

Lampiran 1.

1. Perhitungan Total Bakteri

- a. Sampel ditimbang sejumlah 25 gram, dimasukkan ke dalam wadah steril lalu dihancurkan menggunakan blender yang telah disterilkan, kemudian sampel ditimbang sejumlah 1 gram sampel bentuk padat dan 1 ml untuk sampel bentuk cair.
- b. Memasukkan kedalam larutan pengencer 10^{-1} berisi 9 ml aquades, kemudian dilakukan homogenisasi. Pipetkan sebanyak 1 ml secara aseptik kedalam larutan pengencer 10^{-2} dan seterusnya hingga pengenceran yang dikehendaki.
- c. Media yang digunakan yaitu *Nutrient Agar* (NA).
- d. Memasukkan media kedalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan disterilisasi selama 15 menit.

1.2 Inokulasi Biakan

- a. Sampel hasil pengenceran 10 sampai 14 dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian dimasukkan media.
- b. Cawan petri digoyang – goyang dengan hati – hati (putar dan goyangkan kedepan dan kebelakang serta kekanan dan kekiri) hingga sampel tercampur rata dengan media.
- c. Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- d. Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering (inkubator) dan inkubasikan pada suhu $35 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 jam.
- e. Mencatatkan pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 30 – 300 koloni setelah 24 jam.
- f. Menghitung angka lempeng total (SNI 01 – 2897 – 1992).

2. Isolasi Bakteri

- a. Media yang digunakan yaitu nutrient agar (NA).
- b. Memasukkan media kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian disterilisasi selama 15 menit.
- c. Setelah proses sterilisasi selesai, tabung – tabung reaksi tersebut didiamkan sampai beku dengan posisi miring (Agar miring).
- d. Penanaman biakan dilakukan dengan metode cawan gores.
- e. Memasukkan biakan satu per satu ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi agar miring menggunakan jarum ose, secara aseptik.
- f. Setelah itu memasukkan ke dalam lemari pengering (inkubator) dan inkubasikan pada suhu $35 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 jam.

3. Pengecatan Gram

- a. Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol.
- b. Menggambar bulatan di bawah gelas benda diameter 1 cm dengan spidol, kemudian gelas benda dibalik.
- c. Menetesi permukaan gelas benda dengan 1 tetes aquades di dalam bulatan. Biakan bakteri diambil dengan ose kemudian dicampur dan diratakan dengan aquades pada seluruh area bulatan.
- d. Mengeringkan sampai membentuk noda kemudian difiksasi selama 1 – 2 detik. Ditetes 2 – 3 tetes cat utama violet kristal dan dibiarkan selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan.
- e. Menetes dengan beberapa tetes larutan iodin, dibiarkan selama 1 menit.
- f. Mencuci dengan ethanol 95 % sampai ethanol bekas cucian tidak berwarna (30 detik). Cuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan.
- g. Memberi beberapa tetes cat penutup safranin dibiarkan selama 2 menit. Cuci dengan air mengalir, dikeringkan kemudian tutup permukaan dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop.

Catatan : adanya gram negatif ditandai dengan koloni berwarna merah muda dan gram positif ditandai dengan warna biru gelap atau ungu.

4. Pewarnaan Spora

- a. Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkool.
- b. Menggambar bulatan di bawah gelas benda diameter 1 cm dengan spidol, kemudian gelas benda dibalik.
- c. Menetesи permukaan gelas benda dengan 1 tetes aquades di dalam bulatan. Biakan bakteri diambil dengan ose kemudian dicampur dan diratakan dengan aquades pada seluruh area bulatan.
- d. Setelah preparat ulas difiksasi panas, kemudian diberi warna hijau malakid.
- e. Preparat ulas dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit. Panas mengembangkan lapisan luar spora sehingga zat warna hijau malakid dapat masuk ke dalam spora.
- f. Setelah dingin warna hijau terperangkap di dalam spora. Preparat didinginkan selama 1 menit, kemudian diberi zat warna safranin selama 60 detik. Amati di bawah mikroskop.

Catatan : Endospora akan tampak berwarna hijau sedangkan sel vegetatifnya berwarna merah muda (Hadioetomo, 1993).

6. Pewarnaan Asam

- a. Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol.
- b. Menggambar bulatan di bawah gelas benda diameter 1 cm dengan spidol, kemudian gelas benda dibalik.
- c. Menetesи permukaan gelas benda dengan 1 tetes aquades di dalam bulatan. Mengambil biakan bakteri dengan ose kemudian dicampur dan diratakan dengan aquades pada seluruh area bulatan.
- d. Setelah dilakukan fiksasi, memberikan karbol fuksin pada olesan biakkan dan dibiarkan selama 5 menit.
- e. Membuang kelebihan karbol fuksin kemudian bilas dengan air.
- f. Melakukan pemucatan dengan alkohol asamsampai tampak warna merah muda pucat selama 15 detik.
- g. Kemudian dibilas dengan air.

- h. Memberikan metilen biru selama 2 menit dan kemudian bilas dengan air.
- i. Kemudian mengamati di bawah mikroskop.

Catatan : mikroorganisme tahan asam akan tampak warna merah, sedangkan tidak tahan asam akan tampak warna biru (Hadioetomo, 1985).

7. Fermentasi Karbohidrat

- a. Mengamati biakkan dalam tabung durham berisi kaldu glukosa, laktosa, sukrosa, dextrosa dengan indikator merah fenol.

- b. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.

Catatan : Bila warna medium berubah menjadi kuning, artinya bakteri tersebut membentuk asam. Bila tabung kecil yang diletakkan terbalik di dalam tabung Durham itu terdapat gelembung artinya dari fermentasi tersebut terbentuk gas (Hadioetomo, 1993).

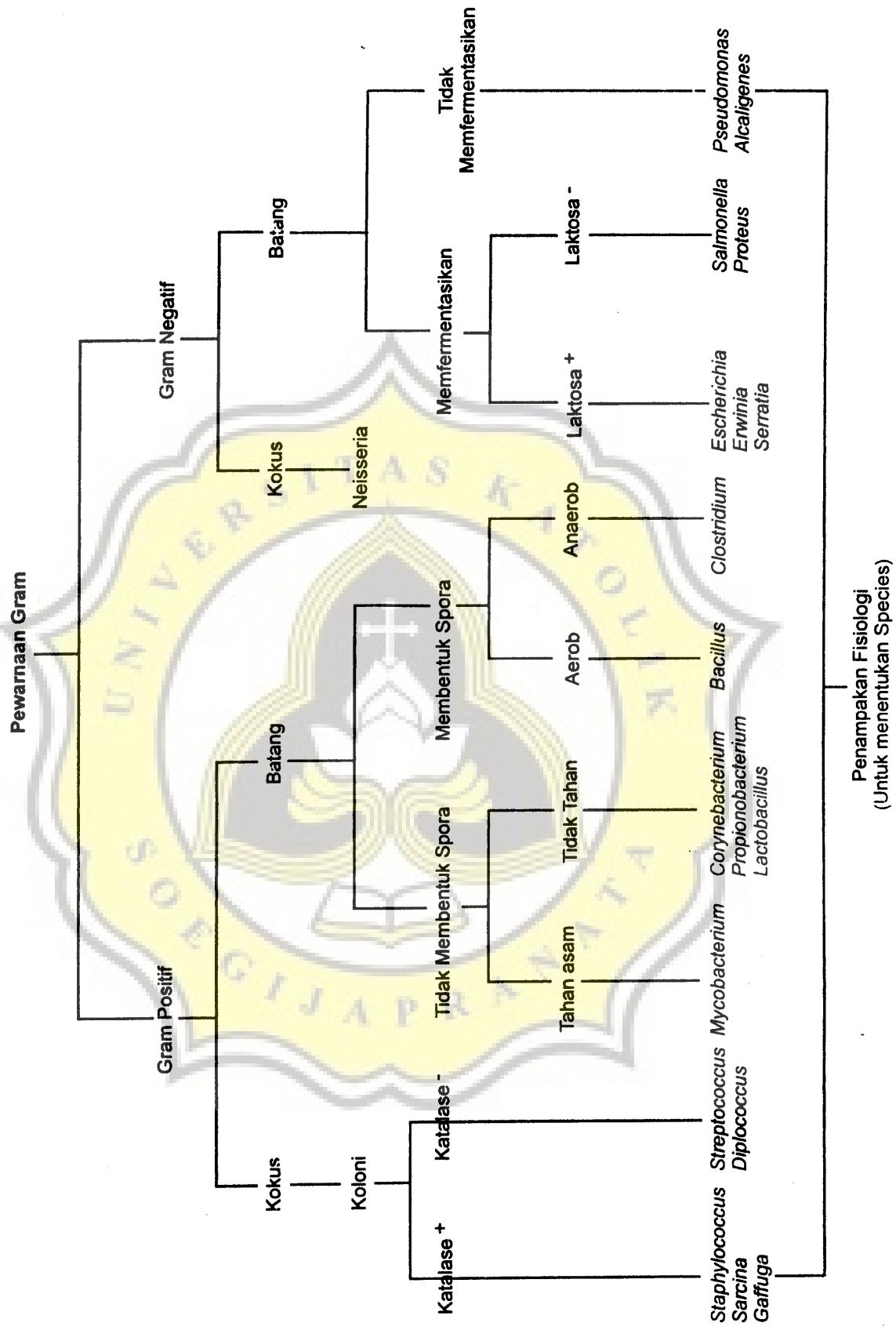
8. Pengujian Katalase

- a. Membersihkan kaca preparat dengan alkohol.
- b. Kemudian diberi 2 tetes larutan *hydrogen peroksida* 3%.
- c. Memindahkan sedikit biakkan dengan jarum inokulasi kemudian diratakan.

Catatan : Bakteri yang bersifat katalase positif ditandai oleh terbentuknya gelembung – gelembung oksigen (udara) yang menandakan ada enzim katalase yang merubah *hydrogen peroksida* menjadi O₂ dan H₂O (Hadioetomo, 1993).

Lampiran 2

IDENTIFIKASI BAKTERI



Lampiran 3 Hasil TPC (Total Plate Count) Sampel Makanan Jajanan

Sampel	Ulangan*	Jmlh Koloni (CFU/g)
Teh manis	1	52×10^{13}
	2	49×10^{13}
	3	47×10^{13}
Rata - Rata		49×10^{13}
Molen	1	41×10^{12}
	2	44×10^{12}
	3	42×10^{12}
Rata - Rata		42×10^{12}
Rames	1	46×10^{14}
	2	43×10^{14}
	3	47×10^{14}
Rata - Rata		45×10^{14}
Soto	1	46×10^{14}
	2	42×10^{14}
	3	44×10^{14}
Rata - Rata		44×10^{14}
Bakso	1	41×10^{14}
	2	39×10^{14}
	3	43×10^{14}
Rata - Rata		43×10^{14}

* Pengambilan sampel dilakukan pada minggu berbeda

Lampiran 4 Penghitungan Gram dan Bentuk Koloni Bakteri

Sampel	Ulangan	Pewarnaan Gram		Bentuk Koloni Bakteri			
		Gram (+)		Gram (-)			
		Gram (+)	Gram (-)	Coccus	Bacillus	Coccus	Bacillus
Teh manis	1	22	30	2	20	15	15
	2	22	27	15	7	13	14
	3	20	27	13	7	8	19
Rata - Rata Teh manis :		21	28	10	11	12	16
Molen	1	15	26	7	8	11	15
	2	18	26	9	9	7	19
	3	19	23	11	8	3	20
Rata - Rata Molen :		17	25	9	8	7	18
Rames	1	23	23	12	11	9	14
	2	18	25	8	10	8	17
	3	23	24	7	16	5	19
Rata - Rata Rames :		21	24	9	12	7	17
Soto	1	25	21	12	13	7	14
	2	23	19	11	12	5	14
	3	20	24	10	10	6	18
Rata - Rata Soto :		23	21	11	12	6	15
Bakso	1	24	17	14	10	5	12
	2	20	19	14	6	6	13
	3	28	15	16	12	6	9
Rata - Rata Bakso :		24	17	15	9	6	11

Lampiran 5 Kepadatan Bakteri

Sampel	Jenis Bakteri	Kepadatan Tiap Jenis Bakteri			
		(CFU/g)			
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata - Rata
Teh Manis	Bacillus sp.	2	3	5	3
	Clostridium sp.	10	0	0	3
	Streptococcus sp.	0	4	6	3
	Staphylococcus sp.	2	11	7	7
	Lactobacillus sp.	8	4	2	5
	Mycobacterium sp.	0	0	0	0
	Corynebacterium	0	0	0	0
	Escherichia sp.	13	6	8	9
	Pseudomonas sp.	2	8	9	6
	Salmonella sp.	0	0	0	0
	Neisseria sp.	15	13	10	13
Kepadatan Total Bakteri (CFU/g) $\times 10^{-13}$		52	49	47	49
Molen	Bacillus sp.	4	5	3	4
	Clostridium sp.	2	1	2	2
	Streptococcus sp.	0	0	0	0
	Staphylococcus sp.	7	9	11	9
	Lactobacillus sp.	0	0	0	0
	Mycobacterium sp.	0	0	0	0
	Corynebacterium sp	2	3	3	3
	Escherichia sp.	10	12	15	12
	Pseudomonas sp.	5	7	5	6
	Salmonella sp.	0	0	0	0
	Neisseria sp.	11	7	3	7
Kepadatan Total Bakteri (CFU/g) $\times 10^{-12}$		41	44	42	42
Rames	Bacillus sp.	5	6	8	6
	Clostridium sp.	4	3	5	4
	Streptococcus sp.	0	0	3	1
	Staphylococcus sp.	12	8	4	8
	Lactobacillus sp.	2	1	3	2
	Mycobacterium sp.	0	0	0	0
	Corynebacterium sp	0	0	0	0
	Escherichia sp.	8	12	15	12
	Pseudomonas sp.	6	5	4	5
	Salmonella sp.	0	0	0	0
	Neisseria sp.	9	8	5	7
Kepadatan Total Bakteri (CFU/g) $\times 10^{-14}$		46	43	47	46

Lanjutan Lampiran 5

		4	5	3	4
Soto	Bacillus sp.	4	5	3	4
	Clostridium sp.	0	4	2	2
	Streptococcus sp.	4	7	4	5
	Staphylococcus sp.	8	4	6	6
	Lactobacillus sp.	6	3	5	5
	Mycobacterium sp.	3	0	0	1
	Corynebacterium sp	0	0	0	0
	Escherichia sp.	10	12	13	12
	Pseudomonas sp.	4	2	5	4
	Salmonella sp.	0	0	0	0
	Neisseria sp.	7	5	6	6
Kepadatan Total Bakteri (CFU/g) $\times 10^{-14}$		46	42	44	44
Bakso	Bacillus sp.	7	2	5	5
	Clostridium sp.	0	0	0	0
	Streptococcus sp.	5	5	9	6
	Staphylococcus sp.	9	9	7	8
	Lactobacillus sp.	0	0	0	0
	Mycobacterium sp.	0	0	0	0
	Corynebacterium sp	3	4	7	5
	Escherichia sp.	7	8	5	7
	Pseudomonas sp.	3	3	2	3
	Salmonella sp.	2	2	2	2
	Neisseria sp.	5	6	6	6
Kepadatan Total Bakteri (CFU/g) $\times 10^{-14}$		41	39	43	41

Lampiran 6. Ciri – ciri Bakteri pada Makanan Jajanan

1. *Escherichia sp* :

- Termasuk gram negatif
- Ada dalam bentuk single maupun berpasangan
- Mempunyai permukaan yang halus dan basah
- Bentuk sel batang pendek
- Berwarna agak kelabu dengan permukaan yang licin

2. *Bacillus sp* :

- Bentuk seperti rantai dengan ukuran yang panjang dan lurus
- Bentuk sel batang
- Gram positif
- Ada dalam bentuk single maupun berpasangan
- Memiliki endospora yang berbentuk oval
- Berwarna kuning

3. *Pseudomonas sp* :

- Termasuk gram negatif
- Berwarna hijau
- Bentuk sel batang pendek
- Tidak berspora
- Berflagela motil
- Menyebabkan perlendirian pada makanan

4. *Staphylococcus sp* :

- Termasuk gram positif
- Berbentuk bulat
- Tunggal, berpasangan, tetrad atau berpasangan seperti anggur
- Memproduksi pigmen berwarna kuning – orange
- Anaerobik fakultatif

5. *Streptococcus sp* :

- Bentuk bulat
- Termasuk gram positif
- Sifat homofermentatif
- Hidup secara berpasangan, membentuk rantai panjang atau pendek

6. *Salmonella sp* :

- Termasuk gram negatif
- Berbentuk batang
- Mengfermentasi laktosa negatif
- Anaerobik fakultatif
- Tidak berspora

7. *Lactobacillus sp* :

- Termasuk gram negatif
- Katalase negatif
- Bentuk batang yang panjang
- Anaerobik fakultatif
- Tidak berspora
- Tidak tahan asam

8. *Clostridium sp* :

- Bersifat anaerobik sampai mikroaerofilik
- Katalase negatif
- Membentuk spora
- Termasuk gram positif
- Berbentuk batang

9. *Corynebacterium sp* :

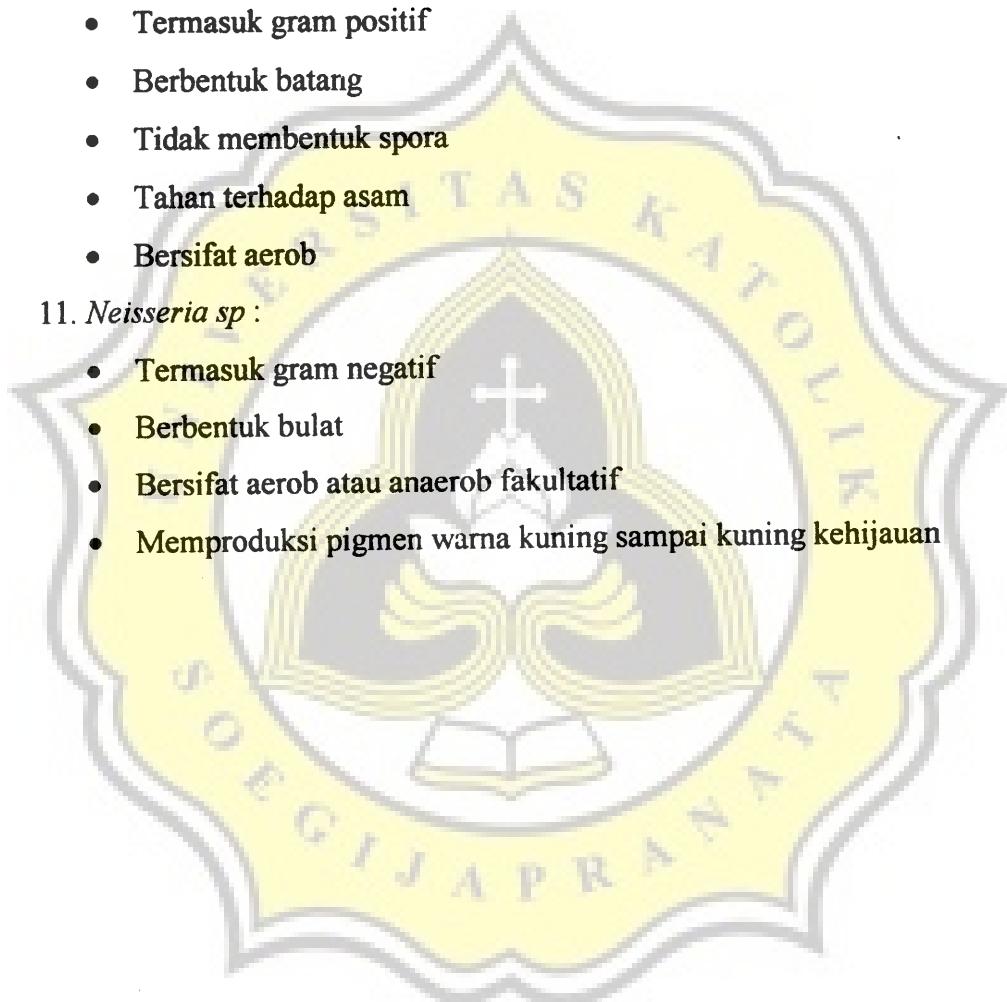
- Termasuk gram positif
- Katalase positif
- Berbentuk batang
- Tidak tahan asam
- Tidak berspora

10. *Mycobacterium sp* :

- Termasuk gram positif
- Berbentuk batang
- Tidak membentuk spora
- Tahan terhadap asam
- Bersifat aerob

11. *Neisseria sp* :

- Termasuk gram negatif
- Berbentuk bulat
- Bersifat aerob atau anaerob fakultatif
- Memproduksi pigmen warna kuning sampai kuning kehijauan



Lampiran 7. Inventori Makanan Jajanan Hasil Survei Pendahuluan

Jenis Makanan	No	Nama Makanan
Makanan Pokok	1	Nasi Rames
	2	Nasi Soto
	3	Bakso
	4	Mi Ayam
	5	Sate Ayam / Kambing
Kudapan/Snack	1	Molen
	2	Batagor
	3	Bakwan/Badak
	4	Pisang Goreng
	5	Tahu isi
Minuman	1	Teh Manis
	2	Es Teh
	3	Jeruk
	4	Es Jeruk
	5	Es Campur