

**MODUL PRAKTIKUM
MIKROBIOLOGI UMUM**



**TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS SRIWIJAYA
INDRALAYA**

I. STERILISASI

Sterilisasi harus dilakukan sebelum melakukan suatu analisis mikrobiologi yang dimaksudkan untuk membuat dan menjaga kondisi aseptis. Sterilisasi adalah suatu perlakuan membebaskan benda yang akan digunakan dari mikroorganisme kontaminan. Bendanya dapat berupa media, alat-alat untuk percobaan dan lingkungan tertentu.

cara sterilisasi yang umum dilakukan adalah:

- a. Sterilisasi secara fisik, misalnya dengan pemanasan, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar-gama, sinar ultra-violet, dan sebagainya. Selama senyawa kimia yang akan disterilkan tidak akan berubah atau terurai akibat temperatur tinggi dan atau tekanan tinggi, selama itu sterilisasi secara fisik dapat dilakukan. Cara sterilisasi ini dapat dilakukan dengan menggunakan udara panas atau uap-air panas dengan tekanan tinggi.

Melalui udara panas, dipergunakan alat yang dinamakan “bejana atau ruang panas” (oven) dengan temperatur di dalamnya antara 170 – 180⁰C. Waktu yang dipergunakan adalah selama 2 jam. Cara ini umum dipergunakan untuk mensterilkan peralatan gelas (tabung, labu, botol, dan sebagainya). Sterilisasi dengan uap-air panas dan tekanan-tinggi, merupakan cara yang paling banyak digunakan, misalnya dengan penggunaan alat yang sudah dikenal yang dinamakan autoklaf (otoklaf). Bejana ini mempunyai nilai temperatur-uap 121⁰C, dengan tekanan 15 psi (Suriawiria, 1995).

- b. Sterilisasi secara kimia, misalnya dengan penggunaan desinfektans, larutan alkohol, larutan formalin, larutan AMC (campuran asam khlorida dengan garam Hg), dan sebagainya. Senyawa kimia yang banyak digunakan sebagai desinfektans antara lain larutan CuSO₄, AgNO₃, HgCl₂, ZnO, dan sebagainya serta larutan alkohol dan campurannya. Beberapa larutan garam seperti NaCl (9%), KCl (11%) dan KNO₃ (10%) dapat dipergunakan untuk membunuh mikroba karena tekanan osmotiknya, yaitu dengan jalan dehidrasi protein pada substrat (Suharto, 1995). Sedangkan asam kuat atau basa kuat dapat pula digunakan karena bersifat menghidrolisis isi sel mikroba.
- c. Sterilisasi secara mekanik, misalnya dengan penggunaan saringan atau filter. Untuk beberapa bahan yang akibat pemanasan tinggi ataupun tekanan tinggi akan mengalami perubahan ataupun penguraian, sterilisasinya harus dilakukan secara mekanik, misalnya dengan saringan. Di dalam bidang mikroba, penyaringan secara fisik yang paling banyak dipergunakan, tergantung kepada tujuan penyaring dan benda yang akan disaring. Tipe-tipe filter yang dipergunakan,

dapat berbentuk filter selulosa, Seitz, gelas ataupun porselen. Sedang cara penggunaan filter, umumnya dilakukan sebagai berikut:

- a. Filter dimaksud ditempatkan antara corong dan penghubung, kemudian diikat.
- b. Alat filter kemudian ditempatkan di atas botol penampung hasil yang dihubungkan dengan pompa hampa udara (pompa vakum)
- c. Larutan yang akan disaring ditempatkan pada corong, dan pompa vakum dijalankan, sehingga hasil saringan akan didapatkan pada botol penampung.
- d. Sterilisasi secara gas mikroksidal jarang digunakan pada teknologi fermentasi, tetapi khusus digunakan pada sterilisasi instalasi mesin dan alat tangki, sistem perpipaan dan filtrasi. Pemakaian gas mikrosidal ini sangat dipengaruhi oleh konsentrasi, relative humidity, suhu dan waktu kontak

Tujuan

Untuk memahami cara sterilisasi dengan menggunakan autoclave dalam kondisi yang aseptis

Alat Dan Bahan

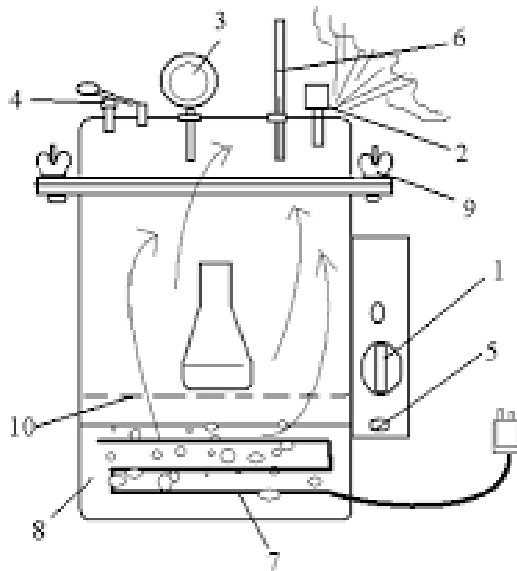
Alat : Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, pipet volume, dan autoclave.

Bahan : Kapas, kertas, karet pengikat, plastik, aquades dan media.

Cara Kerja

1. Alat yang akan digunakan dicuci bersih dan dikering anginkan
2. Alat-alat tersebut kemudian dibungkus dengan kertas hingga semua bagian tertutup rapat. Kemudian semua alat dibungkus dengan plaspik HDPE dan diikat dengan karet.
3. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
4. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol beretutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
5. Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.

6. Nyalakan autoklaf, diatur timer dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121 °C
7. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
8. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada pressure gauge menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.



Keterangan Gambar :

1. Tombol pengatur waktu mundur (timer)
2. Katup pengeluaran uap
3. pengukur tekanan
4. klep pengaman
5. Tombol on-off
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas
8. Aquades (dH₂O)
9. Sekrup pengaman
10. batas penambahan air

II. PENGECERAN

Seperti kita ketahui bahwa semua mikrobia dapat hidup dimanapun selama tempat itu dapat menunjang kondisi hidupnya. Untuk mengetahui hal itu maka perlu dilakukan pembiakan terhadap mikrobia tertentu yang diambil dari suatu sampel tertentu. Dalam uji di laboratorium, yang pertama perlu dilakukan adalah pengenceran dari sejumlah sampel dengan berbagai tingkat pengenceran. Tujuan dari pengenceran adalah untuk mendapatkan jumlah koloni yang dapat dihitung jika dilakukan dalam tempat terbatas.

Tujuan

Memahami cara perhitungan mikrobia dengan cara pengenceran

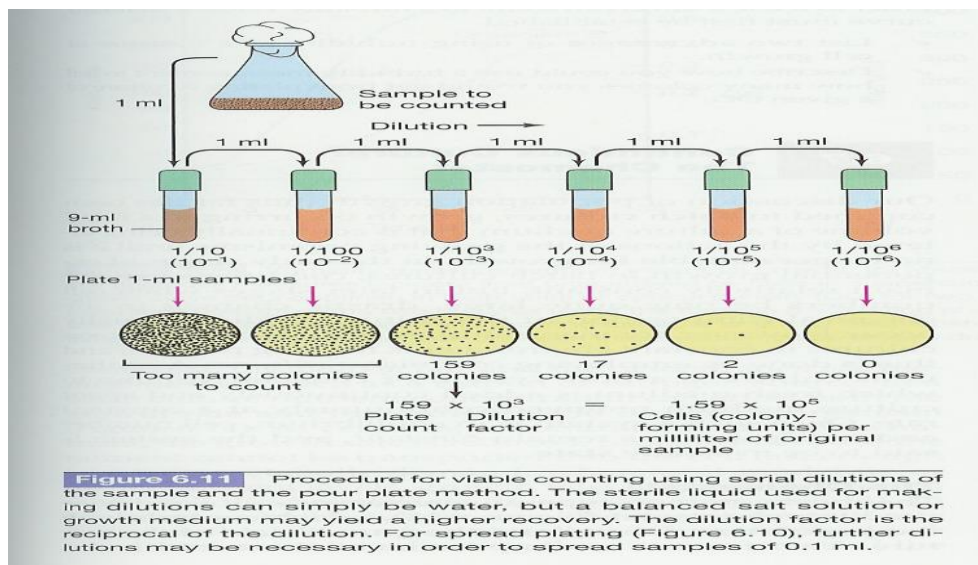
Alat dan bahan

Alat : Timbangan, pipet mikro, pipet volume, tabung reaksi, pemanas bunsen dan inkubator

Bahan : Aquades dan sampel

Cara kerja

1. Sebanyak 5 gram sampel dicampur dengan 45 ml aquades hingga merata. Ini merupakan pengenceran 10^{-1}
2. Dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml larutan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades (merupakan pengenceran 10^{-2}). Di campur hingga homogen.
3. Pengenceran selanjutnya dilakukan sama seperti cara kerja nomor 2 sampai tingkat pengenceran yang diinginkan.



III. TEHNIK PERHITUNGAN MIKROBIA

Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah mikrobia dalam bahan pangan yaitu dengan metode hitungan cawan dan metode hitungan mikroskopik langsung. Dari metode tersebut, metode hitungan cawan yang paling banyak digunakan. Metode hitungan cawan digunakan untuk menghitung jumlah koloni mikroorganisme per gram atau per mili liter contoh. Metode ini dibedakan menjadi metode tuang (*pour plate method*) dan metode sebab (*spread plate method*). Metode hitungan mikroskopik langsung menggunakan alat hemasitometer. Selain kedua metode tersebut, ada juga metode lain yang digunakan khusus untuk menganalisis mikrobia dalam air, terutama terhadap mikrobial koliform yaitu dengan menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*).

Tujuan : mengetahui dan memahami cara perhitungan mikrobia dengan metode hitungan cawan, metode hemasitometer dan metode MPN.

A. Metode Hitungan Cawan

1. Pour Plate Method

Alat : Cawan Petri 3 buah, Pipet Volume 1ml 1 buah, Incubator dan Pemanas Bunsen.

Bahan : Media TSA dan contoh yang telah diencerkan (Roti).

Cara Kerja

1. Contoh yang telah yang diencerkan disiapkan
2. Cawan Petri diberi kode masing-masing per tingkat pengeceran
3. Larutan Contoh diambil 1ml dan dimasukkan ke dalam Cawan Petri
4. Kemudian ditambahkan media yang telah mencair sebanyak 10 – 15 ml kedalam Cawan Petri, dicampur baik-baik dan hati-hati
5. Media dibiarkan mengeras baru kemudian dibalik
6. Cawan Petri tersebut diletakkan didalam Incubator (Temperatur Kamar) selama 24 jam
7. Jumlah koloni yang hidup dihitung. Yang dipakai adalah koloni sejumlah antara 30 – 300 per Cawan Petri dihitung
8. Apabila terdapat jumlah koloni yang menyebar, dihitung sebagai satu koloni. Namun apabila penyebaran lebih dari 25% perhitungan tidak dapat digunakan

9. Jumlah koloni dihitung per gram atau per mili liter dari larutan dengan pengecaraan yang memberikan jumlah koloni 30 – 300. Misal : 200 koloni dari tingkat pengecaraan 103, maka jumlah koloni – $200 \times 10^3 = 2 \times 10^5$ koloni/ml.

2. Spread Methode

Alat : Cawan Petri 3 buah, Pipet Volume 1ml, Spatula dan Incubator.

Bahan : contoh yang telah diencerkan (roti) dan Media TSA

Cara Kerja

1. Cawan Petri 2 buah per tingkat pengecaraan disiapkan dan diberi kode
2. Ditambahkan 10 – 15 ml medium yang telah mencair kedalam cawan dan dibiarkan mengeras
3. Contoh yang telah diencerkan disiapkan
4. Larutan contoh diambil 0,1 ml dan dimasukkan kedalam Cawan Petri dan diratakan dengan Spatula khusus yang Steril sampai Inokulum benar-benar meresap
5. Cawan Petri dibalik dan disimpan dalam Incubator
6. Hitung jumlah koloni seperti metode sebelumnya.

B. Metode Hemasitometer

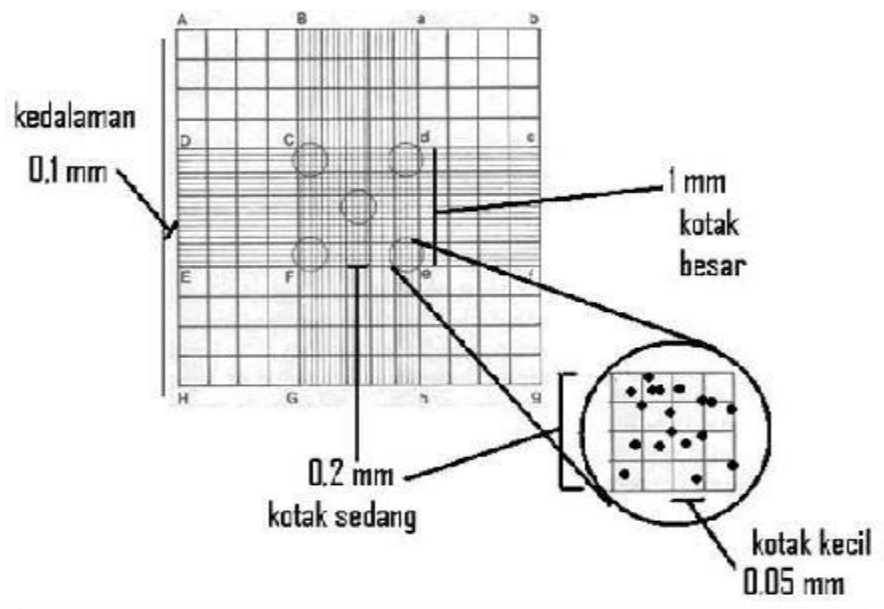
Alat : Hemasitometer

Bahan : Yeast Murni

Cara Kerja

1. Bersihkan permukaan hitung Hemasitometer dengan secarik kertas lensa yang telah dibasahi dengan setetes air. Juga bersihkan kaca tutup Hemasitometer sampai tidak lagi tertinggal sisa-sisa minyak pada permukaannya
2. Letakkan kaca tutup Hemasitometer diatas permukaan hitung Hemasitometer
3. Siapkan Yeast murni ambillah sebanyak 0,1 sampai 0,5 ml dengan Pipet Pasteur. Pengambilan suspensi dengan Pipet Pasteur dapat dilakukan dengan cara memasukan pipet tersebut ke dalam tabung suspensi lalu menutup lubang pangkal pipet dengan telunjuk atau dihisap dengan mulut.
4. Dengan cermat taruhlah ujung Pipet Pasteur yang berisi suspensi ruang Hemasitometer, tutup kaca.

5. Taruhlah Hemasitometer diatas Mikroskop dengan hati-hati. Amatilah dengan obyektif berkekuatan rendah dan hitunglah jumlah sel yang terdapat pada 80 buah kotak kecil yang terletak dalam kotak bagian tengah yang berukuran 1 mm² itu.
6. Cara menghitung keseluruhannya ada 9 area, masing-masing berukuran 1 mm². Kotak yang ditengah (kesemua isinya dibatasi dengan garis triple) juga berukuran 1 mm² dan dibagi menjadi 25 kotak besar, setiap kotak besar ini dibagi lagi menjadi 16 kotak. Dengan demikian dalam kotak tengah tersebut seluruhnya terdapat 400 kotak kecil (25 x 16).
7. Contoh perhitungan : andaikanlah menurut pengamatan anda terdapat 500 sel khamir didalam kotak kecil. Maka jumlah sel khamir yang terdapat didalam mili suspensi asal dapat dihitung dengan cara berikut :
 - a) 80 kotak kecil mempunyai luas 0,2 mm². Jadi didalam setiap mili meter persegi terdapat 500 x 5 atau 2500 sel
 - b) Kedalam cairan dibawah Hemasitometer ialah 0,1 mm maka volume cairan yang tercangkup oleh kotak berukuran 1 mm² ialah 0,1 mm³. Artinya terdapat 2500/0,1 mm³ atau 25.00/mm³.
 - c) 1 ml = 1 cm³ atau 1000 mm³. Maka jumlah sel khamir yang terdapat didalam suspensi asal ialah 2,5 x 10⁷ sel/mm³



C. Metode MPN

Alat : Tabung Durham, Pipet Volume dan Tabung Reaksi

Bahan : Sampel air minum yang akan diuji, *Lauryl Tryptose Broth 2 strength* dan *Lauryl Tryptose 1 strength*.

Cara Kerja

1. Disiapkan dalam tabung-tabung reaksi 10 ml LTB 2 dan LTB 1. disamping itu ke dalam tabung reaksi dimasukkan tabung Durham (bagian tabung Durham yang tertutup disebelah atas). Semua tabung reaksi tersebut disterilisasikan.
2. Penentuan *E.Coli* dengan metode ini menggunakan sistem 5:5:5 artinya :
 - 5 tabung reaksi steril yang berisi masing-masing 10 ml LTB 2 masing-masing diinokulasikan dengan 10 ml larutan contoh bahan.
 - 5 tabung reaksi steril yang berisi masing-masing 10 ml LTB 1 masing-masing diinokulasikan dengan 1 ml larutan contoh bahan.
 - 5 tabung reaksi steril yang berisi masing-masing 10 ml LTB 1 masing-masing diinokulasikan dengan 0,1 ml larutan contoh bahan.
3. Setelah semua tabung reaksi diinokulasikan dengan larutan contoh bahan, kemudian dicampur supaya homogen, dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.
4. Setelah diinkubasi, dihitung tabung reaksi yang menunjukkan adanya pembentukan gas pada tabung Duham. Harus terdapat paling sedikit tabung Durham yang berisi gas (disebut positif). Jika pada tabung Durham didalam tabung-tabung rekasi tidak terbentuk gas (disebut negatif), diinkubasikan kembali selam 24 jam. Kemudian tabung yang positif hasilnya didalam tabel : “Most Probable Number”, : menurut HOSKINS dan kemudian dinyatakan tiap (100 ml contoh bahan) (“Presumptive Coliforms MPN”/10)

IV. TEKNIK ISOLASI DAN PEMURNIAN

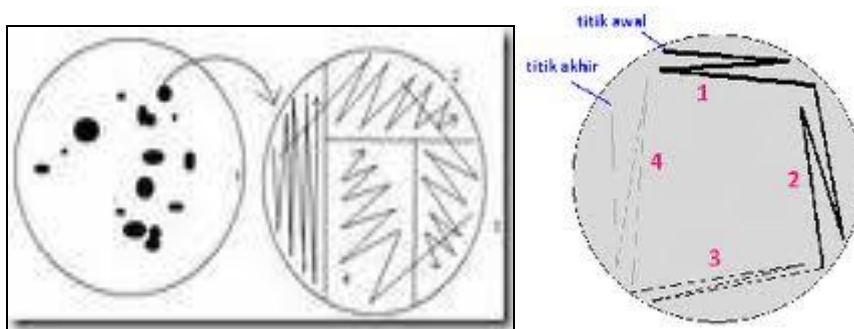
Isolasi mempunyai arti pemisahan mikrobia dari sumbernya . Hasil isolasi adalah isolat. Sedangkan Pemuurnian merupakan salah satu tehnik yang dilakukan dalam bidang mikrobiologi dengan tujuan untuk memperoleh biakan murni. Biakan yang berasal dari satu jenis mikrobia akan dengan mudah dipelajari sifat biakan, morfologi dan sifat lainnya.

Tujuan : Untuk mempelajari cara mengisolasi mikroorganisme dan mempelajari tehnik penggoresan untuk memperoleh biakan murni.

Alat : Cawan petri 3 buah, tabung reaksi 3 buah dan jarum ose.

Cara Kerja

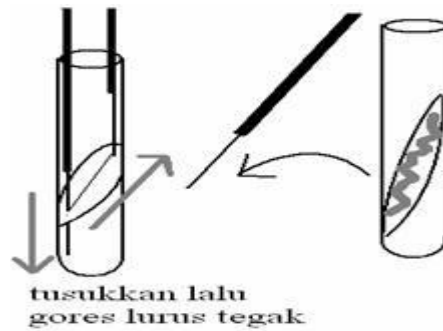
1. Disiapkan cawan petri yang berisi media padat (jenis media tertentu).
2. Satu koloni mikroorganisme dari biakan yang dipilih diambil dengan jarum ose steril berukuran 2 mm.
3. Jarum ose digoreskan pada media padat secara hati-hati dengan cara sebagai berikut :



Gambar 1. Teknik Gores Pada Media Padat

4. Setiap berpindah dari 1 ke-2, ke-3 dan seterusnya jarum ose harus dibakar di atas Bunsen.

5. Cawan petri di inkubasi kemudian dilakukan pemurnian dengan cara di ambil 1 koloni dari cawan petri dengan menggunakan jarum ose steril berukuran 2 mm.
6. Disiapkan tabung reaksi berisi agar miring lalu jarum ose tadi digoreskan di permukaan agar miring dengan hati-hati dan diletakkan dalam inkubator.



Gambar2. Teknik Gores Pada Media Agar Miring

V. IDENTIFIKASI MIKROBIA.

Identifikasi mikrobia merupakan salah satu tugas yang lazim dilakukan di laboratorium mikrobiologi. Mikrobia tidak memiliki ciri anatomi yang nyata, sehingga identifikasi mikrobia, baik bakteri, yeast maupun jamur didasarkan pada sifat morfologi, sifat biakan dan biokimia mikroorganismenya. Morfologi mikroorganismenya berdasarkan bentuk, ukuran dan penataan biasanya tidak cukup untuk melakukan identifikasi. Ciri lainnya seperti sifat pewarnaan, pola pertumbuhan pada karbohidrat dan penggunaan asam amino sangat membantu dalam identifikasi mikrobia.

A. Identifikasi Bakteri

1. Pewarnaan Gram

Tujuan : memahami cara melakukan pewarnaan gram

Alat : Kaca Objek bersih, spidol, jarum ose, bak pewarna, kertas serap, mikroskop majemuk, minyak celup dan kertas lensa.

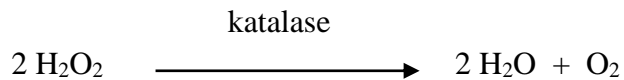
Bahan : Biakan hasil isolasi

Cara Kerja

- a. Kaca objek yang bersih disiapkan
- b. Disiapkan 2 olesan bakteri pada kaca objek dengan jarak antara ke dua olesan tersebut paling sedikit 2 cm.
- c. Kaca objek tersebut difiksasi di atas Bunsen selama beberapa menit.
- d. Setelah difiksasi, kaca objek diletakkan di atas rak kawat bak pewarna.
- e. Olesan bakteri digenangi dengan pewarna primer yaitu ungu kristal selama 1 menit.
- f. Menggunakan pinset, kaca objek dimiringkan di atas bak pewarna untuk membuang kelebihan ungu kristal lalu dibilas dengan aquadest.
- g. Kaca objek ditiriskan dan dikembalikan ke atas rak kawat pada bak pewarna.
- h. Olesan kemudian digenangi dengan larutan iodum selama 2 menit dan kemudian lakukan seperti langkah 6.
- i. Olesan di cuci dengan larutan pemucat tetes demi tetes selama 30 detik atau sampai zat warna ungu kristal tidak terlihat mengalir lagi.
- j. Cuci kembali dengan aquadest dan ditiriskan.
- k. Lalu genangi dengan safranin sebagai pewarna tandingan selama 30 detik.
- l. Lakukan kembali langkah 6 dan 7
- m. Olesan bakteri diamati warnanya, apakah berwarna biru gelap atau ungu (gram positif) atau berwarna merah muda (gram negatif).

2. Uji Katalase

Kebanyakan bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif yang menggunakan oksigen menghasilkan hidrogen peroksida yang sesungguhnya bersifat racun bagi sistem enzimnya sendiri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena dihasilkannya enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen :



Matinya bakteri–bakteri anaerobik obligat bila ada oksigen disebabkan karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri. Ada tidaknya pembentukan enzim katalase dapat membantu pembedaan kelompok-kelompok bakteri tertentu.

Tujuan : Untuk mengamati kegiatan enzimatik bakteri khususnya keberadaan enzim katalase dalam mikrobia.

Alat : Kaca Objek bersih dan jarum ose.

Bahan : Biakan hasil isolasi dan hidrogen peroksida (H_2O_2)

Cara Kerja

- Kaca objek yang bersih disiapkan.
- Dua tetes hidrogen peroksida diletakkan di atas kaca objek, kemudian secara aseptik biakan murni bakteri dipindahkan ke atas tetesan hidrogen peroksida dengan jarum ose.
- Uji positif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa mikrobia tersebut menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan O_2 .

B. Identifikasi Jamur

Tujuan : Untuk mempelajari cara mengidentifikasi jamur

Alat : Kaca objek dan cover glass steril, cawan petri steril, spatula dan jarum ose.

Bahan : Kertas tisu steril, aquadest steril, media PDA steril, ampicilyn, alkohol, kapas, karet gelang, spritus, *Wrapping*, aluminium foil dan lactophenol blue.

Cara Kerja

1. Media PDA steril sebanyak 5 ml disiapkan secara aseptis ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga membeku.
2. Media PDA steril yang telah beku di potong persegi dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm, diletakkan di atas kaca objek yang telah disterilkan terlebih dahulu.
3. Diambil satu mata ose jamur yang akan dibiakkan kemudian digoreskan pada ke empat sudut PDA steril di atas kaca objek, kemudian tutup dengan kaca penutup yang telah disterilkan.
4. Cawan petri steril disiapkan pada bagian dalamnya dialasi dengan kertas tissue steril kemudian di tetesi dengan 5 ml aquadest steril.
5. Kaca objek yang telah berisi biakan jamur dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditutup dan diberi *wrapping* pada sekeliling pinggir bagian penutup untuk mencegah kontaminan.
6. Inkubasi pada suhu kamar selama 48 jam.
7. Setelah 48 jam, kaca objek yang berisi biakan dikeluarkan dari cawan petri, medianya di buang. Kaca objek ditetesi dengan satu tetes lactophenol blue, tutup dengan kaca penutup biarkan selama 1 jam supaya larutan lactophenol blue meresap ke dalam hipa jamur.
8. Diamati struktur jamur dengan menggunakan mikroskop yang meliputi bentuk hipa, spora dan konidia jamur.