

# **PENENTUAN MIKROORGANISME PANGAN LAUT**

**Penulis :**

**Komariah Tampubolon**



**DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**2008**



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)**  
Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680. Telp. (0251) 622915-622916. Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp\_ipb@ipb.ac.id

**SURAT KETERANGAN**

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa:

Nama : Ir. Komariah Tampubolon, MS.  
NIP : 130 355 555  
Pangkat/Jabatan : Pembina Tk. I/ IV b / Lektor Kepala  
Unit Kerja : Departemen Teknologi Hasil Perairan  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB

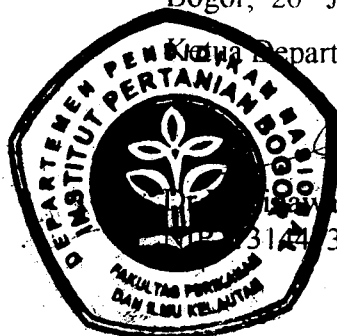
Telah mendokumentasikan Makalah (Hasil Karya Ilmiah) yang berjudul :

No.	Judul	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <b>Komariah Tampubolon</b>
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <b>Komariah Tampubolon</b>
3.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <b>Komariah Tampubolon</b>
4.	Penentuan Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <b>Komariah Tampubolon</b>

pada Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Demikian Surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 26 Juni 2008



Komariah Tampubolon, M.Sc.

314/395



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
**DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)**

Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680, Telp. (0251) 622915-622916. Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp\_ipb@ipb.ac.id

Perihal : Ucapan Terima Kasih

Kepada Yth. : **Ir. Komariah Tampubolon, MS.**  
Staf Pengajar Dept. Teknologi Hasil Perairan FPIK  
Institut Pertanian Bogor  
di Bogor

Dengan ini kami ucapkan terima kasih atas sumbangan Karya Ilmiah berupa :  
Buku/Jurnal/Makalah yang tidak dipublikasikan sebanyak 4 (empat) judul sebagai  
berikut :

No.	Judul Karya Ilmiah	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal</u> : Komariah Tampubolon
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal</u> : Komariah Tampubolon
3.	Penentuan Mikroorganisme Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal</u> : Komariah Tampubolon
4.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal</u> : Komariah Tampubolon

Adapun Buku/Jurnal/Makalah tersebut disimpan di Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 26 Juni 2008  
Perpustakaan  
Dep. Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

Hedy Wibowo, A.Md.  
NIP.

## KATA PENGANTAR

Buku Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut ini disusun untuk memberikan pengetahuan tambahan bagi pembaca dalam menentukan mikroorganisme secara umum dan khususnya yang terdapat dalam pangan laut atau hasil perikanan. Materi yang diberikan adalah berupa cara kerja yang sesederhana mungkin, yang disesuaikan dengan kemampuan dari pembaca. Selanjutnya diharapkan para pengguna, akan dapat melaksanakan penentuan dan penilaian mikroorganisme, serta penghitungan jumlah mikroorganisme yang terdapat dalam produk hasil perikanan.

Penulis menyadari bahwa buku ini masih belum sempurna, dimana perlu perbaikan yang disesuaikan dengan kemajuan teknologi. Semoga buku ini dapat diambil manfaatnya.

Bogor, Mei 2008,

Penulis

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	ii
DAFTAR ISI .....	iii
DAFTAR GANBAR .....	iv
DAFTAR LAMPIRAN.....	v
1. PETUNJUK UMUM PRAKTIKUM.....	1
2. PENGGUNAAN MIKROSKOP.....	3
3. PERSIAPAN MEDIUM DAN LARUTAN PENGECER .....	15
4. KULTUR MIKROBA DAN CARA ISOLASI.....	22
5. PEWARNAAN BAKTERI .....	32
6. MEODE HITUNGAN CAWAN .....	40
7. METODE MPN (Most Probable Number) .....	52
DAFTAR PUSTAKA .....	57
LAMPIRAN .....	58

## DAFTAR GAMBAR

1. Bagian-bagian mikroskop.....	3
2. Pembentukan bayangan oleh lensa obyektif dan okuler pada mikroskop.....	4
3. Hubungan antara jarak kerja lensa obyektif dengan pengaturan diafragma iris.....	5
4. Cara kerja lensa minyak imersi dalam mikroskop sederhana (Pelczar dan Reid, 1972).....	7
5. Bentuk dan cara pengelompokan bakteri serta bentuk dan cara reproduksi khamir.....	11
6. Diagram bentuk beberapa kapang.....	12
7. Cara pembentukan "slide culture" (a) siap untuk disterilisasi (b) Setelah inokulasi, siap untuk diinkubasi.....	13
8. Bentuk pertumbuhan mikroba pada permukaan.....	24
9. Bentuk pertumbuhan mikroba pada (a) Agar miring dan (b) Agar tegak.....	25
10. Cara menggoreskan kultur pada agar cawan.....	27
11. Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan.....	27
12. Cara melakukan metode agar tuang.....	28

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Komposisi Medium .....	57
Lampiran 2. Komposisi Larutan Pengencer.....	63
Lampiran 3. Komposisi Larutan Pewarna.....	64

## 1. PETUNJUK UMUM PRAKTIKUM

Dalam melaksanakan praktikum Mikrobiologi Keamanan Pangan Hasil Laut, kita bekerja selain dengan zat-zat kimia, juga dengan berbagai mikroba, dimana diantaranya ada yang dapat menimbulkan penyakit atau keracunan. Untuk itu cara bekerja di dalam laboratorium mikrobiologi, sedikit berbeda dengan laboratorium lainnya. Pekerjaan mikrobiologi pada umumnya dilakukan dengan cara *aseptik*. Setiap kultur mikroba yang tertetes di atas meja tidak boleh di biarkan begitu saja, tetapi harus segera dibersihkan dengan desinfektan.

Dalam hal ini diberikan beberapa petunjuk yang harus diperhatikan dan juga ditaati, sebelum memulai bekerja, seperti berikut :

- 1) Agar memakai baju/jas laboratorium yang berwarna putih atau warna polos lainnya. Hal ini untuk mencegah tumpahan contoh yang mengandung mikroba, zat warna, dan larutan kimia pada baju dan kulit.
- 2) Sebelum praktikum dimulai, mahasiswa harus sudah membaca dan memahami buku penuntun praktikum dan mencoba mengerti serta membuat rencana pekerjaan yang akan dilakukan pada hari tersebut
- 3) Sebelum praktikum dimulai, akan diberikan kuliah singkat dan petunjuk mengenai pekerjaan yang akan dilakukan. Praktikum tidak boleh dimulai sebelum diberikan petunjuk oleh asisten. Hal-hal yang tidak dimengerti harus ditanyakan kepada asisten.
- 4) Pergunakanlah peralatan gelas, medium dan larutan kimia seefisien mungkin, sesuai dengan petunjuk dalam buku penuntun.
- 5) Semua data-data hasil praktikum harus selalu dicatat di dalam format khusus, kemudian disusun dan dilaporkan sebagai laporan praktikum.

Untuk mencegah terjadinya hal-hal yang tak diinginkan selama praktek, beberapa peraturan laboratorium yang harus diikuti :



- 1) Meja laboratorium harus selalu dibersihkan dengan desinfektan (seperti lysol) sebelum dan sesudah praktikum.
- 2) Setelah selesai praktikum, meja harus bersih dari bahan-bahan dan peralatan yang bekas dipakai. Semua kotoran dan peralatan gelas bekas pakai, harus diletakkan ditempat yang telah disediakan, seperti misalnya pipet ditempatkan pada sebuah tabung/ember yang berisi larutan desinfektan. Peralatan gelas yang mengandung mikroba harus disterilisasi terlebih dahulu sebelum dicuci.
- 3) Dilarang makan, minum atau merokok di dalam ruang laboratorium, selain untuk menjaga kebersihan, juga untuk mencegah tertelannya mikroba yang bersifat patogen.
- 4) Jika terjadi kecelakaan, misalnya peralatan gelas pecah, suspensi mikroba tumpah atau tertelan/terhisap dan kejadian lainnya yang tak diinginkan, maka segera dilaporkan kepada asisten yang bertugas.

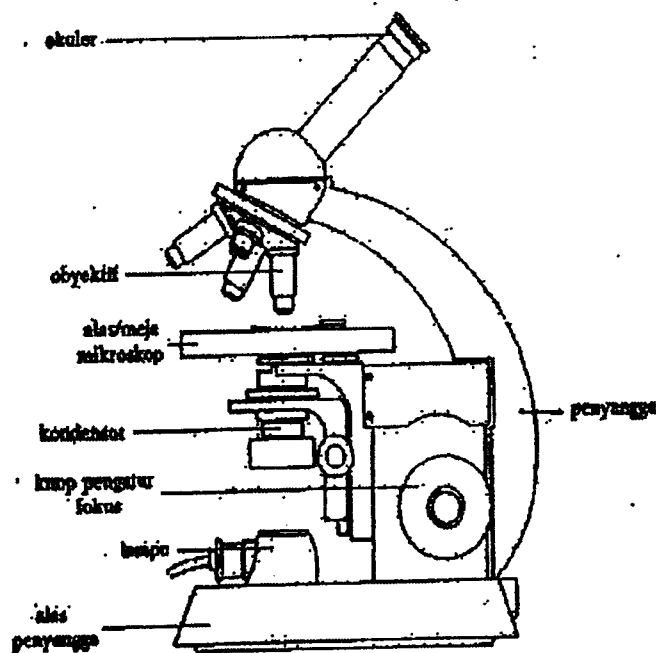
Selanjutnya bagi mahasiswa yang ingin lebih jelas mengetahui cara bekerja yang aman di laboratorium mikrobiologi, dapat dilihat pada buku "Keselamatan Kerja Dalam Laboratorium Biologis" oleh Komariah Tampubolon (2006).

Demikianlah beberapa peraturan yang penting yang harus ditaati, baik sebelum, selama maupun sesudah praktikum Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut.

## 2. PENGGUNAAN MIKROSKOP

### 1. Pendahuluan

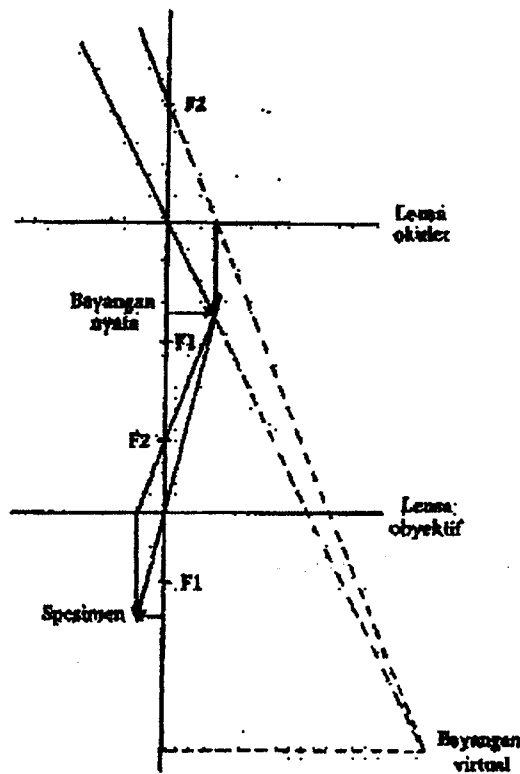
Mikrobiologi adalah ilmu mengenai makhluk hidup yang mempunyai ukuran sangat kecilnya, dimana setiap individu selnya tidak mungkin dapat dilihat secara langsung oleh mata. Ilmu mengenai mikrobiologi dimulai dari penemuan suatu alat yang disebut *mikroskop* yang dapat digunakan untuk melihat sel mikroba yang sedemikian kecil ukurannya, melalui suatu sistem lensa pembesar. Mikroskop dapat dibedakan atas beberapa jenis, tetapi cara bekerjanya pada prinsipnya sama, yaitu terdiri dari *sistem optikal* atau *sistem pembesaran*, dan *sistem iluminasi* yang menyebabkan terlihatnya spesimen atau obyek. Bagian-bagian mikroskop dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagian-bagian mikroskop

## 2. Lensa dan Pembesaran

Pembesaran oleh mikroskop merupakan hasil dari dua sistem lensa yaitu *lensa obyektif* yang terletak di dekat spesimen, dan *lensa okuler* (eyepiece lens) yang terletak di atas di dekat mata yang melihatnya. Lensa objektif mengatur fokus sinar lampu pada spesimen yang ditempatkan di belakang titik fokal  $F_1$  dan memperbesar spesimen sehingga menghasilkan *bayangan nyata* (real image) yang diproyeksikan pada bidang fokal dari lensa okuler. Bayangan nyata yang terletak di depan titik fokal  $F_1$  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 obyektif dan lensa okuler. Lensa objektif terdiri dari kombinasi lensa konveks dan lensa konkaf, seperti terlihat pada Gambar 2.

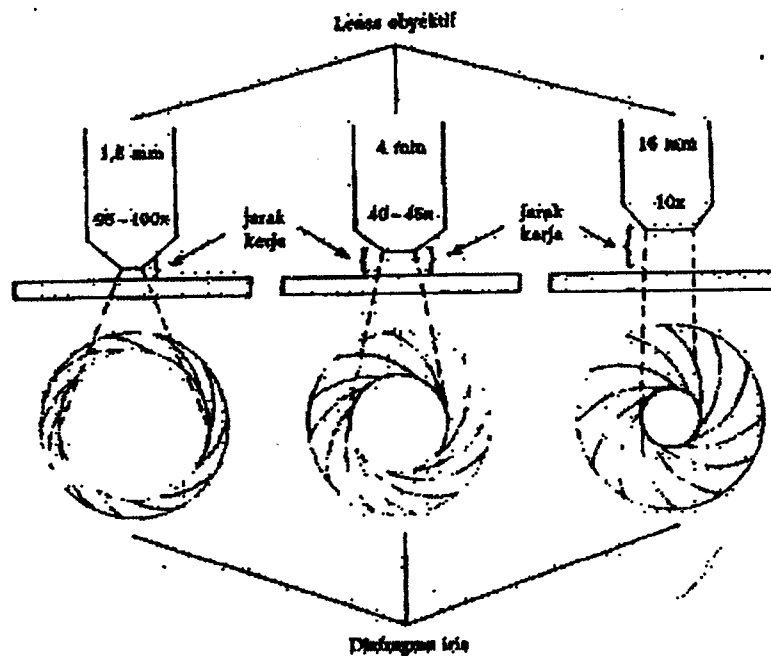


Gambar 2. Pembentukan bayangan oleh lensa obyektif dan okuler pada mikroskop

Untuk mendapatkan hasil dengan berbagai tingkat pembesaran, setiap mikroskop biasanya dilengkapi dengan 3 buah lensa obyektif yang dipasang pada bagian "nosepiece" yang dapat diputar, yaitu :

- (1) lensa obyektif *berkekuatan rendah* (low power, 16 mm), ditandai dengan angka 10x pada bagian luarnya dan mempunyai jarak kerja 5-8,3 mm,
- (2) lensa obyektif *berkekuatan tinggi* (high dry, 4 mm) yang ditandai dengan angka 40x, 43x, 44x, atau 45x, dan mempunyai jarak kerja 0,46-0,72 mm,
- (3) lensa obyektif *minyak imersi* (immersion oil, 1,8 mm), ditandai dengan angka 95x, 97x, atau 100x dan mempunyai jarak kerja 0,13-0,14 mm.

Adapun 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). Pada Gambar 3 menunjukkan hubungan antara jarak kerja lensa obyektif dengan pengaturan diafragma iris. Semakin pendek jarak kerja lensa, diafragma akan semakin terbuka.



Gambar 3. Hubungan antara jarak kerja lensa obyektif dengan pengaturan diafragma iris

Jika lensa okuler mempunyai pembesaran 10x, maka total pembesaran dengan menggunakan lensa berkekuatan rendah adalah menjadi 100x, dengan lensa berkekuatan tinggi pembesarannya adalah 400x, 430x, atau 450x, dan pembesaran dengan lensa minyak imersi adalah 950x, 970x, atau 1000x.

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.

### 3. "Resolving Power"

Jika total pembesaran merupakan hasil dari pembesaran dua buah sistem lensa, maka seharusnya total pembesaran dapat dinaikkan dengan cara menambah lebih banyak lensa. Namun 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 obyek 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 obyektif, dimana  $Na = n \sin \square$ , dan  $\sin \square = \frac{1}{2} \alpha$

"Resolving power" = diameter dari obyek terkecil yang terlihat

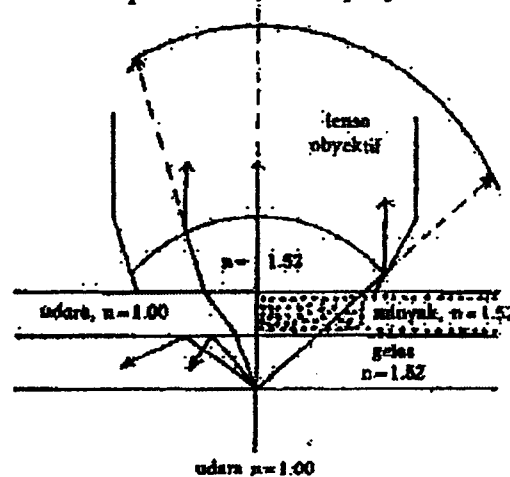
$$= \frac{\text{panjang gelombang}}{\text{"numerical aperture"}}$$

Pada dasarnya "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 obyek (spesimen) dan lensa obyektif, dan menaikkan sudut apertur ( $\alpha$ ) dari lensa obyektif. 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 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:

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

Udara mempunyai indeks refraksi ( $n=1$ ) lebih kecil daripada gelas, oleh karena itu sinar lampu yang datang melalui gelas obyek ke udara akan direfraksi atau dibelokkan. Sinar yang hilang ini menurunkan NA dan resolusi dari benda obyektif. Jika diantara gelas obyek dan lensa obyektif 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 4. Cara kerja lensa minyak imersi dalam mikroskop sederhana (Pelczar dan Reid, 1972)

Dalam hal ini, Gambar 4 diatas, menunjukkan cara kerja minyak imersi dalam mengurangi jumlah sinar yang tidak dapat ditangkap oleh lensa obyektif

#### **4. Iluminasi**

Selain lensa obyektif dan okuler, dua elemen lainnya yang penting dalam mikroskop adalah lampu dan lensa kondenser. 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 kondenser akan mengatur iluminasi dari spesimen secara tepat. Besarnya sinar yang melalui lensa obyektif berbeda untuk setiap jenis lensa. Jika pembesaran lensa obyektif naik, jarak kerja lensa menurun, dan sudut apertur dari obyektif bertambah. Oleh karena itu, dengan bertambahnya pembesaran, bertambah banyak sinar yang harus masuk ke lensa obyektif. Besarnya sinar yang masuk diatur oleh diafragma iris yang terletak di antara kondensor dan lensa. Dengan lensa obyektif berkekuatan rendah dan tinggi, diafragma iris tidak terbuka penuh (Gbr 3) karena pada pembesaran ini spesimen akan terlihat jelas jika sinar tidak terlalu pekat. Tetapi jika digunakan lensa obyektif minyak imersi yang mempunyai pembesaran 95x atau lebih, maka jarak kerja adalah yang terpendek dan diafragma iris akan lebih terbuka.

#### **5. Bahan dan Alat Menggunakan Mikroskop**

Bahan : Suspensi khamir

Suspensi bakteri

Kapang yang ditumbuhkan pada agar cawan

Larutan gliserol 10%

Potato Dextrose Agar (PDA)/Malt Ex

Alat : Mikroskop medan terang

Gelas obyek

Gelas penutup

Cawan petri (1-2 cawan/kelompok)

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

Kertas saring

Otoklaf

## 6. Cara Kerja

### (1) Pemeriksaan bakteri dan khamir

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

Letakkan preparat basah tersebut pada 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 obyektif 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, dan dengan hati-hati lensa obyektif 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 obyek dapat digeser ke kiri, ke kanan, ke depan atau ke belakang, dengan mengatur menggunakan knop penyangga spesimen. Kemudian gunakan lensa



obyektif *berkekuatan tinggi* dengan cara memutar lensa obyektif. Cara selanjutnya sama dengan penggunaan lensa berkekuatan rendah.

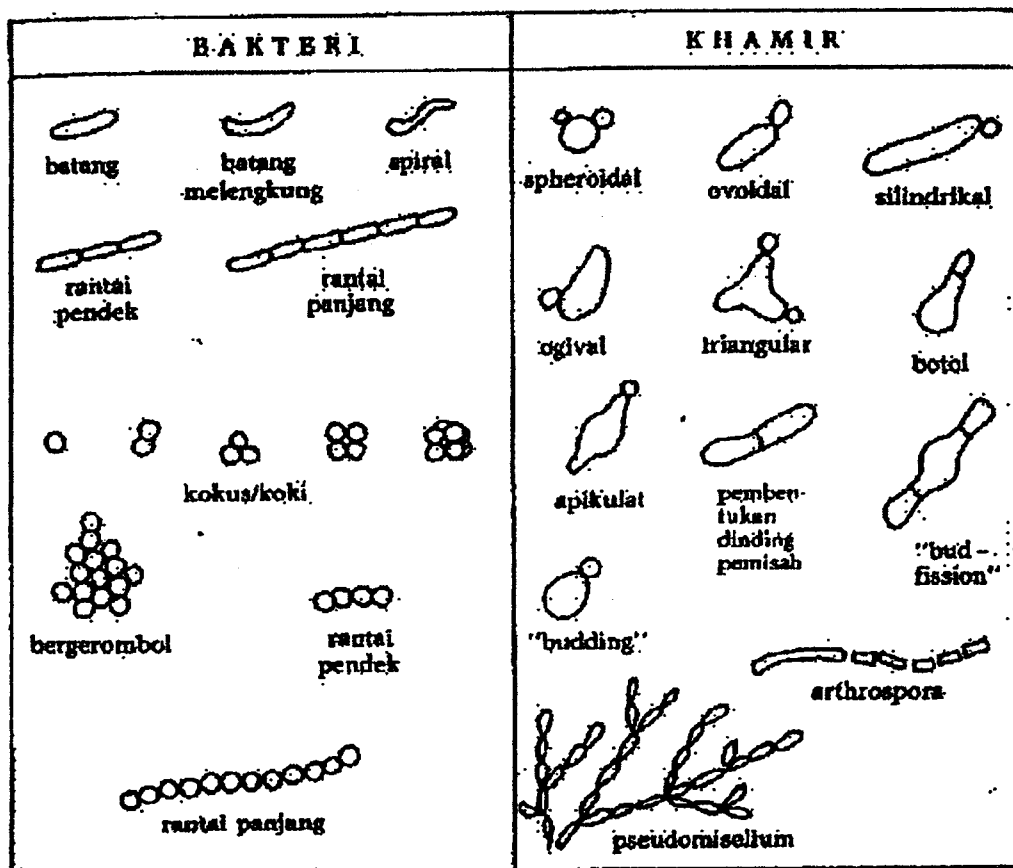
Penggunaan lensa obyektif minyak imersi harus lebih berhati-hati. Mula-mula spesimen harus diatur lokasinya menggunakan lensa berkekuatan rendah. Perlu diingat bahwa semakin tinggi pembesaran, areal obyek yang dapat dilihat di bawah mikroskop akan semakin sempit. Mula-mula tabung penyangga lensa dinaikkan, kemudian putarlah lensa minyak imersi sehingga tepat di atas gelas penutup yang terletak di atas gelas obyek, dan dengan melihat dari samping, turunkan lensa perlahan-lahan sampai menyentuh minyak, tetapi jangan menyentuh gelas obyek. Gunakan pengatur halus untuk menempatkan fokus. *Jangan sekali-kali menurunkan tabung penyangga lensa sewaktu melihat melalui "eyepiece" karena lensa dapat membentur gelas obyek.*

Laporkan bentuk dan ukuran bakteri, serta cara pengelompokannya misalnya tunggal, berpasangan (dua sel), tiga sel, tetrad (empat sel), delapan sel, bentuk rantai panjang, rantai pendek, bergerombol dan sebagainya. Demikian juga dengan bentuk sel khamir, misalnya sferoidal, ovoidal, silindrikal, ogival, triangular, bentuk botol, apikulat, dan sebagainya. Laporkan juga cara reproduksi sel, misalnya dengan cara pembentukan dinding pemisah (*Schizosaccharomyces*), "bud-fission" yaitu "budding" yang diikuti dengan pembentukan dinding pemisah (*Saccharomyces*), "budding" (*Saccharomyces*), pembentukan arthospora (*Trichosporon*), atau pembentukan pseudomiselium (*Candida*). Gambar 5 menunjukkan bentuk, ukuran, dan cara pengelompokan bakteri, serta bentuk dan cara reproduksi khamir. Sel bakteri yang berukuran kecil dapat diamati langsung dengan pembesaran 400x atau 1000x.

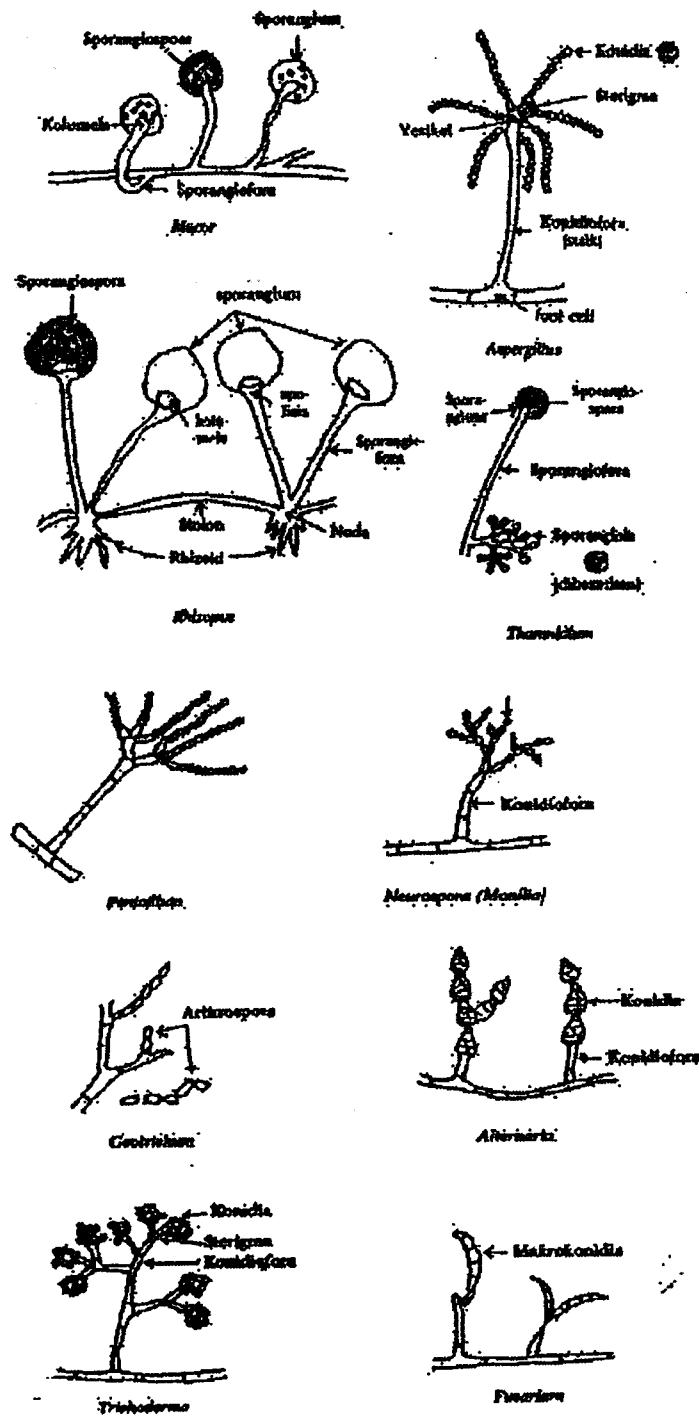
## **(2) Pemeriksaan Kapang**

Berilah setetes larutan gliserol 10% atau larutan laktofenol di atas gelas obyek. 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 6).



Gambar 5. Bentuk dan cara pengelompokan bakteri serta bentuk dan cara reproduksi khamir



Gambar 6. Diagram bentuk beberapa kapang

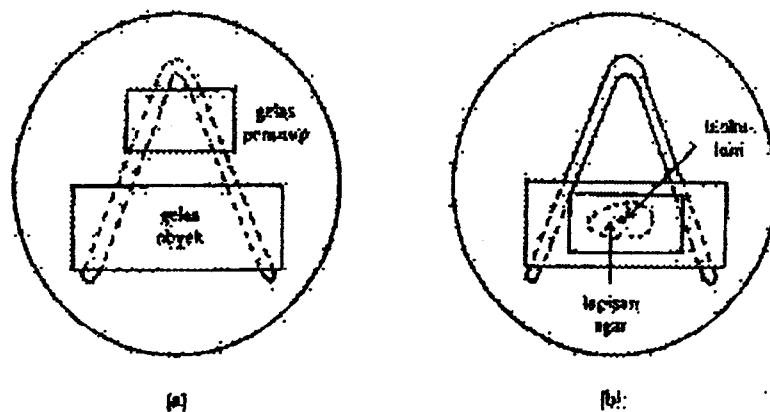
### (3) Pemeriksaan Kapang pada Kultur Cawan

Cara pemeriksaan kapang seperti prosedur sebelumnya (pada gelas obyek) 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. Perlu diingat bawa struktur kapang yang dapat dilihat dengan jelas di bawah mikroskop hanya pada bagian tepi koloni.

### (4) Pemeriksaan Kapang Pada "Slide Culture"

Bagian bawah cawan petri diberi alas kertas saring sehingga menutupi alas bagian dalam cawan. Letakkan batang gelas berbentuk U atau V, kemudian diletakkan gelas obyek di atasnya berdampingan dengan gelas penutup, dan disterilkan di dalam otoklaf (Gambar 7a)



Gambar 7. Cara pembentukan "slide culture" (a) siap untuk disterilisasi (b) Setelah inokulasi, siap untuk diinkubasi

Setelah dingin, di atas gelas obyek diberi setetes medium steril yang telah dicairkan yaitu Potato Dextrose Agar atau Malt Extract Agar atau Glucose Agar. Ratakan dengan jarum Ose steril sehingga membentuk lapisan tipis dengan luas tidak melebihi luas gelas penutup, dan biarkan membeku di dalam cawan tertutup. Setelah membeku, inokulasikan sedikit spora kapang pada permukaan agar menggunakan ujung jarum Ose, dan ditutup dengan gelas penutup (Gambar 7b). Teteskan 5-7 ml gliserol 10% steril ke atas kertas filter untuk memberikan kelembaban yang optimum selama pertumbuhan kapang. Inkubasikan pada suhu kamar selama 3-5 hari, kemudian struktur kapang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran rendah (lensa obyektif 10x) dan tinggi (high dry, lensa obyektif 45x).

#### **Laporan**

Percobaan : Mikroskopi  
(Pemeriksaan Bakteri, khamir dan kapang)

Nama :  
Nrp :  
Gol./Kelompok :

Gambarlah diagram bentuk bakteri, khamir dan kapang yang saudara amati melalui mikroskop, berikan nama genus dan pembesarannya, serta sebutkan ciri-ciri strukturnya.

#### **Pertanyaan**

1. Sebutkan masing-masing 3 (tiga) macam bahan pangan yang sering ditumbuhi oleh ketiga mikroba yang saudara amati.
2. a. Apakah keuntungan pemeriksaan kapang menggunakan "slide culture" dibandingkan dengan pembuatan preparat basah.

### 3. PERSIAPAN MEDIUM DAN LARUTAN PENGECER

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* yang mempunyai konsistensi di antara medium cair dan medium padat.

#### 1. Komposisi Medium

Untuk menstimulus 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 misalnya Nutrient Broth yang mengandung ekstrak daging sapi (beef extract) dan pepton dimana komposisi kimianya tidak tetap (Lampiran 1).

Pembuatan medium dapat dilakukan dengan cara menimbang masing-masing komponen bahan kimia secara teliti, kemudian mencampurkannya, melarutkannya di

dalam air, mengatur pHnya, 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. Berbagai 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 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 dimana bahan-bahan organik tidak boleh terdapat di dalam medium.

## 2. Bentuk dan Jumlah Medium

Jumlah medium yang akan digunakan didalam 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 / contohya, sebagai berikut :

Bentuk medium	Jumlah	Medium/wadah
Agar cawan	15-20	ml/cawan petri (□ 10 cm)
Agar tegak	± 8-9	ml/tabung reaksi (□ 16 mm)
Agar miring	± 6-7	ml/tabung reaksi (□ 16 mm)
Medium cair	± 9-10	ml/tabung reaksi (□ 16 mm)
Medium cair berisitabungDurham	± 9	ml/tabung reaksi (□ 16 mm)

## 3. Larutan Pengencer

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 merupakan sumber fosfor untuk pertumbuhan mikroba.



Garam fosfat yang sering digunakan sebagai bufer adalah kalium monohidrogen fosfat dan/atau kalium dihidrogen fosfat. Sebagai larutan pengencer, selain larutan yang mengandung bufer fosfat, dapat juga digunakan larutan garam fisiologi (0,85%) atau larutan Ringer. Komposisi dari larutan-larutan pengencer tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1.

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.

#### **4. Bahan dan Alat**

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

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

## 5. Cara Kerja

Setiap kelompok harus membuat :

- 5 buah tutup tabung dari kapas
- 6 buah agar cawan (PCA/PDA, jumlahnya 100 ml)
- 5 tabung larutan pengencer (0,85% NaCl a 9 ml) atau
- 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

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 pHnya menggunakan kertas pH atau pH meter. Jika pHnya 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 pHnya, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi dengan jumlah 9 ml. lakukanlah sterilisasi seperti pada pembuatan medium.

### **Laporan**

Percobaan : Persiapan Medium Dan Larutan Pengencer

Nama :

Nrp :

Gol./Kelompok :

Jawablah pertanyaan-pertanyaan di bawah ini

1. Jelaskan fungsi dari masing-masing komponen di bawah ini di dalam medium

- |    |              |    |              |
|----|--------------|----|--------------|
| a. | Pepton       | d. | glukosa      |
| b. | ekstrak sapi | e. | NaCl         |
| c. | agar         | f. | Biru metilen |

2. Jelaskan perbedaan masing-masing medium di bawah ini berdasarkan komposisinya (sintetik atau nonsintetik), dan fungsinya (pertumbuhan umum atau selektif)

- Plate Count Agar (PCA)
- Eosin Methylene Blue (EMB) agar
- Nutrient Agar
- Laktosa Broth
- 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

#### 4. 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.

##### 1. Cara Aseptik dalam Inokulasi

Cara aseptik yang harus dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi merupakan suatu cara kerja dimana 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 diantara 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.

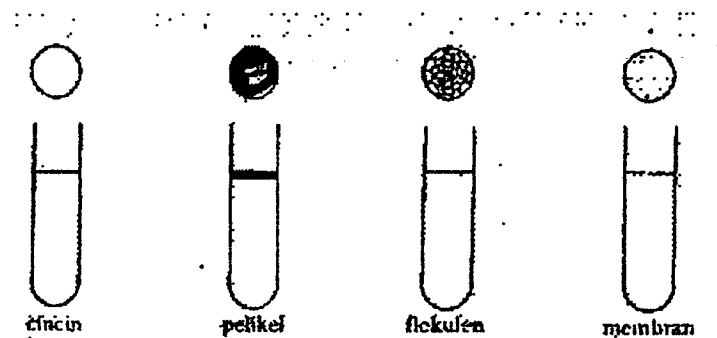
## **2. Kultur Cair**

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:

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 8.

3. Sedimen/endapan, yaitu kumpulan sel-sel yang berkumpul 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.



Gambar 8. Bentuk pertumbuhan mikroba pada permukaan

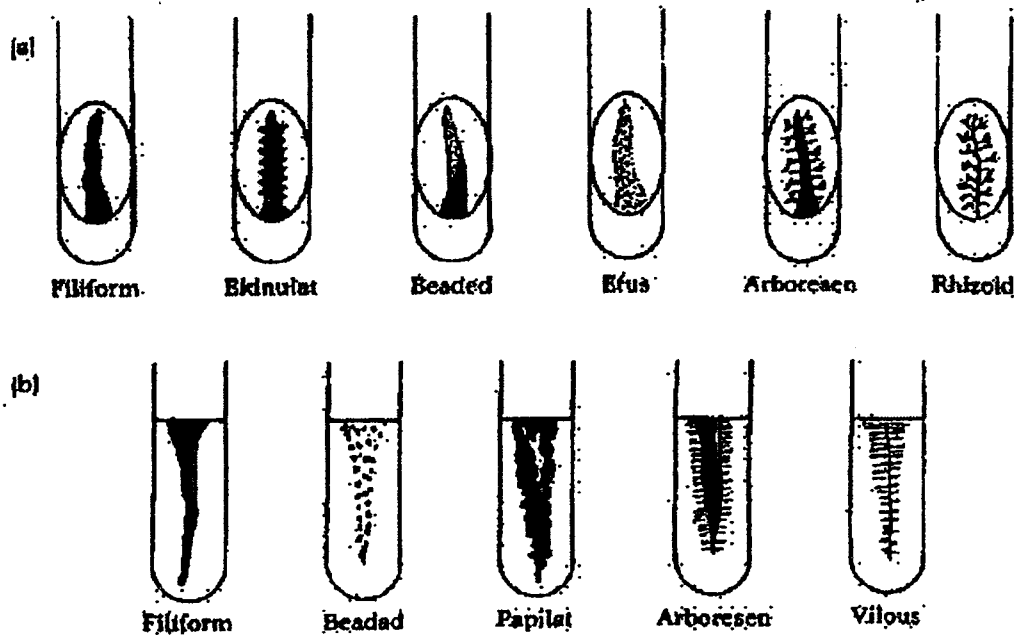
Tabung yang berisi kultur cair tidak boleh digerakkan sebelum pertumbuhan diamati. Sel mikroba yang berukuran relatif besar seperti sel-sel khamir akan mengendap lebih cepat. Oleh karena itu jika kultur akan dipindahkan ke tabung lainnya, tabung harus terlebih dahulu dikocok.

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), dimana 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.

### 3. 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 menggosokkan secara zig-zag pada permukaan agar miring menggunakan jarum Ose yang bagian atasnya dilengkungkan, atau menusukkan loop pada bagian tengah tabung (stab). Cara penusukan 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 9. Agar miring dapat digunakan untuk menyimpan kultur dalam jangka waktu pendek di dalam lemari es pada suhu 4 C, sedangkan agar tegak sering digunakan dalam uji motilitas suatu mikroba.



Gambar 9. Bentuk pertumbuhan mikroba pada (a) Agar miring dan (b) Agar tegak



#### 4. Biakan Agar Cawan

Kultur mikroba dapat dibiakkan dengan cara menginokulasikan pada agar cawan, kemudian penyebaran kultur diatas 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 (Gambar 10), yaitu :

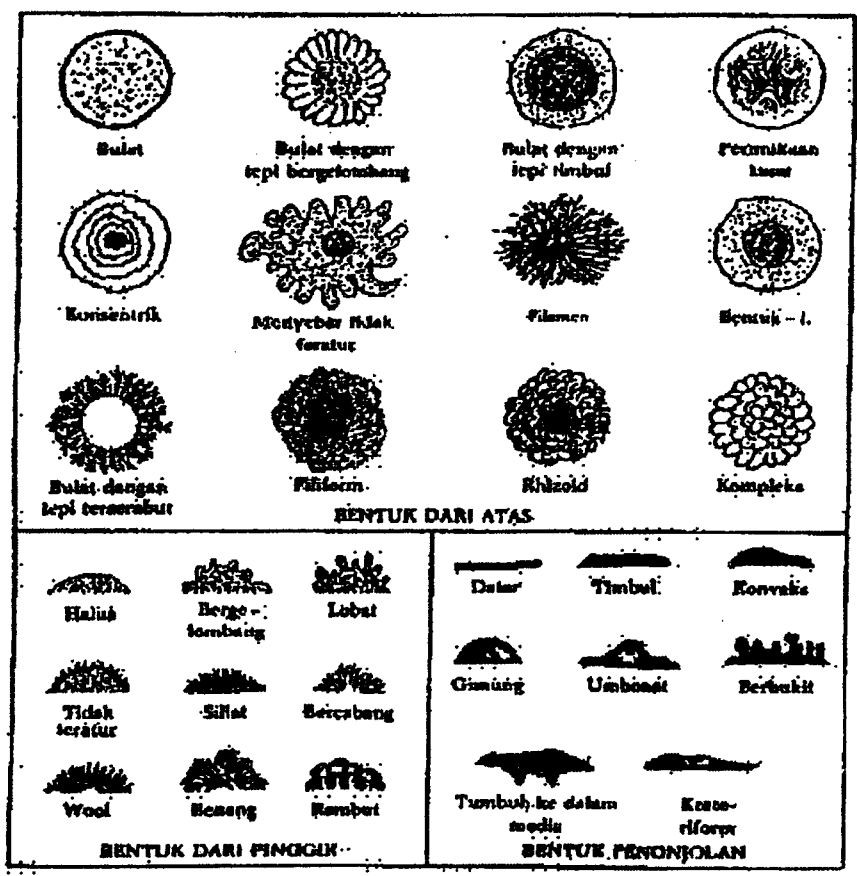
- (1) goresan langsung,
- (2) goresan kuadran, dan
- (3) goresan radian

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 menusukannya pada pinggir agar cawan.



Gambar 10. Cara menggoreskan kultur pada agar cawan

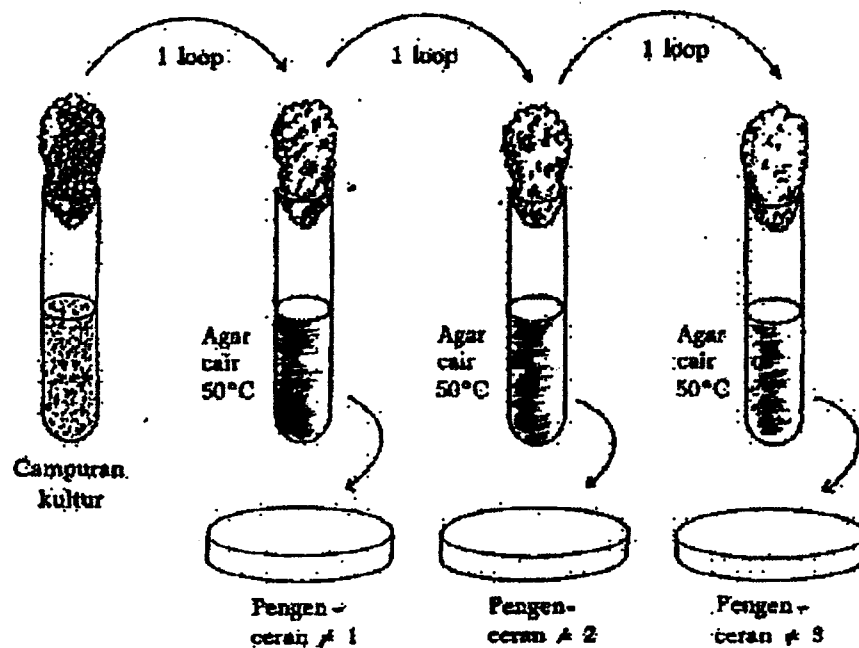
Koloni yang tumbuh pada agar cawan dapat dibedakan dalam besarnya, warna, penampaknya apakah keruh (opaque) atau bening, bentuk penyebarannya, bentuk kemunculannya diatas agar, dan bentuk permukaan. Gambar 11 menunjukkan ciri-ciri pertumbuhan koloni di atas agar.



Gambar 11. Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan

## 5. Metode Agar Tuang

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 sampa 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 12 memperlihatkan cara melakukan pengenceran dengan menggunakan metode agar tuang.



Gambar 12. Cara melakukan metode agar tuang

## 6. Bahan dan Alat

Bahan :

Contoh Setiap kelompok	Mikroba yang diisolasi	Metode (jumlah)
Air kali, susu, rempah-	Bakteri koliform	Goresan pada EMB (2)
rempah, roti, tepung	Bakteri pembentuk spora	Agar tuang PCA (3)
beras	Kapang dan khamir	Goresan pada APDA (2)

Per kelompok : 3 tabung PCA cair (@ 15 ml)  
 2 cawan agar EMB (Eosin Methylene Blue)  
 2 cawan APDA (Acidified Potato Dextrose Agar)  
 2 tabung agar miring PCA

Alat : Cawan petri steril (3 cawan/kelompok)

Jarum Ose

Gelas Penutup

Panci berisi air mendidih

Inkubator 30-32 C

## 7. 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 3-3. 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 AP-DA. Buatlah preparat basah dari masing-masing koloni tersebut, dengan meneteskan air pada gelas obyek dan mengambil kultur pada ujung loop, dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x (untuk koliform dan khamir) atau 400x (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 3-5. Inkubasikan cawan dengan posisi terbalik pada suhu 30-32 °C selama 2-3 hari.

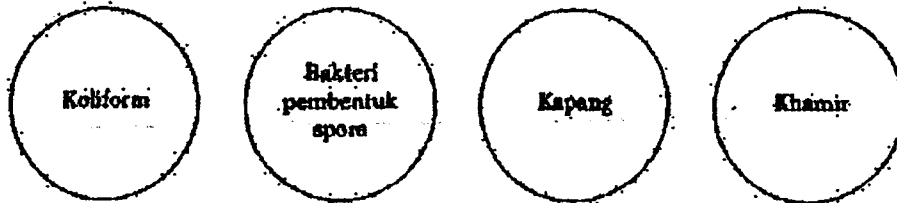
Koloni bakteri pembentuk spora dapat dibedakan dari koloni bakteri lainnya karena koloninya mempunyai permukaan yang bergelombang kasar dan tidak merata, kadang-kadang terlihat seperti kering dan mengapur. Buatlah preparat basah dari koloni pembentuk spora yang tumbuh terpisah dan diperiksa di bawah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

### **Laporan**

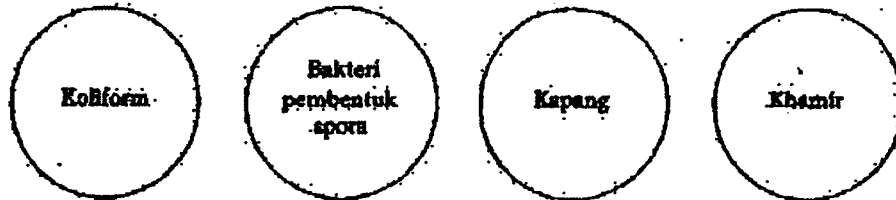
Percobaan : Kultur mikroba dan cara isolasi

) Nama :  
Nrp :  
Gol./Kelompok :

1. Gambarkan bentuk pertumbuhan koloni yang saudara isolasi (bentuk dari atas dari pinggir dan penonjolan) serta warnanya.



2. Gambarkan bentuk sel-sel mikroba yang saudara isolasi jika dilihat di bawah mikroskop.



### Pertanyaan

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

## 5. 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 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, 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 obyektif 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 (kromofor) 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.

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

A. Pewarnaan sederhana

B. Pewarnaan diferensial

1. Pewarnaan Gram

2. Pewarnaan struktural

C. Pewarnaan struktural

1. Pewarnaan Inti sel (Feulgen)

2. Pewarnaan endospora

3. Pewarnaan dinding sel

4. Pewarnaan kapsul

5. Pewarnaan flagela

D. Pewarnaan untuk menguji adanya komponen-komponen tertentu di dalam sel seperti:

1. Glikogen

2. Lipida

Di dalam buku ini hanya akan diuraikan dua cara pewarnaan yang paling mudah dan paling sering dilakukan dalam mikrobiologi pangan yaitu pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan flagela kadang-kadang juga dilakukan, terutama dalam identifikasi bakteri.

### **1. Persiapan dan fiksasi**

Sebelum dilakukan pewarnaan, maka sel-sel bakteri harus terlebih dahulu difiksasi pada gelas obyek. Jika sel-sel tidak difiksasi pada gelas obyek, 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 obyek. Untuk tujuan ini biasanya digunakan panas. Prosedur yang sering dilakukan terdiri dari penyebaran kultur mikroba pada gelas obyek 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 obyek yang bersih menggunakan loop. Tetapi jika kultur diambil dari agar padat maka sebelumnya di atas gelas obyek harus diberi setetes air, kemudian kultur diambil sedikit dengan ujung loop yang telah dipijarkan, dan diratakan di atas gelas obyek 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 obyek. 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.

## 2. 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, dimana dengan cara ini bakteri dapat dibedakan menjadi dua grup yaitu bakterik 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 pewarnaan 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 muda disebut *bakteri gram-negatif*.

### 3. Pewarnaan Endospora

Spesies bakteri yang termasuk dalam genera *Clostridium* dan *Bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut *endospora* akan terlepas menjadi *spora bebas*. Berbeda dengan sel vegetatif, maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim, 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 dan 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.

**4. Bahan dan Alat**

Bahan :

Pewarnaan gram

Kelompok	Makanan	Bakteri gram -	Bakteri gram +	Pewarnaan spora
I	Daging ayam	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>
II	Sayur asin	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>pumilus</i> <i>B. subtilis</i>
III	Sayur basi	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>B.</i>
IV	Ikan	<i>pseudomonas</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>megaterium</i> <i>B. cereus</i>

- Larutan violet kristal
- Larutan yodium gram (Lugol)
- Alkohol 95%
- Larutan safranin
- Larutan malachite green (hijau malasit)

- Alat : Gelas obyek  
Jarum Ose  
Mikroskop

**5. Cara Kerja**

(1) **Persiapan dan Fiksasi**

**Makanan/Kultur Cair.** Sebarkan satu loop makanan atau kultur cair pada gelas obyek sehingga mencapai diameter kira-kira 1-1,5 cm<sup>2</sup>. Keringkan di udara, dan difiksasi dengan nyala api kecil.

**Makanan/Kultur Padat.** Berilah setetes air pada obyek, dan ambillah sejumlah kecil pertumbuhan mikroba menggunakan ujung loop, kemudian disebar pada tetesan air di atas gelas obyek sehingga mencapai diameter kira-kira 1-1,5 cm<sup>2</sup>. 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 dapat dilihat pada lampiran 3. Teteskan pewarna *violet kristal* di atas film pada gelas obyek, dan dibiarkan selama *1 menit*. Bilas dengan air kran dengan cara memegang gelas obyek 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*. Bilaslah dengan air, dan keringkan dengan kertas serap. Periksalah di bawah mikroskop menggunakan lensa obyektif 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 gel obyek, 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*. Setelah dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dengan kertas serap.

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

**Laporan**

Percobaan : Pewarnaan mikroba

Nama :

Nrp :

Gol./Kelompok :

A. Gambarlah pewarnaan Gram dari bakteri yang saudara amati, dan laporkan sebagai berikut :

	Bakteri gram (-)	Bakteri gram (+)
Bentuk sel		
Besar sel (besar/kecil)		
Cara pengelompokan		
Pembentukan spora	Ya/tidak	Ya/tidak

B. Gambarlah pewarnaan Gram dari makanan yang saudara amati, dan laporkan sebagai berikut :

	Makanan	
Reaksi Gram/bentuk sel:		
- Gram positif, bentuk koki	±	%
- Gram positif, bentuk batang	±	%
- Gram negatif, bentuk batang	±	%
- Lain-lain (kapang/khamir)	±	%

Berikan pembahasan mengenai kemungkinan jenis-jenis mikroorganisme yang terdapat di dalam makanan tersebut!

C. Amati pewarnaan spora dari bakteri yang saudara lakukan, dan buatlah gambar serta beri keterangan mengenai :

- Bentuk sel vegetatif
- Bentuk spora
- Besar spora dibandingkan dengan sel vegetatif

- Letak spora di dalam sel
- Pembengkakan sel dengan adanya spora

**Pertanyaan**

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

## 6. METODE HITUNGAN CAWAN

Metode yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah mikroba dalam bahan pangan terdiri dari metode hitungan cawan (HC), Most Probable Number (MPN) dan metode hitungan mikroskopik langsung. Metode lainnya yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu larutan adalah metode turbidimetri (kekeruhan) menggunakan spektrofotometer. Tetapi metode ini sukar diterapkan pada bahan pangan karena membutuhkan medium yang bening, sedangkan ekstrak bahan pangan, misalnya sari buah, biasanya mengandung komponen-komponen yang menyebabkan kekeruhan, sehingga kekeruhan larutan tidak sebanding dengan jumlah mikroba yang terdapat di dalamnya.

### 1. Pengenceran

Bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba per ml, per gram, atau per cm (jika dilakukan pengamatan pada permukaan luar bahan pangan), memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah diantara 30 sampai 300 koloni. Pengenceran biasanya dilakukan dengan cara decimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000 dan seterusnya, atau 1:100, 1:10.000, 1:1000.000 dan seterusnya. pengambilan contoh dilakukan dengan cara aseptik dan pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan kira-kira sebanyak 25 kali untuk memisahkan sel-sel mikroba yang bergabung menjadi satu. Pengenceran secara decimal memudahkan dalam perhitungan jumlah koloni sedangkan pengenceran yang bukan secara decimal misalnya 1:5, 1:25 dan seterusnya jarang dilakukan karena tidak praktis dalam perhitungannya. Untuk mengetahui jumlah mikroba pada permukaan luar bahan pangan, misalnya daging sapi, ayam atau ikan, pengambilan contoh dapat dilakukan dengan menggunakan metode ulas (swab).

Larutan yang digunakan dalam pengenceran dapat berupa larutan buffer fosfat, larutan garam fisiologis 0.85%, atau larutan Ringer. Untuk bahan pangan yang sukar larut, kedalam larutan pengencer pertama dapat ditambahkan pasir putih atau butir-butir gelas (glass bead) yang disterilisasi bersama dengan larutan tersebut. Sebagai contoh jika contoh yang akan dianalisa adalah tepung atau pati, digunakan satu sendok pasir kedalam 90 atau 99 ml larutan pengencer pertama, sehingga sewaktu dikocok pemecahan partikel-partikel dari tepung dan pati akan lebih mudah. Butir-butir gelas digunakan misalnya jika kita akan menganalisis total mikroba dalam telur sehingga bagian yang bersifat koloid dari telur dapat lebih mudah dipisahkan.

## 2. Cara pemupukan

Prinsip dari metode hitungan 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 HC merupakan metode yang paling sensitif untuk menentukan jumlah mikroba karena :

- [1] hanya sel yang masih hidup yang dihitung
- [2] beberapa jenis mikroba dapat langsung dihitung
- [3] dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari sel mikroba dengan penampakan pertumbuhan yang spesifik.

Selain keuntungan-keuntungan tersebut, metode HC juga mempunyai kelemahan-kelemahan yaitu :

- [1] hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroba yang sebenarnya karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni,
- [2] medium dan kondisi yang berbeda menghasilkan hasil yang berbeda,
- [3] mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar,



[4] memerlukan persiapan dan inkubasi yang lama sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung. Metode HC dapat dibedakan menjadi dua metode yaitu metode tuang (pour plate) dan metode permukaan (surface/spread plate).

#### (1) Metode tuang (pour plate)

Dari pengenceran yang dikehendaki, sebanyak 1 ml atau 0.1 ml larutan tersebut (lihat gambar 9-1) dipipet ke dalam cawan petri menggunakan pipet 1 ml atau 1.1 ml. Sebaiknya waktu antara dimulainya pengenceran sampai menuangkan ke dalam cawan petri tidak boleh lebih dari 30 menit. Kemudian ke dalam cawan tersebut dimasukkan agar cair steril yang telah didinginkan sampai 47-50°C sebanyak 15-20 ml. Selama penuangan medium, tutup cawan tidak boleh terlalu leber untuk menghindari kontaminasi dari luar. Segera setelah penuangan cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu gerak melingkar atau menyerupai angka delapan. Setelah agar memadat, cawan-cawan tersebut dapat diinkubasikan di dalam inkubator dengan posisi terbalik.

Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu tertentu sesuai dengan jenis mikroba yang akan dihitung. Medium agar yang dapat digunakan juga disesuaikan dengan jenis mikroba yang akan ditumbuhkan. Selama inkubasi, sel-sel yang masih hidup akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat terlihat langsung oleh mata. Setelah akhir masa inkubasi, koloni yang terbentuk dihitung. Setiap koloni dapat dianggap berasal dari satu sel yang membelah menjadi banyak sel meskipun mungkin berasal dari lebih dari satu sel yang letaknya berdekatan. Perhitungan jumlah koloni dapat dilakukan dengan menggunakan "Quebec Colony Counter". Ketelitian akan lebih tinggi jika dilakukan pemupukan secara duplo, yaitu menggunakan dua cawan petri untuk setiap pengenceran. Cara ini harus dilakukan dalam suatu pekerjaan penelitian. Tetapi untuk praktikum kelas dimana biaya dan jumlah alat-alat

gelas biasanya sangat terbatas, dapat digunakan satu cawan petri untuk setiap pengenceran.

## (2) Metode Pemupukan (surface/spread palte)

Pada pemupukan dengan metode permukaan agar steril terlebih dahulu dituangkan kedalam cawan petri dan biarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna sebanyak 0.1 ml contoh yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut. Sebuah batang gelas melengkung (hockey stick) dicelupka kedalam alkohol 95% dan dipijarkan sehingga alkohol habis terbakar. Setelah dingin kemudian batang gelas tersebut digunakan untuk meratakan contoh di atas medium agar dengan cara memutarakan cawan petri di atas meja. Selanjutnya inkubasi dan perhitungan koloni dilakukan seperti pada metode penuangan. Tetapi harus diingat bahwa jumlah koloni yang ditumbuhkan adalah 0.1 ml jadi harus dimasukkan ke dalam perhitungan "total count"

## 3. Cara menghitung koloni

Perhitungan jumlah koloni akan lebih muda dan cepat jika pengenceran dilakukan dengan cara desimal. Sebagai contoh misalnya penetapan jumlah pada susu. Pengenceran awal 1:10 ( $=10^{-1}$ ) dibuat dengan cara mengencerkan 1 ml susu ke dalam 9 ml larutan pengencer dan dilanjutkan dengan pengenceran yang lebih tinggi misalnya sampai  $10^{-5}$  atau  $10^{-6}$ , tergantung pada mutu susunya. Semakin tinggi jumlah mikroba yang terdapat di dalam susu, semakin tinggi pengenceran yang harus dilakukan. Jika setelah inkubasi misalnya diperoleh 62 koloni cawan yang mengandung pengenceran  $10^{-4}$  maka jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut (1 ml larutan pengencer dianggap mempunyai berat 1 gr).

$$\begin{aligned} \text{Faktor pengenceran} &= \text{pengenceran awal} \times \text{pengenceran selanjutnya} \times \text{jumlah yang ditambahkan} \\ &= \frac{1}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{10} \times 1.0 \end{aligned}$$

$$= 10^{-4}$$

$$\begin{aligned} \text{Koloni per ml} &= \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \\ &= 62 \times \frac{1}{10^{-4}} \\ &= 62 \times 10^4 \\ &= 6,2 \times 10^5 \end{aligned}$$

Contoh lainnya misalnya dalam menentukan total count dari makanan padat. Jika 1,3 gr makanan padat, misalnya keju, diencerkan dengan 48 ml larutan pengencer, dan dibuat pengenceran selanjutnya yaitu 1 : 7, 1 : 65, kemudian 1 ml dan diencerkan lagi dengan 74 ml larutan pengencer. Dari pengenceran yang terakhir sebanyak 0.1 ml ditumbuhkan pada permukaan cawan petri yang berisi agar padat. Setelah inkubasi ternyata pada pengenceran yang tertinggi tumbuh 172 koloni.

Penetapan jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut;

$$\begin{aligned} \text{Faktor pengenceran} &= \text{pengenceran awal} \times \text{pengenceran selanjutnya} \times \text{jumlah yang ditambahkan} \\ &= \frac{1.3}{48+1.3} \times \frac{1}{7} \times \frac{1}{65} \times \frac{1}{74+3} \times \frac{1}{10} \\ &= \frac{1.3}{49.3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Koloni per ml} &= \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \\ &= 172 \times \frac{49.3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10}{1.3} \\ &= 2225895000 \\ &= 2.2 \times 10^9 \end{aligned}$$

Cara pengenceran di atas sebenarnya bukan suatu cara yang salah, tetapi dalam perhitungannya sangat tidak praktis dan memerlukan waktu yang lama. Cara yang lebih praktis adalah dengan mengencerkan contoh tersebut secara desimal sampai pengenceran  $10^{-7}$ , misalnya dengan cara pengenceran 1:10 (5 gr contoh di dalam 45

ml larutan pengenceran),  $1:10^3$ ,  $1:10^5$  dan  $1:10^7$ , kemudian 1 ml dari pengenceran terakhir ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Setelah inkubasi diharapkan dapat terbentuk koloni sebanyak kira-kira 220 pada cawan tersebut sehingga:

$$\begin{aligned}\text{Jumlah koloni per gram} &= 220 \times 1/10^{-7} \\ &= 2.2 \times 10^9\end{aligned}$$

#### 4. Standar Perhitungan

Untuk melaporkan suatu hasil analisa mikrobiologi digunakan suatu standar yang disebut "Standard Plate Count" (SPC), yang menjelaskan mengenai cara menghitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni di dalam suatu contoh.

Cara menghitung koloni adalah sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, dapat dihitung sebagai *satu koloni*
3. Suatu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai *satu koloni*.

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

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari *dua angka*, yaitu angka pertama dan kedua. Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka yang kedua.

Jumlah koloni per pengenceran			"Standard Plate Count"	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
234	28	1	2,3 x 10 <sup>4</sup>	28 dan 1 < 30
700	125	10	1,3 x 10 <sup>5</sup>	700 > 300; 10 < 30
TBUD	TBUD	197	2,0 x 10 <sup>6</sup>	TBUD > 300

TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri (<30), hanya jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			"Standard Plate Count"	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
16	1	0	< 3,0 x 10 <sup>3</sup> (1,6 x 10 <sup>3</sup> )	Hitung pengenceran 10 <sup>-2</sup>

3. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri (>300), hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung, misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada ¼ bagian cawan petri, kemudian hasilnya dikalikan 4. hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			"Standard Plate Count"	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
TBUD	TBUD	355	>3,0 x 10 <sup>6</sup> (3,6 x 10 <sup>6</sup> )	Hitung pengenceran 10 <sup>-4</sup>
TBUD	325	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 menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300 dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2 tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhatikan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2 yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

Jumlah koloni per pengenceran			"Standard Plate Count"	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
293	41	4	3,5 x 10 <sup>4</sup>	Hitung rata-ratanya karena 41000/29300 = 1,4 (<2)
140	32	2	1,4 x 10 <sup>4</sup>	Hitung pengenceran 10 <sup>-2</sup> karena 32000/14000 = 2,3

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu.

Jumlah koloni per pengenceran			"Standard Plate Count"	Keterangan
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
175	16	1	1,9 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup>
208	17	0		
138	42	2	1,5 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-3</sup> dan 10 <sup>-2</sup> adalah 2,4
162	43	4		
290	36	4	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
280	32	1		
291	25	3	3,0 x 10 <sup>4</sup>	Rata-rata dari pengenceran 10 <sup>-2</sup> meskipun 305 > 300
305	27	0		

### 5. Bahan dan Alat

**Bahan** : Setiap kelompok diberi satu macam bahan yang kira-kira mengandung mikroba sebanyak 10<sup>4</sup> - 10<sup>6</sup> sel per ml.

Kelompok	Bahan	Pengenceran	Pemupukan
I	Air kali	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-4</sup> ml
II	Air sayur asin	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> - 10 <sup>-5</sup> ml
III	Air rendaman tahu	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-4</sup> ml
IV	Air sumur	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-3</sup> ml

Tabung hasil pengenceran air kali dan air sayur asin akan digunakan juga dalam perhitungan menggunakan metode MPN (Percobaan 10).

3-4 tabung larutan pengencer @ 9 ml

100 ml PCA (Plate Count Agar) cair (suhu 47-50 C)

**Alat :** 6 cawan petri steril/kelompok

Pipet 1 ml steril

Inkubator 30-32 C

## 6. Cara kerja

Siapkan dan beri label larutan pengencer dan cawan steril sesuai dengan pengenceran dan pemupukan yang ditetapkan. Gunakan 2 cawan (duplo) untuk setiap pengenceran. Kemudian buatlah pengenceran contoh, dengan jumlah pengenceran sesuai dengan yang ditetapkan.

Pipet 1 ml contoh yang telah diencerkan masing-masing ke dalam 2 cawan petri, dimulai dari pengenceran terendah yang ditetapkan untuk pemupukan. Untuk menghemat penggunaan larutan pengencer dan pipet, contoh yang akan dimasukkan ke dalam cawan petri yang terakhir (pengenceran tertinggi) dapat diambil dengan cara memipet sebanyak 0.1 ml dari pengenceran satu desimal di bawahnya. Penghematan pipet juga dapat dilakukan dengan menggunakan pipet yang sama untuk pengenceran dan pemipetan ke dalam cawan, dengan syarat berasal dari pengenceran yang sama.

Tuangkan  $\pm$  15 ml PCA cair ke dalam cawan, dan goyangkan secara mendatar di atas meja supaya contoh menyebar rata. Setelah agar membeku, inkubasikan dengan *posisi terbalik* pada suhu 30-32 C selama 2-3 hari. Hitung jumlah koloni yang tumbuh pada cawan, dan laporkan sebagai jumlah koloni per ml menurut standar yang ditetapkan.

### Laporan

Percobaan : Metode Hitungan Cawan

Nama :

Nrp :

Gol./Kelompok :

A. Laporkan hasil pengamatan saudara dalam bentuk tabel sebagai berikut.



Tabel. Jumlah mikroba pada beberapa contoh

Bahan	Pengenceran	Koloni/cawan		Jumlah mikroba (koloni/ml)
		I	II	
Air kali	$10^{-2}$			
	$10^{-3}$			
	$10^{-4}$			
Air sayur asin	$10^{-3}$			
	$10^{-4}$			
	$10^{-5}$			
Air rendaman tahu	$10^{-2}$			
	$10^{-3}$			
	$10^{-4}$			
Air sumur	$10^{-1}$			
	$10^{-2}$			
	$10^{-3}$			

B. Berikan pembahasan mengenai hasil pengamatan tersebut.

### Soal

- Seorang mahasiswa akan menghitung jumlah mikroba di dalam suatu bubuk lada putih yang akan digunakan untuk membuat suatu produk makanan. Sebanyak 5 gr bubuk lada putih dicampurkan ke dalam 195 ml larutan pengencer steril. Setelah dikocok, 1 ml dari hasil pengenceran tersebut dimasukkan ke dalam 99 ml larutan pengencer, dan dikocok. Kemudian sebanyak 0.2 ml dari hasil pengenceran yang terakhir dipipet masing-masing ke dalam dua buah cawan petri steril. Sebanyak 15 ml PCA kemudian dituangkan ke dalam masing-masing cawan, dan setelah membeku cawan diinkubasikan pada suhu 30-32 C selama 3-4 hari. Setelah inkubasi pada masing-masing cawan tumbuh 28 dan 36 koloni. Hitunglah jumlah mikroba di dalam lada putih. Perhatikan cara perhitungannya.

2. Suatu contoh tepung ikan diketahui mengandung jumlah mikroba sebesar  $2.9 \times 10^7$  koloni/gr. Jelaskan secara skematis cara melakukan pengenceran dan pemupukan sehingga dapat diperoleh jumlah koloni di dalam cawan yang memenuhi syarat untuk dihitung dan dilaporkan sebagai SPC.

3. Laporkan "Standard Plate Count" dari contoh di bawah ini

Contoh	Pengenceran				Koloni/gr atau /ml
	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	
Kaldu daging	280	45	3	-	
	262	28	1		
Udang segar	-	TBUD	1200	340	
		TBUD	1000	325	
Cabe bubuk	1300	294	27	6	
	1250	340	35	3	
Susu bubuk	35	5	0	0	
	25	4	0	0	

## **7. METODE MPN (Most Probable Number)**

Berbeda dengan metode cawan dimana digunakan medium padat (agar), dalam metode MPN digunakan medium cair di dalam tabung reaksi, dimana perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif yaitu yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan, atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham untuk mikroba pembentuk gas. Cara melakukan metode MPN dapat dilihat pada Gambar 10-1. Pada umumnya untuk setiap pengenceran digunakan 3 atau 5 seri tabung. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak.

Dalam metode MPN, pengenceran harus dilakukan sedemikian rupa sehingga beberapa tabung yang berisi medium cair yang diinokulasikan dengan larutan hasil pengenceran tersebut mengandung satu sel mikroba, beberapa tabung mungkin mengandung lebih dari satu sel, sedangkan tabung lainnya tidak mengandung sel. Dengan demikian, setelah inkubasi diharapkan terjadi pertumbuhan pada beberapa tabung yang dinyatakan sebagai tabung positif, sedangkan tabung lainnya negatif. Untuk mendapatkan beberapa tabung negatif, pengenceran yang dilakukan dalam metode MPN harus lebih tinggi dibandingkan dengan pengenceran pada metode cawan.

Metode MPN biasanya dilakukan untuk menghitung jumlah mikroba di dalam contoh yang berbentuk cair, meskipun dapat pula digunakan untuk contoh berbentuk padat dengan terlebih dahulu membuat suspensi 1:10 dari contoh tersebut. Grup mikroba yang dapat dihitung dengan metode MPN juga bervariasi tergantung dari medium yang digunakan untuk pertumbuhan.

### **1. Cara Perhitungan MPN**

Sebagai contoh misalnya terhadap suatu bahan pangan dilakukan pengenceran secara desimal, kemudian dari masing-masing pengenceran dimasukkan 1 ml ke

dalam tabung yang berisi Nutrient Broth. Untuk setiap pengenceran digunakan tiga seri tabung. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dilihat tabung yang positif yaitu tabung yang ditumbuhi mikroba yang dapat ditandai dengan timbulnya kekeruhan. Misalnya pada pengenceran  $10^{-2}$  ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran  $10^{-3}$  dua tabung positif, pada pengenceran  $10^{-4}$  satu tabung positif, dan pada pengenceran  $10^{-5}$  tidak ada tabung yang positif. Kombinasinya menjadi 3, 2, 1, 0, dan jika diambil tiga pengenceran yang pertama kombinasinya adalah 3, 2, 1. Setelah dicocokkan dengan Tabel yang menunjukkan nilai MPN (Lampiran 5), hasilnya adalah sebagai berikut:

Kombinasi 3, 2, 1

Nilai MPN dari Tabel MPN (3 tabung) = 1,50

$$\begin{aligned} \text{"MPN Count"} &= \text{Nilai MPN} \times \frac{1}{\text{pengenceran tabung yang ditengah}} \\ &= 1,50 \times \frac{1}{10^{-3}} \\ &= 1,5 \times 10^3 \end{aligned}$$

Tabel yang digunakan untuk menentukan nilai MPN dari 3 seri tabung berbeda dengan tabel untuk 5 seri tabung. Dibawah ini diberikan beberapa contoh penentuan nilai MPN dari 3 seri tabung MPN.

Jumlah yang ditambahkan				Kombinasi MPN	Nilai MPN	"Count" per ml
10ml	1ml	0,1ml	0,01ml			
3	(3	2	1)	3 2 1	1,50	$1,5 \times 10^1$
(3	1	0	1)	3 1 1	0,75	$0,75 \times 10^1$ $7,5 \times 10^{-1}$
(0	2	0)	0	0 2 0	0,062	$0,062 \times 10^1$ $6,2 \times 10^{-1}$

Kombinasi yang dipilih dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran yang berikutnya ada tabung yang negatif. Kombinasi yang diambil terdiri dari tiga pengenceran. Jika

pada pengenceran yang keempat atau seterusnya masih ditemukan tabung yang hasilnya positif, maka jumlah tabung yang positif tersebut harus ditambahkan pada nilai kombinasi yang ketiga (terakhir) seperti pada contoh yang diberikan.

Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikroba jenis tertentu yang terdapat di antara mikroba-mikroba lainnya. Sebagai contoh, jika digunakan Lactose Broth maka adanya bakteri yang dapat memfermentasi laktosa ditunjukkan dengan terbentuknya gas di dalam tabung Durham. Cara ini biasa digunakan untuk menentukan MPN koliform terhadap air atau minuman karena bakteri koliform termasuk bakteri yang dapat memfermentasi laktosa.

## 2. Bahan dan Alat

**Bahan :** Setiap kelompok menggunakan hasil pengenceran air kali dan air sayur asin yang telah dipersiapkan pada percobaan 9

<u>Kelompok</u>	<u>Bahan</u>	<u>Pengenceran</u>	<u>Jumlah di dalam tabung MPN</u>
I	Air kali	$10^{-2}, 10^{-3}$	$10^{-2}, 10^{-3}$ ml
II	Air kali	$10^{-4}$	$10^{-4}, 10^{-5}$ ml
III	Air sayur asin	$10^{-3}, 10^{-4}$	$10^{-3}, 10^{-4}$ ml
IV	Air sayur asin	$10^{-5}$	$10^{-5}, 10^{-6}$ ml

Hasil kelompok I akan digabungkan dengan hasil kelompok II, sedangkan hasil kelompok III digabungkan dengan hasil kelompok IV.

Medium : 6 tabung Lactose Broth (+ tabung Durham) per kelompok

**Alat :** Pipet-pipet 1 ml  
Inkubator 30-32 C

## 3. Cara Kerja

Pipet contoh yang telah diencerkan sesuai dengan yang ditetapkan masing-masing ke dalam 3 tabung Lactose Broth, sehingga setiap gabungan 2 kelompok mempunyai tabung MPN 3 seri dengan 4 pengenceran. Inkubasikan semua tabung

pada suhu 30-32 C selama 2 hari, dan amati terbentuknya gas di dalam tabung Durham. Catat jumlah tabung yang positif dari masing-masing pengenceran. Dengan cara menggabungkan hasil kelompok I dengan II, dan III dengan IV, cocokkan kombinasi yang saudara pilih berdasarkan peraturan yang ditetapkan dengan Tabel MPN 3 seri (Lampiran 5). Laporkan sebagai MPN pembentuk gas per ml contoh.

**Laporan**

Percobaan : Metode MPN

Nama :

Nrp :

Gol./Kelompok :

A. Laporkan hasil pengamatan saudara dalam bentuk tabel sebagai berikut

Tabel 1. MPN beberapa contoh

Bahan	Pengenceran	Jumlah tabung (+)	Kombinasi	MPN/ml
Air kali	10 <sup>-2</sup>			
	10 <sup>-3</sup>			
	10 <sup>-4</sup>			
	10 <sup>-5</sup>			
Air sayur asin	10 <sup>-3</sup>			
	10 <sup>-4</sup>			
	10 <sup>-5</sup>			
	10 <sup>-6</sup>			

B. Berikan pembahasan mengenai hasil pengamatan tersebut.

**Pertanyaan**

1. Apakah kelebihan dan kekurangan metode MPN dibandingkan dengan metode hitungan cawan

2. Laporkan MPN dari contoh-contoh di bawah ini.

Contoh	Pengenceran				MPN/ml (3 seri)
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	
Susu	+++	+++	---	-+-	
Air teh	+++	-+-	--+	--+	
Sari buah	---	-+-	---	+++	
Santan	+++	+ - +	+++	---	
Air buangan industri	++++ +	++++-	-----+	--+--	
Air sumur		-++++-	-----+	+-----	
Air ledeng	--+++	-----+	-----	-----	
Air cendol	----- --+++	--++-	-----	-----+	

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1995. Standar Nasional Indonesia Kumpulan Standar Metode Pengujian Mutu Hasil Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan, Jakarta.
- Bucle, K.A., R.A. Edward, G.H. Fleet and M. Wooton. 1985. Ilmu Pangan (Hari Purnomo dan Adiono, Penerjemah). UI Press, Jakarta
- Jenie, B. S. L.. 1988. Sanitasi Dalam Industri Pangan. PAU IPB. Bogor.
- Komariah Tampubolon 2006. Keselamatan Kerja Di Laboratorium Biologis. Departemen Teknologi Hasil Perairan. FPIK, Bogor.
- Kusumaningrum, Harsi dan Nurwitri Anjaya 1999. Praktikum Sanitasi. Di dalam Kumpulan Materi Pelatihan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Pangan Bagi Staf Pengajar. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi DEPDIKBUD, Jakarta
- Pelczar, J.M., E.C.S. Chan and M.F. Pelczar. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi (Ratna, S.H, Teja Imas, Sutarmi, T. dan Sri Lestari, A., Penerjemah). UI-Press, Jakarta
- Srikandi, Fardiaz. 1983. Keamanan Pangan, Jilid I, Bakteriologi Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan. IPB, Bogor.
- Srikandi, Fardiaz. 1987. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Lembaga Sumberdaya Informasi IPB, Bogor.
- Srikandi, Fardiaz. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.



## Lampiran 1.

## KOMPOSISI MEDIUM

APT Agar	Ekstrak khamir	7.5 g
	Tripton	12.5 g
	Glukosa	10 g
	Natrium sitrat	5 g
	NaCl	5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
	Mangan klorida	0.14 g
	Magnesium sulfat	0.8 g
	Ferrous sulfat	0.04 g
	Kompleks sorbitan monooleat	0.2 g
	Air	1 liter
	pH sebelum sterilisasi	7.0-7.2
	Azide Dextrose Agar	Ekstrak sapi
Triptosa		10 g
Glukosa		7.5 g
NaCl		7.5 g
Na-azide		0.2 g
Agar		15 g
Air		1 liter
Blood Agar	Infusi jantung sapi	500 g
	Triptosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
	pH	7.0-7.2
	Setelah sterilisasi dan didinginkan sampai 45-50°C tambahkan 5% defibrinated blood steril.	
Brain Heart Infusion Broth	Infusi otak sapi	200 g
	Infusi jantung sapi	250 g
	Pepton	10 g
	Dekstroza	2 g
	NaCl	5 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
	Air	1 liter

	pH	7.4
<b>Brilliant Green Agar</b>	Pepton	10 g
	Ekstrak khamir	3 g
	Laktosa	10 g
	Sukrosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	20 g
	Hijau brilliant	0.0125 g
	Merah fenol	0.08 g
	Air	1 liter
<b>Brilliant Green Lactose Bile Broth (2%)</b>	Pepton	0 g
	Laktosa	10 g
	Oxgall	20 g
	Hijau brilliant	0.0133 g
<b>Dextrose Tryptone Bromcresol Purple Agar (Broth)</b>	Tripton	2.5 g
	Glukosa	5 g
	Agar	15 g
	Bromcresol purple (ungu bromcresol)	0.04 g
	Air	1 liter
	pH	6.7
	Untuk broth, hilangkan agar	
<b>Eosin Methylene Blue (EMB) Agar</b>	Pepton	10 g
	Laktosa	5 g
	Sukrosa	5 g
	K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	2 g
	Agar	13.5 g
	Eosin-Y	0.4 g
	Methylene Blue	0.065 g
	Air	1 liter
<b>Glucose Yeast Water . Yeast Water (double strength)</b>	Glukosa	5 g
	Single Strength Yeast Water	1 liter
	Starch free yeast	200 g
	Air	1 liter
	Dididihkan selama 3 jam dan diotoklaf.	
	Untuk single strength, encerkan dua	

	kali.	
<b>Koser Citrate Medium</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
	Magnesium sulfat	0.2 g
	Na-amonium fosfat	1.5 g
	Na-sitrat	3 g
	Air	1 liter
	pH	6.8 g
<b>Lactose Broth</b>	Ekstrak sapi	3 g
	Pepton	5 g
	Laktosa	5 g
	Air	1 liter
	pH	6.7
<b>Litmus Milk</b>	Skim milk	100 g
	Litmus	0.75 g
	Air	1 liter
<b>MacConkey Agar</b>	Pepton	17 g
	Proteose Pepton	3 g
	Laktosa	10 g
	Bile Salts No.3	1.5 g
	NaCl	5 g
	Agar	13.5 g
	Neutral Red	0.03 g
	Kristal violet	0.001 g
	Air	1 liter
<b>Malt Agar</b>	Ekstrak malt	30 g
	Glukosa	16 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
	Caikan dan asam dengan larutan asam laktat sampai pH 3.5	
<b>Nutrient Broth (Agar)</b>	Ekstrak sapi	3 g
	Pepton	5 g
	Air	1 liter

NA + 1% fat Plate Count Agar	Agar	15 g
	Margarin	10 g (+neutral red )
	Tripton	5 g
	Ekstrak khamir	2.5 g
	Glukosa	1 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
Potato Dextrose Agar, Acidified	Potato infusio	200 ml
	Glukosa	5 g
	Agar	5 g
	Air	800 ml
	Diatur pHnya menjadi pH 3,5-4,0 dengan larutan 10% asam tartarat	
Proteose Broth (Medium MR-VP)	Polipepton	7 g
	Glukosa	5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
	Air	1 liter
	pH	6.9
Salmonella-Shigella (S-S) Agar	Ekstrak sapi	5 g
	Proteose Pepton	5 g
	Laktosa	10 g
	Bile Salts No.3	8.5 g
	Na-sitrat	8.5 g
	Na-thiosulfat	8.5 g
	Ferric sitrat	1 g
	Agar	13.5 g
	Brilliant Green	0.00033 g
	Neutral Red	0.025 g
Air	1 liter	
Selenite Cystine Broth	Tripton	5 g
	Laktosa	4 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g
	Na-acid selenite	4 g
	L-cystine	0.01 g
	Air	1 liter
	pH	7.0

<b>Skim Milk Agar</b>	<b>Plate Count Agar + 2% skim milk (20 g skim milk dalam 1 liter PCA)</b>	
<b>Staphylococcus Medium 110</b>	Ekstrak khamir	2.5 g
	Tripton	10 g
	Gelatin	30 g
	Laktosa	2 g
	Mannitol	10 g
	NaCl	75 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
<b>Starch Agar</b>	Tripton	10 g
	Ekstrak khamir	10 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
	Soluble starch	3 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
<b>Sugar Broth</b>	Nutrient broth	1 liter
	Gula : Glukosa/Sukrosa/Laktosa	5 g
	Brom cresol Purple	0.04 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
<b>Triple Sugar Iron (TSI) Agar</b>	Polipepton	20 g
	Laktosa	10 g
	Sukrosa	10 g
	Glukosa	10 g
	NaCl	5 g
	Ferrous amonium sulfat	0.2 g
	Na-thiosulfat	0.2 g
	Phenol Red	0.025 g
	Agar	12 g
	Air	1 liter
	pH	7.4
<b>Trypticase Soy Agar/Broth</b>	Trypticase (tryptone)	17 g
	Phyton (soytone)	3 g
	Glukosa	2.5g
	Agar	12 g
	Air	1 liter
	Untuk Broth, hilangkan agar dan	

tambahkan 2.5 g  $K_2HPO_4$  perliter

<b>Thioglycolate Medium</b>	Infusi daging sapi	500 g
	Pepton	10 g
	Dekstrosa	5 g
	$K_2HPO_4$	2 g
	NaCl	5 g
	Na-thioglycolate	0.5 g
	Agar	0.5 g
	Biru metilen	0.002 g
	Air	1 liter
<b>Sulfite Agar</b>	Tripton	10 g
	Na-sulfit ( $Na_2SO_3$ )	1 g
	Ferriesitrat	0.59 g
	Agar	20 g
	Air	1 liter
<b>Violet Red Bile Agar</b>	Ekstrak khamir	3 g
	Pepton	7 g
	Garam bile No.3	1.5 g
	Laktosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	Merah netral (neutral red)	0.03 g
	Violet kristal (crystal violet)	0.002 g
<b>Vogel-Johnson Agar</b>	Tripton	10 g
	Ekstrak khamir	5 g
	Mannitol	10 g
	$K_2HPO_4$	5 g
	LiCl	5 g
	Glisin	10 g
	Agar	15 g
	Merah fenol (phenol red)	0.025 g
	Air	1 liter

**Lampiran 2.**

**Komposisi Larutan Pengencer**

<b>Larutan Bufer Fosfat</b>	:		
<b>Larutan stok</b>	:	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34 g
		Air	500 ml
		Atur pH nya sampai pH 7,2	
		Tambahkan air sampai 1 liter	
<b>Larutan Pengencer</b>	:	Larutan stok	1,25 ml
		Tambahkan air sampai 12 liter	
<b>Larutan garam fisiologis</b>	:	NaCl	8,5 gr
		Air	1 liter
<b>Larutan Pengencer + pasir</b>	:	Tambahkan 10 g pasir quartz ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi	
<b>Larutan pengencer + butir gelas</b>	:	Tambahkan satu sendok teh butir gelas ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi	

**Lampiran 3.**

**Komposisi Larutan Pewarna**

Alfa-naftol	5 % alfa-naftol di dalam 95 % etil alkohol	
Larutan pewarna Gram		
- Larutan amonium oksalat kristal violet	Kristal violet (90 %)	2 g
Larutan A	Etanol 95 %	20 ml
Larutan B	Amonium oksalat	0,8 g
Campurkan larutan A dan B	Air	80 ml
- Larutan Gram Iodine	Iodine (yodium)	
	KJ	1 g
	Air	2 g
		300 ml
- Larutan Safaranin (counterstain)	Safaranin 0 (2,5 % di dalam etanol 95%)	10 ml
	Air	100 ml
Pereaksi Kovacs	p-Dimetilaminobenzaldehida	
	Amil Alkohol	5 g
	HCl pekat	75 ml
		25 g
Malachite Green	Larutan 5 % malachite green oksalat di dalam air	
Methylene Blue (untuk uji MBRT)	Air sebanyak 202 ml direbus hingga mendidih. Kemudian ditambahkan 1 tablet methylene blue thiocyanat. Perebusan dilakukan di dalam wadah tertutup	
Methylene Blue (berwarna)	Kristal Biru metilen	1 g
	Air	100 ml
Larutan Methyl Red	0,1% methyl red (bubuk) dan 300 ml etanol 95 % dilarutkan di dalam air sampai 500 ml	