



---

# Penyiapan Media Mikroorganisme

---

**Delatihan  
Laboratorium  
Guru SMA  
Kab. Purworejo**

---

18 Februari 2012

---

Disusun oleh  
Anna Rakhmawati  
Email: [anna\\_rakhmawati@uny.ac.id](mailto:anna_rakhmawati@uny.ac.id)

Jurusan Pendidikan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Yogyakarta  
2012

Obyek yang digunakan di laboratorium Biologi sangat bervariasi. Makalah ini akan membahas persiapan obyek Biologi yaitu mikroorganisme. Mikroorganisme seperti organisme yang lain memerlukan nutrisi untuk kelangsungan hidupnya. Oleh karena itu, diperlukan media (jamak, medium) untuk kultivasi mikroorganisme. Medium adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrisi untuk menumbuhkan mikroorganisme. Selain untuk menumbuhkan mikroorganisme, medium dapat digunakan untuk isolasi, pengujian sifat-sifat fisiologi, dan perhitungan jumlah mikroorganisme.

Persyaratan yang harus dipenuhi dalam persiapan medium supaya mikroorganisme dapat tumbuh baik adalah:

1. Mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroba
2. Mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai
3. Tidak mengandung zat-zat penghambat
4. Steril

Ketepatan komposisi medium tergantung pada kebutuhan species yang akan dikultivasi karena kebutuhan nutrisi sangat bervariasi. Pengetahuan tentang habitat normal mikroorganisme sering berguna untuk menentukan medium yang cocok karena kebutuhan tergantung lingkungan alaminya. Meskipun persyaratan medium untuk menumbuhkan mikroorganisme sangat beragam, namun sebagai organisme hidup mempunyai kebutuhan dasar yang sama yaitu memerlukan sumber karbon, energi, air, nitrogen, fosfat, dan mineral.

Medium yang digunakan dalam Mikrobiologi sangat beraneka macam. Medium dapat dibuat secara alami maupun membeli sudah dalam bentuk kemasan jadi. Pembuatan medium menggunakan bahan-bahan alami selain lebih murah juga dapat untuk mengantisipasi jika tidak ada stok dari pabrik. Gambar 1 menunjukkan berbagai medium dalam kemasan dari pabrik (misalnya Oxoid, Difco, dll). Medium dapat dibedakan berdasarkan komposisi kimia, konsistensi, dan fungsinya.

Berdasarkan komposisi kimiawi komponen penyusun medium, maka medium dibedakan menjadi 2 kategori yaitu medium kompleks (*complex*) dan sintetik (*defined*). Medium kompleks tersusun atas bahan-bahan dengan macam dan komposisi tidak semua diketahui dengan pasti. Contoh medium

kompleks adalah Nutrien Agar (NA) yang mengandung beef extract dan pepton. Medium sintetik tersusun atas bahan-bahan kimia murni dengan macam dan komposisinya diketahui dengan pasti. Misalnya medium untuk menumbuhkan *Escherichia coli* mengandung komponen-komponen sebagai berikut (gr/l): glukosa (1,0);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (16,4);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2);  $\text{CaCl}_2$  (0,01); dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,0005).



Gambar 1. Medium dalam kemasan

Medium dapat dibedakan menjadi 3 berdasarkan konsistensinya yaitu medium cair, semipadat, dan padat. Medium cair (*liquid, broth*) hanya mengandung nutrien-nutrien yang dilarutkan dalam aquades (Gambar 2). Contoh medium cair adalah Nutrient Broth (NB), glukosa broth, dan lain-lain. Medium ini dapat digunakan untuk perbanyak (propagasi) mikroorganisme dalam jumlah besar, uji fermentasi, dan berbagai uji lain. Gambar 3 menampilkan media cair dalam erlenmeyer yang digunakan untuk perbanyak mikroorganisme. Gambar 4 memperlihatkan medium cair yang digunakan untuk uji fermentasi gula.



Gambar 2. Medium Nutrien Broth dalam tabung reaksi



Gambar 3. Medium nutrien broth dalam erlenmeyer



Gambar 4. Medium uji fermentasi gula

Medium padat (solid) mengandung nutrien-nutrien yang dilarutkan dalam aquades ditambah bahan pematat (*solidifying agent*) yaitu agar. Kriteria bahan pematat yang baik yaitu tidak digunakan oleh mikroorganisme, tidak menghambat pertumbuhan mikroorganisme, dan tidak mencair pada temperatur kamar. Medium padat sering digunakan untuk isolasi mikroorganisme, uji aktivitas biokimiawi, perhitungan jumlah mikroorganisme, dan lain-lain. Gambar 5 memperlihatkan isolasi metode *streak plate* pada medium *Nutrien Agar* (NA) dalam petridish. Gambar 6 menunjukkan uji aktivitas amilolitik mikroorganisme menggunakan medium *Starch Agar* (SA). Zona jernih di sekitar koloni setelah ditetesi iod menunjukkan hasil positif.

Medium semipadat (*semisolid*) sama dengan medium padat tetapi konsentrasi bahan pematat (agar atau gelatin) lebih sedikit sehingga konsistensinya seperti jeli. Medium semisolid terutama digunakan untuk eksperimen motilitas mikroorganisme ataupun hidrolisis gelatin.



Gambar 5. Isolasi mikroorganisme pada medium Nutrien Agar



Gambar 6. Uji aktivitas amilolitik pada medium Starch Agar

Medium menurut kegunaannya dibedakan menjadi 3 yaitu media selektif, diferensial, dan pengayaan. Medium selektif merupakan medium yang ditambah zat kimia tertentu bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme lain sehingga hanya mikroorganisme tertentu yang dapat tumbuh contohnya medium MacConkey Agar untuk mendeteksi *E. coli*. Medium diferensial merupakan medium yang dapat digunakan untuk membedakan jenis mikroorganisme yang satu dengan yang lain ditandai dengan adanya suatu reaksi atau ciri khas misalnya Blood Agar. Medium diperkaya (*enrichment medium*) merupakan medium yang ditambah zat-zat tertentu (serum, darah,

ekstrak tumbuh-tumbuhan, dll) sehingga dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu.

Tahap-tahap pembuatan medium dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Pencampuran bahan-bahan

Medium biasanya dibuat dengan melarutkan semua bahan dalam akuades, diurutkan dengan resep, dan dipanaskan sampai semua bahan larut. Apabila selama melarutkan bahan-bahan tersebut volume akuadesnya berkurang maka sebelum disterilakan harus ditambahkan akuades sesuai resep. selama pencampuran dan pemanasan medium dilakukan pengadukan dan dijaga jangan sampai meluap. Gambar 7 sampai 9 memperlihatkan beberapa tahap pembuatan medium sebelum sterilisasi.



Gambar 7. Penimbangan



Gambar 8. Pemanasan



Gambar 9. Media larut sempurna

2. Penyaringan medium

Beberapa jenis medium kadang perlu disaring menggunakan kertas saring atau kain tipis

3. Pengaturan pH

Medium kadangkala memerlukan nilai pH tertentu sehingga perlu dilakukan pengaturan pH. Pengaturan pH dapat dilakukan dengan penambahan larutan NaOH atau HCl. Penambahan HCl dilakukan apabila

nilai pH terlalu tinggi, untuk perbedaan pH besar digunakan 1 N HCl sedangkan kalau perbedaan pH kecil digunakan 0,1 N HCl. Prosedur sama dilakukan apabila pH terlalu rendah hanya saja larutan yang digunakan adalah NaOH. Pengaturan pH dapat dilakukan sebelum sterilisasi.

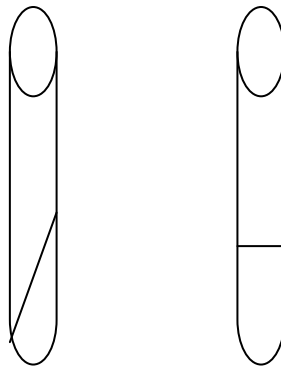
#### 4. Penambahan antibiotik

Antibiotik kadang diperlukan untuk mencegah pertumbuhan jenis mikroorganisme lain yang tidak dikehendaki. Misalnya penambahan chloramfenicol untuk mencegah pertumbuhan bakteri ketika kita ingin menumbuhkan fungi. Penambahan antibiotik dapat dilakukan sebelum atau sesudah sterilisasi tergantung jenis antibiotiknya tahan panas atau tidak.

#### 5. Pemasukan medium dalam tempat (wadah) tertentu

Tahap ini perlu dilakukan sebelum sterilisasi. Wadah yang dapat digunakan misalnya tabung reaksi atau erlenmeyer. Wadah tersebut harus bersih, bebas debu, dan tidak terkontaminasi. Tabung reaksi digunakan misalnya untuk pembuatan agar miring dan agar tegak, sedangkan erlenmeyer digunakan untuk medium yang akan dituang dalam petridish. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $\pm$  5-6 ml (agar miring) atau  $\pm$ 7-8 ml (agar tegak), tergantung tabung reaksi yang digunakan. Gambar 10 memperlihatkan berbagai tampilan media padat dalam tabung reaksi. Medium yang akan disterilkan dalam erlenmeyer tidak boleh lebih dari 2/3 volume erlenmeyer untuk menghindari menyemburnya media ke tutup. Hal ini dapat terjadi karena prinsip sterilisasi menggunakan uap panas bertekanan. Tabung reaksi dan erlenmeyer selanjutnya disumbat dengan kapas atau penutup tahan panas lain. Sumbat ini harus dapat menutup wadah dengan kuat dan rapat tetapi masih dapat dibuka dengan menjepitnya memakai jari kelingking. Pembuatan medium agar tegak dilakukan dengan memosisikan tabung secara tegak secepatnya setelah sterilisasi. Sedangkan pembuatan medium agar miring dengan meletakkan tabung miring dengan kemiringan tertentu dan dibiarkan sampai medium memadat. Kemiringan medium dapat kita atur sesuai tujuan misalnya untuk penyimpanan (*stock culture*)

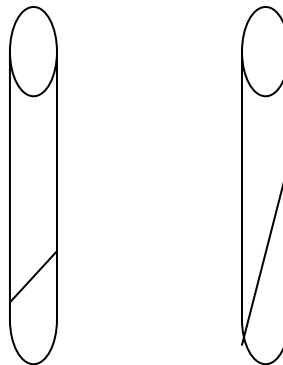
atau pembuatan suspensi (Gambar 11). Medium dalam erlenmeyer setelah disterilisasi dapat dituang sebanyak  $\pm 15$  ml tiap petridish. Proses penuangan medium ke dalam petridish dilakukan secara aseptik (Gambar 12). Medium steril dalam erlenmeyer dapat dituang ke dalam petridish steril apabila suhu medium  $\pm 60$  °C (tidak terlalu panas tetapi masih cair) untuk menghindari terjadinya penjendalan dan uap air dalam petridish. Medium apabila telah memadat maka harus dicairkan kembali dalam penangas air dan jangan memanaskan langsung di atas api.



a. Agar miring

b. Agar tegak

Gambar 10. Berbagai tampilan medium padat



a. *Stock culture*

b. Pembuatan suspensi

Gambar 11. Posisi agar miring dalam tabung reaksi





Gambar 12. Proses penuangan medium ke petridish

#### 6. Sterilisasi medium

Sterilisasi medium dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung macamnya medium. Salah satu cara yang paling sering digunakan adalah menggunakan otoklaf. Prinsip kerja otoklaf adalah uap panas bertekanan (tekanan 1 atm; suhu 121°C selama 15 menit) Cara lain yaitu dengan pasteurisasi untuk medium yang mengandung bahan-bahan yang tidak tahan panas tinggi. Pengecekan apakah medium yang disterilisasi tidak terkontaminasi maka medium didiamkan semalam sebelum digunakan. Medium yang telah terkontaminasi tidak boleh disteril 2 x karena akan merusak medium tersebut.

#### 7. Penyimpanan medium

Medium yang sudah dibuat dan sudah steril mungkin tidak langsung digunakan sehingga sebaiknya disimpan di refrigerator (lemari es). Medium apabila disimpan dalam suhu kamar untuk periode lama maka cenderung kehilangan kelembaban (dehidrasi) dan lebih mudah terkontaminasi.

## PROSEDUR PEMBUATAN MEDIA ALAMI

### A. Media taoge cair

1. Bahan:

Taoge ..... 100 g  
Sukrosa (gula pasir) ..... 60 g  
Akuades ..... 1.000 ml

2. Cara pembuatan:

- a. Taoge direbus dengan akuades sampai mendidih (1-2 jam).
- b. Disaring kemudian ditambahkan sukrosa kemudian didihkan lagi sampai semua sukrosa larut
- c. Ditambahkan aquades yang hilang karena penguapan sampai volume 1.000 ml
- d. Dimasukkan tabung.
- e. Sterilisasi dengan otoklaf (121 °C; 15 menit) atau panci presto (mendidih; 20 menit)

### B. Media taoge agar

Susunan dan cara membuatnya sama seperti media taoge cair dengan ditambah agar-agar 1,5 – 2 %. Agar-agar yang digunakan dapat berupa tepung agar (swallow globe). Penambahan dilakukan bersama dengan sukrosa.

### C. Media wortel agar

1. Bahan:

Wortel ..... 100 g  
CaSO<sub>4</sub> ..... 2 g  
Agar-agar ..... 4 g  
Akuades ..... 200 ml

2. Cara pembuatan:

- a. Wortel digiling/diparut sampai hancur,
- b. Ditambahkan akuades sebanyak 200 ml dan didihkan selama 10 menit.
- c. Ditambahkan akuades yang hilang selama pemanasan
- d. Disaring dengan kain dan ditambahkan CaSO<sub>4</sub> dan agar-agar.

- e. Didihkan lagi sampai semua larut kemudian dimasukkan tabung atau erlenmeyer
- f. Sterilisasi dengan otoklaf (121 °C; 15 menit) atau panci presto (mendidih; 20 menit)

#### **D. Media dari bahan penyedap rasa**

##### 1. Bahan:

Gula pasir .....	3 g
MSG .....	1 g
Agar-agar .....	1,5 g
Akuades .....	100 ml

##### 2. Cara pembuatan

- a. Panaskan semua bahan sampai larut kemudian masukkan ke dalam wadah (tabung/erlenmeyer)
- b. Sterilisasi dengan otoklaf (121 °C; 15 menit) atau panci presto (mendidih; 20 menit)

#### **E. Potato Dekstrosa Agar (PDA)**

##### 1. Bahan:

Kentang .....	200 g
Dekstrosa .....	10 g
Agar-agar .....	15 g
Akuades .....	1.000 ml

##### 2. Cara pembuatan

Kupas kentang dan cuci bersih, kemudian potong-potong menjadi kotak-kotak kecil (2x2 cm). Rebus potongan kentang tersebut dalam 500ml aquades selama 1,5-2 jam. Saring campuran dengan kain tipis berlapis kapas sehingga diperoleh cairan ekstrak kentang yang bening. Tambahkan dekstrosa dan agar, panaskan, dan aduk hingga homogen. Tambahkan aquades hingga diperoleh volume akhir 1.000 ml. Sterilisasi dengan otoklaf (121 °C; 15 menit) atau panci presto (mendidih; 20 menit)

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2005. *Media of microorganism*. [http://www. biology.clc.uc.edu](http://www.biology.clc.uc.edu) 3 Maret 2005, 15.00 WIB
- Atlas, R.M., A.E. Brown, K.W. Debra, and L. Miller. 1984. *Experimental Microbiology: fundamental and applications*. Macmillan publishing company, New York
- Benson, H.J. 1998. *Microbiological applications: laboratory manual in general Microbiology*, 7th edition, WCB McGraw-Hill, Boston USA
- Cappucino, J.E and N. Sherman. 1987. *Microbiology, a Laboratory Manual*. The Benjamin Cummings Publishing company, Inc, California, USA
- Claus, G.W. 1989. *Understanding microbes, a laboratory textbook for Microbiology*, W.H. Freeman and Company, USA
- Hudson, B.K. and L. Sherwood. 1997. *Explorations in Microbiology, a discovery-based approach*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA

