

# **MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN**

**Disusun Oleh:**

**Dr. Ir. Lindayani, MP.**

**Dra. Laksmi Hartayanie, MP.**

Sherly Putri

Rehuel Safira S

Maria Jessica A

Livia Novenia D

Webiana Lowisia

Ruth Jeane S

Nike Chandrawibowo

Ira Yuliani P



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA  
SEMARANG**

**2016**

## **TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN**

1. Praktikan wajib datang 15 menit sebelum praktikum dimulai.
2. **Praktikan wajib mengenakan jas laboratorium dan membawa segala keperluan praktikum untuk / selama praktikum.**
3. Praktikan wajib telah memahami benar prosedur kerja yang akan dilaksanakan pada waktu praktikum.
4. Praktikan tidak makan, minum atau merokok selama praktikum di dalam laboratorium.
5. Praktikan tidak dibenarkan keluar dari laboratorium tanpa sepengetahuan dan seizin asisten. Dalam hal ini praktikan tidak boleh keluar laboratorium secara rombongan (maksimal 2 orang).
6. Praktikan bertanggung jawab penuh atas kebersihan, keutuhan dan keamanan barang-barang inventaris laboratorium.
7. Praktikan bertanggung jawab penuh atas keselamatan diri sendiri, dan orang lain yang ada di dalam laboratorium.
8. Praktikan bertanggung jawab penuh atas keamanan barang-barang berharga milik pribadi (handphone, uang, dll.).
9. **Toleransi keterlambatan praktikum hanya 15 menit dengan konsekuensi tidak diperbolehkan mengikuti kuis dengan materi pada hari itu.**
10. **Keterlambatan lebih dari 15 menit, tidak diperbolehkan membuat laporan praktikum, dan mendapat nilai 0 untuk materi hari itu.**
11. Praktikan yang tidak mengikuti praktikum dengan alasan yang tidak jelas, konsekuensinya sama dengan no. 10.
12. Jika praktikan tidak dapat mengikuti praktikum, dengan alasan yang benar-benar mendesak, dapat diterima dan masuk akal, maka praktikan wajib memberitahu asisten dosen, minimal 1 hari sebelumnya.

Peraturan-peraturan lain yang belum tercantum akan disampaikan secara lisan oleh asisten pada saat pelaksanaan praktikum.

## KETERANGAN PRAKTIKUM

### Penilaian Praktikum :

1. Kuis 15%
2. Laporan 35 %
3. Responsi 50 %
  - Teori 20%
  - Praktek 30%

### Penilaian Laporan Resmi :

1. Tujuan -
2. Tinjauan Pustaka 15
3. Materi dan Metode 10
4. Hasil Pengamatan 15
5. Pembahasan 40
6. Kesimpulan 10
7. Daftar Pustaka 10
8. Lampiran -

### PERATURAN LAPORAN RESMI

- Laporan individu dikumpulkan **1 minggu** setelah ACC laporan sementara.
- Keterlambatan pengumpulan dari jadwal yang sudah disepakati akan mendapatkan sanksi pengurangan nilai **25% nilai akhir** laporan *setiap harinya* (pergantian hari terhitung setiap jam 15.00 sore).
- Dilarang melakukan **PLAGIASI** dalam bentuk apapun, pelanggaran akan mendapatkan sanksi pengurangan nilai seperti yang sudah **disampaikan** oleh asisten secara **lisan** pada saat asistensi.
- Format laporan sesuai dengan panduan yang telah diberikan.
- Peraturan-peraturan lain yang belum tercantum akan **disampaikan** secara **lisan** oleh asisten praktikum pada saat pelaksanaan praktikum.

## DAFTAR ISI

BAB 1. Mikroskop dan Pewarnaan	
Ira Yuliani P.....	1
BAB 2. Media dan Sterilisasi	
Ruth Jeane S.....	11
BAB 3. Fermentasi	
Maria Jessica A.....	20
BAB 4. Pengaruh O <sub>2</sub>	
Rehuel Safira S.....	25
BAB 5. Enumerasi	
Sherly Putri & Nike Chandrawibowo.....	31
BAB 6. Isolasi	
Livia Novenia & Webiana Lowisia.....	44

## JADWAL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN 2016

<p><b>Senin 14/3</b></p>	<p><b>Selasa 15/3</b></p> <p>Media &amp; Sterilisasi A Fermentasi A</p> <p><b>*Kuis:</b> Fermentasi A + Media &amp; Sterilisasi A</p>      <p>Ruth, Jeje, Livia, Ir</p>	<p><b>Rabu 16/3</b></p> <p>Isolasi A Mikroskop &amp; Pewarnaan A Enumerasi A</p> <p><b>*Kuis:</b> Mikroskop &amp; Pewarnaan A</p>      <p>Webi, Livi, Ir, Sher, Nike</p>	<p><b>Kamis 17/3</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi A</p> <p>Isolasi A Pengaruh O<sub>2</sub> A</p> <p><b>*Kuis:</b> Isolasi A</p>      <p>Livi, Webi, Ra</p>	<p><b>Jumat 18/3</b></p> <p>Pengamatan: Enumerasi A</p> <p>Media &amp; Sterilisasi B Fermentasi B</p> <p><b>*Kuis:</b> Enumerasi A, Media &amp; Sterilisasi B + Fermentasi B</p>      <p><b>Sher, Nike, Ruth, Jeje</b></p>	<p><b>Sabtu 19/3</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi A, Fermentasi A, Pengaruh O<sub>2</sub> A</p> <p>Isolasi B Pengaruh O<sub>2</sub> B</p> <p><b>*Kuis:</b> Pengaruh O<sub>2</sub> A, Pengaruh O<sub>2</sub> B</p>      <p>Livia, Webi, Ra, <b>Jeje</b></p>
<p><b>Senin 21/3</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi B, Pengaruh O<sub>2</sub> B</p> <p>Isolasi B Enumerasi B</p> <p><b>*Kuis:</b> Isolasi B</p>      <p>Webi, <b>Ra</b>, Sher, Nike, Ir</p>	<p><b>Selasa 22/3</b></p> <p>Pengamatan: Fermentasi B</p> <p>Mikroskop &amp; Pewarnaan B</p> <p><b>*Kuis:</b> Mikroskop &amp; Pewarnaan B</p>      <p>Jeje, Ir</p>	<p><b>Rabu 23/3</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi B, Enumerasi B</p> <p><b>*Kuis:</b> Enumerasi B</p>      <p><b>Livi, Sher</b></p>	<p><b>Kamis 24/3</b></p> <p style="text-align: center;">LIBUR</p>	<p><b>Jumat 25/3</b></p> <p style="text-align: center;">LIBUR</p>	<p><b>Sabtu 26/3</b></p> <p style="text-align: center;">LIBUR</p>

<p><b>Senin 28/3</b></p> <p>Media &amp; Sterilisasi C Fermentasi C Isolasi C</p> <p><b>*Kuis:</b> Fermentasi C+ Media &amp; Sterilisasi C</p> <p>Ruth, Jeje, Webi</p>	<p><b>Selasa 29/3</b></p> <p>Enumerasi C Pengaruh O<sub>2</sub> C</p> <p><b>*Kuis:</b> Pengaruh O<sub>2</sub> C</p> <p>Sher, Nike, Ra, Ruth</p>	<p><b>Rabu 30/3</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi C</p> <p>Isolasi C Mikroskop &amp; Pewarnaan C</p> <p><b>*Kuis:</b> Mikroskop &amp; Pewarnaan C</p> <p>Livi, Ir, Jeje</p>	<p><b>Kamis 31/3</b></p> <p>Pengamatan: Enumerasi C, Pengaruh O<sub>2</sub> C</p> <p>Media &amp; Sterilisasi D Isolasi D Pengaruh O<sub>2</sub> D</p> <p><b>*Kuis:</b> Enumerasi C, Media &amp; Sterilisasi D + Pengaruh O<sub>2</sub> D</p> <p><b>Nike, Ra, Ruth, Webi</b></p>	<p><b>Jumat 1/4</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi C, Fermentasi C</p> <p>Mikroskop &amp; Pewarnaan D Fermentasi D</p> <p><b>*Kuis:</b> Isolasi C, Mikroskop &amp; Pewarnaan D</p> <p><b>Livia, Jeje, Ir</b></p>	<p><b>Sabtu 2/4</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi D, Pengaruh O<sub>2</sub> D</p> <p>Isolasi D Enumerasi D</p> <p><b>*Kuis:</b> Isolasi D</p> <p><b>Ra, Webi, Sher, Nike</b></p>
<p><b>Senin 4/4</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi D, Enumerasi D</p> <p>Media &amp; Sterilisasi E Fermentasi E Isolasi E</p> <p><b>*Kuis:</b> Enumerasi D, Media &amp; Sterilisasi E + Fermentasi E</p> <p><b>Sher, Webi, Ruth, Jeje</b></p>	<p><b>Selasa 5/4</b></p> <p>Pengamatan: Fermentasi D</p> <p>Enumerasi E, Pengaruh O<sub>2</sub> E</p> <p><b>*Kuis:</b> Fermentasi D, Enumerasi E</p> <p><b>Jeje, Sher, Nike, Ra</b></p>	<p><b>Rabu 6/4</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi E</p> <p>Isolasi E Mikroskop &amp; Pewarnaan E</p> <p><b>*Kuis:</b> Mikroskop &amp; Pewarnaan E</p> <p>Livi, Ir</p>	<p><b>Kamis 7/4</b></p> <p>Pengamatan: Enumerasi E, Pengaruh O<sub>2</sub> E</p> <p>Media &amp; Sterilisasi F Isolasi F</p> <p><b>*Kuis:</b> Pengaruh O<sub>2</sub> E, Media &amp; Sterilisasi F + Isolasi F</p> <p><b>Nike, Ra, Ruth, Webi</b></p>	<p><b>Jumat 8/4</b></p> <p>Pengamatan: Fermentasi E, Isolasi E</p> <p>Mikroskop &amp; Pewarnaan F Fermentasi F</p> <p><b>*Kuis:</b> Isolasi E, Mikroskop &amp; Pewarnaan F</p> <p><b>Webi, Jeje, Ir</b></p>	<p><b>Sabtu 9/4</b></p> <p>Pengamatan: Isolasi F</p> <p>Isolasi F Enumerasi F Pengaruh O<sub>2</sub> F</p> <p><b>*Kuis:</b> Enumerasi F</p> <p>Livi, Sher, Nike, Ra</p>

<b>Senin 11/4</b>	<b>Selasa 12/4</b>	<b>Rabu 13/4</b>	<b>Kamis 14/4</b>	<b>Jumat 15/4</b>	<b>Sabtu 16/4</b>
Pengamatan: Isolasi F, Enumerasi F, Pengaruh O <sub>2</sub> F  <b>*Kuis: Pengaruh O<sub>2</sub> F</b>	Pengamatan: Fermentasi F  Media & Sterilisasi G Fermentasi G Isolasi G  <b>*Kuis: Fermentasi F,            Media &amp; Sterilisasi G            + Fermentasi G</b>	Enumerasi G Pengaruh O <sub>2</sub> G  <b>*Kuis: Enumerasi G</b>	Pengamatan: Isolasi G  Isolasi G Mikroskop & Pewarnaan G  <b>*Kuis: Mikroskop &amp;            Pewarnaan G</b>	Pengamatan: Enumerasi G, Pengaruh O <sub>2</sub> G  <b>*Kuis: Pengaruh O<sub>2</sub> G</b>	Pengamatan: Isolasi G, Fermentasi G  <b>*Kuis: Isolasi G</b>
<b>Webi, Sher, Ra</b>	Jeje, Ruth, Livi	Ra, Sher, Nike, Ruth	Livi, Ir	<b>Nike, Ra</b>	<b>Livi, Jeje</b>

## DAFTAR KELOMPOK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN 2016

Kelompok Kloter	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	11.70.0136 15.I2.0033 15.I1.0006	13.70.0113 15.I1.0041 15.I1.0063 15.I1.0070	14.I1.0212 15.I2.0030 15.I1.0077 15.I1.0101	15.I2.0003 15.I1.0081 15.I1.0020 15.I1.0110	15.I2.0012 15.I2.0029 15.I1.0082 15.I1.0078	15.I2.0020 15.I1.0046 15.I1.0028 15.I1.0027
<b>B</b>	15.I2.0004 15.I1.0111 15.I1.0152 15.I1.0145	15.I2.0009 15.I2.0018 15.I1.0106	15.I2.0017 15.I1.0124 15.I1.0032 15.I1.0047	15.I2.0024 15.I1.0144 15.I1.0026 15.I1.0065	15.I2.0026 15.I1.0139 15.I1.0103 15.I1.0170	15.I2.0027 15.I2.0015 15.I1.0033 15.I1.0141
<b>C</b>	15.I2.0028 15.I2.0023 15.I1.0011 15.I1.0171	15.I2.0007 15.I1.0155 15.I1.0162 15.I1.0084	15.I2.0011 15.I1.0057 15.I1.0019	15.I2.0021 15.I1.0068 15.I1.0013 15.I1.0086	15.I2.0013 15.I2.0025 15.I1.0149 15.I1.0025	15.I2.0005 15.I1.0163 15.I1.0104 15.I1.0079
<b>D</b>	15.I2.0008 15.I2.0019 15.I1.0107 15.I1.0075	15.I1.0073 15.I1.0042 15.I1.0167 15.I1.0031	15.I1.0112 15.I1.0125 15.I1.0048 15.I1.0157	15.I2.0034 15.I2.0001 15.I1.0095 15.I1.0179	15.I1.0038 15.I1.0136 15.I1.0115 15.I1.0089	15.I1.0017 15.I1.0172 15.I1.0009 15.I1.0045
<b>E</b>	15.I1.0184 15.I1.0096 15.I1.0175 15.I1.0185	15.I1.0037 15.I1.0050 15.I1.0014 15.I1.0056	15.I1.0127 15.I1.0188 15.I1.0143 15.I1.0132	15.I1.0169 15.I1.0024 15.I1.0133	15.I1.0098 15.I1.0154 15.I1.0116 15.I1.0091	15.I1.0064 15.I1.0001 15.I1.0134 15.I1.0022
<b>F</b>	15.I1.0015 15.I1.0186 15.I1.0174 15.I1.0023	15.I1.0007 15.I1.0100 15.I1.0187 15.I1.0052	15.I1.0021 15.I1.0148 15.I1.0003 15.I1.0158	15.I1.0180 15.I1.0178 15.I1.0035 15.I1.0043	15.I1.0036 15.I1.0044 15.I1.0097	15.I1.0160 15.I1.0005 15.I1.0053 15.I1.0122
<b>G</b>	15.I1.0092 15.I1.0016 15.I1.0173	15.I1.0118 15.I1.0008 15.I1.0189	15.I1.0061 15.I1.0029 15.I1.0177	15.I1.0135 15.I1.0034 15.I1.0183	15.I1.0159 15.I1.0099 15.I1.0182	15.I1.0058 15.I1.0161 15.I1.0093

# MIKROSKOP DAN PEWARNAAN

## 1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah mengetahui jenis pengecatan, fungsi dan perbedaan masing-masing pengecatan., mengetahui zat-zat warna dan zat-zat lain yang digunakan untuk pengecatan, mengetahui dan mempraktikan beberapa cara pengecatan, mengetahui bentuk sel dan bentuk koloni mikroorganismenya, mengenali morfologi dari beberapa *yeast*, mengetahui perbedaan dan ciri-ciri antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif, dan mengklasifikasikan bakteri berdasarkan komposisi dinding sel dan ada tidaknya endospora.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

Mikrobiologi merupakan ilmu yang mempelajari tentang makhluk yang memiliki sifat mikroskopik yang dikenal dengan nama mikroorganismenya atau jasad renik, sehingga setiap individu selnya tidak mungkin dapat dilihat langsung oleh mata (Fardiaz, 1992). Mikroskop dibedakan atas beberapa jenis, tetapi prinsip kerjanya pada umumnya sama, yaitu terdiri dari *sistem optikal* atau sistem pembesar dan *sistem iluminasi* yang menyebabkan terlihatnya spesimen atau objek.

Mikroskop memiliki 2 sistem lensa, yaitu lensa objektif dan lensa okuler. Lensa okuler merupakan lensa yang berhubungan langsung dengan mata. Perbesaran yang dimiliki lensa okuler adalah 6x, 8x, dan 10x. Fungsi lensa okuler adalah membuat bayangan semu yang terakhir dari suatu objek yang diamati dapat langsung dilihat dengan mata. Lensa objektif merupakan lensa yang digunakan untuk memperbesar objek (benda) yang dilihat dan menghasilkan bayangan yang nyata dari benda tersebut. Bayangan yang dihasilkan oleh lensa objektif akan diperbesar lagi oleh lensa okuler (Waluyo, 2010).

Bagian-bagian mikroskop dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagian-bagian Mikroskop (sederhana)

Cara yang digunakan untuk mengamati bentuk atau ciri-ciri mikroba dengan menggunakan mikroskop ada 2, yaitu: [1] dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang masih hidup tanpa diwarnai, yaitu dengan cara membuat preparat basah, dan [2] dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang telah mati dan diwarnai. Kebanyakan sel bakteri tidak berwarna, sehingga jika dilarutkan di dalam air dan dilihat di bawah mikroskop tidak akan memperlihatkan warna yang kontras dengan medium di sekelilingnya, sehingga supaya dapat terlihat harus diwarnai 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 bakteri yang diwarnai akan lebih mudah dilihat di bawah mikroskop menggunakan lensa obyektif minyak imersi yang mempunyai tingkat pembesaran relatif tinggi.

Pewarnaan sederhana adalah pewarnaan mikroba yang hanya menggunakan 1 jenis zat warna. Zat-zat warna yang biasa digunakan untuk pewarnaan sederhana misalnya *methylen blue*, *fuchsin* basa, atau violet kristal. Zat-zat warna tersebut bekerja dengan baik dalam mewarnai bakteri karena zat-zat tersebut mengandung gugusan fungsional yang dapat membentuk

warna (khromofor) dan bermuatan positif. Zat-zat warna itu disebut zat warna basa. Oleh karena sel-sel bakteri pada umumnya bermuatan negatif, maka sel-sel tersebut dapat mengikat khromofor. 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.

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

1. Pewarnaan sederhana
2. Pewarnaan diferensial
  - a. Pewarnaan Gram
  - b. Pewarnaan asam cepat (*acid-fast*)
3. Pewarnaan struktural
  - a. Pewarnaan inti sel (*Feulgen*)
  - b. Pewarnaan endospora
  - c. Pewarnaan dinding sel
  - d. Pewarnaan kapsul
  - e. Pewarnaan flagella
4. Pewarnaan untuk menguji adanya komponen-komponen tertentu di dalam sel seperti:
  - a. Glikogen
  - b. Lipida

Dua cara pewarnaan yang paling mudah dan paling sering dilakukan dalam mikrobiologi pangan yaitu pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan flagella kadang-kadang juga dilakukan, terutama dalam identifikasi bakteri.

### **Persiapan dan Fiksasi**

Sebelum dilakukan pewarnaan, maka sel-sel bakteri harus difiksasi terlebih dahulu pada gelas obyek untuk membunuh bakteri dan membuat sel-sel bakteri tersebut melekat pada gelas obyek dengan menggunakan panas. Selain itu, fiksasi bertujuan agar organisme tidak hilang tercuci selama prosedur pewarnaan dan sel-selnya tidak menjadi salah bentuk maupun terjadi penyusutan (Hadioetomo, 1993). 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 sebelum 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 tertinggal di antara atau pada sel-sel, sehingga hal ini dapat menghasilkan analisa pengamatan yang salah.

### **Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram merupakan salah satu cara pewarnaan yang paling sering dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi. Pewarnaan gram pertamakali diperkenalkan oleh seorang bakteriologi Denmark pada tahun 1884 yang bernama **Christian Gram**. Pewarnaan gram dibagi menjadi 2, yaitu 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, 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 yang pertama. Sel-sel yang tidak dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan tetap berwarna seperti zat warna pertama, sedangkan sel-sel yang dapat 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 iodium* (lugol). Sel kemudian dicuci dengan *alcohol* untuk menghilangkan violet kristal. Setelah dicuci dengan air, kemudian diwarnai dengan *counterstain* yaitu *fuschin*. Sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet yaitu biru-ungu disebut *bakteri gram-positif*, sedang sel-sel yang dapat melepaskan violet kristal dan mengikat safranin sehingga berwarna merah-merah muda disebut *bakteri gram-negatif*.

### **Pewarnaan Endospora**

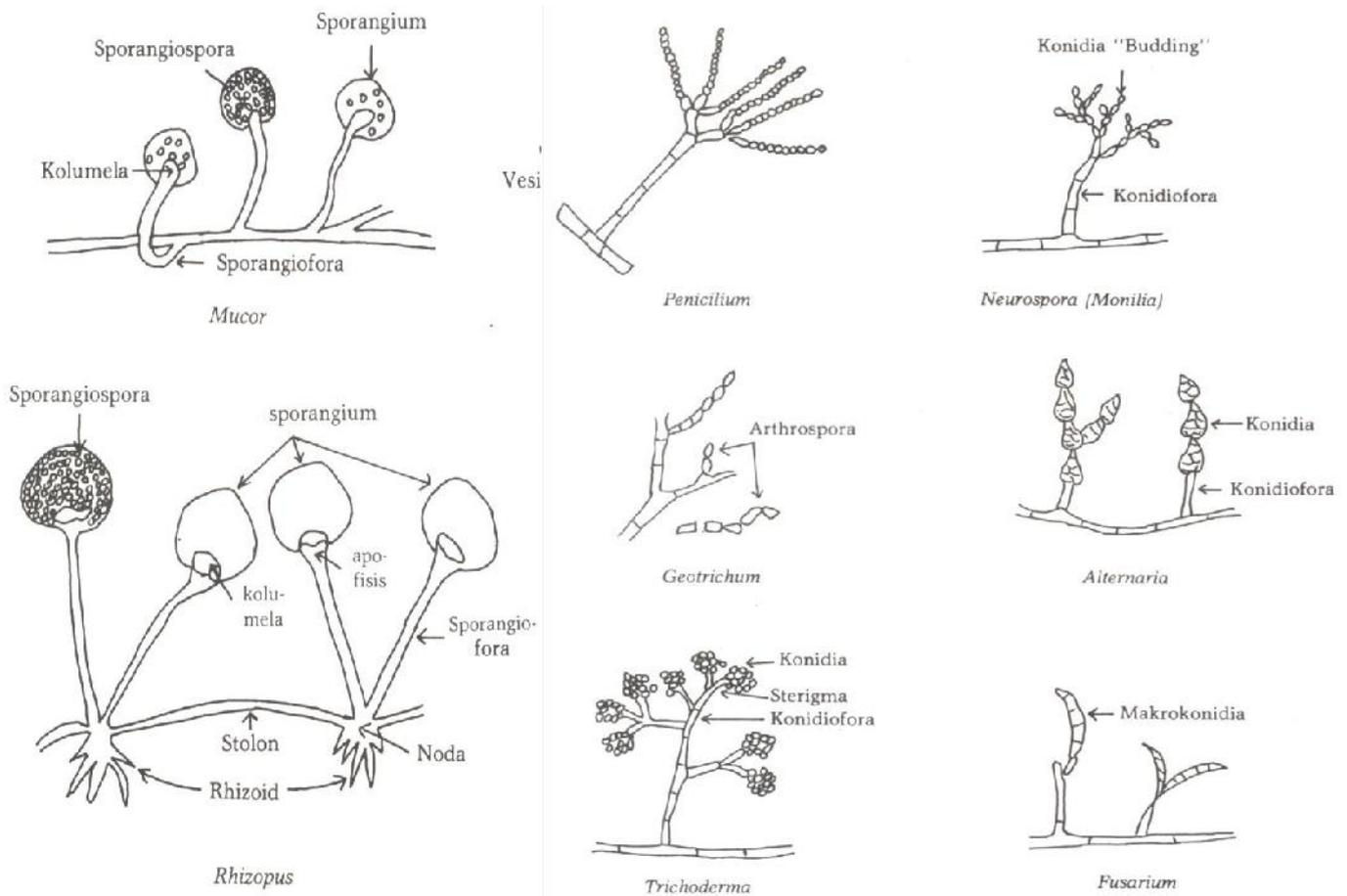
Pewarnaan khusus bertujuan untuk melihat salah satu struktur sel, seperti spora, flagela, inti sel, dan granula metakromatik, karena memiliki susunan kimia dan fisika yang berbeda, maka harus dilakukan pewarnaan khusus apabila ingin melihat struktur selnya. Ada beberapa metode pewarnaan khusus seperti pewarnaan spora, pewarnaan kapsula, perwarnaan flagel, dan pewarnaan badan inklusi (Waluyo, 2010).

Pewarnaan spora ditujukan untuk melihat struktur spora pada beberapa bakteri yang menghasilkan spora untuk mengatasi lingkungan yang tidak menguntungkan, contohnya *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Sporosarcina*, dll (Waluyo, 2010).

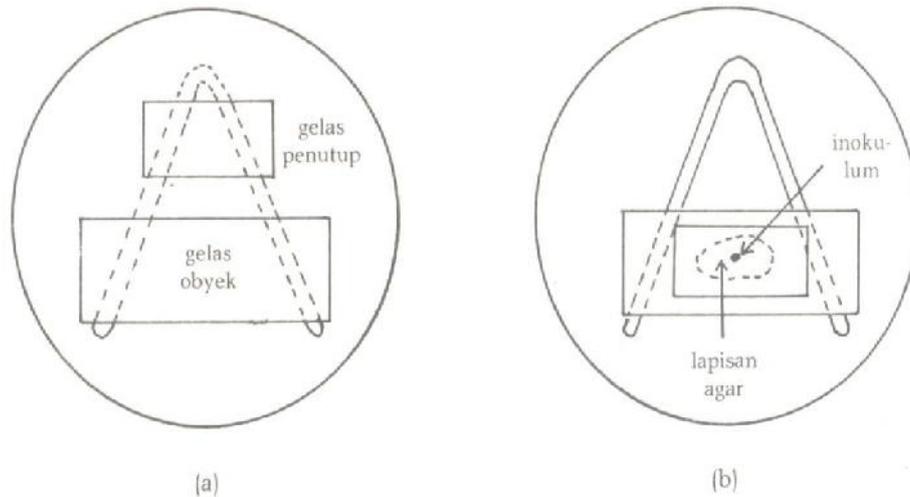
Spesies bakteri yang termasuk dalam genus *Clostridium* dan *Bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut *endospora*. Jika sel semakin tua, maka sel vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi *spora bebas*. Berbeda dengan sel vegetatif, maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim, misalnya dalam keadaan kering, panas, atau adanya bahan kimia yang beracun. Spora juga lebih tahan terhadap pewarnaan, dan sekali berhasil diwarnai, spora akan sukar untuk melepaskan zat warna, sehingga tidak dapat mengikat zat warna lainnya yang diberikan kemudian (*counterstain*). Prinsip pewarnaan ini digunakan untuk membedakan spora dari sel vegetatif. Zat warna yang paling sering digunakan untuk mewarnai spora adalah *malachite green* (Schaeffer dan Fulton) yang akan tetap diikat oleh spora setelah pencucian dengan air, dan sebagai *counterstain* digunakan *fuschin*. 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.

BAKTERI			KHAMIR		
batang	batang melengkung	spiral	spheroidal	ovoidal	silindrikal
rantai pendek	rantai panjang		ogival	triangular	botol
kokus/koki			apikulat	pembentukan dinding pemisah	"bud-fission"
bergerombol	rantai pendek		"budding"		arthrospora
rantai panjang			pseudomiselium		

Gambar 2. Bentuk dan cara pengelompokkan bakteri; bentuk dan cara reproduksi khamir



Gambar 3. Bentuk beberapa jenis kapang



Gambar 4. Cara pembuatan slide culture : a. Siap untuk di sterilisasi; b. Setelah inokulasi dan siap untuk diinkubasi.

### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Materi

##### 3.1.1. Alat

mikroskop, tabung reaksi, jarum N, bunsen, korek api, pemanas elektrik, jarum ose, kaca preparat, kaca objek, bunsen, pengukur waktu, pipet tetes, pipet volum.

##### 3.1.2. Bahan

*methylen blue*, *malachite green*, violet kristal, lugol, *Laktofenol blue*, fuchsin, safranin, alkohol, aquades steril, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cereviceae*, dan *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2. Metode

##### 3.1.1. Pewarnaan pada Kapang

- Pertama-tama, jarum N dipanaskan di atas api bunsen hingga berwarna merah.
- *Laktofenol blue* diteteskan pada kaca preparat yang sebelumnya sudah dibersihkan dengan alkohol.
- Kultur (*Aspergillus niger*) diambil sedikit dengan jarum N dan dilakukan secara aseptis.
- Kemudian kultur yang telah diambil diletakkan pada kaca preparat tersebut.

- Setelah itu, kaca preparat ditutup dan preparat tersebut diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

### 3.1.2. Pengecatan Sederhana

- Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.
- Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.
- Setelah itu, kultur (*Staphylococcus aureus*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.
- Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga mengering.
- Setelah itu, diberi zat warna *methylen blue* dan didiamkan selama 3 menit. Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.
- Dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.
- Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

### 3.1.3. Pewarnaan Gram

- Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.
- Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.
- Setelah itu, kultur (*Escherichia coli* dan *Streptococcus thermophilus*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.
- Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.
- Setelah itu, diberi zat warna larutan violet kristal dan didiamkan selama 1 menit.
- Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.
- Kemudian dikeringkan dan ditetesi dengan larutan lugol dan didiamkan selama 1 menit. Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi.
- Setelah itu, warnanya dihilangkan dengan menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi.
- Kemudian, diwarnai dengan safranin dan didiamkan selama 10-20 detik.

- Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.
- Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

#### **3.1.4. Pewarnaan Spora Bakteri**

- Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.
- Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.
- Setelah itu, kultur (*Bacillus cereus*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.
- Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.
- Setelah itu, diberi zat warna *malachite green* dan dipanaskan selama 5 menit di atas penangas air.
- Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras, lalu dikeringkan.
- Setelah itu, diwarnai dengan safranin dan didiamkan selama 30 detik.
- Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.
- Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

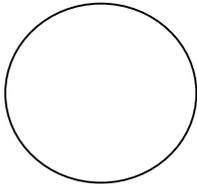
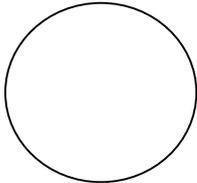
#### **3.1.5. Pewarnaan Spora Yeast**

- Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.
- Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.
- Setelah itu, kultur (*Saccharomyces cereviceae*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.
- Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.
- Setelah itu, diberi zat warna larutan violet kristal dan dipanaskan selama 3 menit di atas penangas air.
- Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.

- Setelah itu, warnanya dihilangkan dengan menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi, lalu dikeringkan.
- Kemudian diwarnai dengan larutan *fuchsin* dan didiamkan selama 10 detik.
- Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.
- Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

### 3. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Hasil pengamatan Mikroorganisme

Kel	Jenis Pewarnaan	Mikroorganisme	Gambar	Keterangan
				Perbesaran : Bentuk : Warna :
				Perbesaran : Bentuk : Warna :

# **MEDIA DAN STERILISASI**

## **1. TUJUAN PRAKTIKUM**

Praktikum ini bertujuan untuk mengetahui pentingnya sterilisasi dan hal-hal yang mempengaruhinya, mengetahui proses sterilisasi menggunakan autoklaf, mengetahui cara penggunaan autoklaf, mengetahui berbagai macam jenis media, mengetahui perbedaan dari media padat dan media cair, mengetahui cara pembuatan medium, mengetahui komposisi medium, serta mengetahui bentuk-bentuk medium.

## **2. TINJAUAN PUSTAKA**

Media adalah suatu substrat makanan yang dibutuhkan untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme. Media bukan hanya digunakan sebagai tempat pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba, namun media sendiri memiliki kegunaan, fungsi dan tujuan yang lain, yaitu untuk isolasi, seleksi, evaluasi, dan diferensiasi. Oleh karena itu, setiap media mempunyai spesifikasi sesuai dengan maksudnya.

Mikroorganisme memiliki kebutuhan dasar untuk hidup, yaitu meliputi air, karbon, energi, mineral, dan faktor tumbuh. Faktor tumbuh adalah komponen esensial yang tidak dapat disintesis sendiri oleh suatu organisme dari dasar sumber karbon dan nitrogennya. Komponen tersebut adalah asam-asam amino atau vitamin. Selain itu, semua mikroorganisme dapat dikatakan memerlukan beberapa unsur logam seperti natrium, kalium, kalsium, magnesium, mangan, besi, seng, tembaga, fosfor, dan kobalt, serta sebagian besar mikroorganisme tumbuh baik pada pH sekitar pH 7.

Mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang pada suatu media disebut kultur. Media kultur merupakan bahan-bahan nutrisi yang disediakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di dalam laboratorium. Namun, ada beberapa bakteri memerlukan media yang khusus untuk tumbuh dan ada juga mikroorganisme yang sama sekali tidak dapat tumbuh pada medium yang mati. Oleh karena itu terdapat beberapa kriteria media yang harus ditentukan untuk dapat menumbuhkan kultur dengan baik dan benar, beberapa diantaranya adalah:

- a. Media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba.
- b. Media harus mempunyai tekanan osmosis dan pH yang sesuai untuk mikroba.
- c. Media harus dalam keadaan steril, tujuannya adalah agar mikroorganisme yang kita tumbuhkan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme yang lainnya.

Bentuk media dapat ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematik seperti agar dan gelatin. Berdasarkan ada tidaknya penambahan zat pematik, bentuk media dibagi ke dalam 3 jenis, yaitu:

- a. Media padat

Media padat merupakan media yang ditambahkan zat pematik (umumnya agar). Jumlah agar yang ditambahkan tergantung kepada jenis atau kelompok mikroba yang ditumbuhkan. Contohnya, ada yang memerlukan kadar air tinggi sehingga penambahan agar harus sedikit tapi adapula yang memerlukan kandungan air rendah sehingga penambahan agar harus lebih banyak. Media padat umumnya digunakan untuk menumbuhkan bakteri, jamur, dan kadang digunakan untuk menumbuhkan mikroalga terutama dalam peremajaan dan pemeliharaan kultur murni dalam bentuk agar miring.

- b. Media cair

Pada media cair tidak dilakukan penambahan zat pematik. Umumnya, media cair digunakan untuk menambah biomassa sel. Media cair digunakan untuk pertumbuhan bakteri, ragi, dan mikroalga.

- c. Media semi padat

Media semi padat merupakan media yang ditambahkan dengan zat pematik, namun jumlahnya hanya setengah atau kurang dari yang seharusnya. Media ini umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerobik atau fakultatif untuk menambah biomassa sel.

Untuk pembuatan medium padat, digunakanlah agar-agar, gelatin, atau silika gel sebagai bahan utama. Namun, yang paling sering digunakan yaitu agar-agar. Meskipun bahan utama dari agar-agar adalah galaktan (suatu kompleks karbohidrat yang diekstraksi dari alga marin genus *Gelidium*), namun sebagian besar mikroorganisme tidak dapat menggunakannya sebagai bahan makanan sehingga fungsi dari agar adalah sebagai bahan pematik. Keunggulan lain dari penggunaan agar adalah agar akan menjadi larut atau cair bila dipanaskan pada suhu hampir 100°C dan tetap berbentuk cair bila didinginkan sampai kurang lebih 43°C.

Medium pembiakan selektif dalam pemakaiannya diberi bermacam-macam bentuk yang sesuai dengan tujuannya, yaitu sebagai berikut:

- a. Bentuk medium cair
- b. Bentuk medium padat dengan penambahan agar-agar atau gelatin.
  - Bentuk lempeng, dipadatkan dalam pinggan petri.
  - Bentuk miring, dipadatkan dalam keadaan miring dalam tabung.
  - Bentuk tegak, dipadatkan dalam keadaan tegak dalam tabung.

Pada pembuatan media padat, media cair yang dipanaskan harus diaduk secara terus-menerus dengan menggunakan *stirrer* atau pemusing magnetik. Tujuannya untuk mencegah hangusnya medium. Pada pembuatan media padat di cawan petri, media yang akan dituangkan tidak boleh memiliki suhu terlalu tinggi, karena akan menyebabkan kondensasi air yang berlebihan pada tutup cawan petri. Hal ini akan menyebabkan air tersebut akan kembali menitik atau menetes pada permukaan agar yang telah memadat.

Sterilisasi adalah pemberian panas yang cukup untuk menumbuhkan dan memusnahkan bakteri (patogen) dan juga mikroba pembusuk. Sterilisasi dilakukan untuk mengurangi resiko kerusakan makanan akibat mikrobia yang masih ada atau yang hampir mati akan aktif kembali dan tumbuh di dalam produk (Winarno, 1994). Mengkulturkan mikroorganisme harus melalui proses sterilisasi yang diperlukan agar mikroorganisme yang tidak diinginkan tidak ikut tumbuh. Bila setelah sterilisasi ternyata ada sedikit koloni di dalam medium tersebut makan pastilah proses sebelumnya salah sehingga terkontaminasi oleh mikroorganisme. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu sekitar 121-130<sup>0</sup>C dengan tekanan 1 atm dan umumnya dilakukan minimal selama 15 menit.

Sterilisasi basah biasanya dilakukan dalam *autoclave* atau sterilisator uap yang mudah diangkat dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Pada proses sterilisasi dengan alat ini hanya bisa dilakukan untuk alat atau bahanyang dapat ditembus oleh uap air dan tidak rusak jika dipanaskan pada suhu 110-121<sup>0</sup>C. Pada saat sterilisasi, cawan petri biasanya ditempatkan dalam kaleng atau dibungkus dengan kertas,

serta tabung uji dan botol disumbat dengan kapas atau penutup lain untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme dalam atmosfer.

### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Materi

##### 3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah tabung reaksi, tabung durham, rak tabung reaksi, timbangan analitik, sendok (plastik untuk  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dan  $KH_2PO_4$ , logam untuk bahan lain), autoklaf, *hot plate*, dan *stirrer*, plastik, korek api, pemanas bunsen, karet, serbet, masker, sarung tangan, tatakan untuk membuat agar miring, label, beaker glass, gelas ukur, lap, kertas buram, dan cawan petri steril.

##### 3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Malt Extract Agar* (MEA), *Lactose broth* (LB), *Pepton Glucose Yeast* (PGY), glukosa, pepton, ekstrak yeast,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Kalium dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), alkohol, kapas, dan aquades.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 6,4 gram NA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 320 ml aquades, kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* tersebut kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* sampai seluruh media larut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 10 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan 26 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutupi dengan kapas agar tetap steril dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Kemudian, cawan petri disiapkan, dibalik dan dibungkus dengan kertas buram dan dimasukkan ke dalam plastik. Selanjutnya, semua tabung reaksi dan cawan petri dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu  $121^{\circ}C$  selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi dan cawan petri diambil. Untuk 20 tabung reaksi yang berisi 10 ml medium diletakkan dalam posisi tegak. Untuk 10 tabung reaksi yang berisi 5 ml medium diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring. Untuk 6 tabung reaksi yang berisi 10 ml medium dipindahkan

secara aseptis ke dalam cawan petri dan kemudian dibungkus lagi dengan menggunakan kertas buram untuk disimpan. Setelah itu medium didinginkan supaya memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.2. Pembuatan Media *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB)**

Sebanyak 7,83 gram MRSB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 150 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 15 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.3. Pembuatan Media *deMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA)**

Sebanyak 1,36 gram MRSA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.4. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)**

Mula-mula 0,78 gram PDA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.5. Pembuatan Media *Malt Extract Agar* (MEA)**

Sebanyak 0,96 gram MEA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.6. Pembuatan Media *Pepton Glucose Yeast* (PGY)**

Sebanyak 0,06 gram glukosa, 0,03 gram pepton, 0,03 gram ekstrak yeast, 0,012 gram MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03 gram kalium dihidrogen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ditimbang menggunakan neraca analitik, lalu dilarutkan dengan 15 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.7. Pembuatan Nutrient Broth (NB)**

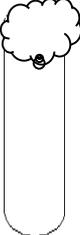
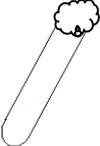
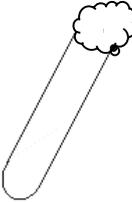
Sebanyak 1,2 gram NB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 150 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 15 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi

selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

### **3.2.8. Pembuatan *Lactose Broth* (LB)**

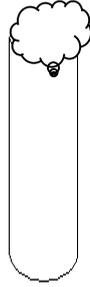
Sebanyak 7,41 gram LB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 570 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 57 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Sebanyak 54 tabung durham diisi dengan media LB, kemudian tabung durham tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi media LB yang sebelumnya telah disiapkan (pada saat tabung durham berada di dalam tabung reaksi, harus dipastikan tidak terbentuk gelembung). Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

#### 4. HASIL PENGAMATAN

Kelompok	Media	Gambar	Keterangan
1	NA		Warna : Wujud :
		10 tabung @ 10 ml	
			Warna : Wujud :
		10 tabung @ 5 ml	
			Warna : Wujud :
		6 cawan petri @ 10 ml	
	MRSA		Warna : Wujud :
2	MRSB		Warna : Wujud :

3

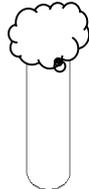
PDA



Warna :  
Wujud :

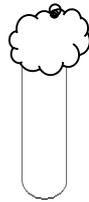
4

MEA



Warna :  
Wujud :

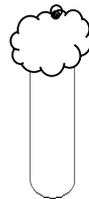
PGY



Warna :  
Wujud :

5

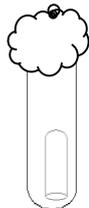
NB



Warna :  
Wujud :

6

LB



Warna :  
Wujud :

# FERMENTASI SPONTAN DAN NON SPONTAN

## 1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah untuk mengetahui proses fermentasi pada pembuatan acar dan minuman fermentasi dari buah, mengetahui reaksi yang terjadi pada saat fermentasi berlangsung, mengetahui perbedaan yang terjadi antara fermentasi spontan dan non spontan, mengetahui pengaruh konsentrasi *yeast* dan garam, suhu, yang digunakan terhadap hasil, mengetahui mikroorganisme apa saja yang berperan dalam proses fermentasi, serta mengetahui hal-hal yang mempengaruhi proses fermentasi.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana oleh mikroba yang bersifat katabolik. Mikroba katabolik tersebut dapat mensintesis beberapa vitamin yang kompleks dan faktor-faktor pertumbuhan bahan lainnya. Proses fermentasi umumnya dikondisikan dalam keadaan tanpa oksigen atau anaerob, tetapi organisme fermentatifnya terkadang memerlukan oksigen untuk proses metabolisme lainnya maupun pertumbuhannya. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi: pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbon dioksida serta oksidasi senyawa nitrogen organik. Contoh produk fermentasi oleh mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan meliputi etil alkohol, asam laktat, asam asetat, gliserol, butilen glikol, aseton, butanol, dan asam butirat. Hasil dari fermentasi ini sendiri sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), macam mikrobial dan kondisi sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikrobial tersebut.

Mikroba yang sering digunakan dalam proses fermentasi adalah bakteri, khamir dan jamur. Khamir selain digunakan dalam substrat cair seperti pada pembuatan minuman fermentasi wine dan bir, juga pada medium padat untuk pembuatan roti. Jamur umumnya digunakan dalam substrat cair misalnya untuk produksi tempe dan oncom, atau digunakan untuk produk jamur itu sendiri. Bakteri asam laktat merupakan jenis mikroba yang seringkali berperan dalam proses fermentasi.

Bakteri asam laktat termasuk bakteri yang menghasilkan sejumlah besar asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme gula (karbohidrat). Asam laktat yang dihasilkan tentunya akan menurunkan nilai pH dari lingkungan pertumbuhannya dan menimbulkan rasa asam. Kondisi asam tersebut umumnya akan menghambat pertumbuhan dari beberapa jenis mikroorganisme lainnya. Bakteri asam laktat selain berperan dalam proses fermentasi, juga berkontribusi besar dalam memberikan manfaat fungsional bagi tubuh manusia sebagai probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup dalam bahan pangan yang tercatat dalam jumlah cukup serta memberikan manfaat kesehatan saluran pencernaan.

Berdasarkan sumber mikroorganisme, proses fermentasi dibagi menjadi dua yaitu :

1. Fermentasi spontan, adalah fermentasi bahan pangan di mana dalam pembuatannya tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, namun mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhan. Aktivitas dan pertumbuhan bakteri asam laktat dirangsang karena adanya garam, contohnya pada pembuatan sayur asin dan acar.
2. Fermentasi non spontan, adalah fermentasi yang terjadi pada bahan pangan yang dalam pembuatannya ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, di mana mikroorganisme tersebut akan berkembang biak secara aktif merubah bahan yang difermentasi menjadi produk, contohnya tempe dan minuman fermentasi.

Acar atau yang dikenal dengan *pickle* adalah sayur atau buah yang diberi garam dan diawetkan baik diberi bumbu atau tidak. Proses penggaraman dilakukan pada tahap awal pembuatan acar dengan cara fermentasi. Terkadang dilakukan penambahan gula sebanyak 1% apabila sayur atau buah yang digunakan berkadar gula rendah. Acar dibuat dengan kombinasi dua cara pengawetan yakni penggaraman dan fermentasi.

Tape adalah sebuah makanan selingan yang cukup digemari khususnya di Indonesia. Tape memiliki rasa yang manis dan sedikit mengandung alkohol, memiliki aroma yang menyenangkan dan bertekstur lunak dan berair. Namun, tape adalah produk bahan pangan yang mudah rusak karena tapai masih bisa mengalami fermentasi lebih lanjut setelah kondisi optimum fermentasi tercapai. Hasil akhir dari fermentasi lanjut dari tape adalah produk asam yang beralkohol. Produk ini tidak bisa dikonsumsi lagi karena rasanya sudah berubah dan menjadi tidak enak.

Pada pembuatan tape, biasanya dapat digunakan ragi sebagai starter, penggunaan inokulum murni akan memperbaiki produk dan mengurangi kontaminasi. Inokulum dikatakan bisa memperbaiki produk karena, di dalam inokulum terkandung organisme penghasil pigmen (kapang) yang dapat menyebabkan produk menjadi berwarna dan berasa asam. Perubahan hidrokimia yang penting pada fermentasi tapai adalah hidrolisis pati menjadi glukosa dan maltosa yang akan memberikan rasa manis serta perubahan gula menjadi alcohol dan asam organic. Fermentasi akan baik jika dilakukan pada kondisi mikroaerob, karena pada kondisi anaerob kapang tidak mampu tumbuh, sehingga tidak dapat menghidrolisis pati. Dan ketika pati tidak dapat terhidrolisis maka, aroma tidak akan berkembang dengan baik karena tidak ada fermentasi alcohol. Organisme yang berperan untuk menghasilkan tape dengan aroma yang baik adalah gabungan dari *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis fibuliger* dan *Hansenula anomala*. Perubahan fisik setelah proses fermentasi yaitu tekstur semakin lunak karena terjadi penurunan selulosa menjadi bentuk yang lebih sederhana.

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan golongan khamir murni, yaitu khamir yang dapat berkembang biak secara seksual dengan pembentukan askospora. Untuk yeast pH optimal untuk pertumbuhan 4-4,5. Pada pH 3 atau lebih rendah lagi maka fermentasi akan berjalan dengan lambat

### **3. MATERI DAN METODE**

#### **3.1. Materi**

##### **3.1.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah timbangan analitik, Bunsen, pisau, *juicer*, pH meter, botol, besek, daun pisang dan toples kaca steril.

##### **3.1.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah : apel (kloter A), salak (kloter B), belimbing wuluh (kloter C), pepaya setengah matang (kloter D), pir (kloter E), jambu air (kloter F), kedondong (kloter G), *yeast* kering, garam, air mineral 600 ml.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Pembuatan Acar**

Buah yang telah dikupas, dicuci dan diiris tipis-tipis (ketebalan  $\pm 1$  mm), ditimbang sebanyak 100 gram. Kemudian, buah tersebut dimasukkan ke dalam toples kaca steril yang didalamnya sudah terdapat air yang telah dicampur dengan garam. Toples kemudian ditutup rapat dan fermentasi dilakukan selama 4 hari pada suhu yang telah ditentukan.

Keterangan:

Kelompok 1  $\rightarrow$  300 ml air + 2,5% garam; suhu dingin

Kelompok 2  $\rightarrow$  300 ml air + 2,5% garam; suhu ruang

Kelompok 3  $\rightarrow$  300 ml air + 5% garam; suhu dingin

Kelompok 4  $\rightarrow$  300 ml air + 5% garam; suhu ruang

Kelompok 5  $\rightarrow$  300 ml air + 10% garam; suhu dingin

Kelompok 6  $\rightarrow$  300 ml air + 10% garam; suhu ruang

\* % kadar garam dihitung dari berat sampel yang difermentasi

### **3.2.2. Pembuatan Minuman Fermentasi**

Sebanyak 50 gram ketan putih setengah matang disiapkan. Ketan tersebut dimasukkan ke dalam besek yang sudah dilapisi dengan daun pisang. Ketan ditata dengan rapi dan padat sampai tidak terdapat lubang diantaranya. Pada ketan kelompok 1 ditambahkan ragi tape sebanyak 0,5 % dari berat ketan. Pada kelompok 2 ditambahkan ragi tape sebanyak 1 % dari berat ketan. Kelompok 3 ditambahkan ragi tape sebanyak 1,5 % dari berat ketan. Pada kelompok 4 ditambahkan ragi tape sebanyak 2 % dari berat ketan. Pada kelompok 5 ditambahkan 5 ml inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Kelompok 6 ditambahkan 10 ml inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Besek ditutup dengan rapat dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang dan setelah 3 hari dilihat dan diamati warna, bau, rasa, dan teksturnya.

## 4. HASIL PENGAMATAN

### 4.1. Pembuatan Acar

Tabel 1. Pembuatan Acar

Kel	Bahan	Suhu Fermentasi	Konsentrasi Garam (%)	pH	Foto	Keterangan	
						Aroma: Tekstur: Warna: Rasa:	
Keterangan:							
Tekstur:		Warna:		Aroma:		Rasa:	
+	: sangat keras	+	: tidak keruh	+	: tidak asam	+	: tidak asam
++	: keras	++	: sedikit keruh	++	: agak asam	++	: agak asam
+++	: agak keras	+++	: keruh	+++	: asam	+++	: asam
++++	: lunak	++++	: sangat keruh	++++	: sangat asam	++++	: sangat asam
+++++	: sangat lunak						

### 4.2. Pembuatan Tape

Tabel 2. Uji Sensori Pembuatan Tape

Kelompok	Bahan	Keterangan	
		Aroma: Tekstur: Warna:	
Keterangan:			
Aroma:			
+	: tidak masam		
++	: agak masam		
+++	: masam		
++++	: sangat masam		
Tekstur:			
+	: sangat keras	Warna:	
++	: keras	+	: putih
+++	: agak keras	++	: putih kekuningan
++++	: lunak	+++	: kuning
+++++	: sangat lunak	++++	: sangat kuning

# PENGARUH O<sub>2</sub>

## 1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah untuk mengetahui beberapa macam kelompok mikroorganisme, mengetahui cara membedakannya, mengetahui cara mengujinya, mengetahui media yang tepat dalam pengujian suatu mikroorganisme, dan juga mengetahui contoh mikroorganisme menurut masing-masing kelompok.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

Mikroorganisme seringkali terbagi menjadi 5 kelompok berdasarkan kebutuhan akan oksigen (O<sub>2</sub>), yaitu:

### 1. Mikroorganisme Aerob obligat

Mikroorganisme aerob obligat atau aerob adalah mikroorganisme yang memerlukan oksigen untuk hidupnya, misalnya *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Mycobacteria phlei*.

### 2. Mikroorganisme Anaerob obligat

- Mikroorganisme anaerob obligat atau anaerob adalah mikroorganisme yang tidak dapat hidup bila ada oksigen, misalnya *Clostridium tetani* dan *Bacteroides fragilis*.
- Di laboratorium, lingkungan anaerob dengan kandungan sekitar 0,1% O<sub>2</sub> dapat diperoleh dengan tabung anaerobik GasPak atau *GasPak anaerobic jar*, *agar kocok*, atau sistem asam pirrogallol-NaOH. Mikroorganisme anaerob tidak dapat hidup dalam lingkungan konsentrasi oksigen lebih dari 0,4%. Kematian ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:
  - a. Kelompok mikroorganisme ini tidak memiliki atau hanya mempunyai sedikit superoksida dismutase yang mengubah superoksida (O<sub>2</sub>) yang bersifat racun menjadi hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
  - b. Bakteri anaerob tidak memiliki peroksida dan katalase, yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi bentuk yang tidak toksik.
  - c. Memiliki sistem enzim yang sensitif terhadap oksigen.

### 3. Mikroorganisme Anaerobik Fakultatif

merupakan mikroorganisme yang dapat hidup di lingkungan dengan ataupun tanpa oksigen, seluruh permukaan tabung akan dipenuhi oleh mikroorganisme tetapi pada bagian atas atau bawah tabung terlihat lebih keruh; misalnya *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

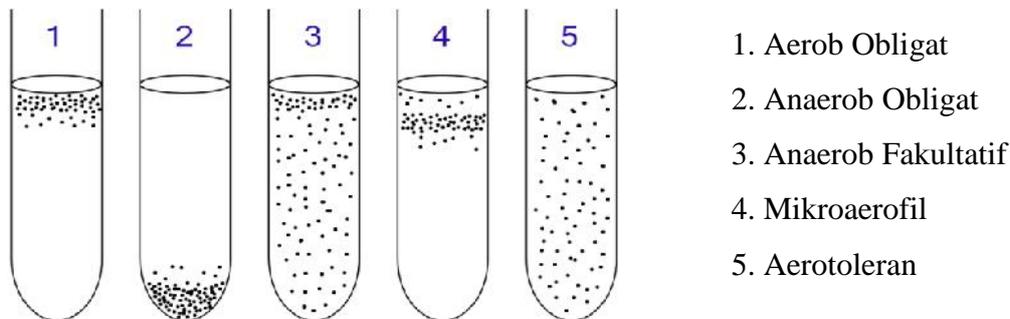
### 4. Mikroorganisme Mikroaerofil

Kelompok ini mencakup mikroorganisme yang memerlukan oksigen, namun hanya dapat tumbuh bila kadar oksigen diturunkan menjadi 15% atau kurang, misalnya *Campylobacter jejuni*, mikroorganisme penyebab diareha dan gastroenteritis akut. Umumnya, kelompok ini tumbuh subur bila kadar oksigen sekitar 5-10% atau tumbuh dibagian atas media tetapi tidak seperti pada mikroorganisme aerobik. Lingkungan mikroaerofil dapat diperoleh pada biakan agar kocok dan amplop GasPak khusus, yang menghasilkan 5-12% CO<sub>2</sub> dan 5-15% O<sub>2</sub>, yang ditempatkan dalam tabung anaerob.

### 5. Mikroorganisme Aerotoleran

Mikroorganisme ini tidak dipengaruhi oleh ketersediaan oksigen, sehingga mereka dapat ditemukan diseluruh tabung secara merata.

Letak pertumbuhan mikroorganisme berdasarkan ketersediaan oksigennya dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Sedangkan menurut Gaman & Sherrington (1994) tersedianya oksigen dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Jamur bersifat aerobik (memerlukan oksigen) sedangkan khamir dapat bersifat aerobik atau anaerobik tergantung pada kondisinya. Sedangkan untuk bakteri sendiri diklasifikasikan menjadi 4 kelompok menurut keperluan oksigennya, antara lain:

- a) *Aerob obligat*
- b) *Aerob fakultatif*
- c) *Anaerob obligat*
- d) *Aerob fakultatif*

Berdasarkan pengaruh oksigen terhadap pertumbuhan mikroorganisme, terdapat beberapa metode untuk membiakan mikroorganisme, antara lain:

a. Metode Pembiakan dalam Tabung Anaerob GasPak

Sistem GasPak sering digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme anaerob, karena penggunaannya mudah dan lingkungan dalam tabung hampir bebas oksigen. Dalam sistem ini, diperoleh lingkungan anaerobic yang diperkaya dengan CO<sub>2</sub>, sehingga menyuburkan pertumbuhan mikroorganisme yang memerlukan CO<sub>2</sub>. Amplop yang disposable mengandung bahan kimia yang menghasilakan H<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> bila ditambahkan air. Reaksi yang dikatalisasi kristal palladium mengubah H<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> menjadi air.

b. Metode Pembiakan dalam “Agar Kocok”

Metode ini merupakan cara yang mudah untuk mengamati keperluan oksigen mikroorganisme. Biakan ini disiapkan dengan cara mengencerkan nutrisi agar dalam tabung. Agar didinginkan kembali sampai mencapai suhu sekitar 47°C kemudian diinokulasi. Mikroorganisme aerob tumbuh pada lapisan permukaan, anaerob tumbuh pada lapisan bawah, mikroaerofil tumbuh pada bagian tengah, sedangkan anaerob fakultatif menunjukkan pertumbuhannya dalam seluruh tabung.

c. Metode Pembiakan dalam Pirogallol-NaOH

Agar miring yang telah diinokulasi dapat ditumbuhkan secara anaerob dengan menambahkan kristal asam pirogallol dan NaOH. Sewaktu diaktivasi dengan NaOH, asam pirogallol mereduksi oksigen dalam tabung menjadi air.

d. Metode Pembiakan dalam Tabung Berlilin

Tabung berlilin sering digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme kapneik, yaitu kelompok mikroorganisme yang hanya dapat tumbuh dengan baik dalam lingkungan yang kadar CO<sub>2</sub>-nya telah ditingkatkan menjadi 0,03-5%. Contoh mikroorganisme kelompok ini adalah *Brucella abortus* yang dapat tumbuh subur dalam lingkungan CO<sub>2</sub> 4% dan O<sub>2</sub> 16%. Lingkungan dalam tabung berlilin serupa dengan lingkungan aerob, namun dengan kadar CO<sub>2</sub> yang meningkat. Pembakaran lilin mereduksi oksigen dari 20% menjadi 16% dan meningkatkan CO<sub>2</sub> dari 0,4% menjadi sekitar 4%, sehingga mikroorganisme kapneik dapat tumbuh.

e. Metode Pembiakan dalam Thioglikolat

Metode ini ditujukan untuk mengetahui pertumbuhan mikroorganisme berdasarkan keperluan akan oksigennya. Media thioglikolat sendiri termasuk media semi padat yang mengandung bahan yang memiliki kemampuan mengoksidasi-reduksikan oksigen, yaitu thioglikolat dan sistin. Setelah indikator, digunakan *resazurin* yang akan berwarna merah

bila ada oksigen. Setelah diinkubasi, pertumbuhan mikroorganisme di media ini akan berbeda, sesuai tingkat kebutuhannya akan oksigen. Berikut merupakan ciri-ciri pertumbuhan yang terjadi pada tiap kelompok mikroorganisme:

1. Mikroorganisme anaerob

Pertumbuhan terjadi di bagian bawah media yang tidak memperlihatkan perubahan warna. Pertumbuhan terlihat sebagai kekeruhan, pembentukan gas atau flokulasi.

2. Mikroorganisme aerob

Pertumbuhan akan terlihat di bagian atas dari media, pada bagian yang memperlihatkan warna kemerahan (*pink*) disebabkan oleh oksidasi indikator.

3. Mikroorganisme mikroaerofilik

Pertumbuhan bakteri akan terlihat di antara kedua bagian tersebut di atas (Lay, 1994).

Tiap mikroorganisme yang dikulturkan di dalam medium memiliki beberapa ciri kultur tersendiri. Ada tiga golongan besar mikroorganisme yang dapat dikulturkan untuk berbagai tujuan dalam berbagai bidang. Golongan tersebut adalah :

1. Bakteri, memiliki ciri kultur sebagai berikut :

- Membentuk film atau lapisan pada medium.
- Menghasilkan lendir.
- Menghasilkan bau tak sedap.
- Tidak berwarna.

Contohnya : *Micrococaceae*, *Streptococaceae*, *Enterobacterium*, dan sebagainya.

2. Yeast, memiliki ciri kultur sebagai berikut :

- Ada yang berwarna merah atau bercak berwarna pada medium.
- Ada yang membentuk film atau lapisan pada permukaan medium.
- Umumnya kering dan berlendir.
- Berwarna putih atau krem.
- Umumnya kering, kecil, dan keriput.
- Tidak berbau

Contohnya : *Saccharomyces sp*, *Zygosaccharomyces*, *Phicia*, dan sebagainya.

3. Jamur, memiliki ciri kultur sebagai berikut :

- Seperti kapas namun berwarna putih atau keruh atau menghasilkan warna lainnya.
- Loose atau lepas-lepas.
- berserat atau berserat.
- Ada pula yang kompak.

- Warna pada miseliumnya.
- Gelatinuous.
- Tidak berbau

Contohnya : *Aspergillus sp*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, dan lain sebagainya.

Berdasarkan masing-masing ciri kultur tersebut maka mikroorganisme dapat diketahui dari golongan mana dengan melihat ciri pertumbuhannya pada medium (Bibiana, 1994). Sel khamir yang termasuk jenis *Saccharomyces* mungkin berbentuk bulat, oval, atau memanjang, dan mungkin membentuk pseudomiselium (Fardiaz, 1992).

### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Materi

##### 3.1.1. Alat

Jarum ose, korek api, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sumbat kapas, mikropipet, cuvet, masker dan sarung tangan

##### 3.1.2. Bahan

Alkohol, *Acetobacter xylinum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, aquades steril, media *Nutrient Broth* (NB) steril dan media *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) steril.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Penumbuhan *Acetobacter xylinum* dan *Staphylococcus aureus*

- Prosedur harus dilakukan secara aseptis.
- Tabung reaksi yang berisi kultur diberi aquades steril 5 ml.
- Jarum ose dipijarkan hingga berwarna merah terang pada nyala api Bunsen.
- Jarum ose didinginkan beberapa detik hingga dingin.
- Kultur dipanen dengan cara digores dengan jarum ose (pada saat penggoresan kultur, tabung harus diletakkan di dekat api Bunsen. Ketika kultur digores, kapas sumbat tabung kultur dipegang menggunakan jari yang sebelumnya sudah disemprot alcohol, dan tidak boleh di letakkan di meja).
- Hasil goresan kultur yang telah bercampur dengan aquades tersebut diambil 0,1 ml dengan mikropipet

- Dimasukkan pada media NB
- Ujung tabung reaksi dipanaskan selama beberapa detik lalu disumbat dengan kapas.
- Jarum ose dipijarkan kembali untuk mematikan mikroba yang masih tersisa. Setelah itu di inkubasi 2 hari
- Diamati letak pertumbuhannya dan difoto.

### 3.2.2. Penumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactococcus lactis*

- Prosedur harus dilakukan secara aseptis.
- Tabung reaksi yang berisi kultur diberi aquades steril 5 ml.
- Jarum ose dipijarkan hingga berwarna merah terang pada nyala api Bunsen.
- Jarum ose didinginkan beberapa detik hingga dingin.
- Kultur bakteri dipanen dengan cara digores dengan jarum ose (pada saat penggoresan kultur, tabung harus diletakkan di dekat api Bunsen. Ketika kultur digores, kapas sumbat tabung kultur dipegang menggunakan jari yang sebelumnya sudah disemprot alcohol, dan tidak boleh di letakkan di meja).
- Hasil goresan kultur yang telah bercampur dengan aquades tersebut diambil 0,1 ml dengan mikropipet
- Dimasukkan pada media MRSB steril.
- Ujung tabung reaksi dipanaskan selama beberapa detik lalu disumbat dengan kapas.
- Jarum ose dipijarkan kembali untuk mematikan mikroba yang masih tersisa. Setelah itu di inkubasi 2 hari
- Diamati letak pertumbuhannya dan difoto.

## 4. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Pengaruh O<sub>2</sub>

Kelompok	Mikroorganisme	Media	Gambar	Letak Pertumbuhan
<hr/>				

# ENUMERASI

## 1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukan praktikum ini adalah untuk mengetahui cara menghitung jumlah koloni mikrobia dengan metode hitungan cawan (HC terdiri dari *pour plate* dan *spread plate*) dan *most probable number* (MPN), mengetahui pengaruh pengenceran terhadap jumlah koloni mikrobia, mengetahui perbedaan antara metode HC dan MPN, mengetahui perbedaan antara *pour plate* dan *spread plate*, mengetahui fungsi dari tabung Durham, mengetahui apa itu *spreader*, dan mengetahui mikroorganisme yang dapat memecah LB.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Analisa Kuantitatif Mikroba yang terdapat dalam Bahan Pangan

Pengukuran kuantitatif populasi mikroba sering diperlukan dalam berbagai penelaahan mikrobiologis. Pada hakikatnya terdapat 2 macam pengukuran dasar yaitu, penentuan jumlah sel dan penentuan massa sel. Pengukuran jumlah sel biasanya dilakukan untuk organisme bersel tunggal (misalnya, bakteri), sedangkan penentuan massa sel dapat dilakukan tidak hanya pada mikroba bersel satu tetapi juga untuk organisme berfilamen (misalnya kapang)

#### Metode Hitungan Cawan

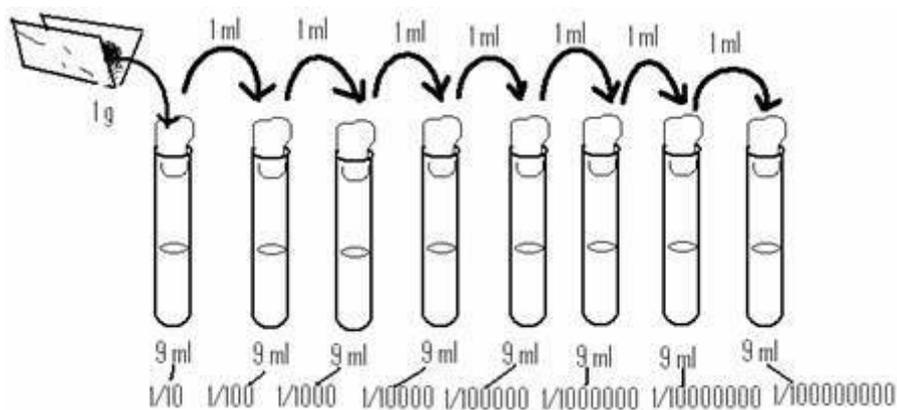
Metode yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah mikrobia di dalam bahan pangan terdiri dari metode hitungan cawan (HC), “*Most Probable Number*” (MPN), dan metode hitungan mikroskopik langsung. Metode lainnya yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikrobia di dalam suatu larutan adalah metode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

#### Pengenceran

Bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikrobia 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 secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000, dan seterusnya, atau 1:100, 1:10.000, 1:1.000.000 dan seterusnya.

Pengambilan contoh dilakukan secara aseptik dan pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan kira-kira sebanyak 25 kali untuk memisahkan sel-sel mikrobia yang bergabung menjadi satu. Pengenceran secara desimal 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 mikrobia pada permukaan luar bahan pangan, misalnya daging sapi, ayam atau ikan, pengambilan contoh dapat dilakukan menggunakan metode ulas (*Swab*).



Gambar 7. Metode Pengenceran

Larutan yang digunakan untuk pengenceran dapat berupa larutan buffer fosfat, larutan garam fisiologi 0,85% atau larutan Ringer. Untuk bahan pangan yang sukar larut, ke dalam larutan pengencer pertama dapat ditambahkan pasir putih atau butir-butir gelas (*Glass beads*) yang disterilisasi bersama dengan larutan pengencer tersebut. Sebagai contoh jika contoh yang akan dianalisa adalah tepung atau pati, digunakan satu sendok pasir kedalam 90 atau 99ml larutan pengencer pertama, sehingga sewaktu dikocok pemecahan partikel-partikel dari tepung atau pati akan lebih mudah. Butir-butir gelas dapat digunakan misalnya jika kita akan menganalisa total mikrobia dari telur sehingga bagian yang bersifat koloid dari telur dapat lebih mudah dipecahkan.

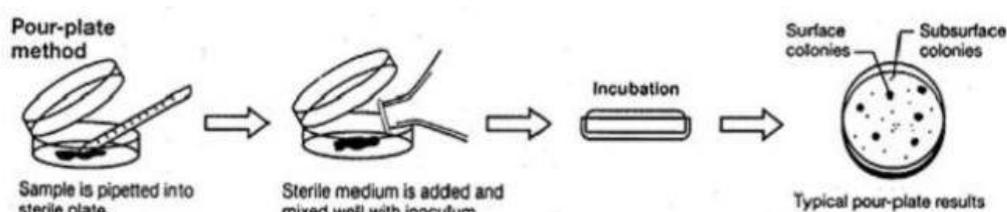
## Cara Pemupukan

Prinsip dari metode hitungan cawan adalah jika sel mikrobia yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar maka sel mikrobia tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode HC merupakan cara yang paling sensitive untuk menentukan jumlah mikrobia karena [1] Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung. [2] Beberapa jenis mikrobia dapat dihitung sekaligus. [3] Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikrobia karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari satu sel mikrobia dengan penampakan pertumbuhan yang spesifik.

Selain keuntungan-keuntungan tersebut metode HC juga mempunyai kelemahan-kelemahan yaitu: [1] Hasil perhitungan tidak menunjukkan sejumlah sel mikrobia yang sebenarnya karena beberapa sel yang saling berdekatan mungkin membentuk satu koloni. [2] Medium dan kondisi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda. [3] Mikrobia yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar. [4] Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi yang lama sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung. Metode HC dapat dibedakan atas dua cara yaitu Metode tuang (*pour plate*) dan Metode permukaan (*surface/ spread plate*).

### 1. Metode Tuang (*Pour Plate*)

Dari pengenceran yang dikehendaki, sebanyak 1 ml larutan tersebut diambil. sebaiknya antara waktu dimulainya pengenceran sampai menuangkan kedalam cawan petri tidak boleh lebih dari 30 menit. Kemudian ke dalam cawan tersebut dimasukan agar cair steril yang telah didinginkan sampai 47-50°C. Selama penuangan medium, tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu melebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Segera setelah penuangan cawan petri digerakan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau gerakan seperti angka delapan. Setelah agak memadat, cawan-cawan tersebut dapat diinkubasikan didalam inkubator dengan posisi terbalik.

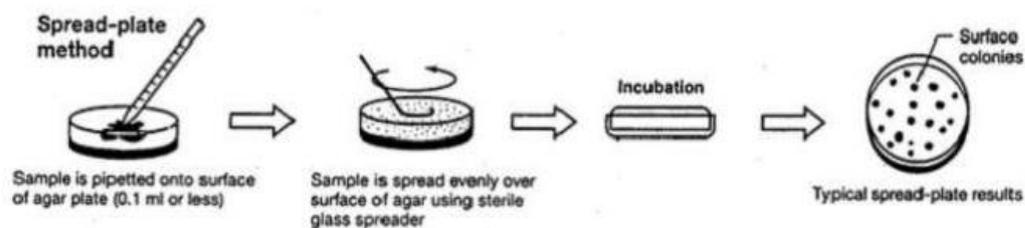


Gambar 8. Metode *Pour Plate*

Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu tertentu sesuai dengan jenis mikrobia yang akan dihitung. Medium agar yang digunakan juga disesuaikan dengan jenis mikrobia 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 jadi banyak sel, meskipun mungkin juga 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 pengerjaan penelitian. Tetapi untuk praktikum di kelas dimana biaya jumlah alat-alat gelas biasanya sangat terbatas, dapat digunakan satu cawan petri untuk setiap pengenceran.

## 2. Metode Permukaan (*Surface/ Spread Plate*)

Pada pemupukan dengan metode ini, agar steril terlebih dahulu dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, kemudian sebanyak 0,1 ml sampel yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut. Kemudian cawan diputar-putar agar sampel tersebar ke seluruh permukaan media. Setelah dingin, batang gelas tersebut digunakan untuk meratakan contoh di atas medium agar dengan cara memutar cawan petri diatas meja. Selanjutnya inkubasi dan perhitungan jumlah koloni dilakukan seperti pada metode penuangan. Tetapi harus diingat bahwa jumlah contoh yang ditumbuhkan adalah 0,1 ml, jadi harus dimasukkan dalam perhitungan "*total count*".



Gambar 9. Metode *Spread Plate*

### Cara Menghitung Koloni

Perhitungan jumlah koloni akan lebih mudah dan cepat jika pengenceran dilakukan secara desimal. Sebagai contoh misalnya penetapan jumlah koloni pada susu. Pengenceran awal 1:10 ( $= 10^{-1}$ ) digunakan 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 mikrobia yang terdapat 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 g)

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

Contoh lainnya misalnya dengan menentukan “total count” dari makanan padat. Jika 1,3 g makanan padat, misalnya keju, diencerkan dengan 48 ml larutan pengencer, dan dibuat pengenceran selanjutnya yaitu 1:7, 1:65, kemudian 1 ml dari pengenceran terakhir diencerkan lagi dengan 74 ml larutan pengencer. Dari pengenceran yang terakhir, sebanyak 0,1 ml ditumbuhkan pada permukaan cawan petri dengan agar padat. Setelah inkubasi ternyata pada pengenceran yang tertinggi tumbuh 172 koloni.

Penetapan jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor pengenceran} &= \text{Pengenceran awal} \times \text{Pengenceran selanjutnya} \times \text{Jumlah yang ditumbuhkan} \\
 &= \frac{1,3}{48+1,3} \times \frac{1}{7} \times \frac{1}{65} \times \frac{1}{74+1} \times \frac{1}{10} \\
 &= \frac{1,3}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Koloni per ml} &= \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} \\
 &= 172 \times \frac{1,3}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \\
 &= 2.225.895.000 \\
 &= 2.2 \times 10^9
 \end{aligned}$$

Cara pengenceran diatas sebenarnya bukan suatu cara yang salah, tetapi dalam perhitungan sangat tidak praktis dan memakan waktu lama. Cara yang lebih praktis adalah dengan mengencerkan contoh tersebut dengan desimal sampai pengenceran  $10^{-7}$ , misalnya dengan cara pengenceran 1:10 (5 g contoh di dalam 45 ml larutan pengenceran), 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup>, dan 1:10<sup>7</sup>, 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:

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

### Standar Perhitungan

Untuk melaporkan suatu hasil analisis mikrobiologi digunakan suatu standar yang disebut “*Standar Plate Count*” (SPC), yang menjelaskan mengenai cara hitung 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 angka 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			Standar Plate Count	Keterangan
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$		
<u>234</u>	28	1	$2,3 \times 10^4$	28 dan 1 <30
700	<u>125</u>	10	$1,3 \times 10^5$	$700 > 300:10 < 30$
TBUD	TBUD	<u>197</u>	$2,0 \times 10^6$	TBUD > 300

\*TBUD = Terlalu Banyak untuk Dihitung (TBUD > 300)

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			Standar Plate Count	Keterangan
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$		
<u>16</u>	1	0	$< 3,0 \times 10^3$ { $1,6 \times 10^3$ }	Hitung pengenceran $10^{-2}$

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  $\frac{1}{4}$  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			Standar Plate Count	Keterangan
TBUD	TBUD	<u>335</u>	$> 3,0 \times 10^6$ { $3,6 \times 10^3$ }	Hitung pengenceran $10^{-4}$
TBUD	<u>335</u>	20	$> 3,0 \times 10^5$	Hitung pengenceran $10^{-3}$

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 menghitungkan pengenceran. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$		
<u>293</u>	<u>41</u>	4	$1,9 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran karena $41000/29300 = 1,4 (<2)$
<u>140</u>	32	2	$1,4 \times 10^4$	Hitung pengenceran $10^{-2}$ karena $32000/14000 = 2,3 (>2)$

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

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$		
<u>175</u>	16	1	$1,9 \times 10^5$	Rata-rata pengenceran $10^{-2}$
<u>208</u>	17	0		
<u>138</u>	42	2	$1,5 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran $10^{-2}$ karena perbandingan antara pengenceran $10^{-3}$ dan $10^{-2}$ adalah 2,4 ( $>2$ )
<u>162</u>	43	4		
<u>290</u>	<u>36</u>	4	$3,1 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran $10^{-2}$ dan $10^{-3}$ karena perbandingan antara kedua pengenceran adalah 1,2 ( $<2$ )
<u>280</u>	<u>32</u>	1		
<u>291</u>	25	3	$3,0 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran $10^{-2}$ meskipun $305 > 300$
<u>305</u>	27	0		

## 2.2. Aplikasi Metode Plate Count untuk Uji Mikrobiologis Bahan Pangan

Ada beberapa cara untuk mengukur jumlah sel, antara lain dengan hitungan mikroskopik langsung (*direct microscopik count*), hitungan cawan (*platecount*), secara elektronik dengan bantuan alat Colony Counter (*Penghitungan Koloni*), dan *Most Probable Number* (MPN). Pada prinsipnya, jika sel hidup diinokulasikan pada agar maka sel mikroba akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat dilihat dengan mata. Jadi dengan metode ini hanya sel hidup saja yang dapat terhitung, selain itu jenis mikroba yang tumbuh dapat diketahui dan dihitung. Metode ini juga dapat digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroba yang tumbuh pada bahan tertentu berdasarkan koloni yang tumbuh.

## 2.3. Metode Most Probable Number (MPN)

Pada metode MPN media yang digunakan adalah medium cair di dalam tabung reaksi. Perhitungan MPN didasarkan pada jumlah tabung reaksi yang positif, yaitu mikroba yang tumbuh setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan atau terbentuknya gas dalam tabung Durham. Untuk setiap pengenceran pada umumnya menggunakan 3 atau 5 seri tabung, semakin banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi.

Metode MPN biasanya digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam sampel yang berbentuk cair yang berada di antara campuran mikroba lain, meskipun dapat juga digunakan untuk sampel padat. Untuk metode MPN, harus lebih dahulu membuat suspensi 1:10 dari

sampel tersebut, misalnya jika digunakan medium kaldu laktosa, adanya mikroba ditunjukkan dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham. Kelompok mikroba yang dapat dihitung dengan metode MPN juga bervariasi tergantung dari medium yang digunakan untuk pertumbuhan.

### Cara Menghitung MPN

Contoh : Dilakukan pengenceran secara desimal terhadap suatu bahan pangan. Kemudian sebanyak 1ml larutan dari masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam tabung berisi media Broth, dan setiap pengenceran menggunakan 3 seri tabung. Setelah inkubasi, tabung positif diamati, ditandai dengan timbulnya kekeruhan pada tabung. Misalnya pada pengenceran  $10^{-1}$  ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran  $10^{-2}$  dua tabung positif, pada pengenceran  $10^{-3}$  satu tabung positif. Maka kombinasinya menjadi 3, 2, 1. Nilai MPN kemudian dihitung dengan cara :

Kombinasi : 3,2,1

Nilai MPN (lihat tabel MPN 3 tabung) : 150

$$\begin{aligned} \text{MPN Count} &= \text{Nilai MPN} \times \frac{1}{\text{Pengenceran tabung yang di tengah}} \\ &= 150 \times \frac{1}{10^{-2}} \\ &= 150 \times 10^{-2} \end{aligned}$$

## 3. MATERI METODE

### 3.1. Materi

#### 3.1.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung durham, kapas, bunsen, korek api, cawan petri steril, pemanas elektrik, jarum ose, vortex, kertas pembungkus, pipet, masker, colony counter, inkubator 30-32°C, erlenmeyer, dan neraca.

#### 3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah aquades, alkohol, kultur *Bacillus cereus*, media NA cair, media *Lactose Broth*, air sumur (kloter A), air aquarium (kloter B), air bekas pencucian daging (kloter C), air bekas pencucian telur (kloter D), air es batu (kloter E), air got (kloter F), dan air tambak udang (kloter G).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Pengenceran Kultur

- Tambahkan kultur *Acetobacter xylinum* dengan 10 ml aquades yang sudah disterilkan dan pindahkan dalam tabung reaksi.
- Vortex tabung tersebut hingga diperoleh pengenceran  $10^0$ .
- Ambil 1 ml larutan tersebut kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril lalu divortex sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$  (Kelompok 1).
- Ambil 1 ml larutan dari pengenceran  $10^{-1}$  kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril lalu divortex sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$  (Kelompok 2).
- Lakukan pengenceran hingga didapatkan pengenceran  $10^{-6}$  (kelompok 6)

### 3.2.2. Metode Hitungan Cawan

#### 3.2.2.1. Metode *Pour Plate*

- Ambil 1 ml kultur *Acetobacter xylinum* pada masing-masing pengenceran, masukkan ke dalam cawan petri dan diputar-putar hingga merata.
- Tuang media NA yang sudah disterilkan dan diturunkan suhunya kedalam cawan lalu diputar-putar hingga merata.
- Biarkan media hingga memadat, kemudian bungkus kembali dengan kertas buram.
- Inkubasi media selama 2 hari dengan posisi terbalik.
- Amati dan hitung jumlah koloni per ml dengan rumus :

$$\text{Jumlah koloni per ml} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times 10$$

#### 3.2.2.2. Metode *Spread Plate*

- Tuang media NA steril ke dalam cawan petri dan biarkan hingga memadat.
- Ambil 0,1 ml kultur *Acetobacter xylinum* dari masing-masing pengenceran dan masukkan ke dalam cawan petri.
- Putar kultur cawan tersebut agar kultur merata, kemudian cawan dibungkus kembali dengan kertas buram dan inkubasikan selama 2 hari.
- Amati dan hitung jumlah koloni per ml nya menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah koloni per ml} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

### 3.2.2.3. Metode Most Probably Number (MPN)

- Siapkan media LB dalam 9 tabung reaksi dan diberi tabung durham.
- Pastikan tidak ada gelembung pada tabung durham, apabila ada gelembung, percobaan harus diulangi.
- Sterilisasi media tersebut dan turunkan suhunya.
- Tambahkan 1 ml sampel pada masing-masing tabung; 3 tabung pertama diisi dengan pengenceran  $10^{-1}$ , 3 tabung kedua diisi dengan pengenceran  $10^{-2}$  pada 3 tabung kedua, dan 3 tabung ketiga diisi dengan pengenceran  $10^{-3}$ .
- Inkubasikan tabung tersebut selama 2 hari dan amati keberadaan gelembung pada masing-masing tabung.
- Jika pada pengenceran  $10^{-1}$  tabung durham yang mengandung gelembung hanya 1 maka pada hasil pengamatan kolom  $10^{-1}$  ditulis 1. Jika pada pengenceran  $10^{-1}$  tabung durham yang mengandung gelembung hanya 2 maka pada hasil pengamatan kolom  $10^{-1}$  ditulis 2. Begitu seterusnya pada masing-masing pengenceran. Kemudian hasil urutan 3 angka yang tersusun dicocokkan dengan tabel nilai MPN untuk 3 seri tabung.

## 4. HASIL PENGAMATAN

### 4.1. Metode Hitungan Cawan

#### 4.1.1. *Pour Plate*

Tabel 1. *Pour Plate*

Kelompok	Pengenceran	Jumlah koloni/mL

#### 4.1.2. *Spread Plate*

Tabel 2. *Spread Plate*

Kelompok	Pengenceran	Jumlah koloni/mL

### 4.2. Metode Most Probable Number (MPN)

Tabel 3. MPN

Kelompok	Tabung Positif			MPN Number	MPN Count	Keterangan
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$			
						Positif : Negatif :

Tabel MPN per ml/gr mempergunakan 3 tabung masing-masing diinokulasi dengan 1ml contoh dari pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  (SII 0717-83)

Tabung Positif			M.P.N (A.P.M)	Tabung Positif			M.P.N (A.P.M)
1ml $10^{-1}$	1ml $10^{-2}$	1ml $10^{-3}$		1ml $10^{-1}$	1ml $10^{-2}$	1ml $10^{-3}$	
1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	1	3	2	1	0	15
0	0	2	6	2	1	1	20
0	0	3	9	2	1	2	27
0	1	0	3	2	1	3	34
0	1	1	6	2	2	0	21
0	1	2	9	2	2	1	28
0	1	3	12	2	2	2	35
0	2	0	6	2	2	3	42
0	2	1	9	2	3	0	29
0	2	2	12	2	3	1	36
0	2	3	16	2	3	2	44
0	3	0	9	2	3	3	53
0	3	1	13	2	0	0	9
0	3	2	16	2	0	1	14
0	3	3	19	2	0	2	20
1	0	0	4	2	0	3	26
1	0	1	7	3	0	0	23
1	0	2	11	3	0	1	39
1	0	3	15	3	0	2	64
1	1	0	7	3	0	3	95
1	1	1	11	3	1	0	43
1	1	3	19	3	1	1	75
1	2	0	11	3	1	2	120
1	2	1	15	3	1	3	160
1	2	2	20	3	2	0	93
1	2	3	24	3	2	1	150
1	3	0	16	3	2	2	210
1	3	1	20	3	2	3	290

# ISOLASI

## 1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah mengetahui manfaat dan cara melakukan isolasi, mengetahui cara melakukan pemindahan kultur mikrobial, mengetahui faktor-faktor dan ciri-ciri pertumbuhan mikrobial, mengetahui bentuk-bentuk koloni mikrobial, mengetahui ciri genus dari mikrobial yang diisolasi, mengetahui penyebab dan jenis mikrobial yang mengkontaminasi, mengetahui mikroorganisme yang tumbuh pada nasi basi, sayuran busuk, buah busuk, air fermentasi sayur asin, santan basi dan susu basi, mengetahui kenampakan mikroorganisme pada media dan bahan pangan.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

Untuk mempelajari sifat dari masing-masing mikrobial termasuk sifat pertumbuhan, morfologi, dan fisiologinya, masing-masing mikrobial tersebut harus dipisahkan antara satu dengan yang lainnya, sehingga dapat terbentuk suatu kultur murni. Kultur murni adalah suatu biakan yang terdiri dari sel-sel dari suatu spesies atau satu galur mikrobial. Isolasi adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan mikroorganisme dalam medium menjadi sel yang individu yang disiapkan untuk mendapatkan spesies tunggal. Isolasi dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi atau campuran sel pada suatu media padat, yang kemudian menginkubasinya, sehingga setiap sel akan tumbuh membentuk suatu koloni (berkelompok/menggerombol).

### 2.1. Cara Aseptik

Cara aseptik harus dilakukan dalam setiap pekerjaan mikrobiologi. Aseptik merupakan suatu kondisi dimana terjadinya kontaminasi oleh mikrobial lain yang tidak dikehendaki dicegah semaksimal mungkin, sedangkan mikrobial yang dikehendaki dipertahankan semaksimal mungkin. Untuk memindahkan sel-sel mikrobial dari satu medium ke medium yang lainnya, digunakan suatu kawat yang diberi batang pemegang di bagian pangkalnya, yang disebut jarum ose atau *loop*. Jarum ose harus dipijarkan sampai berwarna merah bata sesaat sebelum dan sesudah digunakan. Dengan pemijaran, bagian dari jarum ose akan menjadi steril untuk sementara karena mikrobial yang ada pada permukaan jarum ose akan mati. Pemijaran pada jarum ose harus rata pada semua permukaannya dari mulai ujung sampai dengan pangkal dekat

tangkai pemegang, dengan nyala merah yang bersamaan. Sebelum dilakukan untuk inolasi, jarum ose yang telah memijar/menyala harus didinginkan dalam waktu beberapa detik untuk mencegah kematian mikrobia yang akan diinokulasikan dalam percobaan.

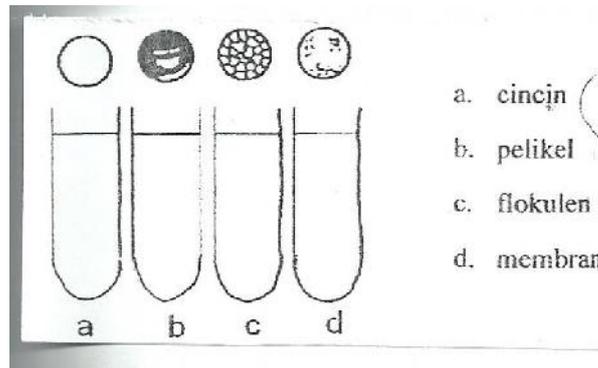
Sebelum melakukan pemindahan kultur, meja yang digunakan harus disemprot dengan alkohol dan dilap dengan *tissue* bersih. Termasuk tangan harus diusap dengan alkohol. Dalam melakukan pemindahan kultur, tabung reaksi harus dipegang dengan tangan kiri, kemudian untuk membuka tutup tabung (berupa kapas) dilakukan dengan tangan kanan dengan cara menjepit tutup tersebut diantara jari-jari tangan kanan. Tutup tabung sangat tidak diperbolehkan untuk diletakkan di atas meja, karena hal ini akan mengakibatkan kontaminasi pada tutup dan mulut tabung. Segera setelah tutup tabung dibuka, mulut dan leher tabung harus segera dipanaskan, namun pemanasan tidak boleh terlalu lama karena akan mengakibatkan kematian pada kultur mikrobia. Sebaiknya, dalam melakukan pemindahan kultur, semua peralatan yang digunakan harus selalu berada dekat dengan api untuk menghindari kontaminasi pada semua alat yang digunakan. Kemudian, kultur mikrobia diambil dengan jarum ose yang telah dipijarkan. Setelah selesai, mulut dan leher tabung dipanaskan kembali dan segera ditutup. Setelah jarum ose digunakan, jarum ose dipijarkan lagi untuk membunuh sisa kultur mikrobia yang menempel pada jarum ose. Pekerjaan secara aseptis ini harus dilakukan dengan hati-hati namun tetap secepat mungkin untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

## **2.2. Medium Cair**

Cara yang paling sederhana untuk menyimpan suatu kultur mikrobia adalah dengan menumbuhkannya di dalam suatu medium cair, dengan suhu dan waktu inkubasi tertentu tergantung pada jenis mikrobianya. Di dalam medium cair, mikrobia akan tumbuh dalam waktu 24-48 jam. Pertumbuhan mikrobia dalam suatu medium cair dapat terlihat dalam berbagai bentuk, yaitu:

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

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobia pada permukaan dapat dilihat pada Gambar 1.



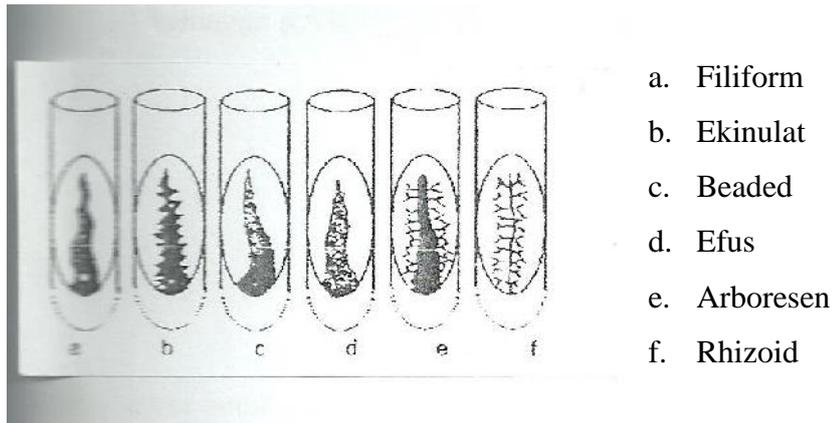
Gambar 1. Pertumbuhan mikrobia pada permukaan

Kultur cair dapat disimpan dengan cara dibekukan atau dikeringkan, sehingga sel-sel mikrobia berada dalam keadaan *dormant*, yaitu keadaan dimana mikrobia dalam keadaan tidak mati namun tidak dapat tumbuh dan berkembangbiak. Karena banyak sel mikrobia yang tidak tahan terhadap pembekuan atau pengeringan, maka cara yang paling baik dalam menyimpan kultur mikrobia dalam jangka waktu yang lama adalah dengan melakukan liofilisasi (*freeze drying*). *Freeze drying* adalah suatu cara untuk membekukan kultur dengan campuran es kering (*dry ice*) dan alkohol, kemudian dikeringkan secara vakum. Dengan cara ini kultur mikrobia dapat disimpan selama bertahun-tahun tanpa kehilangan keaktifannya.

### 2.3. Medium Agar (Medium Padat)

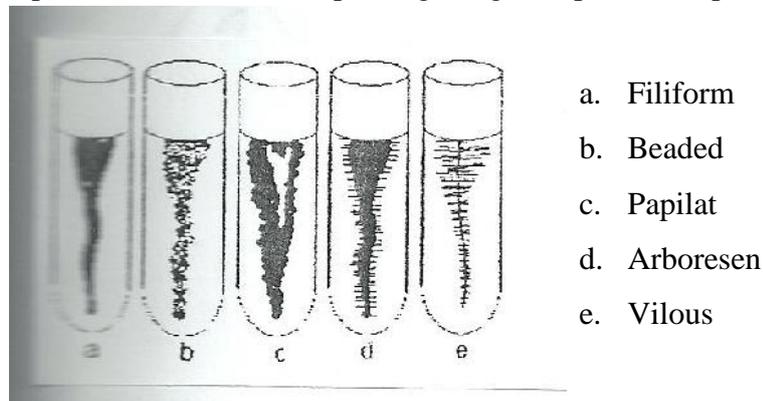
Agar miring merupakan salah satu bentuk medium padat yang dapat digunakan untuk membiakkan mikrobia, terutama yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif. Ciri-ciri kultur berupa pembentukan warna dan bentuk pertumbuhan dapat diamati pada agar miring. Inokulasi mikrobia pada agar miring dapat dilakukan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

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobia pada agar miring dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan mikrobia pada agar miring

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobia pada agar tegak dapat dilihat pada Gambar 3.

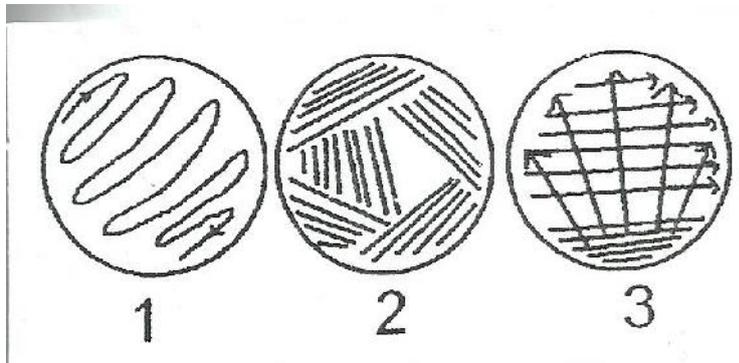


Gambar 3. Pertumbuhan mikrobia pada agar tegak

#### 2.4. Metode Pemurnian atau Purifikasi pada Agar Cawan

Kultur mikrobia dapat dibiakkan dengan cara menginokulasikan pada agar cawan, kemudian penyebaran kultur di atas agar dilakukan dengan menggunakan *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 dilihat oleh mata. Pada bagian agar tempat dimulainya goresan populasi mikrobia biasanya terlalu pekat sehingga koloni akan berkumpul menjadi satu. Dengan semakin banyaknya goresan atau penyebaran yang dilakukan, maka akan semakin sedikit sel-sel 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 pembiakkan yang diulangi beberapa kali terhadap satu koloni yang tumbuh terpisah pada agar cawan akan

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. Beberapa cara untuk menggoreskan kultur pada agar cawan, dapat dilihat pada Gambar 4.

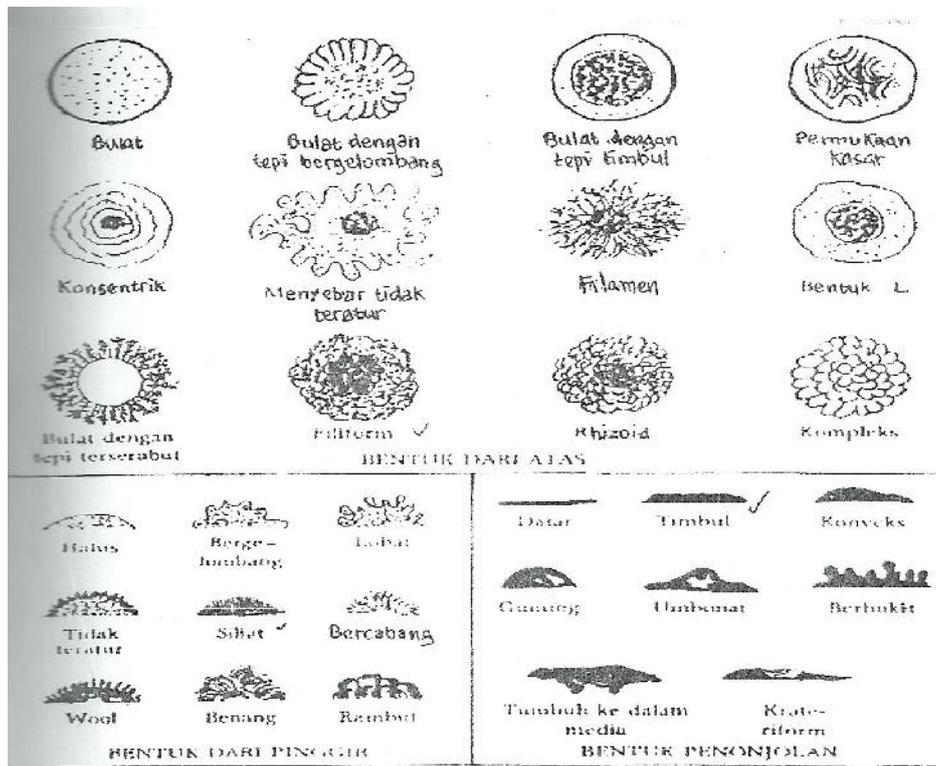


1. Goresan Langsung
2. Goresan Kuadran
3. Goresan Radian

Gambar 4. Cara menggoreskan kultur

Pada masing-masing cara, *loop* harus selalu dipijarkan dan didinginkan segera sebelum melakukan goresan berikutnya. Sebagai contoh pada cara goresan kuadran, diantara goresan pertama dan kedua, kedua dan ketiga, serta ketiga dan keempat, *loop* harus dipijarkan dan kemudian didinginkan dengan cara memasukkan pada bagian pinggir agar cawan. Koloni yang tumbuh pada agar cawan dapat dibedakan dalam besar, warna, penampakkannya apakah keruh (*opaque*) atau bening, bentuk penyebarannya, bentuk kemunculannya diatas agar, dan bentuk permukaan.

Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan

### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Materi

##### 3.1.1. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam praktikum ini antara lain masker, sarung tangan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, *laminar airflow*, kapas, bunsen, korek api, dan label.

##### 3.1.2. Bahan

###### 3.1.2.1. Isolasi

Bahan-bahan yang digunakan dalam pengisolasian kultur antara lain media NA steril, alkohol, nasi basi (kelompok 1), sayuran busuk (kelompok 2), buah busuk (kelompok 3), air fermentasi sayur asin (kelompok 4), santan basi (kelompok 5) dan susu basi (kelompok 6).

###### 3.1.2.2. Pemindahan Kultur

Bahan-bahan yang digunakan dalam pemindahan kultur antara lain media NA steril, media PDA steril, media MRSA steril, alkohol, kultur *Acetobacter xylinum*, kultur *Rhizopus oligosporus* dan kultur *Streptococcus thermophilus*.

Keterangan: Kelompok 1 dan 2 → NA → *Acetobacter xylinum*

Kelompok 3 dan 4 → PDA → *Rhizopus oligosporus*

Kelompok 5 dan 6 → MRSA → *Streptococcus thermophilus*

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Isolasi

- Media NA steril dibiarkan memadat dengan posisi miring, untuk memperoleh agar miring.
- Meja dilap dengan alkohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alkohol terlebih dahulu.
- Jarum ose dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.
- Lalu tabung reaksi yang berisi media steril dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung).
- Setelah itu mulut tabung reaksi dipanaskan sebentar diatas api.
- Kemudian bagian sampel yang busuk diambil sedikit dengan jarum ose.
- Lalu digoreskan secara zig-zag pada permukaan agar miring.

- Mulut dan tutup tabung reaksi dipanaskan lagi dan ditutup, jarum ose juga dipijarkan kembali.
- Kemudian diinkubasi selama 2 hari, pertumbuhan yang terjadi diamati, digambar, dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

### 3.2.2. Pemindahan Kultur

- Media yang akan digunakan untuk mengkulturkan mikroba disiapkan (media NA, media PDA dan media MRSA).
- Meja yang digunakan untuk praktikum dibersihkan dengan alcohol, kemudian tangan dibersihkan juga dengan alcohol.
- Kemudian disiapkan tabung reaksi yang berisi kultur mikroba (sesuai kelompok).
- Jarum ose dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.
- Tabung reaksi yang berisi kultur mikrobial dipegang dengan menggunakan tangan kiri. Tutup tabung dibuka secara bergantian (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakkan di atas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Lalu mulut tabung dipanaskan sebentar dengan api bunsen.
- Kultur mikrobial digores dengan menggunakan jarum ose (**dengan hati-hati tanpa merusak media agar**).
- Mulut tabung dan tutupnya dipanaskan sebentar dan ditutup kembali.
- Media yang akan digunakan untuk membiakkan mikrobial diambil (sesuai kelompok). Tutup dibuka dan mulut tabung dipanaskan sebentar. Untuk media agar miring dilakukan penggosokan secara *zig-zag* pada permukaan media agar miring.
- Mulut kedua tabung reaksi media dipanaskan lagi lalu ditutup.
- Jarum ose juga dipanaskan hingga berwarna merah.
- Inkubasi selama 2 hari. Amati bentuk pertumbuhannya, digambar, dan diberi keterangan meliputi warna dan bentuk pertumbuhannya.

### 3.2.3. Inokulasi Mikroba pada Agar Tegak

- Media semi padat steril (NB + agar) dan sampel hasil isolasi disiapkan
- Meja dilap dengan alcohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alcohol terlebih dahulu.
- Jarum N (jarum ose lurus) dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.

- Lalu tabung reaksi yang berisi sampel hasil isolasi dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Mulut tabung dibakar sebentar.
- Jarum N dioleskan pada isolat mikrobial, mulut tabung dibakar dan ditutup kembali.
- Lalu tabung reaksi yang berisi media semi padat steril dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Setelah itu mulut tabung reaksi dipanaskan sebentar diatas api.
- Jarum N yang sudah dioleskan dengan isolat, ditusukkan pada media semi padat tersebut, kemudian mulut tabung dibakar lalu ditutup dan jarum N pun dipijarkan kembali.
- Kemudian diinkubasi selama 2 hari, pertumbuhan yang terjadi diamati, digambar, dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

#### 3.2.4. Pemurnian Mikroba

- Sampel hasil isolasi disiapkan.
- Meja dilap dengan alkohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alkohol terlebih dahulu.
- Media NA dituangkan dalam cawan petri secara aseptis, kemudian dibiarkan memadat.
- Jarum ose dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.
- Lalu tabung reaksi yang berisi sampel hasil isolasi dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Mulut tabung dibakar sebentar.
- Jarum ose steril tersebut dioleskan pada isolat mikrobial, kemudian bakar kembali mulut tabung, lalu ditutup.
- Jarum ose digoreskan pada media yang telah memadat dicawan petri dengan menggunakan teknik penggoresan kuadran (secara aseptis).
- Cawan petri dibungkus kembali dengan kertas buram dan diinkubasi selama 2 hari, diamati pertumbuhannya, digambar dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

#### 4. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Isolasi

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna

Tabel 2. Pemindahan Kultur

Kel	Mikroorganisme	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna

Tabel 3. Inokulasi Mikroba pada Agar Tegak

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan

Tabel 4. Pemurnian Mikroba

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna