati tetapi, secepat mungkin untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

B. KULTUR CAIR

Cara yang paling sederhana untuk menyimpan suatu kultur mikroba adalah dengan menumbuhkannya di dalam suatu medium cair, dengan suhu dan waktu inkubasi tertentu tergantung pada jenis mikroba yang diinginkan. Dalam pembuatan kultur cair dapat digunakan medium cair tertentu yang disebut medium “*preenrichment*” atau “*enrichment*”. Medium ini, digunakan untuk menstimulir pertumbuhan bakteri tertentu yang diinginkan. Sebagai contoh, dalam analisa bakteri salmonella yang biasanya terdapat dalam jumlah sangat kecil di dalam makanan, digunakan lactose broth sebagai medium “*preenrichment*”, dan selenite cystine broth atau tetrathionate broth sebagai medium “*enrichment*”. Dengan cara ini, konsentrasi sel salmonella di dalam makanan tersebut akan dipertinggi.

Di dalam medium cair, mikroba akan tumbuh dalam waktu 24 – 48 jam. Pertumbuhan mikroba di dalam suatu medium cair dapat terlihat dalam berbagai bentuk misalnya, berikut ini.

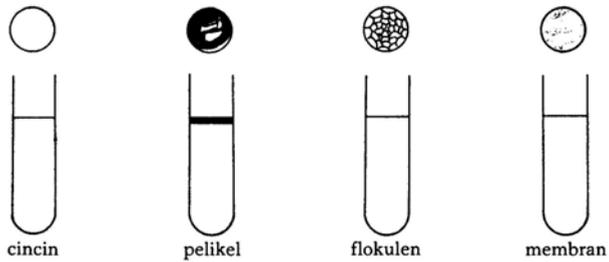
1. Kekeruhan, yang biasanya terlihat pada seluruh bagian medium.
2. Pertumbuhan pada permukaan yang dapat berbentuk pelikel, cincin, flokulen atau membran, seperti terlihat pada Gambar 1.8.
3. Sedimen/endapan, yaitu kumpulan sel-sel yang mengumpul pada dasar tabung dan akan menyebar lagi jika tabung digerakkan atau dikocok. Medium pada bagian atas tabung mungkin akan tetap bening jika inkubasi dilakukan lebih lama.

Tabung yang berisi kultur cair tidak boleh digerakkan sebelum pertumbuhan diamati. Sel mikroba yang berukuran relatif besar seperti sel-sel khamir akan mengendap lebih cepat. Oleh karena itu, jika kultur akan dipindahkan ke tabung lainnya, tabung harus terlebih dahulu dikocok.

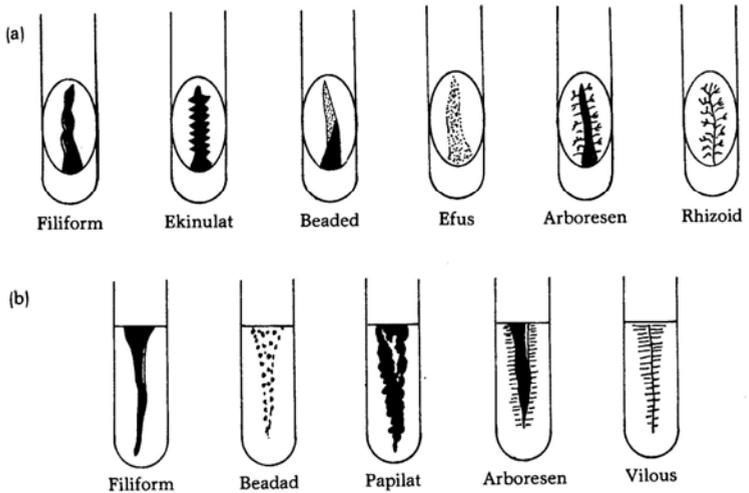
Kultur cair dapat disimpan dengan cara dibekukan atau dikeringkan sehingga sel-sel mikroba berada dalam keadaan dorman, yaitu tidak dapat tumbuh dan berkembang biak tetapi, tidak mati. Karena banyak sel mikroba yang tidak tahan terhadap pembekuan atau pengeringan maka cara yang paling baik untuk menyimpan kultur mikroba dalam jangka waktu lama adalah dengan melakukan liofilisasi (*freeze drying*), di mana kultur dibekukan dengan campuran es kering (*dry ice*) dan alkohol, kemudian dikeringkan secara vakum. Dengan cara ini kultur mikroba dapat disimpan selama bertahun-tahun tanpa berkurang keaktifannya.

C. BIAKAN AGAR MIRING DAN AGAR TEGAK

Agar miring merupakan salah satu bentuk medium yang digunakan untuk membiakkan mikroba, terutama yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif. Ciri-ciri kultur termasuk pembentukan warna dan bentuk pertumbuhannya dapat segera diamati pada agar miring. Inokulasi mikroba pada agar miring dapat dilakukan dengan cara menggoreskan (*streak*) secara zig-zag pada permukaan agar miring menggunakan jarum Ose yang bagian atasnya dilengkungkan, atau menusukkan loop pada bagian tengah tabung (*stab*). Cara penusukan (*stab*) yang juga dilakukan pada agar tegak digunakan untuk menstimulir pertumbuhan mikroba dalam keadaan kekurangan oksigen atau anaerobik. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, pertumbuhan mikroba pada agar miring dan tegak akan terlihat dalam berbagai bentuk seperti terlihat pada Gambar 1.9. Agar miring dapat digunakan untuk menyimpan kultur dalam jangka waktu pendek di dalam lemari es (*refrigerator*) pada suhu 4°C, sedangkan agar tegak sering digunakan dalam uji motilitas suatu mikroba.



Gambar 1.8.
Bentuk Pertumbuhan Mikroba pada Permukaan



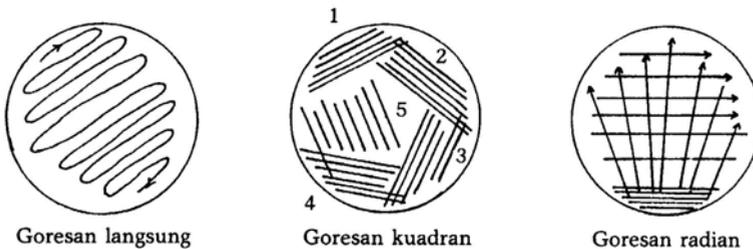
Gambar 1.9.
Bentuk Pertumbuhan Mikroba pada (a) Agar Miring dan (b) Agar Tegak

D. BIAKAN AGAR CAWAN

Kultur mikroba dapat dibiakkan dengan cara menginokulasikan pada agar cawan, kemudian penyebaran kultur di atas agar dilakukan dengan pertolongan loop yang dilengkungkan bagian atasnya, atau menggunakan batang gelas. Tujuan dari penyebaran kultur adalah untuk memisahkan sel-sel

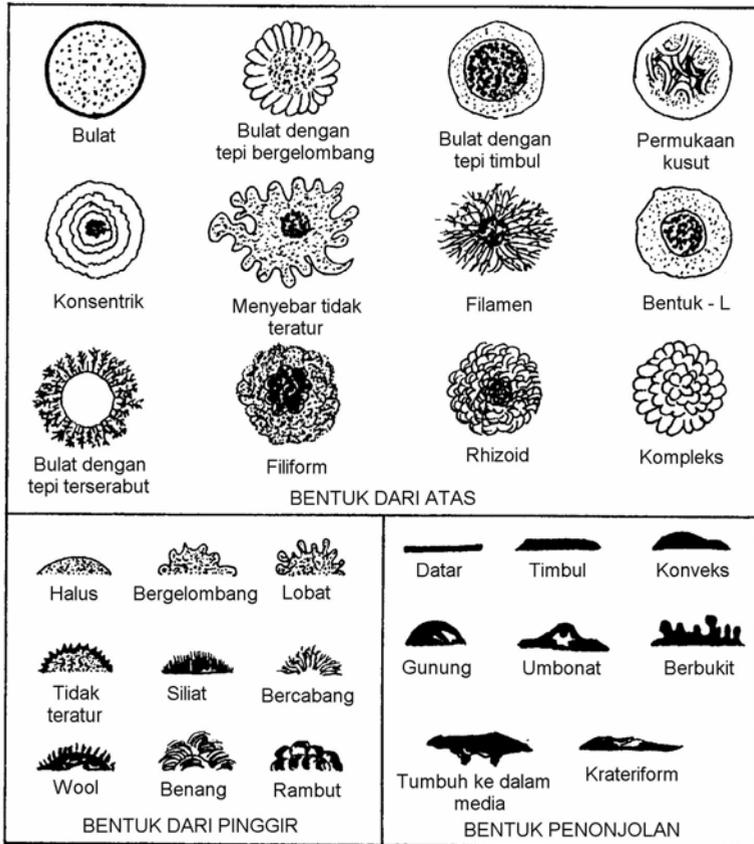
mikroba satu dengan yang lainnya sehingga setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu masing-masing sel kemudian akan tumbuh dan berkembang biak membentuk kumpulan sel atau koloni yang dapat terlihat oleh mata. Pada bagian agar tempat dimulainya goresan populasi mikroba biasanya terlalu pekat sehingga koloni akan berkumpul menjadi satu. Dengan semakin banyaknya goresan atau penyebaran yang dilakukan, akan semakin sedikit sel-sel mikroba yang terbawa oleh loop sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni-koloni secara terpisah. Satu koloni mungkin berasal dari satu sel atau beberapa sel, tergantung dari tingkat penyebaran atau kemurnian kultur. Goresan dan pembiakan yang diulangi beberapa kali terhadap satu koloni yang tumbuh terpisah pada agar cawan, dapat menghasilkan koloni-koloni yang berasal dari satu sel. Koloni ini dapat diambil dan dibiakkan pada agar miring untuk mendapatkan suatu kultur murni yang terdiri dari satu spesies mikroba.

Ada beberapa cara untuk menggoreskan kultur pada agar cawan, yaitu: (1) goresan *langsung*, (2) goresan *kuadran*, dan (3) goresan *radian* (Gambar 1.10). Pada masing-masing cara, loop harus selalu dipijarkan dan didinginkan segera sebelum melakukan goresan berikutnya. Sebagai contoh, pada cara goresan kuadran, di antara goresan pertama dan kedua, kedua dan ketiga, serta ketiga dan keempat, loop harus dipijarkan dan kemudian didinginkan dengan cara menusukkannya pada bagian pinggir agar cawan.



Gambar 1.10.
Cara Menggoreskan Kultur pada Agar Cawan

Koloni yang tumbuh pada agar cawan dapat dibedakan dalam besarnya warna, penampaknya apakah keruh (*opaque*) atau bening, bentuk penyebarannya, bentuk kemunculannya di atas agar, dan bentuk permukaannya. Gambar 1.11 menunjukkan ciri-ciri pertumbuhan koloni di atas agar

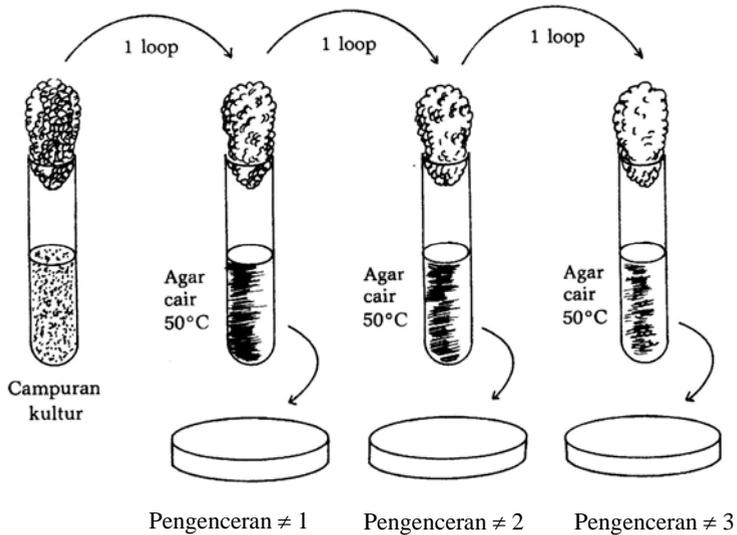


Gambar 1.11.
Bentuk Pertumbuhan Koloni di atas Agar Cawan

E. METODE AGAR TUANG (PENGECERAN LOOP)

Metode agar tuang digunakan untuk mengencerkan mikroba yang terdapat pada contoh, dan dapat dilakukan untuk mengisolasi mikroba dari contoh. Cara ini berbeda dengan metode goresan karena agar steril yang akan diinokulasikan masih dalam bentuk cair tetapi, telah didinginkan sampai 45 – 47°C. Setelah suhu dan waktu tertentu, koloni akan tumbuh pada permukaan dan bagian bawah agar. Pengenceran harus dilakukan sedemikian rupa sehingga pada cawan yang terakhir tumbuh koloni-koloni yang terpisah.

Gambar 1.12 memperlihatkan cara melakukan pengenceran dengan menggunakan metode agar tuang.



Gambar 1.12.
Cara Melakukan Metode Agar Tuang

F. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Contoh setiap Kelompok	Mikroba yang Diisolasi	Metode Jumlah
Air kali, susu	Bakteri koliform	Goresan pada EMB (2)
Rempah-rempah	Bakteri pembentuk spora	Agar tuang PCA (3)
Roti, tepung beras	Kapang dan khamir	Goresan pada APDA (2)

Per kelompok : 3 tabung PCA cair (a 15 ml)

2 cawan agar EMB (*Eosin Methylene Blue*)

2 cawan APDA (*Acidified Potato Dextrose Agar*)

2 tabung agar miring PCA

2. Alat

Cawan petri steril (3 cawan/kelompok).

Jarum Ose.

Gelas objek.

Gelas penutup.

Panci berisi air mendidih inkubator 30 – 32°C.

G. CARA KERJA

1. Persiapan Suspensi Contoh

Sejumlah contoh yang berbentuk padat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air destilata atau larutan pengencer steril, dan dikocok. Pada pengamatan bakteri pembentuk spora (contoh rempah-rempah), suspensi contoh dipanaskan di dalam penangas mendidih selama 5 menit untuk membunuh sel vegetatif.

2. Metode Gores

Dalam metode gores digunakan agar cawan yang telah didinginkan. Dengan menggunakan loop yang telah dipijarkan, suspensi contoh diambil dan digoreskan dengan menggunakan cara goresan kuadran seperti terlihat pada Gambar 1.10. Inkubasikan cawan dengan *posisi terbalik* pada suhu 30 – 32°C selama 2 – 3 hari.

Pilihlah salah satu koloni koliform yang terpisah pada agar EMB, dan koloni kapang dan khamir yang terpisah pada APDA. Buatlah preparat basah dari masing-masing koloni tersebut, dengan meneteskan air pada gelas objek dan mengambil kultur pada ujung loop, dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000× (untuk koliform dan khamir) atau 400× (untuk kapang). Koloni koliform di atas agar EMB terlihat berwarna hijau metalik (*Escherichia coli*), atau berwarna merah muda dengan titik hitam seperti mata ikan di bagian tengahnya (*Enterobacter aerogenes*). Koloni kapang dapat dibedakan dari khamir karena adanya pertumbuhan miselium.

3. Metode Agar Tuang

Dalam metode agar tuang digunakan medium agar steril yang belum membeku (suhu 50°C). Terhadap suspensi rempah-rempah dilakukan metode agar tuang seperti terlihat pada Gambar 1.12. Inkubasikan cawan dengan *posisi terbalik* pada suhu 30–32°C selama 2 – 3 hari.

Koloni bakteri pembentuk spora dapat dibedakan dari koloni bakteri lainnya karena koloninya mempunyai permukaan yang bergelombang kasar dan tidak merata, kadang-kadang terlihat seperti kering dan mengapur. Buatlah preparat basah dari koloni pembentukan spora yang tumbuh terpisah dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000×



LATIHAN

Untuk memperdalam pemahaman Anda mengenai materi di atas, kerjakanlah latihan berikut!

- 1) Apakah yang disebut kultur murni?
- 2) Sebutkan berbagai cara penyimpanan/pengawetan kultur, dan jelaskan masing-masing kelebihan dan kekurangannya.

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk dapat menjawab soal-soal latihan di atas, Anda harus mempelajari kembali Kegiatan Belajar 3 tentang Kultur Mikroba dan cara Inokulasi.



RANGKUMAN

Secara alamiah, mikroba terdapat dalam bentuk campuran dari berbagai jenis. Sebagai contoh berbagai jenis mikroba terdapat di dalam makanan, tanah, air, udara, sampah, dan sebagainya. Masing-masing mikroba tersebut, harus dipisahkan satu dengan lainnya sehingga terbentuk suatu kultur murni, yaitu suatu biakan yang terdiri dari sel-sel dan satu spesies atau satu jalur mikroba.

Cara yang paling sederhana untuk menyimpan suatu kultur mikroba adalah dengan menumbuhkannya di dalam suatu medium cair, dengan suhu dan waktu inokulasi tertentu tergantung pada jenis mikroba yang diinginkan.

Cara isolasi yang aseptik harus dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi merupakan suatu cara kerja di mana terjadinya kontaminasi oleh mikroba lain yang tidak dikehendaki dicegah semaksimal mungkin, sedangkan mikroba yang dikehendaki dipertahankan semaksimal mungkin.



TES FORMATIF 3

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Dalam pembuatan kultur cair dapat digunakan medium cair tertentu, yang disebut medium
 - A. *preenrichment* atau *enrichment*
 - B. penyusunan
 - C. penambah konsentrasi
 - D. pemecah

- 2) Kultur cair dapat disimpan dengan cara
 - A. didinginkan
 - B. dipanaskan
 - C. dibekukan dan dikeringkan
 - D. disimpan pada suhu kamar

- 3) Beberapa cara untuk menggoreskan kultur pada agar cawan sebagai berikut, *kecuali* goresan
 - A. langsung
 - B. kuadran
 - C. radial
 - D. vertikal

- 4) Pada metode agar tuang, agar steril yang akan diinokulasikan masih dalam bentuk cair dengan suhu
 - A. 45° – 47°C
 - B. 47° – 50°C
 - C. 50° – 55°C
 - D. 55° – 60°C

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 Belajar 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 Belajar 4. **Bagus!** Jika masih di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi Kegiatan Belajar 3, terutama bagian yang belum dikuasai.

Kegiatan Praktikum 4

Pewarnaan Bakteri

Untuk mengamati bentuk atau ciri-ciri suatu mikroba menggunakan mikroskop, dapat digunakan dua cara yaitu: (1) dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang masih hidup tanpa diwarnai, yaitu dengan cara membuat preparat basah, dan (2) dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang telah mati dan diwarnai. Kebanyakan sel bakteri tidak berwarna sehingga jika dilarutkan di dalam air dan dilihat di bawah mikroskop tidak memperlihatkan warna yang kontras dengan medium di sekelilingnya. Warna sel mikroba dapat dibuat lebih kontras dan lebih mudah dilihat di bawah mikroskop dengan cara mewarnai sel tersebut dengan suatu zat warna. Beberapa zat yang digunakan untuk mewarnai bakteri juga dapat digunakan untuk mengamati struktur bagian dalam sel. Keuntungan lain dari pewarnaan, terutama untuk bakteri yang mempunyai sel dengan ukuran relatif kecil, adalah karena bakteri yang diwarnai akan lebih mudah dilihat di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif minyak imersi yang mempunyai tingkat pembesaran relatif tinggi.

Dalam pewarnaan mikroba, dapat digunakan satu jenis zat warna. Cara ini disebut *pewarnaan sederhana*. Zat-zat warna yang biasa digunakan untuk pewarnaan sederhana misalnya biru metilen, fuchsin basa, atau violet kristal. Zat-zat warna tersebut bekerja dengan baik dalam mewarnai bakteri karena zat-zat tersebut mengandung gugusan fungsional yang dapat membentuk warna (khromofor) dan bermuatan positif. Oleh karena sel-sel bakteri pada umumnya bermuatan negatif, maka sel-sel tersebut dapat mengikat khromofor. Zat-zat warna demikian disebut zat warna basa. Zat-zat warna yang mengandung khromofor yang bermuatan negatif (anion), disebut zat warna asam, dan tidak dapat digunakan untuk mewarnai bakteri karena tidak dapat diikat oleh sel bakteri.

Bermacam-macam cara perwarnaan yang dilakukan untuk mewarnai bakteri merupakan modifikasi atau gabungan dari cara pewarnaan sederhana. Pewarnaan bakteri dapat dibedakan atas beberapa golongan yaitu:

1. pewarnaan sederhana,
2. pewarnaan diferensial,

3. pewarnaan struktural,
4. pewarnaan untuk menguji adanya komponen-komponen tertentu di dalam sel .

Di dalam modul ini, hanya akan diuraikan dua cara pewarnaan yang paling mudah dan paling sering dilakukan dalam mikrobiologi pangan yaitu pewarnaan gram dan pewarnaan endospora.

A. PERSIAPAN DAN FIKSASI

Sebelum dilakukan pewarnaan maka sel-sel bakteri harus terlebih dahulu difiksasi pada gelas objek. Jika sel-sel tidak difiksasi pada gelas objek maka lapisan sel yang akan diwarnai dapat tercuci selama prosedur pewarnaan. Yang dimaksud dengan fiksasi adalah membunuh bakteri dan membuat sel-sel bakteri tersebut melekat pada gelas objek. Untuk tujuan ini, biasanya digunakan panas. Prosedur yang sering dilakukan terdiri dari penyebaran kultur mikroba pada gelas objek sehingga terbentuk lapisan sel yang tipis, pengeringan di udara terbuka, dan fiksasi secara singkat di atas nyala api. Jika kultur diambil dari medium cair maka penyebaran dapat langsung dilakukan di atas gelas objek yang bersih menggunakan loop. Tetapi, jika kultur diambil dari agar padat maka sebelumnya di atas gelas objek harus diberi setetes air, kemudian kultur diambil sedikit dengan ujung loop yang telah dipijarkan, dan diratakan di atas gelas objek sehingga terbentuk lapisan tipis. Kesalahan yang sering dilakukan adalah pengambilan kultur yang terlalu banyak dari agar padat, sehingga akan terbentuk lapisan sel yang terlalu tebal pada gelas objek. Keadaan ini akan menghasilkan pewarnaan yang kurang baik, terutama jika di dalam prosedurnya diperlukan tahap pencucian zat warna (*destaining/decolorizing*). Dengan adanya sel-sel bakteri yang tebal dan bertumpuk-tumpuk, sebagian zat warna akan sukar dicuci, dan tetap tertinggal di antara atau pada sel-sel sehingga hal ini dapat menghasilkan analisa pengamatan yang salah.

B. PEWARNAAN GRAM

Pewarnaan gram merupakan salah satu cara pewarnaan yang paling sering dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi. Cara pewarnaan ini diciptakan pertama kali tahun 1884 oleh seorang ahli bakteriologi yang bernama Christian Gram. Cara pewarnaan ini merupakan cara pewarnaan

diferensial, di mana dengan cara ini bakteri dapat dibedakan menjadi dua grup, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Perbedaan dari kedua grup bakteri tersebut disebabkan oleh perbedaan dalam lapisan-lapisan dinding selnya.

Dalam pewarnaan gram diperlukan empat jenis larutan, yaitu larutan zat warna basa, *mordant*, pencuci zat warna, dan satu zat warna lainnya (*counterstain*) yang berbeda dari zat warna yang pertama. *Mordant* adalah suatu zat yang dapat menaikkan afinitas atau pengikatan antara sel dengan zat warna. Beberapa contoh *mordant* misalnya asam, basa, garam metal, dan yodium. Dengan adanya *mordant*, zat warna akan lebih sukar tercuci. *Pencuci warna* digunakan untuk menghilangkan zat warna dari sel bakteri. Beberapa sel bakteri lebih mudah melepaskan zat warna daripada sel-sel lainnya. Dalam pewarnaan gram dan pewarnaan diferensial lainnya, perbedaan dari bakteri disebabkan oleh perbedaan dalam kecepatan melepaskan zat warna oleh sel. Zat warna kedua yang digunakan setelah sel dicuci dengan larutan pencuci disebut "*counterstain*" yang berbeda warnanya dari zat warna pertama. Sel-sel yang tidak dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan tetap berwarna seperti zat warna pertama, sedangkan sel-sel yang dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan mengikat zat warna kedua.

Dalam perwarnaan gram, mula-mula sel bakteri diwarnai dengan zat warna basa yaitu violet kristal, diikuti perlakuan menggunakan suatu mordant yaitu *larutan yodium* (lugol). Sel kemudian dicuci dengan alkohol untuk menghilangkan violet kristal. Setelah dicuci dengan air, kemudian diwarnai dengan "*counterstain*" yaitu *safranin*. Sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet, yaitu biru-ungu disebut *bakteri gram-positif* sedang sel-sel yang dapat melepaskan violet kristal dan mengikat *safranin* sehingga berwarna merah-merah muda disebut *bakteri gram-negatif*.

C. PEWARNAAN ENDOSPORA

Spesies bakteri yang termasuk dalam *genera clostridium* dan *bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut endospora. Jika sel semakin tua maka sel vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi spora bebas. Berbeda dengan sel vegetatif maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrem, misalnya dalam

keadaan kering, panas, atau adanya bahan kimia yang beracun. Spora juga lebih tahan terhadap pewarnaan, dan sekali berhasil diwarnai, spora sangat sukar untuk melepaskan zat warna sehingga tidak dapat mengikat zat warna lainnya yang diberikan kemudian (*counterstain*). Prinsip pewarnaan ini digunakan untuk membedakan spora dari sel vegetatif. Zat warna yang paling sering digunakan untuk mewarnai spora adalah *malachite green* (Schaeffer dan Fulton) yang akan tetap diikat oleh spora setelah pencucian dengan air, dan sebagai “*counterstain*” digunakan safranin. Dengan cara ini, endospora yang masih terdapat di dalam sel vegetatif maupun spora bebas akan berwarna hijau-biru, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah sampai merah muda.

D. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Kelompok	Makanan	Pewarnaan Gram		Pewarnaan Spora
		Bakteri Gram (-)	Bakteri Gram (+)	
I	Daging ayam	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
II	Sayur asin	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>B. subtilis</i>
III	Sayur basi	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>B. megaterium</i>
IV	Man	<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>B. cereus</i>

Larutan violet kristal

Larutan yodium gram (Lugol) Alkohol 95%

Larutan safranin

Larutan *malachite green* (hijau malasit)

2. Alat

Gelas objek.

Jarum Ose.

Mikroskop.

E. PROSEDUR KERJA

1. Persiapan dan Fiksasi

Makanan/kultur cair, sebarkan satu loop makanan atau kultur cair pada gelas objek sehingga mencapai diameter kira-kira 1 – 1,5 cm². Keringkan di udara, dan difiksasi dengan nyala api kecil.

Makanan/kultur padat, berilah setetes air pada gelas objek, dan ambillah sejumlah kecil pertumbuhan mikroba menggunakan ujung loop, kemudian disebarkan pada tetesan air di atas gelas objek sehingga mencapai diameter kira-kira $1 - 1,5 \text{ cm}^2$. Suspensi yang terbentuk tidak boleh terlalu keruh untuk mencegah terbentuknya lapisan film yang terlalu tebal. Keringkan di udara, dan difiksasi dengan nyala api kecil.

2. Pewarnaan Gram

Larutan-larutan zat warna yang digunakan dalam pewarnaan gram violet kristal. Teteskan pewarna violet kristal di atas film pada gelas objek, dan dibiarkan selama 1 menit. Bilas dengan air kran dengan cara memegang gelas objek pada posisi miring. Buanglah sisa air yang tertinggal, dan tetesi dengan larutan yodium gram (lugol) selama 1 menit. Setelah dicuci kembali dengan air, kemudian dihilangkan warnanya menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi. Setelah dicuci sebentar, kemudian diwarnai dengan "*counterstain*" yaitu larutan safranin selama 10-20 detik.

Bilasilah dengan air, dan keringkan dengan kertas serap. Periksalah di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif minyak imersi, dan catatlah bentuk dan besar mikroba, cara pengelompokan (tunggal, berpasangan, rantai, bergerombol, dan sebagainya), pembentukan spora, dan reaksi Gram.

3. Pewarnaan Spora

Teteskan pewarna hijau malakit di atas lapisan film pada gelas objek, dan biarkan selama 20 menit tanpa pemanasan, atau selama 5 menit di atas penangas air. Setiap kali pewarna menjadi kering, teruskan lagi pewarna yang baru. Cucilah hati-hati dengan air selama 20 – 30 detik, kemudian diberi safranin selama 30 detik. Setelah dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dengan kertas serap.

Periksalah di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif minyak imersi, amati bentuk dan besar spora, serta letak spora di dalam sel. Juga perlu dicatat, apakah sel vegetatif membengkak dengan adanya spora, atau besarnya tetap.



LATIHAN

Untuk memperdalam pemahaman Anda mengenai materi di atas, kerjakanlah latihan berikut!

- 1) Jelaskan perbedaan bakteri gram positif dan gram negatif dalam hal:
 - a. komposisi dinding selnya,
 - b. sifat-sifat dinding sel tersebut terhadap reaksi pewarnaan gram.
- 2) Gambarkan dan jelaskan struktur endospora bakteri. Bagaimana sifat endospora terhadap reaksi pewarnaan.

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk dapat menjawab soal-soal latihan di atas, Anda harus mempelajari kembali Kegiatan Belajar 4 tentang Pewarnaan Bakteri.



RANGKUMAN

Dalam pewarnaan mikroba, dapat digunakan satu jenis zat warna. Cara ini disebut pewarnaan sederhana, zat-zat warna yang bisa digunakan untuk pewarnaan sederhana misalnya bila metilen, fueksen basa, atau violet kristal. Zat-zat warna tersebut bekerja dengan baik dalam mewarnai bakteri karena zat-zat tersebut mengandung gugusan fungsional yang dapat membentuk warna (khromofor) dan bermuatan positif, zat-zat warna demikian disebut zat warna basa, zat-zat warna yang mengandung khromofor yang bermuatan negatif (anion), disebut zat warna asam, dan tidak dapat digunakan untuk mewarnai bakteri karena tidak dapat diikat oleh sel bakteri.

Berbagai macam cara pewarnaan yang dilakukan untuk mewarnai bakteri merupakan modifikasi atau gabungan dan cara pewarnaan sederhana.

Di kalau modul ini, hanya akan diuraikan dua cara pewarnaan yang paling mudah dan paling sering dilakukan dalam mikrobiologi pangan yaitu pewarnaan gram dan pewarnaan endospora.



TES FORMATIF 4 _____

Pilihlah satu jawaban yang paling tepat!

- 1) Sebelum dilakukan pewarnaan maka sel-sel bakteri harus terlebih dahulu
 - A. di jemur pada gelas objek
 - B. di fiksasi pada gelas objek
 - C. diarahkan pada gelas objek
 - D. didinginkan pada gelas objek

- 2) Yang dimaksud dengan fiksasi sebagai berikut, *kecuali*
 - A. membunuh bakteri
 - B. menggunakan suhu panas
 - C. menggunakan suhu dingin
 - D. membuat sel-sel bakteri tersebut melekat pada gelas objek

- 3) Dalam pewarnaan gram diperlukan empat jenis larutan sebagai berikut, *kecuali*
 - A. violet kristal
 - B. yodium (legal)
 - C. safrarium
 - D. spiritus

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 Belajar 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 Belajar 4, terutama bagian yang belum dikuasai.

Kunci Jawaban Tes Formatif

Tes Formatif 1

- 1) A
- 2) B
- 3) D
- 4) A

Tes Formatif 2

- 1) D
- 2) C
- 3) A

Tes Formatif 3

- 1) A
- 2) C
- 3) D
- 4) A

Tes Formatif 4

- 1) B
- 2) C
- 3) D

Daftar Pustaka

- Benson, H.J. (1973). *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology 2nd ed.* WM.C. Brown Co. Publ. Dubuque, Iowa.
- Diliello, L.R. (1982). *Methods in Food and Dairy Microbiology.* Avi Publ. Co., Inc. Westport, Connecticut.
- Frazier, W.C., Marth. E.H. and Deibel, R.H. (1968). *Laboratory Manual for Food Microbiology. 4th ed.* Burgess Publ. Co. Minneapolis, Minn.
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1978). *Food Microbiology.* New York: McGraw-Hill Book Co.
- 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 Fransico: W.H. Freeman and Co.
- Stainer, R.Y., Adelberg, E.A., and Ingraham, J. (1978). *The Mikrobial World 4th en.* Prentice-Hall, inc., New Jersey: Englewood Cliffs.
- Walter, W.G., Ed. (1967). *Standar Methods for the Examination of Dairy Products, 12th ed.* New York: American Public Health Association, Inc.
- Winarno, F.G. dan Fardiaz, S. (1974). *Polusi dan Analisa Air.* Bogor: Departemen Teknologi Hasil Pertanian, Fatemeta – IPB.