



PENUNTUN PRAKTIKUM TERPADU

MIKROBIOLOGI HASIL PERTANIAN

2022

Dr. Aswita Emmawati, S.TP., M.Si

Marwati, S.TP., M.P

Maghfirotin Marta Banin, S.Pi., M.Sc

Yudha Agus Prayitno, S.TP., M.P

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas Pertanian

Universitas Mulawarman

DAFTAR ISI

Contents

DAFTAR ISI	1
DAFTAR GAMBAR	3
DAFTAR TABEL	4
Acara 1. Perencanaan Proyek Praktikum	5
A. Pendahuluan	5
B. Tujuan	5
C. Prosedur Pelaksanaan	5
Acara 2. Presentasi Proposal	7
A. Pendahuluan	7
B. Tujuan	7
C. Prosedur Pelaksanaan	7
Acara 3. Pengenalan Alat di Laboratorium Mikrobiologi dan Sterilisasi	9
A. Pendahuluan	9
B. Tujuan	16
C. Prosedur Pelaksanaan	16
Acara 4. Fermentasi Makanan	18
A. Pendahuluan	18
B. Tujuan	19
C. Prosedur Pelaksanaan	19
Sistematika Modul	19
Acara 5. Pembuatan Media dan Sterilisasi	20
A. Pendahuluan	20
Media	20
B. Tujuan	22
C. Prosedur Pelaksanaan	23
Acara 6. Penentuan Jumlah Mikroorganisme	25
A. Pendahuluan	25
B. Tujuan	26
C. Prosedur Pelaksanaan	27
Acara 7. Isolasi Mikroba	33

A. Pendahuluan	33
B. Tujuan	33
C. Prosedur Pelaksanaan	33
Acara 8. Morfologi Bakteri	37
A. Pendahuluan	37
B. Tujuan	37
C. Prosedur Pelaksanaan	37
Acara 9. Pengaruh Faktor Intrinsik dan Ekstrinsik Terhadap Pertumbuhan Mikroba.....	39
A. Pendahuluan	39
B. Tujuan	39
C. Prosedur Pelaksanaan	39
Hasil Pengamatan	41
Acara 10. Uji Koliform	42
A. Pendahuluan	42
B. Tujuan	42
C. Prosedur Pelaksanaan	43
Acara 11. Sanitasi dan Hygiene Pengolahan	46
A. Pendahuluan	46
B. Tujuan	46
C. Prosedur Pelaksanaan	46
Acara 12. Aktifitas Antimikroba	49
A. Pendahuluan	49
B. Tujuan	49
C. Prosedur Pelaksanaan	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Preparasi sampel berupa padatan menggunakan mortar	27
Gambar 2 Teknik pengenceran bertingkat dan penanaman pada media	28
Gambar 3 Teknik Pour Plate	29
Gambar 4 Teknik Spread plate.....	30
Gambar 5 Streak PlateMethod secara Goresan Sinambung	34
Gambar 6 Streak Plate Method secara Goresan T	34
Gambar 7 Streak PlateMethod dengan lebih banyak Sektor	34
Gambar 8 Contoh Hasil Isolasi Streak PlateMethod	35
Gambar 9 Pour plate method	36
Gambar 10 Biakan agar miring dan agar tegak	36
Gambar 11 Skema pemupukan untuk uji NPN koliform.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Beberapa peralatan yang digunakan di laboratorium Mikrobiologi	9
Tabel 2 Mikroorganisme dalam Pengolahan Makanan Fermentasi	18
Tabel 3 Mikroorganisme dalam Pengolahan Makanan Fermentasi	Error! Bookmark not defined.
Tabel 4 Jumlah koloni mikroba pada sampel Percobaan	32
Tabel 5 Nilai MPN (Most Probable Number) untuk seri 3 tabung.....	45
Tabel 6 Densitas Mikroba Pada Ruangan.....	48
Tabel 7 Status Kebersihan Tangan Pekerja Pengolahan Makanan	48

Acara I. Perencanaan Proyek Praktikum

A. Pendahuluan

Setiap kegiatan yang tidak terencana dapat berakhir pada kegagalan atau kesimpulan yang tidak sesuai. Oleh sebab itu dalam setiap langkah harus dilakukan perencanaan. Perencanaan dalam penelitian dikenal dengan sebutan proposal.

Praktikum Mikrobiologi Hasil Pertanian sejak dari awal dirancang untuk menjadi suatu proyek penelitian (project based). Dalam praktikum, mahasiswa akan membuat produk fermentasi, melakukan serangkaian uji mikrobiologis, melakukan isolasi dan karakterisasi mikroorganisme asal produk fermentasi, menganalisis faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme pada produk, menguji sanitasi dan keamanan produk. Agar kegiatan praktikum dapat memenuhi capaian pembelajaran dan tujuan dalam setiap acara, maka diperlukan perencanaan dalam bentuk proposal proyek praktikum.

Dalam proposal akan terkandung latar belakang mengapa dilakukan penelitian tersebut, tujuan yang dikehendaki atau yang akan dicapai, hipotesis sebagai acuan dalam membuat metode, metode penelitian (atau praktikum) rencana analisis data.

B. Tujuan

Mampu membuat proposal proyek praktikum dengan benar

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Peserta praktikum dibagi dalam kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 5 – 6 mahasiswa dan dibimbing oleh satu orang dosen/asisten praktikum.
2. Tiap kelompok mendiskusikan produk fermentasi yang akan dibuat serta factor-faktor yang akan diteliti sebagai perlakuan. Dosen/asisten berperan mengarahkan jalannya diskusi (bukan mengintervensi atau menentukan). Setelah factor ditentukan, maka dibuatlah proposal
3. Pembuatan proposal. Dalam proposal harus terdapat:
 - a. Judul: misal “Pengaruh penggunaan garam beryodium dan non yodium pada fermentasi mandai terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat”
 - b. Pendahuluan berisi latar belakang, rumusan permasalahan dan tujuan. Latar belakang, memuat tentang mandai dan peran garam dan iodium bagi pertumbuhan mikroba dan dalam fermentasi mandai.
 - c. Metodologi berisikan alat, bahan, rancangan penelitian, dan prosedur. Dalam bagian ini disebutkan alat-alat yang digunakan masing-masing dengan fungsi alat tersebut, bahan yang digunakan dan fungsinya, rancangan dan perlakuan serta prosedur.

Acara 2. Presentasi Proposal

A. Pendahuluan

Sebagai bagian dari keterampilan yang harus dimiliki mahasiswa adalah harus dapat menyajikan karya ilmiah secara lisan di depan forum akademik. Keterampilan presentasi akan dikembangkan pula dalam praktikum. Mahasiswa yang telah membuat proposal proyek praktikum diharapkan dapat menyajikan di depan forum secara ilmiah.

Suatu presentasi yang baik disampaikan dengan bahasa resmi dan baku, menyajikan permasalahan secara langsung dan tepat, fokus pada pokok pembahasan, dapat menarik perhatian peserta agar fokus pada permasalahan yang sedang dipresentasikan, menepati waktu yang disediakan. Penyaji juga harus dapat menjawab pertanyaan dengan baik dan menjaga etika akademik.

Dalam presentasi kelompok, perlu diperhatikan pembagian peran antar anggota kelompok. Selama presentasi, ada yang berperan sebagai moderator, penyaji (1 orang atau lebih dengan pembagian peran yang dinamis), serta notulen.

Peserta dalam presentasi juga harus menjaga etika peserta yaitu: menyimak dengan baik, meminta waktu untuk bertanya, bertanya dan memberi masukan dengan bahasa yang baik, langsung pada permasalahan, mengapresiasi presenter dan tidak meninggalkan forum sebelum presentasi selesai, kecuali jika telah mendapatkan ijin.

Bahan presentasi disiapkan dengan memanfaatkan teknologi multimedia, tetapi tidak berlebihan. Materi presentasi dituliskan secara singkat, berisi point-point penting yang akan dibahas. Tulisan ditampilkan dalam ukuran yang memadai sehingga mudah terbaca oleh peserta. Jika diperlukan, presentasi dapat ditampilkan dalam bentuk bagan atau diagram alir.

B. Tujuan

1. Melatih kemampuan peserta dalam membuat presentasi ilmiah
2. Melatih kemampuan peserta agar dapat melakukan presentasi yang efektif
3. Melatih peserta agar dapat menjadi peserta forum ilmiah yang mengikuti etika akademik

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Proposal yang telah disiapkan, dibuat menjadi materi presentasi menggunakan power point atau googleslides.
2. Presentasi proposal dilakukan oleh setiap kelompok secara bergantian dalam waktu 10 menit. Ketepatan waktu dan pembagian peran dari setiap peserta harus diperhatikan dengan baik

3. Peserta dan dosen pembimbing/asisten praktikum memberikan masukan dan saran atas presentasi yang telah disajikan.
4. Presentasi merupakan prasyarat sebelum pelaksanaan praktikum.

Acara 3. Pengenalan Alat di Laboratorium Mikrobiologi dan Sterilisasi

A. Pendahuluan


Analisis pangan hasil pertanian di laboratorium mikrobiologi membutuhkan peralatan khusus. Beberapa peralatan yang digunakan hanya ada di laboratorium mikrobiologi (Tabel 3.1). Setiap peralatan yang akan digunakan di laboratorium mikrobiologi harus disterilisasi sebelum digunakan.

Sterilisasi adalah suatu upaya menghilangkan cemaran mikroorganisme pada suatu peralatan atau bahan. Terdapat dua jenis sterilisasi dalam mikrobiologi, yaitu sterilisasi panas dan sterilisasi dingin atau tanpa pemanasan. Sterilisasi dingin dilakukan dengan menggunakan filtrasi menggunakan membran filter, desinfektan kimiawi (seperti klorin atau etanol 70%), gas (seperti ozon), dan iradiasi. Sterilisasi panas merupakan teknik yang paling banyak dilakukan. Umumnya sterilisasi panas dilakukan terhadap peralatan yang tahan panas.

Sterilisasi panas dilakukan dengan panas basah dan panas kering. Sterilisasi dengan panas basah dilakukan dengan menggunakan air atau uap air. Sterilisasi dapat dilakukan dengan merebus peralatan pada suhu 100°C selama 30 menit. Sterilisasi dengan cara ini efektif membunuh sel vegetatif tetapi tidak efektif terhadap spora bakteri. Spora bakteri dapat dieliminasi dengan pemanasan menggunakan pemanas tekanan tinggi, dalam hal ini adalah otoklaf. Pemanasan dengan otoklaf dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit, pada tekanan 15 psi.

Sterilisasi dengan panas kering dilakukan dengan menggunakan oven atau incinerator. Peralatan gelas umumnya disterilisasi menggunakan oven. Pemanasan dilakukan pada suhu 160°C selama 120 menit, atau 170°C selama 60 menit, atau 180°C selama 30 menit.

Tabel 1 Beberapa peralatan yang digunakan di laboratorium Mikrobiologi

No	Alat	Fungsi dan Cara Sterilisasi
1	Cawan Petri 	Fungsi: Untuk perhitungan bakteri dan isolasi Cara Sterilisasi (sterilisasi dapat menggunakan otoklaf ataupun oven)

2	<p>Mikroskop</p> 	<p>Fungsi: Untuk mengetahui sifat Gram dan bentuk bakteri</p> <p>Cara Sterilisasi</p> <p>Mikroskop tidak disterilkan namun dibersihkan lensanya sehingga tidak ada kotoran yang akan mengganggu pengamatan pada perbesaran yang digunakan.</p>
3	<p>Toples</p> 	<p>Fungsi: sebagai wadah/fermentor fermentasi</p> <p>Cara sterilisasi</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bersihkan botol dengan sabun dan air 2. Jika telah kering semprot bagian dalam dengan alcohol 96% kemudian ditutup rapat 3. Siap digunakan
4	<p>Jarum ose</p> 	<p>Fungsi: untuk inokulasi</p> <p>Cara sterilisasi: menggunakan incinerator atau dibakar langsung di atas api sampai membara</p>
5	<p>Otoklaf</p>	<p>Fungsi: Sterilisasi alat dan media</p>



6

Inkubator

Fungsi: inkubasi mikroorganismen setelah dikulturkan pada media









7




Laminar airflow


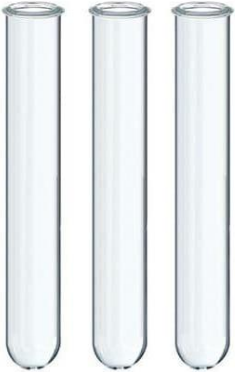

Fungsi: Tempat melakukan inokulasi mikroorganismen





8	<p>Bunsen</p> 	<p>Fungsi: mensterilkan peralatan yang akan digunakan untuk analisis mikrobiologi, menjaga lingkungan aseptis</p>
9	<p>Oven</p> 	<p>Fungsi: Sterilisasi peralatan tahan panas</p>
10	<p>Shaker Incubator</p> 	<p>Fungsi: Inkubasi mikroorganisme</p>

11	<p>Vorteks</p> 	<p>Fungsi: menghomogenkan larutan atau media cair yang telah diinokulasi</p>
12	<p>Hotplate</p> 	<p>Fungsi: Memanaskan media</p>
13	<p>Cell Spreader</p> 	<p>Fungsi:meratakan kultur mikroorganismen yang diinokulasikan dalam teknik <i>spread plate</i></p> <p>Cara sterilisasi: Dibungkus plastik tahan panas lalu diotoklaf, atau didesinfeksi dengan alkohol 70%</p>

14	<p>Colony Counter</p> 	<p>Fungsi: Menghitung jumlah koloni</p>
15	<p>Beaker Glass</p> 	<p>Fungsi: Melarutkan media atau larutan pengencer/saline</p> <p>Cara sterilisasi: Dibungkus dengan plastik tahan panas dan disterilisasi dengan otoklaf</p>
16	<p>Labu Erlenmeyer</p> 	<p>Fungsi: Menempatkan media mikrobiologi</p> <p>Cara sterilisasi: Setelah diisi media, ditutup dengan sumbat kapas atau aluminium foil, lalu disterilkan di otoklaf</p>
17	<p>Botol Kaca</p>	<p>Fungsi: Menempatkan media mikrobiologi</p> <p>Cara sterilisasi: Setelah diisi media, ditutup, lalu disterilkan di otoklaf</p>

		
18	<p>Tabung reaksi</p> 	<p>Fungsi: Untuk media pengenceran atau untuk menumbuhkan mikroorganisme</p> <p>Cara sterilisasi: Setelah diisi media, ditutup, lalu disterilkan di otoklaf</p>
19	<p>Tabung Durham</p> 	<p>Fungsi: menampung gas pada media fermentasi</p> <p>Cara Sterilisasi: dimasukkan dalam tabung reaksi berisi media fermentasi, lalu disterilkan bersama tabung reaksinya</p>
20	<p>Kaca objek/slide dan Kaca penutup/cover glass</p>	<p>Fungsi: untuk membuat preparat mikroorganisme untuk pengamatan di bawah mikroskop</p>

		
21	<p>Gelas ukur</p> 	<p>Fungsi: mengukur volume saat akan membuat pengencer/saline atau media</p>

B. Tujuan

1. Mengetahui nama dan fungsi alat di laboratorium mikrobiologi
2. Mengetahui cara mensterilkan alat di laboratorium mikrobiologi

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Pengenalan alat
 - a. Peserta memperhatikan setiap peralatan yang terdapat di lab mikrobiologi dan penjelasan yang diberikan oleh dosen/asisten praktikum
2. Sterilisasi kering
 - a. Hidupkan bunsen dengan hati-hati, atur agar apinya berwarna biru. Ambil Ose dan panaskan jarumnya dengan cara menempatkan di dalam api sampai jarum memerah.
 - b. Tempatkan 2 cawan petri dalam oven dalam posisi bertangkup, lalu panaskan pada 160°C selama 120 menit. Setelah 120 menit, matikan oven. Cawan petri boleh dikeluarkan setelah cukup dingin
3. Sterilisasi basah
 - a. Bungkus 2 cawan petri dalam kondisi bertangkup dengan kertas bersih, lalu ditempatkan dalam plastik tahan panas. Ikat dengan karet gelang atau distaples.

Masukkan ke dalam otoklaf. Nyalakan otoklaf dan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

Pertanyaan

1. Apakah perbedaan efek sterilisasi dengan pemanasan kering dan basah bagi mikroorganisme
2. Mana yang lebih efektif mengeliminasi mikroorganisme, pemanasan basah atau pemanasan kering?
3. Manakah yang lebih baik dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi?

Acara 4. Fermentasi Makanan

A. Pendahuluan

Fermentasi adalah proses pengawetan makanan yang telah dikenal sejak dahulu kala. Kata fermentasi berasal dari bahasa latin “*fervere*” yang berarti mendidih (*boiling*), oleh karena pada proses pembuatan minuman anggur bahan seolah-olah kelihatan mendidih. Fermentasi tidak terbatas pada pembuatan anggur saja, tetapi juga pada pembuatan makanan dan minuman selain anggur. Fermentasi adalah pembentukan produk dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroorganisme atau bagiannya (Hidayat et al., 2020).

Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba pada substrat organik yang sesuai. Produk fermentasi tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), jenis mikroba dan kondisi lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Mikroorganisme yang banyak membantu dalam proses fermentasi pangan antara lain bakteri, kapang dan khamir. Salah satu aplikasi penggunaan mikroorganisme dalam bidang pangan adalah pembuatan tempe, tape dan yoghurt.

Tabel 2 Mikroorganisme dalam Pengolahan Makanan Fermentasi

No.	Bahan Pangan	Mikroorganisme	Golongan	Produk
1	Susu	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Bakteri	Yoghurt
		<i>Streptococcus termophilus</i>	Bakteri	Yoghurt
		<i>Streptococcus lactis</i>	Bakteri	Mentega
		<i>Penicillium requiforti</i>	Kapang	Keju
		<i>Propioni bacterium</i>	Bakteri	Keju Swiss
		<i>Lactobacillus casei</i>	Bakteri	Susu asam
2	Kedelai	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Kapang	Tempe
		<i>Rhizopus stoloniferus</i>	Kapang	Tempe
		<i>Rhizopus oryzae</i>	Kapang	Tempe
		<i>Aspergillus oryzae</i>	Kapang	Kecap
3	Kacang tanah	<i>Neurospora sitophyla</i>	Kapang	Oncom
4	Beras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Khamir	Tape Ketan
		<i>Monascus purpurea</i>	Kapang	Ang-Kak (beras merah)
		<i>Aspergillus oryzae</i>	Kapang	Sake (hidrolisa pati beras)
5	Singkong	<i>Acetobacter xylinum</i>	Bakteri	Nata de coco
6	Tepung gandum	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Khamir	Roti

B. Tujuan

1. Praktikan mampu membuat salah satu produk fermentasi dan mengetahui peran mikroorganisme dalam proses pembuatan produk tersebut yang dituangkan dalam modul praktikum.
2. Praktikan mampu menentukan jumlah bakteri pada produk fermentasi

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Praktikan menentukan produk makanan fermentasi yang akan dibuat
2. Praktikan mengkonsultasikan produk makanan fermentasi tersebut kepada dosen pengampu praktikum
3. Praktikan menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan dalam proses pembuatan produk fermentasi yang telah disetujui oleh dosen pengampu praktikum
4. Praktikan membuat produk sesuai dengan prosedur pembuatan produk makanan fermentasi
5. Praktikan menganalisa jumlah bakteri pada produk makanan fermentasi yang telah dibuat
6. Praktikan mencatat, mendokumentasikan dan melaporkan hasil pembuatan dan analisis produk fermentasi pada modul praktikum

Sistematika Modul

Modul memuat bagian-bagian berikut :

1. Cover depan yang memuat nama modul, logo UNMUL, tim penyusun, nama jurusan dan universitas dan tahun
2. Kata pengantar
3. Daftar isi
4. Isi Modul Praktikum, yang memuat judul praktikum dan terdiri atas:
 - BAB I PENDAHULUAN : Latar Belakang dan Tujuan Praktikum
 - BAB II METODE PRAKTIKUM : Waktu dan tempat; Alat dan Bahan; Prosedur Praktikum
 - BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN
 - BAB IV : PENUTUP : Kesimpulan dan Saran
 - Daftar Pustaka "Elsevier-Harvard (with titles)"
 - Lampiran

Acara 5. Pembuatan Media dan Sterilisasi

A. Pendahuluan

Media

Kelangsungan hidup dan pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh adanya nutrisi dan faktor lingkungan. Bahan nutrisi yang tersedia dapat berupa bahan alami dan dapat pula berupa bahan sintetis. Bahan nutrisi yang digunakan mikroorganisme biasanya berupa senyawa sederhana yang tersedia secara langsung atau berasal dari senyawa yang kompleks yang kemudian dipecah oleh mikroorganisme menjadi senyawa yang sederhana melalui proses enzimatik. Bahan nutrisi ini dapat berupa cairan atau padatan setengah padat (semi solid) yang disebut sebagai media.

Syarat media yang baik untuk pertumbuhan mikroba adalah lingkungan kehidupannya harus sesuai dengan lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut, yaitu : susunan makanannya (media harus mengandung air untuk menjaga kelembaban dan untuk pertukaran zat/metabolisme, juga mengandung sumber karbon, mineral, vitamin dan gas), tekanan osmose yaitu harus isotonik, derajat keasaman/pH umumnya netral tapi ada juga yang alkali, temperatur harus sesuai dan steril. Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu: sumber energi (contoh: gula), sumber nitrogen, juga ion inorganik esensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin (Jawetz *et al.*, 1996). Macam-macam media pertumbuhan mikroorganisme antara lain :

1. Media berdasarkan berdasarkan konsistensi atau kepadatannya :

a. Medium cair (*broth / liquid medium*)

Medium yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (*Nutrient Broth*), LB (*Lactose Broth*). Medium cair akan memberi kesempatan kepada bakteri untuk menyebar dan bercampur dengan seluruh nutrient, sehingga lebih cocok untuk mengoptimalkan pertumbuhan mikroba. Medium cair dapat juga digunakan untuk mengetahui karakter suatu mikroba berdasarkan kebutuhan oksigen

b. Medium setengah padat (semi solid medium)

Medium yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat dan tidak begitu cair. Medium semi solid dibuat dengan tujuan agar mikroba dapat menyebar ke seluruh media namun tidak mengalami pencampuran sempurna jika dilakukan agitasi atau penggoyangan

c. Medium padat (*solid medium*)

Medium semi solid dan solid menggunakan bahan pematat (seperti amilum, gelatin, selulosa dan agar-agar). Untuk medium padat / solid, dapat menggunakan agar-agar

dengan kadar 1,5 % - 1,8 % (15 g agar / l liter aquades). Fungsi medium padat untuk memudahkan penghitungan koloni mikroba

2. Media berdasarkan berdasarkan komposisi bahannya :

a. Media alami

Komposisi media ini tidak diketahui secara pasti baik jenisnya maupun ukurannya. Media ini sudah tersedia secara alami misalnya air, nasi, buah, biji, daging dan lain-lain

b. Media sintetis

Sering juga disebut media buatan. Komposisi senyawa berikut takarannya diketahui secara pasti, tidak tersedia secara alami tapi dibuat. Media sintetis sering digunakan untuk mempelajari sifat genetika mikroorganisme. Senyawa organik dan anorganik ditambahkan dalam media sintetis harus murni sehingga harganya mahal, misalnya: sabouroud agar, czapek's dox agar, cairan hanks dan lain-lain.

c. Media semi sintetis Komposisinya sebagian diketahui secara pasti, sebagian lagi tidak disebut juga media setengah buatan misalnya potato dextrose agar, nutrient agar dan lain-lain

3. Media berdasarkan berdasarkan tujuannya :

a. Media isolasi

Media umum yang digunakan untuk mengisolasi suatu mikroba menjadi kultur murni. Media isolasi biasanya mengandung semua kebutuhan mikroba untuk tumbuh dan tergantung tujuan isolasinya, misalnya Blood agar atau Chocolate agar, NA, NB, PDA, TEA, PCA (Barrow and Feltham, 1993).

b. Media selektif (*selective or inhibitory media*)

Berfungsi untuk menumbuhkan mikroba target atau yang diinginkan dan menekan pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (background flora). Umumnya media selektif menseleksi mikroba target berdasarkan kelompok, genus atau spesiesnya, misalnya EMBA untuk seleksi *E. coli*, *Baird parker* untuk isolasi *S. aureus*; MRS untuk bakteri asam laktat (Barrow and Feltham, 1993)

c. Media pengaya (*enrichment media*)

Media pengaya termasuk media selektif namun lebih berfungsi untuk memperbanyak mikroba target sehingga saat dilakukan pengkulturan, mikroba yang tidak diinginkan tidak dalam jumlah besar. Media pengaya harus dalam bentuk cair dan digunakan di awal tahap analisa. Misalnya untuk memisahkan bakteri penyakit tifus (*Salmonella typhi*) dari bahan tinja atau kotoran manusia .salah satu contoh media pengkaya adalah media *Baird Parker Water* (BPW) (Barrow and Feltham, 1993).

d. Media peremajaan kultur (maintenance of cultures media)

Media peremajaan kultur mengandung nutrisi sehingga mempercepat pertumbuhan, misalnya *Nutrient Agar* (NA) (Barrow and Feltham, 1993).

Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu cara atau teknik yang dilakukan untuk mendapatkan suatu kondisi bebas mikroorganisme atau setiap proses yang dilakukan baik secara fisika, kimia, dan mekanik untuk membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Dalam bidang mikrobiologi, baik dalam pengerjaan penelitian atau praktikum, keadaan steril merupakan syarat utama berhasil atau tidaknya pekerjaan dilaboratorium. Berdasarkan hal tersebut, maka setiap proses (baik fisika, kimia maupun mekanik) yang membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme disebut dengan sterilisasi. Adanya pertumbuhan mikroorganisme menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri masih berlangsung dan tidak sempurnanya proses sterilisasi, artinya sudah terjadi kontaminasi di dalamnya dan pengujian atau pekerjaan yang dilakukan tidak valid . Jika sterilisasi berlangsung sempurna, maka spora bakteri yang merupakan bentuk paling resisten dari kehidupan mikroorganisme. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu: cara kimia, mekanik atau fisik.

a. Sterilisasi cara kimia

Bahan atau senyawa kimia yang memiliki sifat membunuh mikroorganisme dapat digunakan untuk sterilisasi atau desinfektan, misalnya dibidang kedokteran. Contohnya alkohol 70%, detergen, karbol, lisol, merkurokrom dan lain-lain.

b. Sterilisasi cara mekanik

Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan alat penyaring yang sangat halus atau disebut metode filtrasi.

c. Sterilisasi cara fisik

Umumnya dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu tinggi. Salah satu contohnya adalah menggunakan alat autoklaf, disterilkan pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1,5 kg/cm² (15 lbs) dalam jangka waktu tertentu bergantung pada apa yang disterilkan.

B. Tujuan

1. Praktikan mengetahui berbagai jenis media pertumbuhan mikroba
2. Praktikan mengenal berbagai fungsi media pertumbuhan mikroba dan cara pembuatannya.
3. Praktikan mengetahui cara sterilisasi media pertumbuhan mikroba

Alat

- | | |
|--------------------|------------------------------|
| 1. Autoklaf | 9. Batang pengaduk |
| 2. Pembakar Bunsen | 10. Pipet volume |
| 3. Cawan petri | 11. Beaker glass |
| 4. Erlenmeyer | 12. Timbangan Analitik |
| 5. Batang pengaduk | 13. Kompor pemanas/hot plate |
| 6. Tabung reaksi | 14. Gelas ukur |
| 7. Mikro pipet | 15. Rak tabung reaksi |
| 8. Blue tip | 16. Gelas ukur |

Bahan

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1. Media Nutrien Agar (NA) | 6. Kapas |
| 2. Media MRSA | 7. Alkohol 70% |
| 3. Media PDA (Potato Dextrose Agar) | 8. Alumunium Foil |
| 4. Aquades | 9. Karet Gelang |
| 5. Kertas/koran | 10. Plastik tahan panas |

C. Prosedur Pelaksanaan

Pembuatan Media NA (Nutrien Agar) untuk Total Bakteri

1. 20 gram Nutrien Agar (NA) ditimbang dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*
2. Ditambahkan 1000 ml aquades.
3. Dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen
4. Tuangkan di erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas lalu alumunium foil.
5. Dimasukkan dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121⁰C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media PDA (Potato Detrose Agar) untuk Total Kapang/Khamir

1. 39 gram Potato Dextrose Agar (PDA) ditimbang dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*
2. Ditambahkan 1000 ml aquades.
3. Dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen.
4. Tuangkan di erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas lalu alumunium foil.
5. Dimasukkan dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121⁰C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit

Sterilisasi Alat dan Media

1. Bungkus cawan petri dengan kertas/koran
2. Alat gelas yang lain dibungkus menggunakan alumunium foil dan atau plastik tahan panas.
3. Isilah autoklaf dengan aquades setinggi batas sarangan, masukkan alat dan bahan (media, aquadest) yang akan disterilisasi.
4. Atur suhu sebesar 121°C , dengan tekanan 2 atm dan aturlah waktu yang akan digunakan sampai pada angka 15-20 menit.
5. Tutup autoklaf dan pastikan dalam kondisi terpasang rapat.
6. Pastikan lubang uap dalam keadaan tertutup (*Exhaust Close*)
7. Tarik tuas power ke arah ON, lalu tekan tombol ON (push) untuk memulai sterilisasi, apabila lampu hijau menyala maka dapat dipastikan autoklaf dalam keadaan bekerja.
8. Setelah selesai maka tarik tuas power hingga ke titik OFF kemudian bukalah lubang uap dengan cara memutar ke arah OPEN.
9. Diamkan autoklaf selama 15 menit untuk memastikan bahwa uap telah keluar dan autoklaf dalam keadaan tidak panas.
10. Bukalah tutup autoklaf dan keluarkan alat-alat yang telah steril

Acara 6. Penentuan Jumlah Mikroorganisme

A. Pendahuluan

Mikroorganisme terdapat dimana-mana, baik didalam tanah, air, udara maupun pada makhluk hidup termasuk pada jaringan tubuh kita sendiri (kulit dan selaput lendir). Mikroba sangat beragam jumlahnya, yang umumnya berada dalam suatu populasi campuran. Dalam keadaan sebenarnya (di alam bebas) tidak ada bakteri yang hidup tersendiri terlepas dari spesies lainnya. Kerap kali bakteri patogen terdapat bersama-sama bakteri yang tidak berbahaya sehingga beberapa teknik isolasi dan pemurnian mikroba sangat diperlukan untuk memisahkan tiap jenis mikroba tersebut sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut (Waluyo, 2004).

Teknik pengambilan sampel untuk mendapatkan mikroba yang diinginkan merupakan suatu aspek penting yang harus diperhatikan ketika melakukan penelitian mikrobiologi. Sampel yang diambil haruslah merupakan representasi dari seluruh bagian yang diteliti. Untuk itu diperlukan teknik yang benar agar terhindar dari kesalahan yang mengakibatkan sampel menjadi bias. Beberapa prinsip pengambilan sampel antara lain adalah; sampel yang diambil merupakan perwakilan dari keseluruhan bagian yang diteliti; sampel yang diambil benar-benar dari sumbernya dan sampel tetap terjaga kondisinya seperti saat pengambilan sampai dilakukan tahap pembiakan dan analisa sampel.

Morfologi mikroba serta jumlahnya dapat diobservasi dengan cara mengisolasi dan membiakkannya pada media agar nutrisi terlebih dahulu. Koloni bakteri dapat diamati pertumbuhannya setelah diinkubasi selama 1 x 24 atau 2 x 24 jam pada suhu yang sesuai, sedangkan jamur dapat diamati setelah 5-7 hari inkubasi. Karakteristik morfologi tiap koloni perlu dicatat sesuai dengan ciri-ciri yang ditunjukkan sebagai bagian dari proses identifikasi bakteri.

Mengisolasi suatu mikroba didefinisikan sebagai proses memisahkan mikroba dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan (Jutono *et al.*, 1980). Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikrobia adalah: 1). *Spread plate method* (cara tebar/sebar), 2). *Streak plate method* (cara gores), 3). *Pour plate method* (cara tabur). Namun demikian, untuk mengurangi kepadatan mikroba yang diperoleh dari suatu sampel diperlukan adanya proses pengenceran bertingkat atau serial dilution.

1. Metode tebar atau sebar (*spread plate method*)

Teknik *spread plate* merupakan teknik dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya

tidak diketahui, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang-kurangnya ada satu dari pengenceran itu yang mengandung koloni terpisah (30-300 koloni). Koloni mikrobial yang terpisah memungkinkan koloni tersebut dapat dihitung (Jutono *et al.*, 1980).

2. Metode tuang (*pour plate method*)

Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono *et al.*, 1980).

3. Metode gores (*streak plate method*)

Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono *et al.*, 1980). Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994).

B. Tujuan

1. Praktikan mengetahui cara pembuatan pengenceran bertingkat
2. Praktikan mengetahui teknik inokulasi mikroba pada sampel produk fermentasi
3. Praktikan mengetahui metode perhitungan jumlah mikroba *Total Plate Count*

Alat

- | | |
|----------------------|-----------------|
| 1. Pembakar Bunsen | 9. Gelas ukur |
| 2. Cawan petri | 10. Vortex |
| 3. Colony counter | 11. Inkubator |
| 4. Erlenmeyer | 12. Mikro pipet |
| 5. Tabung reaksi | 13. Blue tip |
| 6. Rak tabung reaksi | 14. Mortar alu |
| 7. Cell Spreader | 15. Botol Kaca |
| 8. Timbangan Digital | |

Bahan

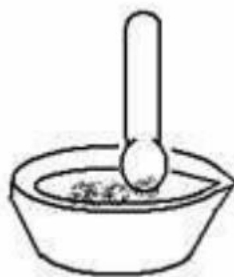
1. Media Nutrien Agar (NA)
2. Media MRSA
3. Media PDA (Potato Dextrose Agar)
4. Aquadest
5. Kertas/koran
6. Kapas
7. Alkohol 70%
8. Alumunium Foil
9. Karet Gelang
10. Platik tahan panas

C. Prosedur Pelaksanaan

Isolasi Mikroorganisme dengan Pengenceran

Teknik isolasi dengan cara pengenceran ini merupakan salah satu teknik preparasi suspensi. Teknik ini dilakukan dengan cara mengambil sampel kemudian disuspensikan dalam aquades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam aquades sehingga lebih mudah penanganannya. Salah satu cara preparasi sampel adalah maserasi (penghancuran). Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar atau pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam aquades. Contoh sampelnya antara lain tempe, tape dan lain-lain. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1 : 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tidak perlu dimaserasi. Maseration dapat dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Masukkan sampel ke dalam mortar atau pestle
- b. Hancurkan sampel menggunakan mortar
- c. Sampel siap untuk diencerkan dan digunakan.



Gambar 1 Preparasi sampel berupa padatan menggunakan mortar.

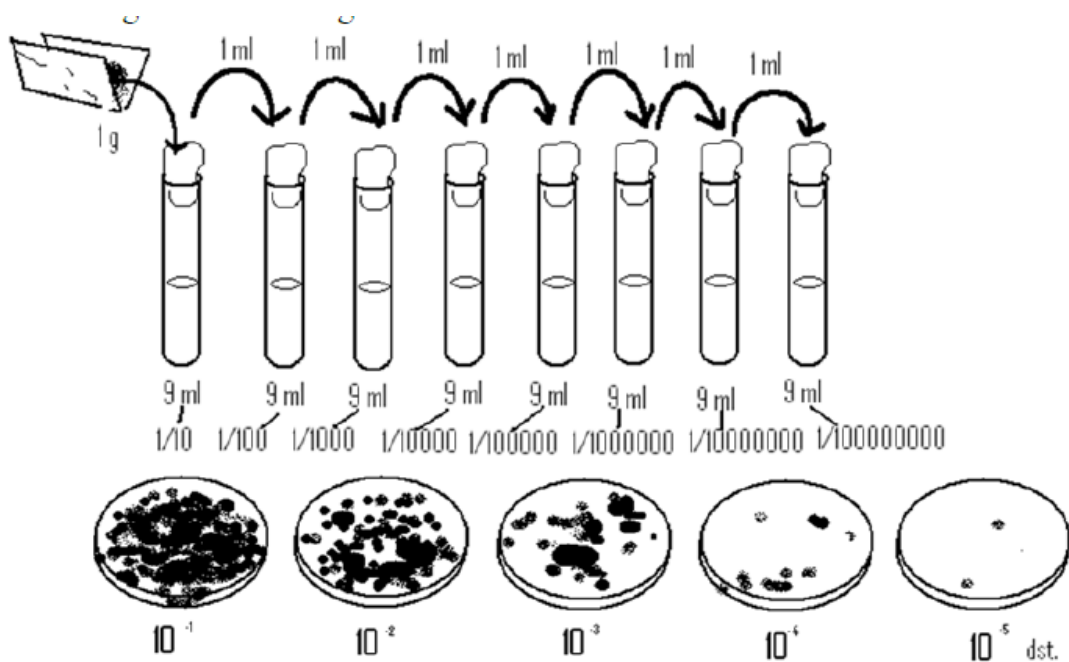
Teknik Pengenceran Bertingkat

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung

kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.

Cara Kerja :

1. Sampel yang mengandung bakteri dimasukan ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9. Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya sampai homogen atau menggunakan vortex.
2. Ambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer.
3. Pemandahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama. (*Note* : tingkat pengenceran tergantung jenis sampel)



Gambar 2 Teknik pengenceran bertingkat dan penanaman pada media

Teknik Penanaman Mikroba

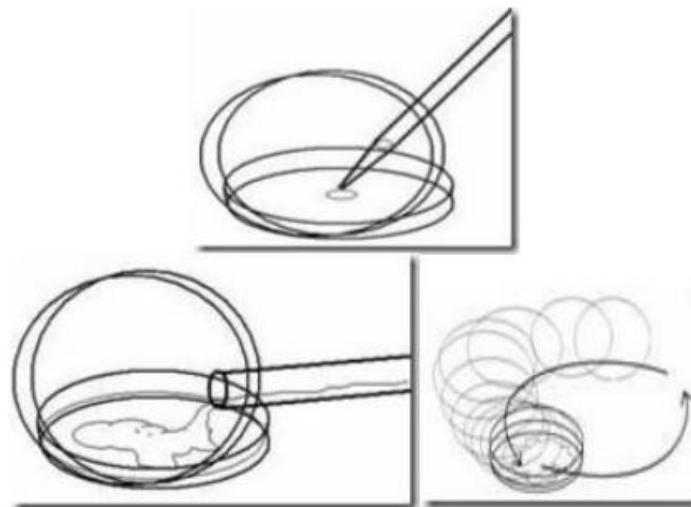
Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil suspensi dari beberapa tabung pengenceran terakhir.

Pour Plate Method (Metode cawan tuang) untuk Total Bakteri dan Total BAL

Tujuan dari teknik ini adalah untuk menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan medium agar saja melainkan sel terendam dalam medium (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya O₂ dan ada yang tumbuh di dalam agar dengan kandungan oksigen sedikit. Teknik ini memerlukan agar yang belum padat (>45°C) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat.

Cara Kerja :

1. Ambil 1 ml suspensi sel menggunakan mikro pipet kemudian masukkan kedalam cawan petri kosong yang telah steril secara aseptis.
2. Tuangkan media agar yang hangat (suhu 45–50°C) ke cawan yang telah berisi suspensi bakteri tersebut dan tutup
3. Homogenkan campuran media dan suspensi dengan cara goyangkan atau putar cawan petri secara perlahan membentuk angka delapan (8) di atas meja yang rata dalam kondisi aseptis
4. Setelah agar memadat cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu kamar ataupun inkubator selama 24 jam. Amati pertumbuhannya.



Gambar 3 Teknik Pour Plate

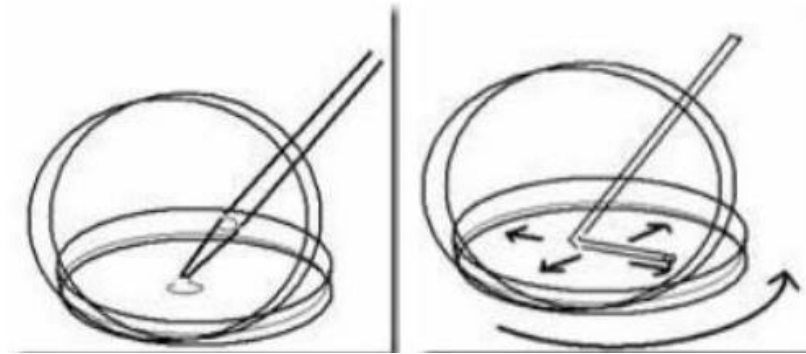
Spread Plate Method (Metode cawan tebar/sebar) untuk Total Kapang/Khamir

Teknik spread plate merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat.

Cara kerja :

1. Pindahkan 0,1 mL suspensi berisi bakteri secara aseptis dengan mikro pipet ke permukaan media yang telah memadat dalam cawan petri menggunakan pipet.

2. Sterilisasi cell spreader/batang bengkok/batang Drigalsky dengan cara disemprot alkohol 70% kemudian dibakar dengan dilewatkan diatas api, kemudian biarkan spreader dingin.
3. Tebarkan/sebarkan kultur bakteri dengan spreader secara merata dan biarkan sampai permukaan agar mengering.
4. Setelah permukaan agar mengering, selanjutnya inkubasikan secara terbalik selama 24 jam pada suhu kamar ataupun inkubator dan amati pertumbuhannya.



Gambar 4 Teknik Spread plate

Perhitungan Jumlah Mikroba

Penghitungan jumlah sel mikroba dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, antara lain secara langsung dengan hitung mikroskopik (*direct microscopic count*) menggunakan haemocytometer dan secara tidak langsung dengan hitung cawan (plate count), selain itu juga terdapat penghitungan menggunakan metode MPN dan turbidimetri menggunakan alat spektrofotometer. Pada praktikum Mikrobiologi Hasil Pertanian, praktikan melakukan perhitungan jumlah sel mikroba secara tidak langsung dengan hitung cawan / Angka Lempeng Total / Total Plate Count untuk bakteri / Angka Kapang Khamir (AKK) untuk jamur.

Prinsip metode hitung cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel mikroba itu akan membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung dengan mata telanjang, dan disebut dengan "*colony forming unit*" = cfu. Metode hitungan cawan dapat dilakukan dengan menggunakan metode tuang (pour plate) dan metode permukaan (surface/spread plate). Penghitungan jumlah mikroba dianggap valid jika dalam satu cawan tumbuh koloni sebanyak 30-300, sehingga jika pertumbuhan mikroba terlalu padat, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu.

$$\text{Koloni per mL (CFU/mL)} = \text{Jumlah Koloni} \times \left(\frac{1}{\text{Faktor Pengenceran (FP)}} \right)$$

- $FP = \text{pengenceran awal} \times \text{pengenceran selanjutnya} \times \text{jumlah yang ditumbuhkan (volume yang dimasukkan dalam cawan petri 0,1 mL atau 1 mL)}$

Cara menghitung jumlah koloni pada cawan harus memenuhi kaidah sebagai berikut (Schlegel, 2001):

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloni diragukan, dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan (rantai) yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.
4. Data yang dilaporkan harus mengikuti peraturan yaitu hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka ke dua dibelakang koma.
5. Jika semua pengenceran menghasilkan angka kurang dari 30 koloni, hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung. Jika semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan Petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung.
6. Jika terdapat lebih dari satu cawan yang mempunyai jumlah koloni yang memenuhi syarat, maka dihitung nilai rata-ratanya

Satu koloni bakteri yang terpisah dengan koloni lainnya dapat diamati tipe pertumbuhan pada masing-masing media, diantaranya dilakukan terhadap konsistensi, bentuk koloni, warna koloni dan permukaan koloni (Lim, 2000).

Angka kapang/khamir adalah jumlah koloni kapang dan khamir yang ditumbuhkan dalam media yang sesuai selama 5 hari pada suhu 20-25°C dan dinyatakan dalam satuan koloni /mL (Soekarto, 2008). Prinsip uji AKK (Angka Kapang Khamir) yaitu pertumbuhan kapang dan khamir yang telah diisolasi menggunakan metode *pour plate* ataupun *spread plate* pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C. Setelah inkubasi, dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni. Jumlah koloni rata-rata dari dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya.

Laporan Hasil Pengamatan

Tanggal :

Sampel :

Kelompok :

Tabel 3 Jumlah koloni mikroba pada sampel Percobaan

Jumlah Koloni	Pengenceran			Jumlah mikroba
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
Cawan Ulangan 1				
Cawan Ulangan 2				

Telah diperiksa

Pembimbing/Asisten Pratikum

(.....)

Acara 7. Isolasi Mikroba

A. Pendahuluan

Untuk menanam suatu mikroba perlu diperhatikan faktor- faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen (gas, O₂ atau udara). Cara menumbuhkan mikroba yang anaerob sangat berbeda dengan yang aerob. Mengisolasi suatu mikroba ialah memisahkan mikroba tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Untuk isolasi harus diketahui cara-cara menanam dan menumbuhkan mikroba pada medium biakan serta syarat-syarat lain untuk pertumbuhannya (Jutono dkk, 1980).

Mikroba jarang terdapat di alam dalam keadaan murni. Kebanyakan merupakan campuran bermacam-macam spesies mikroba. Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikrobia adalah : 1). Spread plate method (cara tebar/sebar), 2). Streak plate method (cara gores), 3). Pour plate method (cara tabur).

B. Tujuan

Mahasiswa dapat melakukan isolasi dan penyimpanan mikroorganisme

Alat : Pipet steril 1 mL, Cawan Petri steril, Tabung reaksi Penangas air micropipet steril

Bahan : Makanan dan Minuman, Jajanan, Yakult

C. Prosedur Pelaksanaan

a. Persiapan suspensi contoh

Sejumlah contoh yang berbentuk padat dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi aquadest atau larutan pengencer steril dan dikocok, sedangkan sampel berbentuk cair dapat di tambahkan atau tidak ditambahkan aquadest/ larutan pengencer steril.

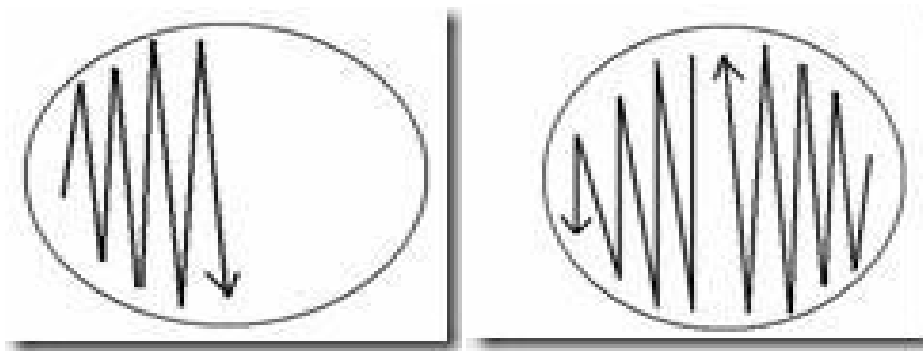
b. Prosedur isolasi dengan metode :

a. ***Streak Plate Method (Cara Gores)***

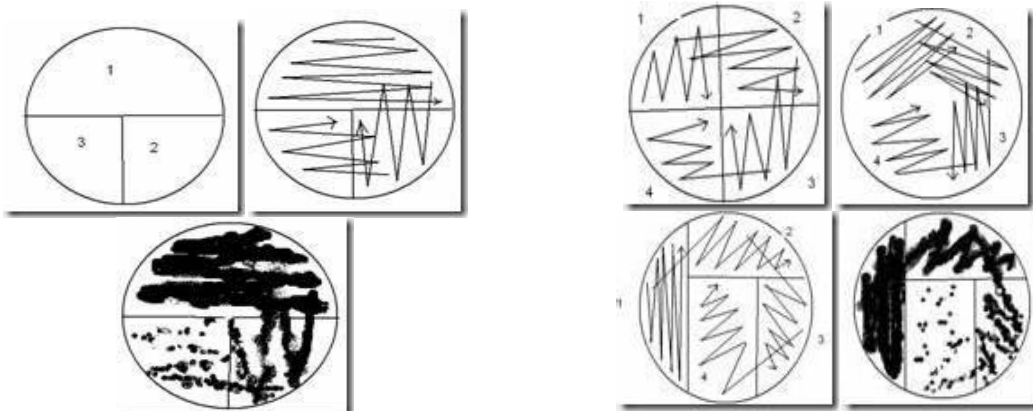
Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk, 1980). Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila

digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994)

- Panaskan jarum ose hingga memijar di atas bunsen, kemudian dinginkan. Gunakan ose yang telah dingin untuk menggores pada permukaan media agar dalam cawan petri.
- Ambil 1 ose kultur murni bakteri dan goreskan pada permukaan media agar dimulai pada satu ujung. *Perhatikan teknik penggoresan!* (lihat Gambar 3, 4, 5, 6). Ose disentuhkan pada permukaan media agar dalam cawan petri, sewaktu menggores ose dibiarkan meluncur di atas permukaan agar.
- Setiap kali menggoreskan ose untuk kuadran berikutnya, pijarkan ose terlebih dahulu dan biarkan dingin.
- Inkubasikan secara terbalik pada suhu kamar selama 24 jam dan amati pertumbuhannya.

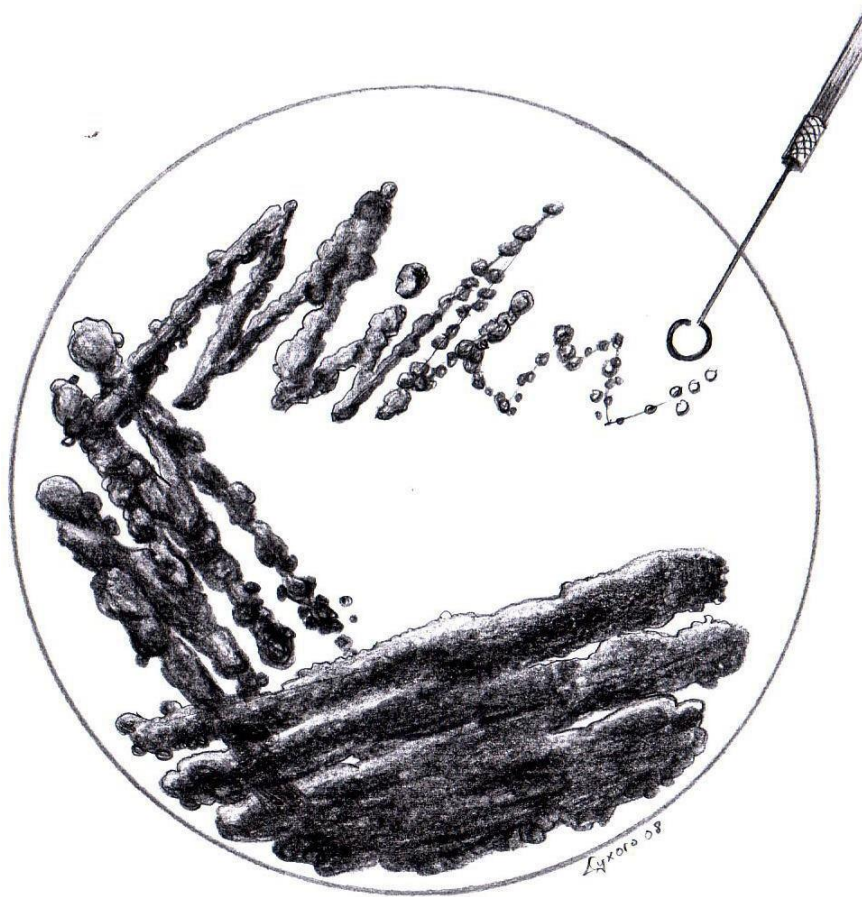


Gambar 5 Streak Plate Method secara Goresan Sinambung



Gambar 6 Streak Plate Method secara Goresan T

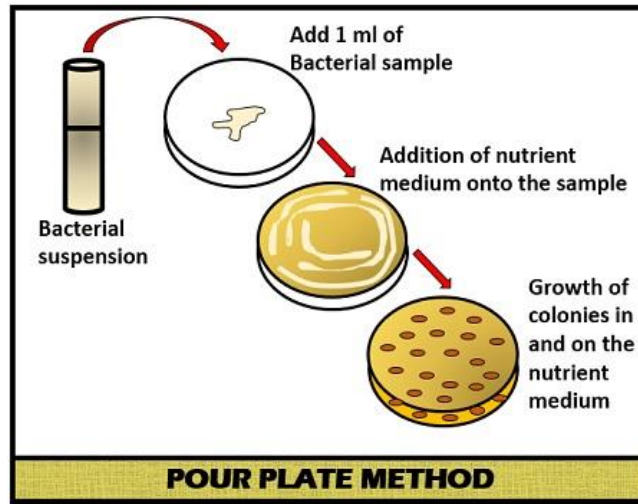
Gambar 7 Streak Plate Method dengan lebih banyak Sektor



Gambar 8 Contoh Hasil Isolasi Streak Plate Method

b. Metode Agar tuang / pour plate

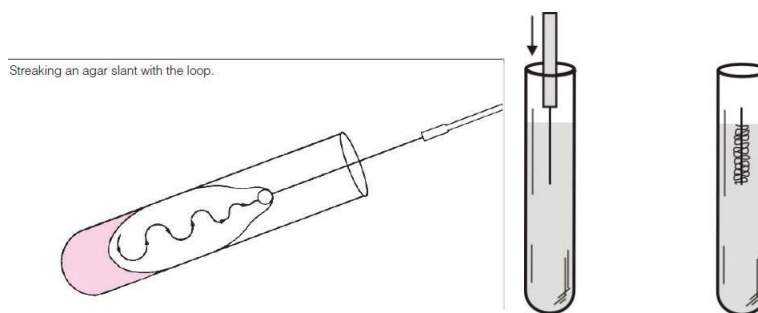
Dalam metode agar tuang digunakan medium agar steril yang sudah dicairkan (suhu sekitar 50°C). tuangkan 1 mL bahan ke cawan petri kemudian tambahkan medium dan putar cawan agar merata lalu biarkan membeku dan inkubasi dalam keadaan terbalik selama 2 – 3 hari pada suhu ruang. Isolasi dapat dilakukan dengan pengenceran untuk menghindari koloni yang bertumpuk (gambar 5.2).



Gambar 9 Pour plate method

c. Biakan agar miring dan agar tegak

Koloni terpisah hasil isolasi mikroba selanjutnya dibiakkan dengan metode agar miring dan agar tegak. Inokulasi mikroba pada agar miring dapat dilakukan dengan cara menggoreskan (streak) secara zigzag pada permukaan agar dengan jarum ose (Gambar 5.3a). Untuk agar tegak dengan cara tusukan (gambar 5.3b). Setelah tumbuh ambil koloni yang terpisah dan tumbuhkan pada agar miring selama dua hari pada suhu ruang dan amati morfologi koloninya: bentuk tepi, elevasi dan sebagainya dan bentuk sel serta sifat Gram secara mikroskopis (acara VII).



Gambar 10 Biakan agar miring dan agar tegak

Hasil Pengamatan

(Gambarkan penampakan mikroba yang ditumbuhkan/ diisolasi dengan metode gores dan hasil biakan pada agar miring dan agar tegak)

Acara 8. Morfologi Bakteri

A. Pendahuluan

Bakteri bersifat transparan, berukuran kecil sehingga tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Untuk mengetahui struktur, morfologi dan sifat kimia bakteri sehingga kita perlu melakukan suatu pengecatan terhadap bakteri tersebut. Pengecatan bakteri tergantung dari sifat fisik dan kimiawi zat warna tersebut. Persenyawaan zat warna harus memiliki komponen-komponen warna dalam tiap molekulnya. Pada umumnya zat warna untuk melihat bakteri adalah bahan kimia dari golongan anilin dan secara garis besar zat warna dibagi atas dua golongan, yaitu zat warna asam dan zat warna basa. Istilah asam dan basa tidaklah menunjukkan reaksi kimianya, melainkan untuk menunjukkan apakah zat warna tersebut bersatu dengan anion atau kation. Sebagai contoh dalam reaksi zat warna methylene blue chlorida, yang bertindak sebagai zat warnanya adalah kation methylene blue⁺.

Methylene blue chlorida \rightleftharpoons methylene blue⁺ + chlorida. Jadi dalam hal ini zat warna tersebut termasuk zat warna basa. Pengecatan memiliki bermacam-macam jenis, ada pengecatan tunggal atau sederhana dan pengecatan majemuk. Pengecatan tunggal atau sederhana biasanya pengecatan yang menggunakan satu macam zat warna saja, misalnya carbol fuchsin, crystal violet atau methylene blue. Sedangkan pengecatan majemuk ialah pengecatan yang menggunakan lebih dari satu macam zat warna.

B. Tujuan

Mahasiswa mengerti teknik membuat preparasi dan pewarnaan dengan satu macam zat warna dan mengetahui morfologi (bentuk susunan) bakteri dengan menggunakan suatu macam zat warna.

Alat dan Bahan

Bahan : Biakan bakteri, Zat warna crystal violet, methylene blue, safranin, Minyak imersi

Alat : Gelas objek – ose, Gelas penutup -lampu spiritus, Mikroskop

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Pembuatan film

Untuk mendapatkan hasil pengamatan yang baik, pembuatan film memegang peranan penting. Bakteri yang terlalu bertumpuk atau terlalu tipis di atas gelas objek akan menghasilkan gambaran yang kurang jelas setelah pengecatan.

- Bersihkan gelas objek dengan kapas yang sudah diberi alkohol 95% untuk menghilangkan lemak dan mikroorganisme yang menempel, lalu keringkan di udara. Buat lingkaran kecil di bagian bawah gelas objek untuk membatasi film.
- Ambil satu ose suspensi bakteri secara aseptik (ose dibakar di atas lampu spiritus sampai memijar, kemudian didinginkan sebentar), lalu tempelkan pada bagian dalam dari tabung biakan sebelum mengambil suspensi bakteri. Buat film setipis mungkin di atas gelas objek di dalam batas lingkaran tadi.
- Lakukan fiksasi dengan cara melakukan film di atas api secara cepat 2 sampai 3 kali. Maksudnya untuk membunuh bakteri secara cepat sehingga tidak mengalami perubahan bentuk. Disamping itu fiksasi dapat melekatkan bakteri pada gelas objek.

2. Pengecatan

- Buat suspensi bakteri hasil isolasi, ambil dengan ose dan letakkan pada gelas objek, ratakan dan fiksasi dengan nyala api kecil sehingga semua cairannya menguap (membentuk lapisan).
- Teteskan Gram A (cat utama, crystal violet) dan biarkan 1 menit kemudian cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan.
- Teteskan Gram B (cat penguat, KI), biarkan 1 menit kemudian cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan.
- Teteskan Gram C (cat peluntur, aseton etanol), biarkan 0,5 menit kemudian cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan.
- Teteskan Gram D (cat penutup, safranin), biarkan 1 menit kemudian cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan.
- Amati dengan mikroskop perbesaran lemah (100 x) jika sudah jelas amati dengan perbesaran sedang (400X) jika mungkin dengan perbesaran kuat (1000X) menggunakan minyak emersi.
- Catat hasil yang diperoleh.

Acara 9. Pengaruh Faktor Intrinsik dan Ekstrinsik Terhadap Pertumbuhan Mikroba

A. Pendahuluan

Pertumbuhan mikroba pada suatu makanan dipengaruhi oleh sifat intrinsik, sifat ekstrinsik dan proses pengolahan yang diterapkan pada bahan makanan tersebut. Sifat intrinsik adalah sifat yang terdapat pada bahan makanan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba pada makanan tersebut. Sifat intrinsik meliputi aw, pH, potensi redoks (Eh), komposisi nutrient, adanya antimikroba dan sebagainya.

Sifat ekstrinsik adalah faktor eksternal bahan makanan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba pada makanan, seperti suhu, kelembapan dan komposisi atmosfer. Faktor pengolahan seperti pemanasan dan pendinginan dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba pada bahan makanan tersebut.

B. Tujuan

Praktikum ini bertujuan mengetahui pengaruh perlakuan pengolahan terhadap pertumbuhan mikroba dalam bahan makanan.

Alat dan Bahan

Alat : Tabung reaksi, jarum ose, incubator

Bahan : Isolat mikroba dalam nutrient broth (NB) berusia 18-24 jam, Nutrient Agar (NA) tegak dan cair dalam tabung reaksi, Nutrient Broth (NB), Nutrient Broth (NB) mengandung 7,5% NaCl

C. Prosedur Pelaksanaan

A. Pengaruh Suhu Inkubasi

1. Inokulasi 1 loop isolate mikroba kedalam 2 tabung berisi NB
2. Inokulasi masing-masing 1 tabung pada suhu refrigotor dan suhu kamar selama 2 hari
3. Amati ada tidaknya pertumbuhan, nyatakan alam tanda – jika tidak ada pertumbuhan, + jika ada pertumbuhan sedikit, ++ jika ada pertumbuhan banyak, +++ jika ada pertumbuhan sangat banyak

B. Pengaruh Ketersediaan Udara

1. Inokulasi 1 loop isolate mikroba kedalam NA cair. Biarkan membeku

2. Inkubasikan pada suhu kamar selama 2 hari
3. Amati dimana terjadi pertumbuhan mikroba. Mikroba aerobik akan tumbuh dipermukaan media. Mikroba mikroaerofilik akan tumbuh didekat permukaan. Mikroba aerobik akan tumbuh didasar media. Mikroba anaerobic fakultatif akan tumbuh menyebar diseluruh bagian media
4. Gambarkan pada lembar laporan

C. Pengaruh Kadar Garam

1. Inokulasi 1 loop isolate kedalam tabung berisi NB yang telah diberi 7,5 % NaCl.
2. Inkubasi pada suhu kamar selama 2 hari.
4. Nyatakan dalam tanda – jika tidak ada pertumbuhan, + jika ada pertumbuhan sedikit, ++ jika ada pertumbuhan banyak, +++ jika ada pertumbuhan sangat banyak.

Hasil Pengamatan

A. Pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan mikroba

Suhu inkubasi	Jumlah mikroba yang tumbuh
Suhu Refrigerator	
Suhu Ruang	

B. Pengaruh ketersediaan udara terhadap pertumbuhan mikroba (Gambarkan)

C. Pengaruh kadar garam terhadap pertumbuhan mikroba

Kadar garam (%)	Jumlah mikroba yang tumbuh
0	
7,5	

Keterangan:

- : Tidak ada yang tumbuh
- + : Tumbuh tetapi sedikit
- ++ : Tumbuh banyak
- +++ : Tumbuh sangat banyak

Acara 10. Uji Koliform

A. Pendahuluan

Koliform merupakan kelompok bakteri yang digunakan sebagai indikator sanitasi dalam produk makanan dan minuman. Secara lebih khusus, uji koliform dilakukan untuk mengetahui adanya kontaminasi fekal yang akan mengidentifikasi buruknya sanitasi makanan dan minuman tersebut. Uji koliform dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu uji penduga, penguat dan identifikasi. Pengujian ini dapat dilakukan secara kuantitatif atau kualitatif sesuai kondisi sampel dan kebutuhan uji. Koliform fekal diuji tersendiri untuk memastikan adanya cemaran fekal pada produk. Produk minuman terdiri dari minuman yang diambil langsung dari sumber, minuman yang dikemas dalam botol, minuman ringan atau sari buah yang dikemas dan minuman yang diperuntukkan untuk jajanan. Semua jenis minuman tersebut berpotensi terkontaminasi mikroorganisme selama pengolahan dan distribusinya. Air dalam botol yang dibuat secara industri serigkali diawetkan dengan ozon yang ditambahkan kedalam air segera sebelum pembotolan. Oleh karena itu, air dalam botol seharusnya bebas dari koliform dan mengandung mikroorganisme aerobik dalam jumlah rendah, yaitu kurang dari 1000/mL pada saat pembotolan sejumlah kecil mikroorganisme yang mungkin belum mati hanya dapat berkembang biak selama penyimpanan jika konsentrasi ozon sudah sangat berkurang. Akan tetapi, karena kondisi nutrisi sangat terbatas, maka bakteri-bakteri tersebut tidak dapat hidup dengan baik. Mikroorganisme yang dominan terdapat didalam air botol terutama adalah bakteri gram negatif berbentuk batang seperti *Shewanella*, *Flavobacterium* dan *Moraxella/Acinetobacter*. Bakteri-bakteri ini mungkin masih dapat tumbuh secara lambat didalam air destilata, air bebas mineral maupun air mineral.

B. Tujuan

Mahasiswa dapat melakukan uji koliform terhadap produk minuman dan mengetahui cemaran pada beberapa produk minuman

Alat dan Bahan

Sample : air sumur, air PDAM, air minum dalam kemasan, air minum isi ulang.

Media : nutrient Agar, Lactose broth atau laurylsulfite tryptose (LST) broth, eosin metilene blue (EMB) agar atau endoagar.

Perekasi untuk pewarnaan gram dan mikroskop larutan pengencer, cawan petri, tabung reaksi, pipet dan jarum ose, incubator 35 C dan 44,5 C, pembakar Bunsen.

C. Prosedur Pelaksanaan

1. Pengambilan contoh

Pengambilan contoh dilakukan langsung didalam wadah pengepak, dan jika analisis tidak dapat dilakukan, contoh tidak perlu disimpan didalam lemari es. Jika diperlukan wadah kedua untuk pengumpulan contoh harus digunakan botol yang sudah disterilisasi, dan analisi harus dilakukan secepat mungkin. Jika analisi tidak dapat dilakukan dalam waktu 8 jam setelah pengambilan contoh, contoh harus disimpan didalam lemari es selama transport dalam keadaan ini waktu antara pengambilan contoh dengan analisi tidak boleh lebih dari 30 jam.

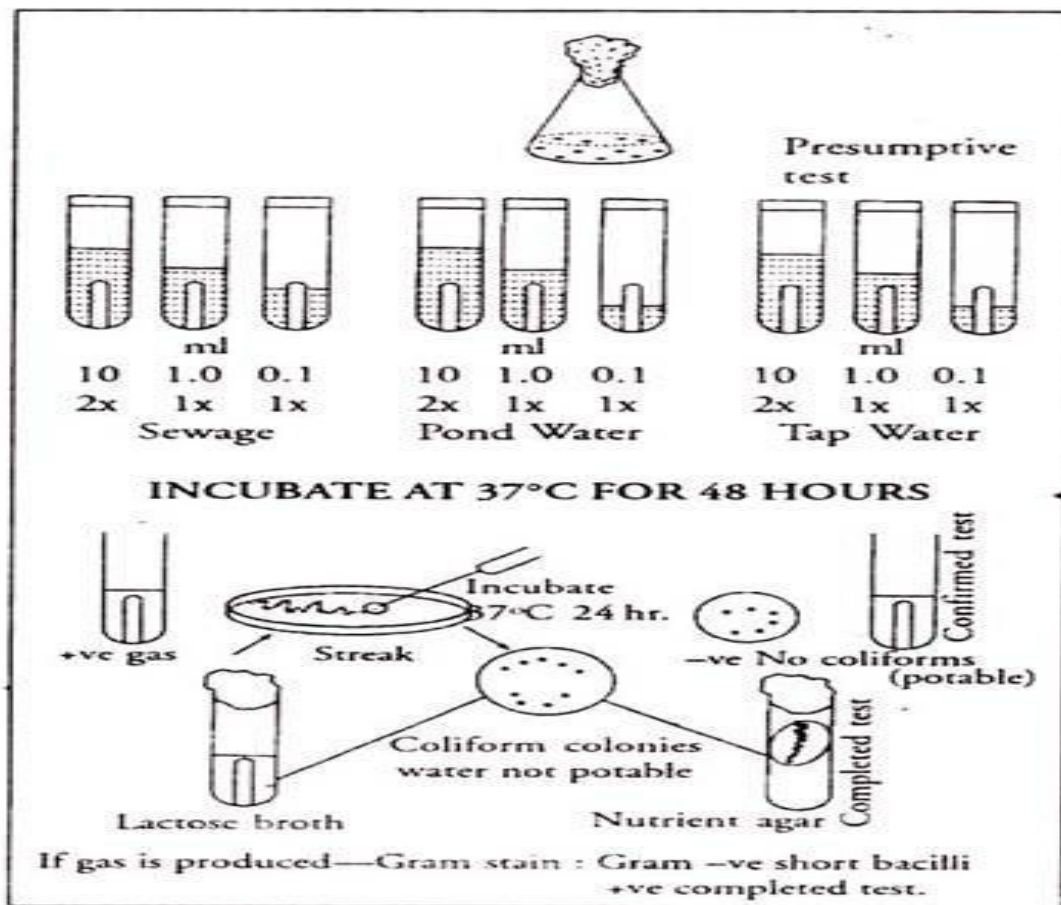


Fig. 6.1: Bacteriological Analysis of Water

Gambar 11 Skema pemupukan untuk uji NPN koliform

2. Uji NPN Koliform

Uji koliform dilakukan dengan seri 9 atau 15 tabung, dimana setiap 3 atau 5 tabung masing-masing berisi contoh sebanyak 10 ml, 1,0 ml dan 0,1 ml. medium yang digunakan adalah Lactose Broth (LB) dengan tambahan indikator warna merah fenol dengan suhu inkubasi $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 48 Jam. Untuk jumlah contoh 10 ml, digunakan tabung LB double strength (konsentrasi laktosa digandakan). Kemudian dihitung dengan jumlah tabung positif pada setiap seri dengan jumlah contoh sama, yaitu tabung yang memperlihatkan terjadinya pembentukan gas didalam tabung Durham. Nilai MPN contoh sesuai dengan lampiran 1 untuk prosedur yang menggunakan 9 tabung dan Lampiran 2 untuk prosedur yang menggunakan 15 tabung.

3. Uji lengkap Koliform

Terhadap paling sedikit 10% dari hasil uji MPN positif dilakukan uji lengkap koliform untuk membuktikan adanya bakteri koliform didalam contoh. Dari tabung-tabung MPN positif tersebut diambil suspensi menggunakan jarum ose dan masing-masing digoreskan pada agar cawan yang berisi Eosine Methylene Blue, segera setelah terlihat adanya pembentukan gas. Cawan kemudian diinkubasikan pada suhu $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 24 Jam. Koloni koliform pada EMB berwarna hijau metalik (koliform fekal atau escheria coli), atau berwarna merah muda dengan titik hitam dibagian tengahnya (koliform nonfekal, misalnya *Enterobacter aerogenes*).

Koloni terpisah yang menunjukkan koliform fekal maupun nonfekal kemudian diambil dengan jarum ose dan masing-masing digoreskan pada agar miring Nutrient Agar dari koloni yang sama diinokulasikan kedalam tabung Lactose Broth yang berisi tabung durham. Semua tabung diinkubasikan pada suhu $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (untuk nonfekal) dan $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (untuk yang fekal) selama 48 jam.

Dari agar miring Nutrient Agar, dimana koloninya pada Lactose Broth menunjukkan pembentukan gas, dibuat pewarnaan gram, kemudian dilihat dibawah mikroskop. Adanya bakteri gram negative berbentuk batang tidak berspora menunjukkan uji lengkap positif, yang berarti contoh mengandung bakteri koliform.

Pertanyaan

1. Bagaimana perbedaan kualitas mikrobiologis air sumur, air PAM, air minum kemasan dan air minum isi ulang ?
2. Apakah pengaruh perbedaan cara pemrosesan dan pengemasan dapat mempengaruhi kualitas air minum yang dihasilkan ?

Tabel 4 Nilai MPN (Most Probable Number) untuk seri 3 tabung

Jumlah tabung positif				MPN	Jumlah tabung positif				MPN
Seri A	Seri B	Seri C	Seri A		Seri B	Seri C			
0	0	0	<0,03	2	0	0	0,091		
0	0	1	0,03	2	0	1	0,14		
0	0	2	0,06	2	0	2	0,20		
0	0	3	0,09	2	0	3	0,26		
0	1	0	0,03	2	1	0	0,15		
0	1	1	0,061	2	1	1	0,20		
0	1	2	0,092	2	1	2	0,27		
0	1	3	0,12	2	1	3	0,34		
0	2	0	0,062	2	2	0	0,21		
0	2	1	0,093	2	2	1	0,28		
0	2	2	0,12	2	2	2	0,35		
0	2	3	0,16	2	2	3	0,42		
0	2	0	0,094	2	2	0	0,29		
0	2	1	0,13	2	2	1	0,36		
0	2	2	0,16	2	2	2	0,44		
0	2	3	0,19	2	2	3	0,53		
1	0	0	0,036	3	0	0	0,23		
1	0	1	0,072	3	0	1	0,39		
1	0	2	0,11	3	0	2	0,64		
1	0	3	0,15	3	0	3	0,95		
1	1	0	0,19	3	1	0	0,43		
1	1	1	0,11	3	1	1	0,75		
1	1	2	0,15	3	1	2	1,20		
1	1	3	0,20	3	1	3	1,60		
1	2	0	0,24	3	2	0	0,93		
1	2	1	0,16	3	2	1	1,50		
1	2	2	0,20	3	2	2	2,10		
1	2	3	0,24	3	2	3	2,90		
1	3	0	0,16	3	3	0	2,40		
1	3	1	0,20	3	3	1	4,60		
1	3	2	0,24	3	3	2	11,0		
1	3	3	0,29	3	3	3	>24,00		

Acara 11. Sanitasi dan Hygiene Pengolahan

A. Pendahuluan

Sanitasi dan hygiene adalah suatu istilah yang dikaitkan dengan kesehatan manusia. Dalam industri pengolahan makanan, sanitasi meliputi kegiatan secara aseptis dalam persiapan, pengolahan, dan pengemasan produk makanan, kesehatan dan kebersihan lingkungan pabrik dan pekerja.

Sanitasi lingkungan meliputi sanitasi didalam dan diluar ruang pengolahan. Pengolahan yang dilakukan didalam ruang yang tidak bersih akan memungkinkan terjadi pencemaran makanan yang diolah. Demikian pula kebersihan lingkungan yang tidak terjaga akan menyebabkan penyebaran penyakit melalui makanan.

Pekerja yang menangani makanan merupakan sumber kontaminasi yang penting, karena kandungan mikroba pathogen pada manusia dapat menimbulkan penyakit yang ditularkan melalui makanan. Manusia yang sehat merupakan sumber potensial mikroba, seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, dan *Streptokoki*. Stafilocoki umum terdapat pada kulit, mulut dan tenggorokan serta dapat dengan mudah dipindahkan kedalam makanan yang sedang diolah..

Bakteri pathogen yang berasal dari pencernaan mempunyai kesempatan yang baik untuk mengkontaminasi makanan dapat memindahkan bakteri pathogen kedalam bahan makanan jika mereka tidak mencuci tangannya setelah mengunjungi kamar kecil.

B. Tujuan

Untuk mengetahui status sanitasi udara pada suatu lingkungan pengolahan dan status hygiene pekerja pengolahan makanan.

Alat dan Bahan

Alat : Cawan petri steril

Bahan : Media NA dalam cawan petri steril, sabun cuci biasa dan sabun cuci antiseptic.

C. Prosedur Pelaksanaan

A. Hygiene dan Sanitasi Ruang Pengolahan Makanan

1. Cawan petri berisis NA diletakkan secara terpisah dilaboratorium, toilet, dan koridor kemudian dibiarkan terbuka selama 15 menit (Dilakukan duplo).
2. Setelah cawan ditutup, inkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari.
3. Hitung jumlah koloni yang tumbuh, nyatakan dalam densitas mikroba perjam per cm².

Densitas/jam/cm² =

(rata-rata Σ mikroba 2 cawan X 60 menit)

(15 menit X luas cawan (cm²))

B. Higene dan Sanitasi Pekerja Pengolahan Makanan

1. Pada uji hygiene pekerja akan dilihat status kebersihan tangan : sebelum dicuci, dicuci tanpa sabun, dicuci dengan sabun biasa dan dicuci dengan sabun antiseptic
2. Salah satu pratikan menempelkan 3 jari tangan pada permukaan media selama 4 detik, setelah itu cawan ditutup
3. Kemudian tangan dicuci sesuai perlakuan dan dibiarkan mengering. Ulangi menempelkan 3 jari selama 4 menit
4. Inkubasikan cawan pada suhu 30°C selama 2 hari
5. Amati koloni yang tumbuh, nyatakan secara kualitatif dalam :

-	:	Tidak ada yang tumbuh
+	:	Tumbuh tetapi sedikit
++	:	Tumbuh agak banyak
+++	:	Tumbuh banyak
++++	:	Tumbuh sangat banyak

Laporan Sementara

Pratikum acara 1

Nama :

Tanggal :

Kelompok :

Hasil Pengamatan

Tabel 5 Densitas Mikroba Pada Ruangan

Ruang	Jumlah koloni yang tumbuh		Luas Cawan	Densitas Mikroba
	Cawan 1	Cawan 2		

Tabel 6 Status Kebersihan Tangan Pekerja Pengolahan Makanan

Perlakuan	Pertumbuhan mikroba	
	Pekerja 1	Pekerja 2
Sebelum dicuci		
Dicuci tanpa sabun		
Dicuci dengan sabun biasa		
Dicuci dengan sabun antiseptic		

Samarinda, 20...

Ttd co-ass

Acara 12. Aktifitas Antimikroba

A. Pendahuluan

Uji potensi antimikroba dapat dilakukan dengan 2 macam metode, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Cara pengujian potensi (daya atau kekuatan) senyawa antimikroba ada bermacam-macam, tergantung pada sifat dan bentuk sediaan senyawa antimikroba. Pada umumnya digunakan cara pengenceran, cylinder diffusion plate method, paper disk diffusion method dan agar dilution plate method.

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Metode difusi dapat dilakukan secara paper disk dan secara sumuran.

Metode difusi secara sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang telah ditanami mikroba uji. Sumuran dibuat tegak lurus terhadap permukaan media. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran ini dan diinkubasikan, setelah itu hasilnya dibaca seperti pada difusi secara paper disk. Luasnya zona jernih merupakan petunjuk kepekaan mikroba terhadap antibiotik. Selain itu, luasnya zona jernih juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media (Lay, 1994; Jawetz dkk, 1986).

B. Tujuan

Mengetahui ada tidaknya potensi antibakteri dari suatu senyawa antimikroba, misalnya antibiotik, secara difusi sumuran

C. Prosedur Pelaksanaan

Uji Potensi Senyawa Antibiotik Secara Difusi Sumuran

Alat dan Bahan :

Alat gelas : petridish steril, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur

Mikropipet, pelobang gabus no. 4, jangka sorong/penggaris, jarum ose, spidol, kertas label, vortex mixer, spreader, Senyawauji berupa antibiotik (Chloramfenicol dll), Kultur murni bakteri uji dalam media NB umur 24 jam, Media nutrien agar (NA), Deret larutan standar Mac Farland, Nutrient Broth (NB) untuk pembuatan suspensi bakteri uji, Aquadest steril sebagai pelarut senyawa uji dan Alkohol 70 %

Cara kerja :

Preparasi Senyawa Uji

Preparasi senyawa uji dilakukan sesuai petunjuk dalam kemasan, kemudian buatlah berbagai variasi konsentrasi senyawa uji. Pada praktikum ini dibuat 4 variasi konsentrasi senyawa uji 25 %, 50%, 75% dan 100 %

Preparasi Mikroba Uji

- Siapkan kultur murni bakteri uji dan Siapkan deret larutan standar Mac Farland
- Buat sebanyak 2 tabung @10 ml suspensi bakteri uji menggunakan media BPW dan setarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroba 6.10^8 CFU/ml).

Pengujian potensi antibiotik secara difusi sumuran

- Siapkan beberapa petri berisi 20 ml media nutrient agar (NA)
- Buka petri berisi 20 media NA, secara aseptis buatlah sumuran pada petri 1) dengan pelobang gabus no. 4. Ambil bulatan NA pada sumur yang dibuat dengan jarum ose secara hati-hati sehingga NA di sekelilingnya tidak tergores/rusak. Masukkan bulatan NA tersebut dalam beker glass berisi alkohol.
- Dengan menggunakan mikropipet, pada masing- masing sumuran tersebut diinokulasikan 50 μ l senyawa uji dengan kontrol negatif/pelarut dan 4 variasi konsentrasi senyawa uji.
- Beri label pada dasar petri secara benar
- Inkubasikan selama 24 jam. Perhatian : inkubasi tidak dilakukan secara terbalik! Amati zona keruh dan jernih di setiap petri.
- Amati, gambar pertumbuhannya. Ukur diameter zona jernih di sekitar sumuran dengan jangka sorong/penggaris. Hitung diameter zona hambat yang terbentuk.

PERTANYAAN-PERTANYAAN DISKUSI :

1. Apa perbedaan metode difusi sumuran dan difusi paper disk yang Anda kerjakan di atas?
2. Mengapa pada preparasi mikroba uji diperlukan larutan standar?
3. Bagaimana cara pembuatan larutan standar Mac Farland?
4. Apa fungsi dari : kontrol kontaminasi media, kontrol pertumbuhan mikroba uji dan kontrol negatif/pelarut?
5. Mungkinkah digunakan pelarut senyawa uji yang memiliki potensi antimikroba? Jelaskan!

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M., 1997, *Principles of Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers. Iowa
- Barrow, G.I., and R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* Third Edition. Syndicate of the University of Cambridge. United Kingdom.
- Bonang, G., dan Koeswardono, E.A., 1982, *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*, 45-46, P.T. Gramedia, Jakarta
- BPOM, 2006, Metode Analisis PPOMN, MA PPOMN nomor
- Djide, N., Sartini dan S. Kadir. 2005. Analisis Mikrobiologi Farmasi. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Universitas Hasanuddin
- Fardiaz, S. 1988. Petunjuk Laboratorium Mikrobiologi Pengolahan Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB
- Fardiaz, S. 1992 Mikrobiologi Pangan. Gramedia, Jakarta
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan prosedur dasar laboratorium. Gramedia, Jakarta
- Jay, J. 2000. *Modern Food Microbiology*, 6th Ed, Aspen Publ., Gathersburg, Maryland
- Jost, H. 2006. *Microbiology Techniques Laboratory Manual*. Departement of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., Suhadi D., 1980, *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta. UGM Press. Yogyakarta
- Lay, B., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, Brock, 2000, *Biology of Microorganisms*, 9th ed, Prentice Hall International Inc., Upper Saddle River, New York
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap and D.P. Clark, 2009, *Brock Biology and Microorganisms*, 12th ed, Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco
- McKane, L., Kandel, J., 1996, *Microbiology : Essentials and Application*, Mc Graw Hill Inc., New York
- Murray P.R., 1999, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington
- Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta
- Pelczar, M.J., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta Prescott, L.M., Habley, J.P., and Klein, D.A., 1999, *Microbiology*,
- Radji, M. 2004, *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*, Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia, Jakarta
- SNI, 1992, Cara Uji Cemar Mikroba, SNI 01-2897-1992, Jakarta,
- Soekarto, 2008. Kapang Dalam Bahan Pangan, <http://www.scumdoctor>
- Volk, W. A., dan M. F. Wheeler, 1988, *Mikrobiologi Dasar*, Penerbit Erlangga, Jakarta

