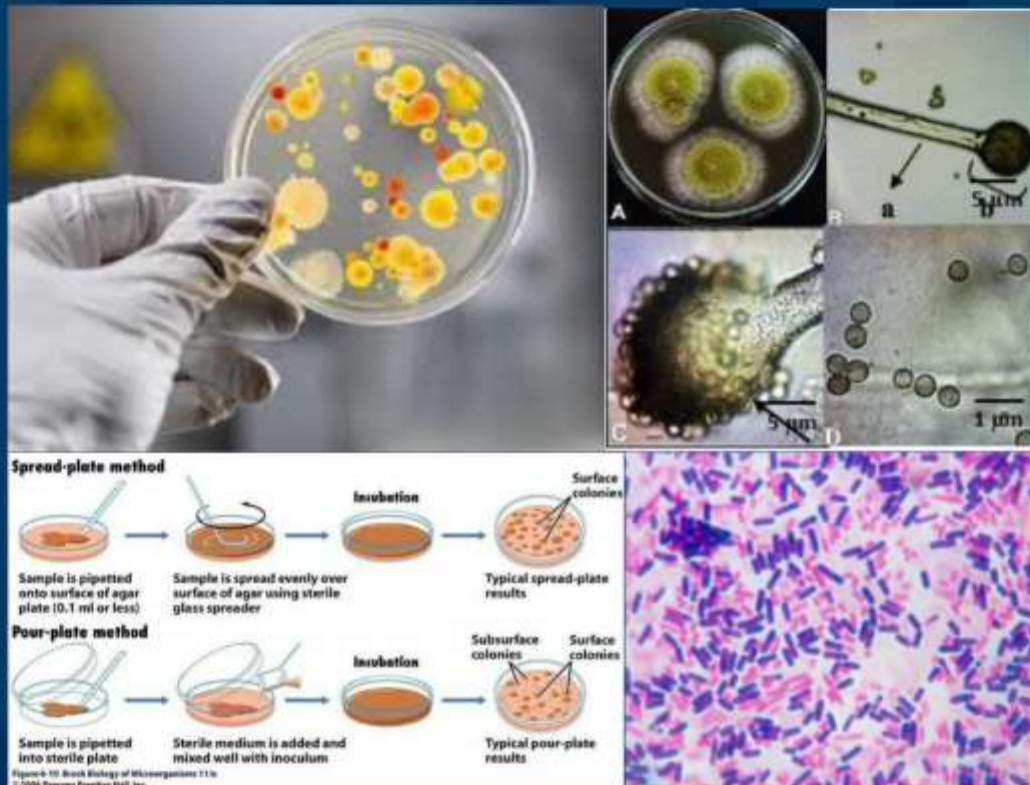


PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI



Oleh
Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S
Drs. Ibnul Mubarak, M.Sc
Dr. Ir. Pramesti Dewi, M.Si

Petunjuk Praktikum Mikrobiologi

TIM PENYUSUN

Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S
Drs. Ibnul Mubarak, M.Sc
Dr. Ir. Pramesti Dewi, M.Si



Hak Cipta © pada penulis dan dilindungi Undang-Undang Penerbitan.

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin dari penerbit.

Petunjuk Praktikum Mikrobiologi

TIM PENYUSUN

Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S

Drs. Ibnul Mubarak, M.Sc

Dr. Ir. Pramesti Dewi, M.Si

ISBN

Penerbit LPPM Universitas Negeri Semarang

Gedung Prof. Dr. Retno Sriningsih Satmoko,

Penelitian dan Pengabdian Masyarakat,

Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229

WA 085158837598 | Email sentraki@mail.unnes.ac.id

Sanksi Pelanggaran Pasal 72 Undang-Undang Nomor 19 Tahun 2002 Tentang Hak Cipta

1. Barangsiapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1(satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima milyar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual, kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 50.000.000,00 (lima puluh juta rupiah).

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberi rizki, hidayah dan rahmatnya kepada kita, sehingga Petunjuk Praktikum Mikrobiologi ini selesai ditulis ulang, untuk melengkapi kegiatan praktikum mahasiswa Biologi, Petunjuk Mikrobiologi ini disusun ringkas, sederhana dan terbatas; memuat gambaran umum mikroorganisme terdiri atas bakteri dan jamur. Jamur atau fungi yang dibahas terbatas terutama divisio Ascomycota, Zygomycota dan Deuteromycota. Mikroorganisme dalam domain makhluk hidup di alam semesta, menurut Carl Richard Woese (1977) termasuk dalam domain Archaea, Bacteria dan Eukarya. Serangkaian acara praktikum yang telah disusun meliputi Pengenalan alat peralatan di Lab. Mikrobiologi, media pertumbuhan mikroorganisme dan reagen/cat mikrobial; Keanekaragaman karakter morfologi mikrobial pada bahan pangan dan lingkungan; Morfologi sel bakteri melalui pengecatan sederhana dan pengecatan negatif; Pengecatan deferensial bakteri melalui pengecatan Gram dan pengecatan Spora; Morfologi koloni dan sel kapang (jamur benang) dan khamir (yeast); Sterilisasi dan Pembuatan media; Isolasi dan penanaman mikroorganisme dengan teknik sebaran (pour plate), perataan (spread plate) dan goresan (streak plate); Purifikasi dan identifikasi mikroorganisme; Pemeriksaan antibakteri dari bahan alam secara dilusi dan difusi; Fermentasi pangan dan non pangan. Mikroorganisme merupakan makhluk hidup mikroskopis yang kehadirannya sangat penting, karena perannya sebagai agen dekomposisi dalam siklus hidup semua organisme dan lingkungan semesta alam. Observasi mikroorganisme merupakan langkah awal yang penting bagi mahasiswa Biologi dan pendidikan Biologi untuk bisa mendalami, mengembangkan dan menyampaikan kepada masyarakat luas, peserta didik dan sesama peneliti. Semoga Buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi ini bermanfaat bagi mahasiswa Jurusan Biologi dan lainnya sebagai pendukung untuk lebih menyenangkan dan mengembangkan bidang bioteknologi, mikrobiologi dan ilmu yang terkait lainnya.

Semarang, Agustus 2022

Koordinator penyusun

Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S

DAFTAR ISI

PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
TATA TERTIB DAN PERATURAN LABORATORIUM MIKROBIOLOGI	vi
ACARA I - Pengenalan Alat Media Pertumbuhan dan Reagen/Cat Mikrobial.....	1
ACARA II - Keanekaragaman Karakter Mikrobial pada Bahan Pangan dan Lingkungan	7
ACARA III - Morfologi Sel Bakteri Melalui Pengecatan Sederhana dan Pengecatan Negatif	13
ACARA IV - Pengecatan Gram dan Pengecatan Spora.....	16
ACARA V - Morfologi Koloni dan Sel Kapang dan Khamir	21
ACARA VI - Sterilisasi dan Pembuatan Media	23
ACARA VII - Isolasi Teknik Sebaran, Perataan dan Goresan Purifikasi dan Identifikasi Mikroorganisme .	30
ACARA VIII - Pemeriksaan Antibakteri dari Bahan Alam dengan Metode Dilusi dan Difusi.....	34
ACARA IX - Fermentasi Pangan dan Non Pangan.....	39
DAFTAR PUSTAKA	44

TATA TERTIB DAN PERATURAN LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

1. Sebelum praktikum dimulai, mahasiswa diwajibkan untuk :
 - a. Membuat rencana kerja praktikum yang akan dikerjakan sebelumnya
 - b. Menyelesaikan tugas yang berhubungan dengan acara praktikum
 - c. Menempuh pre-test yang dilaksanakan sebelum praktikum dimulai.
2. Bagi mahasiswa yang **terlambat lebih dari 15 menit** tidak diperbolehkan mengikuti praktikum
3. Peserta praktikum wajib memenuhi kehadiran sebanyak 100%. Tidak ada *inhal* dengan alasan apapun selama praktikum mikrobiologi. Bagi mahasiswa bila **berhalangan hadir** karena sakit atau hal-hal yang dapat dipandang sebagai kondisi darurat atau mendesak diwajibkan memberi keterangan resmi. Kecuali dengan alasan yang sangat kuat mahasiswa diperbolehkan *inhal* maksimal 2x, jika lebih dianggap gagal dalam mata kuliah praktikum mikrobiologi.
4. Mahasiswa yang tidak hadir tanpa pemberitahuan tertulis akan diberikan nilai 0 (nol) untuk bab yang ditinggalkan.
5. Dilarang menggunakan sepatu di area laboratorium. Sepatu harap disimpan pada rak sepatu yang sudah disediakan dengan rapi.
6. Menggunakan kaos kaki untuk perlindungan kaki selama di dalam laboratorium mikrobiologi.
7. Dilarang meletakkan barang-barang pengguna laboratorium (tas dan barang berharga lain) di atas meja kerja laboratorium. Tas dan barang berharga harap diletakkan di tempat yang sudah disediakan.
8. **Dilarang** makan, minum, merokok atau membawa makanan/minuman ke dalam laboratorium. **Dilarang** bermain-main atau memasukkan/menggigit-gigit barang (seperti pensil) dalam bentuk apapun baik secara sengaja atau tidak sengaja ke dalam mulut! Hal ini untuk menghindari kemungkinan tertelannya kultur mikroorganisme yang digunakan di laboratorium.
9. Selama bekerja di laboratorium mahasiswa diharuskan untuk :
 - a. Mencuci tangan dengan menggunakan air dan sabun sebelum dan sesudah bekerja di laboratorium. Lakukan hal yang sama saat meninggalkan laboratorium untuk pergi ke kamar kecil.
 - b. Membersihkan meja praktikum dari alat peralatan, bahan praktikum dan bawaan praktikan **sebelum dan sesudah bekerja di Lab Mikrobiologi.**
 - c. Memakai jas praktikum yang bersih dan terkancing rapi. Bagi yang menggunakan jilbab, masukkan rumbai kerudung ke dalam jas praktikum.
 - d. Bagi yang berambut panjang hendaklah rambutnya diikat.
 - e. **Memberi label terhadap semua barang** terutama yang disimpan dan diinkubasi (Nama, kelompok, tanggal, jenis kultur dan keterangan lain yang dianggap penting).
 - f. Jika secara tidak sengaja ada bahan **kultur yang tercecer**, segera jenuhi dengan desinfektan, tutup dengan *paper towel/tissue* dan lapor segera kepada pengawas laboratorium. Area segera di dekontaminasi dengan desinfektan. Hati-hati dengan pembakar Bunsen, matikan bila tidak sedang digunakan. Ketika sedang bekerja, hati-hati untuk tidak menyentuh api bunsen dengan tangan.
 - g. Dilarang membuang biakan sisa atau habis pakai dan pewarna sisa di sembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan oleh asisten/laboran.
 - h. Semua material yang terkontaminasi segera ditempatkan pada tempat yang telah disediakan untuk didekontaminasi oleh petugas. Semua material yang akan diautoklaf ditempatkan di dalam wadah yang tepat untuk pengumpulan. Pipet yang telah terpakai

ditempatkan dalam disinfektan. Dilarang membawa kultur ke luar ruangan laboratorium. Hal ini dilakukan untuk meminimalkan tersebarnya mikroorganisme.

10. Untuk setiap kecelakaan kerja harus segera dilaporkan pada pengawas (asisten, laboran, atau dosen jaga) untuk segera diambil tindakan yang tepat.
11. Setelah selesai menjalankan praktikum, alat-alat harus dikembalikan dalam keadaan bersih dan kering. Untuk alat-alat bekas mikroba sebelum dibersihkan harus disterilkan terlebih dahulu (baca poin 8 di atas).
12. Laporan praktikum diserahkan setelah tiap acara praktikum selesai dengan format laporan yang disediakan.
13. Setiap pelanggaran tata tertib akan dikenakan sanksi.

Keterangan :

1. Sebelum memulai praktikum mahasiswa sudah mempelajari materi dan membuat rencana kerja acara praktikum yang akan dikerjakan.
2. Setiap akan memulai praktikum dilakukan pre-tes dengan topik praktikum pada hari tersebut.
3. Laporan diserahkan seminggu setelah akhir mata acara praktikum per Acara selesai.
4. Mid responsi dilaksanakan pada minggu ke 8 atau 9
5. Responsi praktikum dilakukan pada minggu ke 16.
6. Nilai praktikum meliputi :
 - A. Partisipatif meliputi aktivitas dalam kelompok dan ketepatan pengumpulan laporan praktikum akhir, sebesar 30%
 - B. Laporan akhir dan laporan sementara praktikum/pembahasan, sebesar 30%
 - C. Pretest atau Postest 10%
 - D. UTS/Mid Responsi 15%
 - E. UAS/ Responsi Akhir 15%

ACARA I

PENGENALAN ALAT MEDIA PERTUMBUHAN DAN REAGEN/CAT MIKROBIA

A. TUJUAN

Mempelajari macam jenis alat-peralatan, bahan/medium yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi dan kegiatan yang berhubungan dengan aspek mikrobiologi serta penggunaannya dengan benar.

B. PENDAHULUAN

Mikrobiologi merupakan ilmu yang mempelajari organisme berukuran mikroskopis. Untuk mempelajari sifat dan peranannya, mikroba perlu dibiakkan dan diamati di dalam laboratorium. Mengingat bahwa mikroba merupakan makhluk hidup dengan ukuran sangat kecil, maka kontaminasi merupakan hal yang perlu dihindari. Untuk kepentingan mempelajari mikroba diperlukan berbagai alat dengan berbagai fungsi, antara lain peralatan sterilisasi, peralatan inkubasi, peralatan untuk pengamatan makroskopis maupun mikroskopis dan berbagai peralatan gelas untuk kegiatan kultivasi mikroba.

Alat-alat laboratorium merupakan bagian yang penting dalam menjalankan suatu kegiatan atau praktikum. Untuk melakukan praktikum biologi banyak digunakan alat-alat laboratorium yang beraneka, demikian pula untuk praktikum mikrobiologi. Alat-alat yang digunakan dalam praktikum mikrobiologi pada umumnya tidak berbeda dengan alat-alat praktikum Lab. Mikrobiologi pada institusi lain. Beberapa alat memiliki kekhususan, baik sifat maupun cara penggunaannya.

1. Peralatan gelas

Alat-alat gelas yang dipergunakan dalam pekerjaan mikrobiologi pada umumnya berupa alat-alat gelas seperti yang digunakan dalam lab. Mikrobiologi, antara lain : tabung reaksi, petridish, erlenmeyer, gelas piala, pipet ukur, gelas ukur, gelas obyek, kaca penutup, dll.



Gambar 1.1 (a) gelas ukur, (b) Beaker glass, (c) petridish, (d) erlenmeyer, (e) pipet ukur, (f) tabung reaksi

2. Peralatan sterilisasi

Semua peralatan yang digunakan dalam mikrobiologi harus dijaga kebersihannya dan disterilkan sebelum digunakan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroba yang tidak diinginkan. Peralatan untuk sterilisasi antara lain : lampu spiritus, autoklaf, disamping itu masih pula diperlukan lemari inokulasi (transfer-box / laminar air flow), milipore filter, dll.



Gambar 1.2 (a) pembakar spiritus, (b) autoklaf, (c) Laminar air flow, dan (d) Oven

Selain itu diperlukan alat khusus untuk menanam mikroba yang disebut dengan jarum tanam atau ose (Gambar 1.3). Terdapat 2 jenis jarum tanam, yaitu jarum tanam tajam yang digunakan untuk menanam/memindahkan biakan berfilamen (jamur), dan ose atau jarum tanam bulat yang digunakan untuk menanam/memindahkan biakan mikroba yang tidak berfilamen (bakteri dan khamir).



Gambar 1.3 Ose



Gambar 1.4 Cork borer

3. Peralatan inkubasi

Untuk menumbuhkan mikroba di dalam laboratorium, diperlukan peralatan tertentu berdasarkan sifat bakteri yang berkaitan dengan kondisi optimum pertumbuhannya.

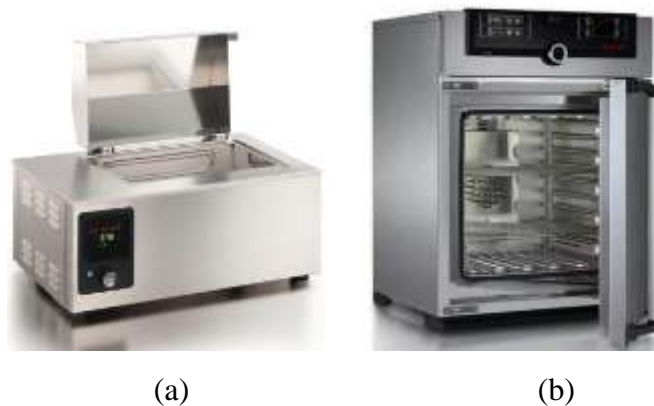
Menurut suhu pertumbuhannya, mikroba dikelompokkan menjadi :

1. psikrofil : hidup pada suhu minus 10 °C -20°C, optimum pada suhu 10°C
2. mesofil : hidup pada suhu 10 °C – 50°C, optimum pada suhu 35°C
3. termofil : hidup pada suhu 40 °C - 70°C, optimum pada suhu 60°C
4. hipertermofil : hidup pada suhu 65 °C - 110°C, optimum pada suhu 90°C

Menurut kebutuhan akan oksigen, mikroba dikelompokkan menjadi:

1. aerob
2. anaerob fakultatif
3. anaerob obligat
4. anaerob aerotoleran
5. mikroaerofil

Untuk menumbuhkan mikroba sesuai dengan kebutuhan suhu inkubasi dan oksigen, dapat digunakan peralatan seperti pada Gambar 1.5.



Gambar 1.5 (a) water bath, (b) inkubator

4. Mikroskop

Perkembangan ilmu mikrobiologi, salah satunya ditentukan oleh penemuan dan perkembangan mikroskop sebagai suatu alat utama untuk mengamati mikroba yang berukuran mikrometer ($\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) atau lebih kecil lagi. Beberapa jenis mikroskop telah dikembangkan antara lain mikroskop cahaya yang mendapatkan sumber cahaya dari gelombang cahaya dan mikroskop elektron yang sumber cahayanya berasal dari berkas sinar elektron. Berbagai jenis mikroskop cahaya telah dikenal, yaitu mikroskop medan terang, mikroskop medan gelap (dark field microscope), mikroskop

fluorensensi (fluorecens microscope) dan mikroskop fase kontras (phase contrast microscope). Mikroskop medan terang, merupakan jenis mikroskop yang paling umum digunakan di dalam praktikum mikrobiologi (Gambar 1.6)

Mikroskop jenis ini umumnya mempunyai lensa obyektif perbesaran lemah (4x atau 10x), perbesaran sedang (40x) dan perbesaran kuat (100x). Total perbesaran pengamatan obyek ditentukan dari hasil perkalian lensa obyektif dan lensa okuler yang digunakan.



Gambar 1.6 Mikroskop

Cara penggunaan mikroskop:

1. Bersihkan meja preparat dengan kain halus.
2. Letakkan preparat di atas meja preparat dan jepit dengan penjepit agar preparat tidak bergerak.
3. Mulailah mengamati preparat menggunakan lensa obyektif dengan perbesaran terkecil (misalnya 4x). Putar revolver, sehingga lensa obyektif berada tepat satu poros / di atas preparat.
4. Nyalakan sumber cahaya dan carilah fokus preparat dengan menaikturunkan lensa dengan cara memutar tombol fokus kasar secara perlahan-lahan. Hentikan apabila mulai terlihat bayangan gambar pada bidang pandang mikroskop.
5. Lanjutkan pencarian fokus preparat pada bidang pandang dengan memutar tombol fokus halus, sampai preparat terlihat jelas.
6. Setelah preparat terlihat jelas/detil, pada perbesaran 100x (10x10) perbesar pengamatan dengan menempatkan obyektif perbesaran 40x yang selanjutnya di arahkan untuk perbesaran 400x tepat satu poros / di atas preparat, dengan memutar revolver (lakukan dengan tidak mengubah posisi/meja preparat dan posisi tombol fokus kasar/halus).

7. Lakukan langkah-langkah 4 s/d 6, sampai mendapatkan gambar yang fokus sesuai dengan target pengamatan.
 8. Perbesar pengamatan menggunakan obyektif perbesaran yang lebih kuat 1000x, dengan melakukan langkah-langkah seperti di atas.
 9. Setelah selesai menggunakan, ambil preparat dan bersihkan meja preparat dengan menggunakan lap atau kertas tisu yang bersih.
 10. Sisa-sisa minyak imersi pada lensa obyektif dibersihkan **secara hati-hati** dengan larutan xylol/ethanol 96% dengan menggunakan kertas lensa
 11. Simpan kembali mikroskop dengan posisi lensa perbesaran lemah tepat di atas permukaan meja preparat, meja preparat dan diturunkan dengan menggunakan tombol fokus sampai lensa mencapai jarak terdekat dari permukaan meja preparat.
5. Peralatan untuk analisis

Suatu peralatan dengan fungsi tertentu guna membantu peneliti/praktikan untuk menyelesaikan suatu tugas. Alat ini digunakan untuk menganalisis suatu sampel secara kualitatif maupun kuantitatif. Alat analisis yang terdapat pada Lab. Mikrobiologi pada umumnya antara lain : pH meter, spektrofotometer, timbangan analitik dan kromatografi lapis tipis.



Gambar. 1.7 (a) pH meter, (b) spektrofotometer, (c) timbangan analitik

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : alat yang diperlukan adalah keseluruhan alat yang ada di laboratorium mikrobiologi

Alat tersebut antara lain :

- a. Alat non gelas : sendok tandu, spoit, labu semprot, hand spray
- b. Alat gelas : cawan petri, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, ball pipet, pipet ukur, pipet volum, erlenmeyer, tabung durham
- c. Alat Lab. Mikrobiologi : oven, inkubator, laminar air flow/ biosafety cabinet, autokaf, sentrifuge, penangas, shaker, neraca analitik, neraca ohaus, spektrofotometer, mikroskop.
- d. Alat spesifik mikrobiologik : ose lurus, ose bulat, ent kas cork borrar,

Bahan : Deterjen/teepol dan alkohol 70%, Aquadest, Spirtus, Kapas, Tissue

D. CARA KERJA

1. Siapkan alat-alat gelas, alat non gelas, alat instrumen dan alat-alat lainnya yang digunakan dalam laboratorium mikrobiologi
2. Potret alat-alat tersebut kemudian menempelkan pada buku laporan
3. Berikan keterangan dari bagian alat tersebut, kemudian mencatat fungsi dan prinsip kerja dari alat-alat tersebut.

E. HASIL PENGAMATAN

No	Nama alat dan keterangan	Fungsi	Prinsip kerja	Modifikasi	Dokumentasi

F. PERLATIHAN

1. Tuliskan prinsip kerja autoklaf, LAF/BSC, cork borer dan water bath!
2. Sterilisasi senyawa monomer misalnya gula sederhana dan antibiotik sebaiknya digunakan alat apa dan sebutkan alasannya!
3. Sebutkan masing-masing fungsi cat A, cat B, cat C dan cat D pada pengecatan gram!
4. Sebutkan rangkaian cat untuk pengecatan spora bakteri!
5. Tuliskan prinsip pengecatan gram!
6. Medium pertumbuhan meliputi nutrien agar, malt ekstrak agar, potato dekstrose agar dapat dibuat sendiri. Tuliskan bahan dan cara pembuatannya!
7. Jelaskan perbedaan antara pengecatan sederhana dan pengecatan negatif!

ACARA II

KEANEKARAGAMAN KARAKTER MIKROBIA PADA BAHAN PANGAN DAN LINGKUNGAN

A. TUJUAN

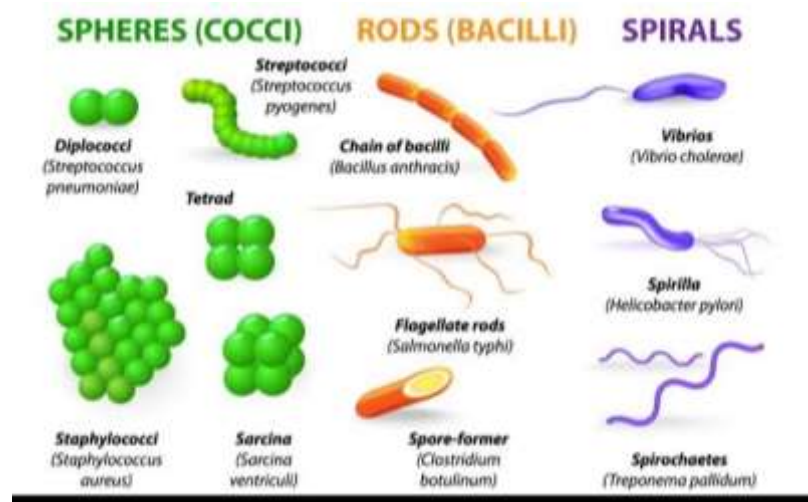
Untuk mengetahui morfologi koloni dan sel mikroorganisme (bakteri dan fungi) yang terdapat pada bahan pangan dan bahan lain dari lingkungan sekitar kita.

B. PENDAHULUAN

1. Bakteri

Bakteri dapat diidentifikasi baik secara morfologi, biokimiawi maupun secara genetik (molecular). Identifikasi bakteri secara morfologi dilakukan dengan mempelajari bentuk, ukuran dan susunan sel. Perubahan lingkungan mungkin dapat sedikit mempengaruhi bentuk dan ukuran sel, misalnya bakteri berbentuk batang dapat sedikit lebih pendek atau lebih panjang dalam kondisi lingkungan tertentu, namun hampir tidak pernah terjadi perubahan dari bentuk batang menjadi bentuk bulat atau sebaliknya.

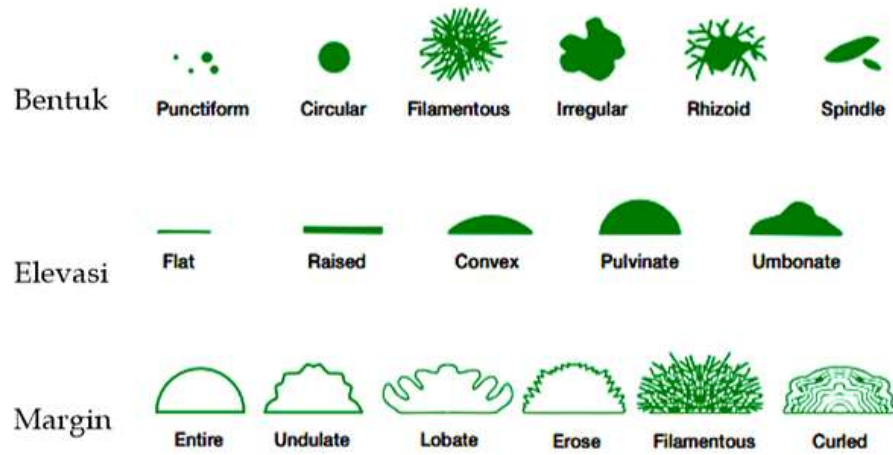
Bentuk bakteri bermacam-macam, ada yang berbentuk batang, bulat dan spiral. Bakteri dapat dilihat tanpa pengecatan misalnya dengan cara *hanging drop* (tetesan bergantung) dan dengan menggunakan gelas benda cekung. Untuk melihat sel bakteri lebih jelas sampai struktur selnya, perlu dilakukan pengecatan.



Gambar 2.1 Bentuk dan susunan sel bakteri

a. Pertumbuhan bakteri pada cawan petri

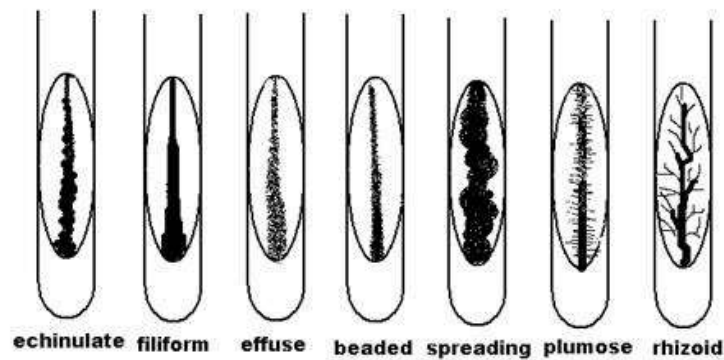
Ciri-ciri yang perlu diperhatikan adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Morfologi koloni mikroba yang sering dijumpai

b. Pertumbuhan bakteri pada agar miring

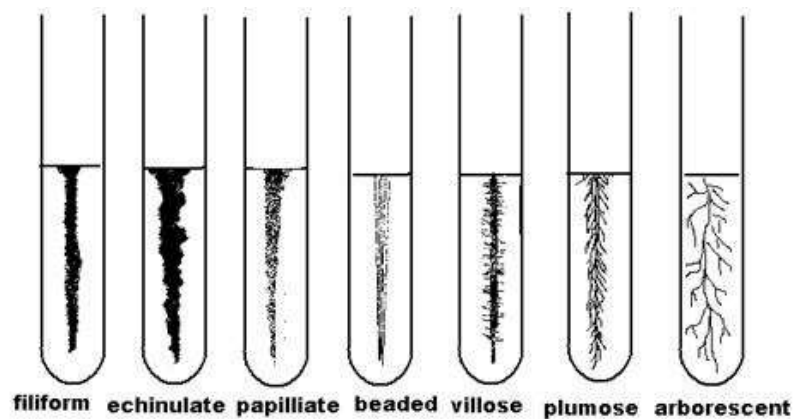
Ciri-ciri koloni diperoleh dengan menggoreskan jarum inokulum tegak dan lurus. Ciri koloni berdasarkan bentuk :



Gambar 2.3 Pertumbuhan bakteri pada agar miring

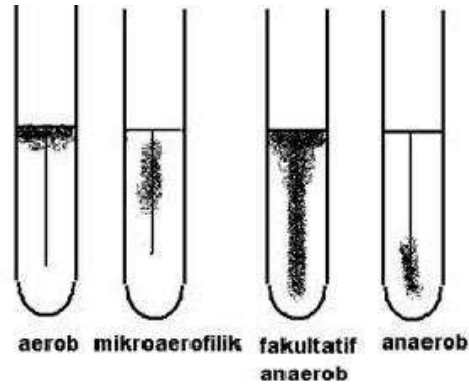
c. Pertumbuhan bakteri pada agar tegak

Cara penanaman adalah dengan memasukkan jarum inokulum *needle* kedalam media agar tegak. Ciri-ciri koloni berdasarkan bentuk :



Gambar 2.4 Pertumbuhan bakteri pada agar tegak

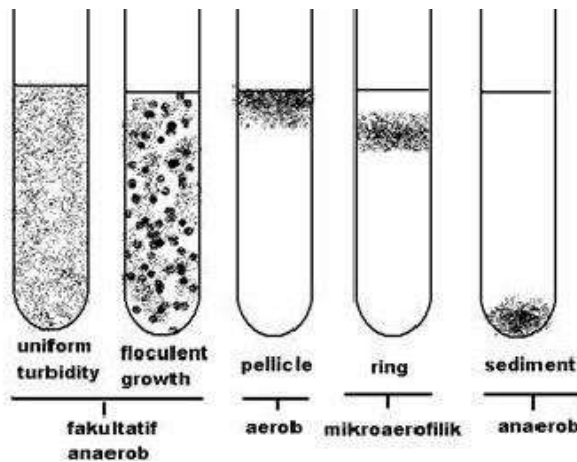
Ciri koloni berdasarkan kebutuhan oksigen :



Gambar 2.5 Pertumbuhan koloni berdasarkan kebutuhan oksigen pada agar tegak

d. Pertumbuhan pada media cair

Pola pertumbuhan berdasarkan kebutuhan oksigen :



Gambar 2.6 Pertumbuhan koloni berdasarkan kebutuhan oksigen pada media cair

2. Fungi (Kapang dan Khamir)

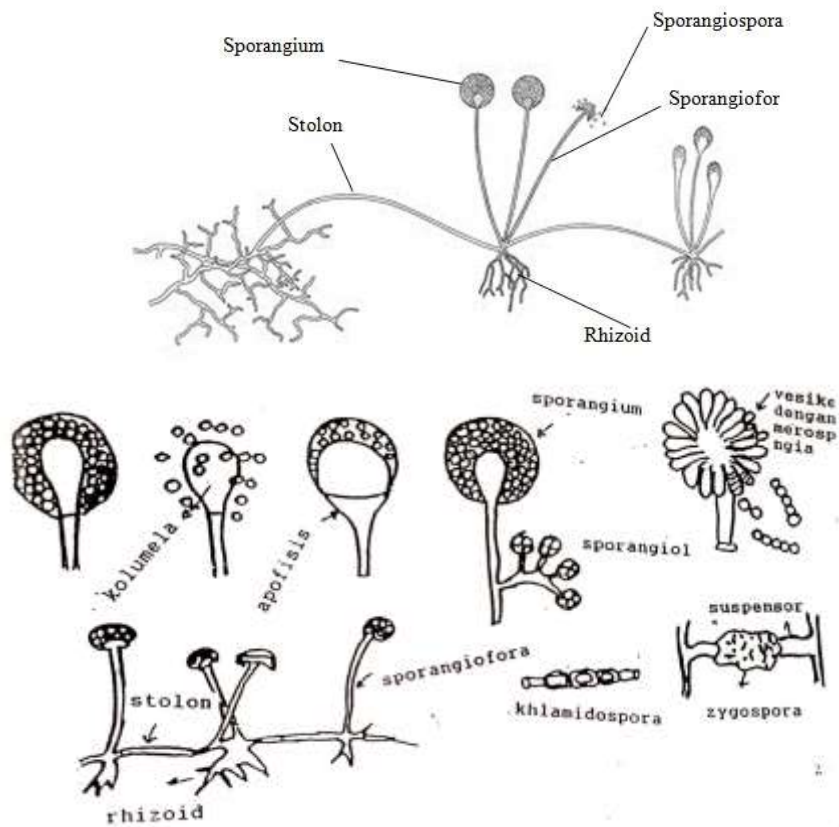
Kapang

Kapang termasuk dalam eukariot seperti halnya tanaman, namun kapang tidak memiliki pigmen klorofil untuk proses fotosintesis. Organisme ini akan tumbuh secara aerob dan memperoleh energinya dari proses oksidasi menggunakan substrat organik. Peranan kapang dialam sangat besar, terutama bagi kehidupan manusia. Ada yang menguntungkan dan ada yang merugikan.

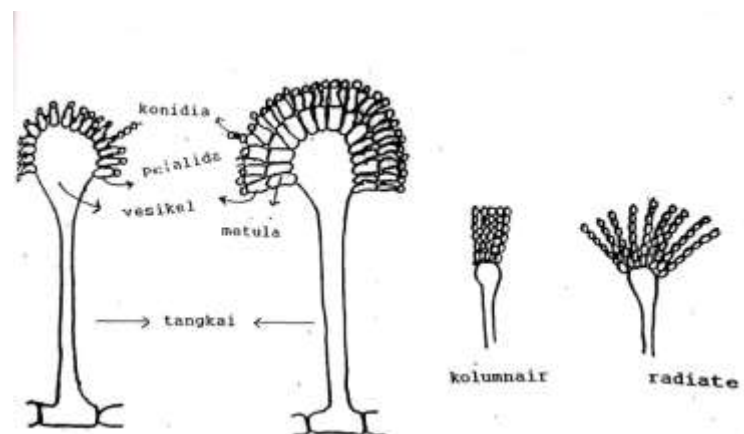
Kapang mempunyai bentuk vegetatif berupa talus, yang terdiri atas filamen. Masing-masing filamen ini disebut sebagai hifa dan jaringan hifa disebut dengan miselium. Filamen atau hifa yang berdinging sel dengan sitoplasma di dalamnya ini bercabang dan menyebar di permukaan disebut hifa udara atau masuk ke dalam substrat disebut sebagai *submerged hypha*. Hifa juga dapat diklasifikasikan sebagai hifa vegetatif, yang terutama

terlibat di dalam penyiapan nutrisi jamur, dan hifa fertil yang terlibat di dalam produksi bagian-bagian reproduktif.

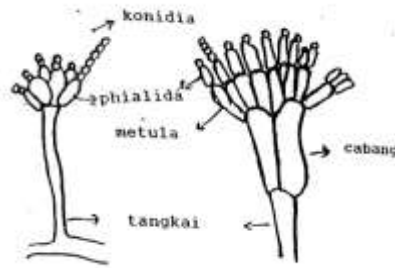
Untuk pengamatan kapang secara mikroskopis, perlu diperhatikan ada tidaknya sekat pada hifa, halus tidaknya sitoplasma hifa, bentuk spora/konidia, badan buah, dasar badan buah, pendukung badan buah, stolon, rhizoid dan sebagainya.



Gambar 2.7 Struktur morfologi Zygomyces



Gambar 2.8 Struktur morfologi Aspergillus



Gambar 2.9 Struktur morfologi Penicillium

Khamir

Khamir merupakan sel uniseluler, tidak berklorofil, tidak berflagela, berukuran lebih besar daripada bakteri, tidak membentuk miselium, berbentuk bulat, bulat telur, batang, silindris, seperti buah jeruk, seperti sosis, kadang-kadang dapat mengalami dimorfisme (yaitu dalam fase F-filamen atau fase Y Yeast) khamir bersifat saprofit, namun ada beberapa yang cara hidupnya sebagai parasit, tersebar dimana-mana lebih sering dalam bentuk sel vegetatif daripada spora.

Penyebaran khamir hampir terdapat pada bahan-bahan yang mengandung gula, di tanah-tanah perkebunan, dalam tubuh serangga dan getah pohon. Ukuran sel khamir tergantung spesiesnya, yakni antara $1-9 \times 10^{-20}$. Macam-macam bentuk khamir :

- a. Bulat/oval : *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp*
- b. Topi : *Endomyces sp*, *Hansenula sp*, *Hanseniapora sp*
- c. Sphaeris : *Endomycopsis sp*, *Debarymyces sp*
- d. Jarum : *Nematospora sp.*
- e. Pseudohifa : *Hyphopichia burtonii*

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : Mikroskop dan minyak imersi

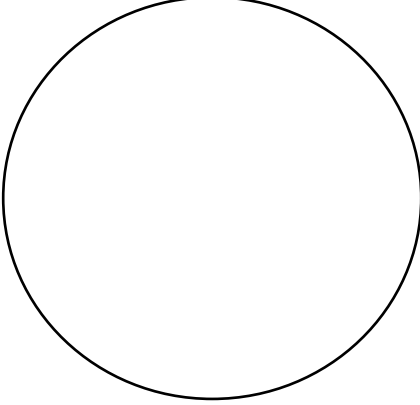
Bahan : sampel dari bahan alam yang di bawa masing-masing kelompok (wortel, kentang, nasi yang sudah mendapatkan perlakuan dan sudah di inkubasi selama 1-3 hari, air tape, bintil akar kacang-kacangan, daging buah yang sudah diinkubasi dan sudah ditumbuhi mikroba pada permukaannya pada bagian kulit atau ujungnya) dll.

D. CARA KERJA

1. Amati bentuk-bentuk sel bakteri, kapang dan khamir pada preparat yang telah dibawa dengan menggunakan mikroskop, mulailah dengan perbesaran lemah (5x) dan dilanjutkan dengan perbesaran sedang (10x) hingga kuat (40x atau 100x) menggunakan minyak imersi.
2. Amati morfologi koloni fungi (khamir dan kapang) pada sampel yang Sdr. bawa, pada point 1) meliputi warna, bentuk, kilap, dan tekstur.

3. Pengamatan sel dengan menggunakan mikroskop diamati keseluruhan sel meliputi spora/konidia, sporangiofor, rhizoid, hifa, dan ciri morfologi khasnya.
4. Buatlah gambar sel yang Anda dapatkan lengkapi dengan keterangan gambar.

E. HASIL PENGAMATAN

	<p>KETERANGAN :</p>
---	---------------------

F. PERLATIHAN

1. Jelaskan keberadaan eksistensi mikroorganisme di bahan pangan, pertanian, perairan dan sampah!
2. Pada air tape terdapat mikroorganisme dari genus apa saja?
3. Prediksikan mikroorganisme apa saja yang terdapat pada irisan kentang, wortel, yang sudah matang yang telah dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu kamar!
4. Pada tempe, Anda bisa mendapatkan sel rhizopus yang berlimpah untuk dapat diamati koloni dan selnya, sebutkan cara yang Anda gunakan!
5. Sebutkan pada bahan apa Anda mendapatkan isolat bakteri?
6. Pada fermipan Anda akan mendapatkan nama spesies, sebutkan nama spesies tersebut!
7. Pada bahan pangan yang dibuka selama 24 jam, misalnya irisan buah semangka, pepaya dan melon akan didapatkan bakteri, jelaskan bagaimana cara mendapatkannya!

ACARA III

MORFOLOGI SEL BAKTERI MELALUI PENGECATAN SEDERHANA DAN PENGECATAN NEGATIF

A. TUJUAN

1. Untuk mengamati bentuk bakteri dengan menggunakan metode pengecatan sederhana dengan menggunakan satu pewarna dan satu tahapan pewarnaan
2. Untuk mengamati bentuk bakteri dengan metode yang cepat, dengan latar belakang gelap dan dapat dipakai untuk mengukur besarnya bakteri.

B. PENDAHULUAN

Bakteri atau mikroba lain dapat diamati secara langsung dengan mikroskop tanpa pengecatan, antara lain dengan metode tetesan bergantung (*hanging drop*), menggunakan mikroskop medan gelap atau mikroskop fase kontras, dll. Pengamatan tanpa pengecatan ini tidak dapat digunakan untuk melihat bagian-bagian sel dengan teliti, karena sel bakteri atau mikroba pada umumnya transparan atau semi transparan. Morfologi bakteri dapat diamati dengan lebih jelas dengan pengecatan sel.

Pengecatan sederhana merupakan pengecatan sel mikroba dengan satu pewarnaan dan satu tahap pengecatan saja. Tipe pengecatan ini dapat mewarnai sel atau latar belakangnya sehingga memungkinkan untuk mengamati bentuk sel dan susunan sel. Contoh : carbol fuchsin, gentian violet, metylen blue.

Pengecatan negatif merupakan pengecatan tidak langsung, karena yang di cat adalah latar belakang preparat. Pada teknik ini tidak dilakukan fiksasi, sehingga dapat dipergunakan untuk melihat bentuk sel yang sesungguhnya dan untuk menentukan ukuran sel mikroba. Cat yang banyak digunakan antara lain tinta cina atau nigrosin.

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : Mikroskop, objek glass, deck glass, pipet tetes, ose, bunsen.

Bahan : biakan murni *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*, larutan Ziehl Neelsen carbol fuchsin atau larutan cat Hucker's crystal violet, larutan nigrosin atau tinta cina, xilol, alkohol dan minyak imersi.

D. CARA KERJA

Pengecatan Sederhana

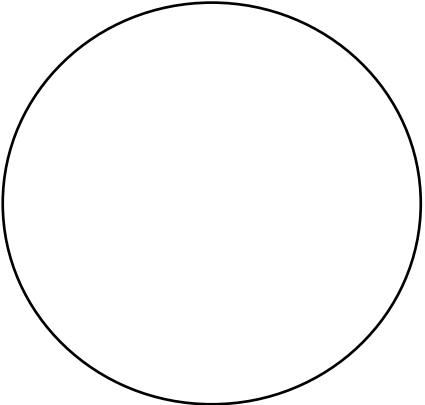
1. Bersihkan gelas benda dengan alkohol sampai bebas lemak, kemudian ganggang di atas nyala api bunsen.
2. Ambil secara septik 1 ose suspensi bakteri dan ratakan di atas objek glass seluas ± 1 cm

3. Kering anginkan preparat tersebut, hingga membentuk noda
4. Setelah preparat kering kemudian difiksasi dengan cara memanaskan di atas nyala api bunsen (lalukan preparat di atas nyala lampu bunsen 6 sampai 7 kali).
5. Setelah dingin teteskan cat (larutan carbol fuchsin atau crystal violet) pada noda sebanyak 1 atau 2 tetes, dan biarkan selama 1 sampai 2 menit.
6. Cuci dengan air mengalir sampai sisa-sisa cat tercuci seluruhnya.
7. Selanjutnya preparat dikering anginkan
8. Amati preparat dengan mikroskop perbesaran kuat dengan minyak imersi. Sel-sel bakteri akan tampak berwarna merah (ungu) dengan latar belakang terang.
9. Gambar bentuk-bentuk bakteri pada laporan sementara.

Pengecatan Negatif

1. Bersihkan gelas benda dengan alkohol kemudian ganggang di atas bunsen
2. Ambil satu ose biakan bakteri secara aseptis kemudian letakkan di atas objek glass.
3. Teteskan larutan nigrosin 1-2 tetes di atas biakan.
4. Ratakan biakan bakteri yang sudah tercampur nigrosin dengan ujung objek glass sehingga membuat lapisan yang sangat tipis.
5. Kering anginkan
6. Amati preparat di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat memakai minyak imersi
7. Gambar dan perhatikan bentuk bakteri yang tampak transparan dengan latar belakang gelap.

E. HASIL PENGAMATAN

	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; min-height: 100px;"> <p>KETERANGAN :</p> </div>
---	--

F. PERLATIHAN

1. Jelaskan prinsip pengecatan negatif!
2. Jelaskan prinsip pengecatan sederhana!

3. Sebutkan alasan mengapa pada pengecatan sederhana dilakukan fiksasi, pada pengecatan negatif tidak!
4. Berikan contoh gambar hasil pengecatan sederhana dan pengamatan negatif pada biakan *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*!
5. Sebutkan cat/pewarna yang digunakan pada pengecatan sederhana!
6. Sebutkan dua fungsi pada pengecatan negatif pada bakteri!
7. Sebutkan cat/pewarna yang digunakan pada pengecatan negatif!

ACARA IV

PENGECATAN GRAM DAN PENGECATAN SPORA

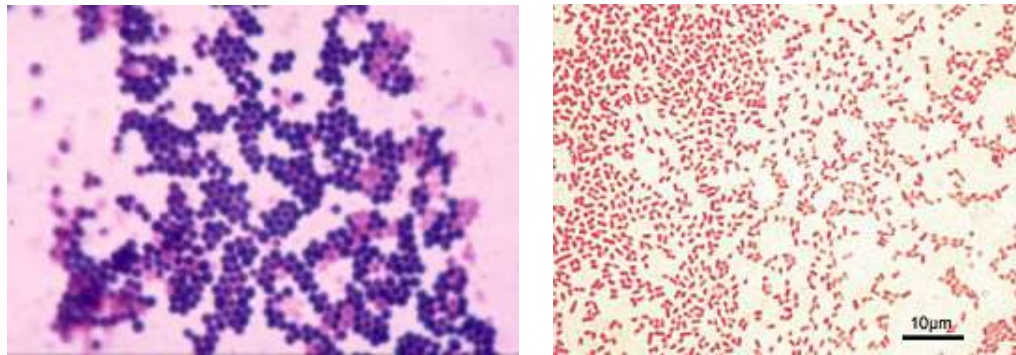
A. TUJUAN

1. Untuk mengamati bentuk dan sifat bakteri dengan pengecatan gram (beberapa macam cat)
2. Untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif
3. Untuk mengamati spora bakteri dengan pengecatan

B. PENDAHULUAN

Bakteri atau mikroorganisme uniseluler lain pada umumnya semitransparan atau transparan, sehingga sulit diamati morfologinya. Komposisi kimia dinding sel bakteri ternyata tidak sama satu sama lain. Perbedaan komposisi dinding sel merupakan hal yang sangat penting dalam identifikasi bakteri yang tidak dikenal, hal ini dapat diketahui berdasarkan reaksi bakteri tersebut terhadap pengecatan Gram. Pengecatan ini mula-mula dikembangkan oleh Hans Christian Gram (1884) Berdasarkan pewarnaan ini bakteri dikelompokkan menjadi dua kelompok besar, disebabkan adanya perbedaan komposisi dinding sel, yaitu Gram positif (ungu) dan Gram negatif (merah). Hal ini menyebabkan pengecatan Gram menjadi langkah pertama yang harus dilakukan, dalam proses identifikasi bakteri yang tidak dikenal. Selain untuk mengetahui sifat Gram dari bakteri yang tidak dikenal, pengecatan juga mempermudah pengamatan; memperjelas ukuran dan bentuk bakteri. Teknik pengecatan gram meliputi 4 tahap yaitu :

1. Pemberian cat utama (larutan cat crystal violet) berwarna ungu.
2. Mengintensifkan cat utama dengan menambahkan larutan mordan larutan JKJ.
3. Pencucian (dekolorisasi) dengan larutan alkohol aseton.
4. Pemberian cat penutup (cat lawan, counter stain) yaitu larutan cat safranin yang berwarna merah.



Gambar 4.1 (a) Bakteri pengecatan Gram Postif (b) Bakteri pengecatan Gram Negatif

Keberhasilan pengecatan bakteri ditentukan oleh faktor-faktor: 1) Fiksasi; 2) Peluntur cat (Decolorizer); 3) Intensifikasi pengecatan, 4) Cat penutup (counter stain), dan 5) Waktu pada setiap tahapan pengecatan. Beberapa hal yang dapat menyebabkan ketidaktepatan hasil pengecatan, yaitu: - perubahan pH medium; - tahap pengecatan tidak dilakukan dengan waktu yang tepat; - jenis bakteri; - umur bakteri; - jenis medium.

Salah satu sifat yang penting diketahui dalam identifikasi adalah adanya struktur khusus pada sel bakteri, misalnya endospora, kapsula, flagela, dll. Pengamatan terhadap struktur bakteri akan lebih mudah dengan pewarnaan yang bersifat khusus. Pengecatan dilakukan untuk mempermudah pengamatan; memperjelas ukuran dan bentuk struktur khas pada bakteri tersebut.

Endospora pada bakteri diproduksi saat bakteri menghadapi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Ada beberapa genus bakteri yang dapat menghasilkan endospora, yaitu *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Thermoactinomyces* dan *Clostridium*. Endospora tersusun dari senyawa asam dipikolinat bersifat tahan kondisi tahan kondisi panas, kondisi asam tinggi, dan kondisi ekstrim lainnya. Keberhasilan pengecatan spora bakteri sangat ditentukan oleh umur biakan bakteri uji serta keterampilan individu yang melakukan pengecatan.



(a)

(b)

Gambar 4.2 (a) spora di dalam sel vegetatif, (b) spora di luar sel vegetatif

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : Mikroskop dengan perbesaran kuat, objek glass, deck glass, bunsen, ose, botol pencuci dan kelengkapannya.

Bahan : biakan murni *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*, **cat pengecatan gram :** larutan crystal violet (Gram A); larutan Lugol iodine (Gram B) sebagai mordan; larutan alkohol aseton (Gram C); larutan safranin (Gram D); dan Alkohol 70%, **cat pengecatan spora :** larutan methylen blue; larutan safranin 0,5%, larutan Malachit green 5% ; larutan cuka 5%.

D. CARA KERJA

Pengecatan Gram

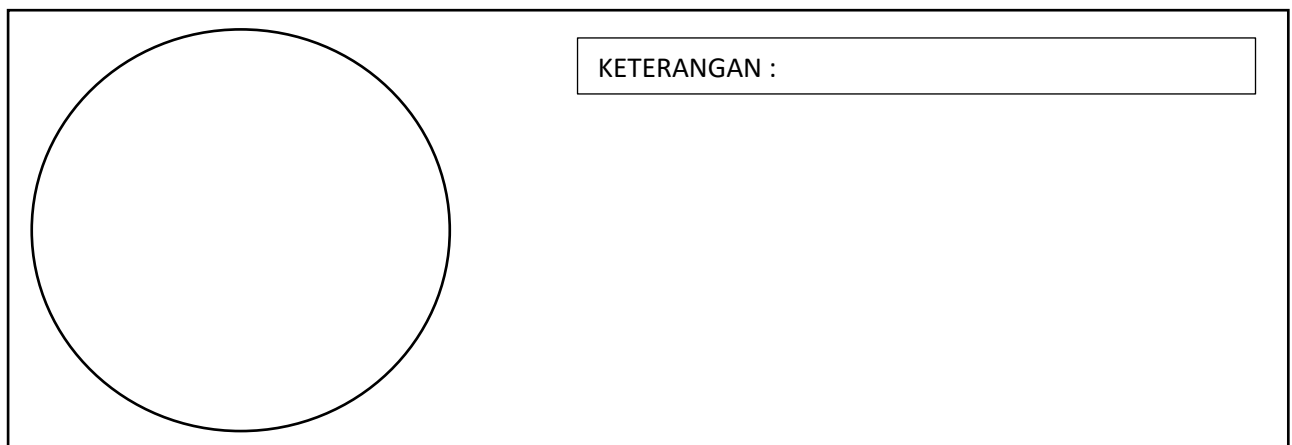
1. Bersihkan objek glass dengan alkohol kemudian ganggang di atas api bunsen.
2. Secara aseptis ambil 1 ose biakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Masing-masing biakan diletakkan di atas objek glass.
3. Campur kedua biakan tersebut dan ratakan di atas objek glass seluas $\pm 1\text{cm}^2$.
4. Kering anginkan!
5. Fiksasi di atas api bunsen, dinginkan!
6. Setelah dingin teteskan cat utama (Gram A) sampai menutupi noda dan diamkan selama 1 menit.
7. Cuci dengan air mengalir, kemudian kering anginkan!
8. Teteskan di atas noda tadi larutan mordan (Gram B) dan diamkan selama 1 menit.
9. Cuci dengan air mengalir, kemudian kering anginkan!
10. Cuci dengan larutan peluntur (Gram C) selama maksimal 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan.
11. Teteskan di atas noda tadi larutan cat penutup (Gram D) selama 1-2 menit.
12. Cuci dengan air mengalir kemudian kering anginkan!
13. Amati preparat dengan mikroskop perbesaran kuat memakai minyak imersi.

14. Gambar hasil pengamatan dengan keterangan mengenai bentuk sel, warna dan sifatnya. Bakteri Gram positif memberikan warna biru-violet pada sel, sedangkan bakteri Gram negatif sel tampak berwarna merah.

Pengecatan Spora

1. Bersihkan objek glass dan deck glass dengan alkohol, kemudian ganggang di atas bunsen!
2. Secara aseptik ambil 1 ose biakan bakteri kemudian letakkan di atas objek glass dan ratakan seluas 1 cm².
3. Kering anginkan, dan fiksasi di atas bunsen!
4. Teteskan larutan Malachit green berlebihan dan biarkan selama ½-1 menit, kemudian dipanasi di atas bunsen sampai cat menguap selama 30 detik!
5. Cuci dengan air mengalir, kemudian kering anginkan!
6. Teteskan larutan safranin selama 30 detik.
7. Cuci dengan air mengalir dan kering anginkan!
8. Amati di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah dilanjut dengan perbesaran kuat menggunakan minyak imersi. Spora yang terlepas tampak berwarna hijau, spora yang masih terdapat di dalam sel berwarna transparan, sedangkan sel vegetatif berwarna merah.
9. Gambar hasil pengamatan dan tentukan letak spora pada sel vegetatif.

E. HASIL PENGAMATAN



F. PERLATIHAN

1. Bagaimana prinsip pengecatan gram!
2. Bagaimana prinsip pengecatan spora!
3. Pengecatan gram mempunyai beberapa kendala untuk dapat menghasilkan informasi sifat gram dari bakteri yang diamati, sebutkan dan bagaimana solusi dari kendala tersebut!
4. Berapa jam idealnya umur isolat bakteri pada pengecatan spora? Sebutkan alasannya!
5. Sebutkan beberapa bakteri yang mempunyai sifat Gram positif dan Gram negatif masing-masing 5!

6. Tidak semua bakteri memiliki endospora, sebutkan genus bakteri yang positif mempunyai endospora!
7. Pengecatan Gram dan pengecatan spora merupakan pengecatan diferensial, bagaimana menurut Anda, benar atau salah?

ACARA V

MORFOLOGI KOLONI DAN SEL KAPANG DAN KHAMIR

A. TUJUAN

1. Untuk mengetahui morfologi kapang (jamur benang) secara makroskopis maupun mikroskopis serta membedakan jenis kapang satu dengan lainnya.
2. Untuk mengetahui morfologi khamir (yeast) secara makroskopis dan mikroskopis.

B. PENDAHULUAN

Pengamatan morfologi merupakan hal yang sangat penting dalam identifikasi dan determinasi, terutama untuk jenis kapang dan cendawan. Pengamatan terhadap sifat fisiologisnya diperlukan untuk membantu determinasi dan identifikasi sampai pada jenis/spesies dan atau strain. Untuk determinasi dan identifikasi khamir, pengamatan sifat-sifat fisiologi harus dilakukan, disamping pengamatan morfologinya.

Hal-hal yang perlu diperhatikan pada pengamatan mikroskopis, antara lain:

- a. Hifa : ada tidaknya sekat/septa, transparan atau keruh, dan warna.
- b. Spora seksual : ada/tidak bentuk dan ukuran oospora, askospora, basidiospora.
- c. Spora aseksual : ada/tidak, bentuk, ukuran, permukaan (halus, berduri, bergaris-garis) dari sporangiospora, konidiospora, arthrospora (Oidia).
- d. Tubuh buah : bentuk, warna, ukuran dan letak dari sporangium, kepala konidia atau bentuk yang lain. Untuk kepala konidia perlu diamati pula jumlah dan lapisannya, letak sterigma keadaan konidia (tunggal, berantai, halus, berduri dsb).
- e. Dasar tubuh buah : bentuk, warna, ukuran dari kolumella, vesikula dsb.
- f. Tangkai badan buah : bentuk, percabangan, permukaan, warna dari sporangiofor.
- g. Ada tidaknya bentuk khusus seperti : stolon, rhizoid, sel kaki, apofise, khlamidospora, sklerotia dsb.

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : Mikroskop, ose lurus, jarum pentul, objek glass, deck glass, bunsen.

Bahan : bahan berjamur seperti tempe segar, oncom, tape, serta bahan makanan/ rempah-rempah/ biji-bijian yang sering kedapatan berjamur (roti, jagung, nasi, dsb), biakan murni *Rhizopus sp*, *Aspergillus sp*, dan *Penicillium sp*, cairan/bahan yang mengandung khamir seperti air tape ketela/ketan, minuman hasil fermentasi, getah pohon, cairan buah manis yang membusuk dll, alkohol 70%, aquades, larutan laktofenol, larutan methylen blue, larutan malachit blue, larutan carbol Fuchsin, alkohol asam.

D. CARA KERJA

Pengamatan Morfologi Kapang (Jamur benang)

1. Bersihkan objek glass dan deck glass dengan alkohol!
2. Objek glass diganggang di atas bunsen.
3. Teteskan larutan laktofenol 1-2 tetes di atas objek glass pada bagian tengahnya.
4. Ambil sedikit miselium kapang (jamur benang) yang tumbuh pada bahan (berjamur) dengan jarum atau ose dan letakkan di atas objek glass yang telah ditetesi laktofenol.
5. Tutup dengan deck glass, jangan sampai ada gelembung udara.
6. Amati dengan perbesaran lemah, kemudian dengan perbesaran sedang.
7. Gambar hasil pengamatan dan beri keterangan.

Pengamatan Morfologi Khamir (yeast)

1. Bersihkan objek glass dan deck glass dengan alkohol
2. Objek glass diganggang di atas bunsen
3. Ambil 1 ose cairan yang mengandung khamir (yeast) dengan menggunakan ose steril, kemudian letakkan pada objek glass
4. Tutup dengan deck glass dan amati dengan mikroskop pada perbesaran lemah dan kuat
5. Gambar setiap bentuk khamir yang Anda jumpai

Pengamatan Morfologi Khamir (yeast) dengan Pengecatan Sederhana

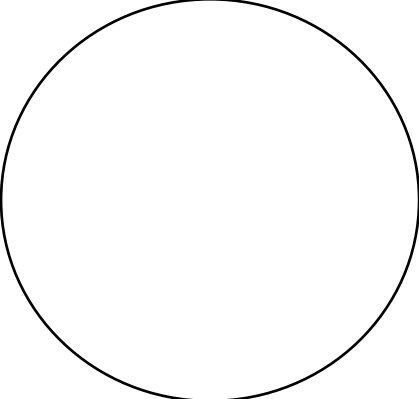
1. Bersihkan objek glass dan deck glass dengan alkohol!
2. Objek glass diganggang di atas bunsen!
3. Secara aseptis ambil 1 ose dari masing-masing biakan murni khamir dan letakkan ditengah-tengah objek glass.
4. Teteskan masing-masing satu tetes larutan methylen blue dan dicampur.
5. Tutup dengan deck glass dan segera amati di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah (10x10) dan sedang (40x10). Sel-sel khamir yang mati akan berwarna transparan (tidak berwarna).
6. Gambarlah bentuk sel untuk masing-masing biakan pada laporan sementara. Berilah keterangan!

Pengamatan Spora Khamir

1. Buatlah pengenceran 1 ose biakan murni *Sacharomyces cerevisiae* dari media wortel, kemudian gojog sampai rata.
2. Ambil 1 ose suspensi khamir di atas, kemudian buat preparat lapisan di atas objek glass. Biarkan sampai kering kemudian fiksasi di atas api bunsen 5-10 kali.

3. Teteskan pada lapisan preparat larutan Carbol Fuchsin berlebihan, kemudian panaskan di atas api bunsen selama 3 menit. Dijaga cat jangan sampai mendidih atau kering.
4. Cuci dengan air mengalir dan keringkan!
5. Tetesi dengan alkohol asam selama 30 detik, kemudian cuci dengan air mengalir dan kering anginkan.
6. Amati di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah sampai terlihat bayangan. Kemudian amati dengan perbesaran sedang, dan untuk melihat spora digunakan perbesaran kuat dengan pengecatan tersebut spora akan tampak tercat merah dan selnya berwarna biru.

E. HASIL PENGAMATAN

	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">KETERANGAN :</div>
--	---

F. PERLATIHAN

1. Pengecatan untuk sel kapang dan khamir dapat dilakukan dengan metode apa? Sebut dan jelaskan!
2. Sebutkan beberapa jenis sel khamir yang mempunyai sifat multiseluler!
3. *Sacharomyces cerevisiae* dapat Anda dapatkan pada sampel apa saja? Berikan gambar serta keterangannya!
4. *Rhizopus oligosporus* adalah jamur benang yang ada pada tempe. Gambarkan dan beri keterangan!
5. Pengecatan fungi (kapang dan khamir) sel tidak dilakukan fiksasi, bagaimana menurut saudara?
6. Sebutkan beberapa bahan praktikum segar yang di dalamnya ditemui banyak mengandung jamur benang!
7. Sebutkan beberapa bahan praktikum segar yang di dalamnya ditemui banyak mengandung khamir!

ACARA VI

STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA

A. TUJUAN

1. Untuk mengenal alat sterilisasi dan cara menggunakannya.
2. Untuk mengenal dan membuat media yang digunakan.

B. PENDAHULUAN

1. Sterilisasi

Steril adalah bebas dari mikroorganisme hidup. Istilah sterilisasi mempunyai arti sebagai cara atau usaha untuk membebaskan bahan atau alat dari segala bentuk kehidupan (mikroorganisme hidup). Di dalam praktik terutama yang menyangkut kegiatan mikrobiologis, alat-alat serta media yang digunakan selalu dalam keadaan steril. Hal ini bertujuan supaya mikroorganisme lain yang tidak diinginkan tidak ikut tumbuh. Adapun kecepatan kematian mikroorganisme selama sterilisasi tergantung pada jenis mikroorganismenya dan faktor-faktor lingkungannya.

Pada waktu sterilisasi perlu diperhatikan macam bahan serta sifat bahan dan alat-alat yang disterilkan. Selain itu perlu juga diperhatikan adanya faktor hidrasi dan lama waktu sterilisasi. Ada empat macam cara sterilisasi yaitu:

a) Sterilisasi secara fisik (dengan pemanasan)

Cara ini meliputi sterilisasi dengan udara panas kering/basah, tindalisasi, pasteurisasi, dengan api langsung dari nyala bunsen serta sterilisasi dengan uap air panas dan tekanan.

b) Sterilisasi secara khemis (dengan desinfektan)

Sterilisasi cara khemis yaitu sterilisasi dengan menggunakan zat-zat kimia seperti alkohol 70%, formalin 4%, sublimat 0,1%, karbol, lisol, sabun/deterjen dan lain-lain.

c) Sterilisasi secara mekanis (dengan penyaringan)

Sterilisasi cara ini menggunakan alat saring Barkerfeld filter atau Zeitz filter. Biasanya digunakan untuk mensterilkan bahan yang tidak boleh dipanaskan seperti serum darah dan beberapa macam gula tertentu.

d) Sterilisasi dengan radiasi

Radiasi yang dapat digunakan untuk sterilisasi adalah sinar ultra violet, sinar Co^{60} atau Cs^{139} .

2. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrien (zat makanan) yang dipakai untuk menumbuhkan mikrobia yang meliputi kegiatan isolasi, meremajakan dan memperbanyak mikrobia, perhitungan serta untuk tujuan pengujian sifat fisiologi.

Untuk dapat tumbuh dalam suatu media diperlukan syarat-syarat tertentu. Syarat tersebut yaitu media harus mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan untuk mikrobia,

mempunyai tekanan osmose, tegangan muka, dan pH yang sesuai, tidak mengandung zat penghambat serta media harus steril.

Media diklasifikasikan berdasarkan atas susunan kimia, konsistensi dan fungsinya. Menurut konsistensinya media dibedakan menjadi media padat, media cair dan media padat yang dapat dicairkan.

C. ALAT DAN BAHAN

Alat :

1. Sterilisasi

Alat-alat gelas : tabung reaksi, petridish, erlenmeyer, serta alat-alat gelas lain. Autoklaf

2. Pembuatan Media

Kertas pH, label, kertas saring, autoklaf, erlenmeyer, tabung reaksi, beaker glass, pengaduk corong, dan gelas ukur.

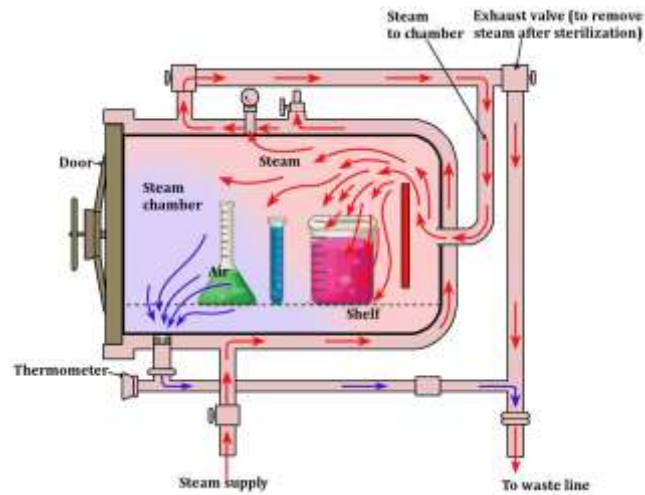
Bahan:

Medium pertumbuhan mikroba : nutrisi agar, PCA (Plate Count Agar), MEA (Malt Ekstrak Agar) dalam tabung reaksi dan erlenmeyer serta bahan-bahan yang lain.

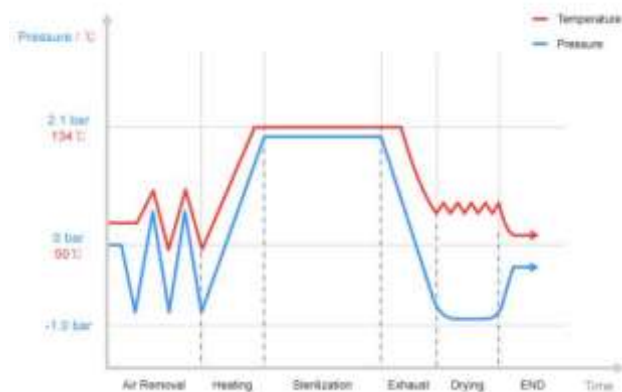
D. CARA KERJA

Sterilisasi

1. Siapkan alat-alat yang disterilkan, bila sudah bersih tutup dengan kapas/*cotton plug*. Bungkus dengan plastik dan diikat rapat-rapat dengan karet.
2. Siapkan bahan atau medium yang akan disterilkan, masukkan dalam tabung reaksi ± 5 ml (untuk medium agar miring/slant), volume ± 10 ml (untuk medium agar tegak) atau dimasukkan dalam erlenmeyer. Tutup dengan kapas atau *cotton plug*.
3. Siapkan autoklaf, isilah dengan air/akuades sampai angsang
4. Masukkan semua alat dan bahan yang akan disterilkan, rapikan letak alat dan bahan
5. Kencangkan baut-baut yang setangkup dengan rapat agar tidak ada uap air panas yang bocor/keluar, kemudian kran dibuka (posisi tegak).
6. Taruhlah diatas kompor atau alas yang kuat dan tunggu sampai termometer menunjuk 100°C . Tunggu pada temperatur tersebut ± 10 menit (sampai udara keluar seluruhnya) dan kran ditutup.
7. Amati petunjuk tekanan (manometer), apabila telah menunjukkan pada tekanan 2 atm (15 lbs) dan temperatur 121°C , pertahankan selama 15-20 menit. Bila telah selesai matikan kompornya dan buka tutupnya
8. Untuk medium agar miring setelah dikeluarkan dari autoklaf segera taruh pada tempat yang mendatar dan miringkan dengan sudut $\pm 45^{\circ}\text{C}$.



Gambar 6.1 Mekanisme kerja autoklaf selama sterilisasi



Gambar 6.2 Tahap kerja autoklaf

Pembuatan Media

Potato Dextrose Agar (PDA) Sintetis

1. Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut :

Potato kentang	3g
Peptone	5g
Agar	15g
Akuades	s.d 1000mL
2. Kentang direbus dalam akuades selama 30 menit – 1 jam sampai lunak/ air tinggal setengahnya, kemudian diambil ekstraknya dengan menyaring dan memerasnya menggunakan kertas saring lalu ditampung di beaker glass steril
3. Agar dilarutkan dengan *hot plate strirer* dalam 50 ml akuades. Setelah larut dapat ditambahkan *peptone* dan dihomogenkan lagi.
4. Setelah semua larut ekstrak kentang dan agar-sukrosa dicampur dan dihomogenkan. pH media diatur menjadi 4-5 dengan meneteskan HCl/NaOH.
5. Media dituang ke dalam erlenmeyer atau ke tabung reaksi, tutup dengan aluminium foil dan kertas payung diberi identitas

6. Kemudian siap untuk disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.
7. Tuang pada cawan petri ±20-25 ml (sepertiga petridish) atau tabung reaksi steril. Untuk mendapatkan agar miring pada tabung maka sebelum dingin letakkan dengan kemiringan 45⁰. Beri identitas media.
8. Tunggu sampai dingin dan simpan media pada almari pendingin.

Potato Dextrose Agar (PDA) Semi Sintetis

1. Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut :

Potato kentang	100g
Sukrosa	60g
Agar (1,5 – 2%)	15g
Akuades	s.d 1000mL
2. Kentang direbus dalam sebagian akuades selama 30 menit – 1 jam sampai lunak/ air tinggal setengahnya, kemudian diambil ekstraknya dengan menyaring dan memerasnya menggunakan kertas saring lalu ditampung di beaker glass steril
3. Agar dilarutkan dengan *hot plate stirrer* dalam 50 ml akuades. Setelah larut dapat ditambahkan sukrosa dan dihomogenkan lagi.
4. Setelah semua larut ekstrak kentang dan agar-sukrosa dicampur dan dihomogenkan. pH media diatur mejadi 4-5 dengan meneteskan HCl/NaOH.
5. Media dituang ke dalam erlenmeyer atau ke tabung reaksi, tutup dengan aluminium foil dan kertas payung diberi identitas
6. Kemudian siap untuk disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.
7. Tuang pada cawan atau tabung reaksi steril. Untuk mendapatkan agar miring pada tabung maka sebelum dingin letakkan dengan kemiringan 45⁰. Beri identitas media.
8. Tunggu sampai dingin dan simpan media.

Malt Ekstrak Agar (MEA) Semi Sintetis

1. Timbang bahan yang akan digunakan, yaitu :

Malt ekstrak	20g
Pepton	5g
Sukrosa/glukosa	20g
Agar-agar	15-20g
Akuades	s.d 1000mL
2. Letakkan ekstrak tersebut pada erlenmeyer steril, kemudian ditambahkan 60 gram sukrosa.

3. Tambah dengan akuades sampai volumenya menjadi 950 ml, panaskan sampai homogen.
4. Agar dilarutkan dengan *hot plate stirrer* dalam 50 ml akuades. Setelah larut dapat ditambahkan *peptone* dan dihomogenkan lagi.
5. Tambahkan agar-agar sebanyak 15-20 gram kemudian panaskan sampai homogen
6. Setelah semua larut diatur pH nya menjadi 4-5 dengan menambah asam laktat atau asam sitrat.
7. Tuangkan pada erlenmeyer dengan hati-hati.
8. Kemudian siap untuk disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.
9. Tuang pada cawan atau tabung reaksi steril. Untuk mendapatkan agar miring pada tabung maka sebelum dingin letakkan dengan kemiringan 45⁰. Beri identitas media.
10. Tunggu sampai dingin dan simpan media.

Malt Ekstrak Agar (MEA) alami

1. Buat ekstrak kentang dengan cara merebus 100 gram kentang yang telah dikupas dan diiris - iris dalam akuades sebanyak 1 L. Setelah tinggal setengahnya , angkat dan saring dengan menggunakan kertas saring.
2. Letakkan ekstrak tersebut pada erlenmeyer steril, kemudian ditambahkan 60 gram sukrosa.
3. Tambah dengan akuades sampai volumenya menjadi 1L, panaskan sampai homogen.
4. Bila akan dibuat medium padat, maka tambahkan agar-agar sebanyak 1,5-2% (15-20 gr), kemudian panaskan sampai homogen
5. Angkat dan periksa pH nya dengan kertas pH, atur pH pada 4-5 dengan menambah asam laktat atau asam sitrat
6. Tuangkan pada erlenmeyer dengan hati-hati
7. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit.
8. Tuang pada cawan atau tabung reaksi steril. Untuk mendapatkan agar miring pada tabung maka sebelum dingin letakkan dengan kemiringan 45⁰. Beri identitas media.

Plate Count Agar (PCA) / Trypton Glucose Yeast Agar (Semi sintetis)

1. Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut :
- | | |
|----------------|--------------------|
| Yeast ekstrak | 12,5 g (oxoid L21) |
| <i>Trypton</i> | 5 g (Oxoid L42) |
| Dextrose | 1 g |
| Agar | 9 g |
| Akuades | s.d 1000mL |

2. Campurkan yeast ekstrak, trypton, dextrose dengan menambahkan sedikit akuades dan di homogenkan, kemudian ditambahkan dengan larutan agar-agar dan dihomogenkan.
3. Tambah suspensi dengan akuades sampai 1L. Kemudian dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan penangas air
4. Angkat dan periksa pH nya dan diatur pada pH 7 dengan menambah asam latat atau asam sitrat
5. Tuangkan pada erlenmeyer dengan hati-hati
6. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit.
7. Tuang pada cawan atau tabung reaksi steril. Untuk mendapatkan agar miring pada tabung maka sebelum dingin letakkan dengan kemiringan 45⁰. Beri identitas media.

E. HASIL PENGAMATAN

1. Sterilisasi Alat peralatan

No.	Nama Alat/Bahan	Hasil

2. Pembuatan Media

No.	Nama Medium	Kegunaan

F. PERLATIHAN

1. Jelaskan mengapa udara harus dihilangkan dari dalam autoklaf selama proses sterilisasi?
2. Sebutkan macam spesifikasi sterilisasi secara fisik!
3. Sebutkan persyaratan bahan/media yang dapat disterilkan dengan autoklaf!
4. Sebutkan media umum yang dipergunakan untuk pertumbuhan bakteri, kapang dan khamir!
5. Sebutkan macam-macam media berdasarkan konsistensinya, sebutkan pula spesifikasinya!
6. Mengapa media perlu diatur suhunya?

ACARA VII

ISOLASI TEKNIK SEBARAN, PERATAAN DAN GORESAN PURIFIKASI DAN IDENTIFIKASI MIKROORGANISME

A. TUJUAN

Melakukan isolasi, purifikasi dan identifikasi bakteri sampai mendapatkan isolat murni dengan informasi sifat Gram bakteri.

B. PENDAHULUAN

Melakukan isolasi suatu mikroba merupakan suatu usaha memindahkan mikroba dari lingkungan alam ke satu medium bakteri di laboratorium dan menumbuhkannya sebagai biakan murni. Untuk isolasi perlu diperhatikan hal-hal penting, sebagai berikut:

1. Sifat-sifat spesies mikroba yang akan diisolasi
2. Tempat hidup atau asal mikroba tersebut
3. Medium untuk pertumbuhan yang sesuai
4. Cara inkubasi mikroba yang diisolasi
5. Cara menanam mikroba yang diisolasi
6. Cara menguji bahwa mikroba yang diisolasi telah berupa biakan murni
7. Cara memelihara agar mikroba yang telah diisolasi tetap merupakan biakan murni

Ada 3 macam cara yang umum dilakukan untuk mengisolasi mikroba yaitu:

1. Cara sebaran (*pour plate method*)
2. Cara perataan (*spread plate method*) diatas permukaan medium padat
3. Cara goresan (*streak plate method*)

Untuk mendapatkan biakan murni, setelah dilakukan salah satu metode isolasi tersebut maka perlu dilakukan pemurnian (*purifikasi*) secara berulang-ulang.

C. ALAT DAN BAHAN

Alat : Bunsen, ose, beaker glass, petridish, pipet tetes, penangas air.

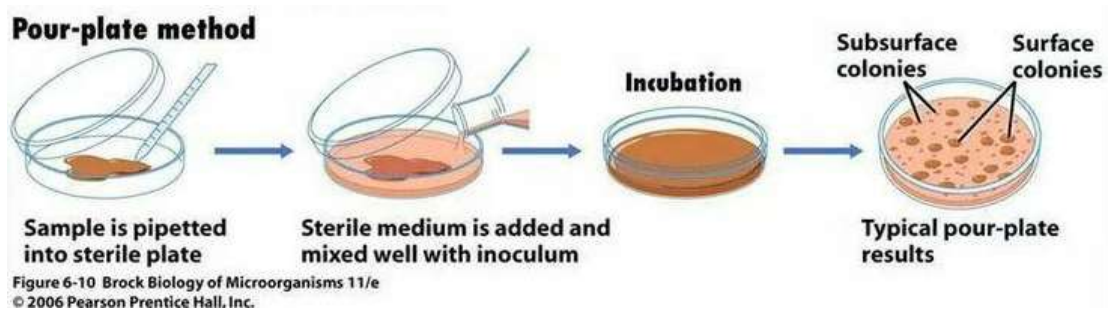
Bahan : media nutrien agar dan media nutrien agar miring, suspensi bahan yang mengandung bakteri

D. CARA KERJA

Cara Sebaran

1. Suspensikan sampel yang mengandung bakteri atau campuran bakteri seencer mungkin untuk mendapatkan koloni yang terpisah, sehingga mudah diisolasi
2. Cairkan media nutrien agar dalam penangas air
3. Dinginkan sampai temperatur 50°C, kemudian inokulasikan dengan 1 ose bahan yang mengandung bakteri atau campuran secara aseptik. Gojog supaya tercampur rata.

4. Tuangkan ke dalam petridish steril secara aseptik dan ratakan
5. Beri label (etiket), kemudian dibungkus dan dibalik untuk mencegah terjadinya tetesan air (kondensat) pada permukaan agar hasil kondensasi
6. Sesudah inkubasi (\pm selama 24 jam) akan terlihat koloni-koloni yang terpisah. Tiap koloni yang terpisah mungkin berasal dari satu sel bakteri. Untuk petridish kontrol, dijaga tetap steril (tidak ada kontaminasi)
7. Pilihlah dari masing-masing tipe koloni, satu koloni saja yang merupakan satu jenis koloni
8. Pilih salah satu dari tipe koloni yang terpisah, murnikan lagi dengan cara sebaran (*pour plate method*)
9. Ambil 1 ose koloni yang terpisah secara aseptik dan periksalah kemurniannya dengan pengecatan Gram
10. Pindahkan koloni hasil isolasi ke dalam media nutrisi agar miring

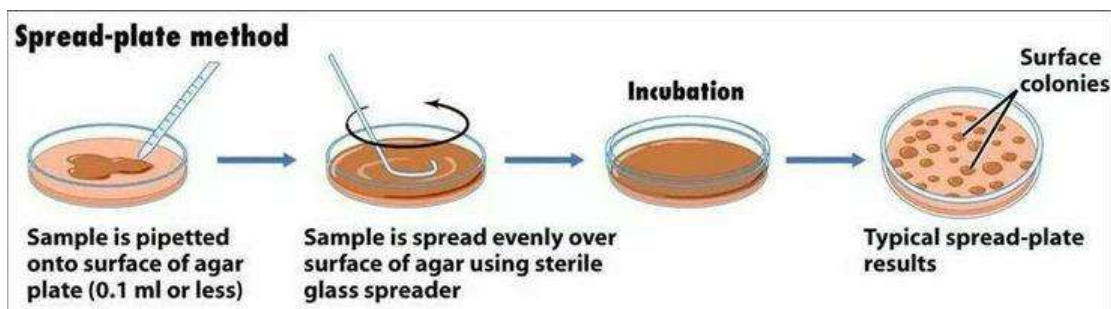


Gambar 6.1 Teknik sebaran (*pour plate method*)

Cara Perataan

1. Inkubasikan pada temperatur kamar selama 24-48 jam, biakan murni telah di dapatkan Suspensikan sampel yang mengandung bakteri atau campuran bakteri menurut pengenceran seri.
2. Cairkan nutrisi agar dalam penangas air.
3. Dinginkan sampai temperatur 50⁰C, kemudian inokulasikan 0,1 ml atau 1,0 ml dengan pipet ukur (sokorex) dari suspensi (pengenceran seri) yang dibuat.
4. Secara aseptik ratakan tetesan suspensi tadi dengan ose segitiga (ose drigalski) ke seluruh permukaan petridish.
5. Beri label (etiket), kemudian dibungkus dan dibalik untuk mencegah terjadinya tetesan air (kondensat) pada permukaan agar hasil kondensasi.
6. Sesudah inkubasi (\pm selama 24 jam) akan terlihat koloni-koloni yang terpisah. Tiap koloni yang terpisah mungkin berasal dari satu sel bakteri. Untuk petridish kontrol, dijaga tetap steril (tidak ada kontaminasi)
7. Pilihlah dari masing-masing tipe koloni, satu koloni saja yang merupakan satu jenis koloni
8. Pilih salah satu dari tipe koloni yang terpisah, murnikan lagi dengan cara perataan (*spread plate method*)

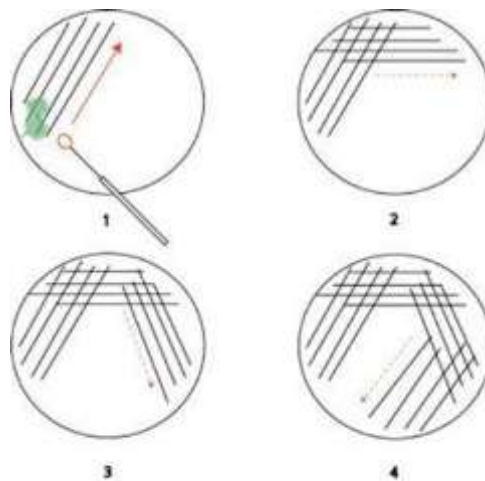
9. Ambil 1 ose koloni yang terpisah secara aseptik dan periksalah kemurniannya dengan pengecatan Gram
10. Pindahkan koloni hasil isolasi ke dalam media nutrisi agar miring
11. Inkubasikan pada temperatur kamar selama 24-48 jam, biakan murni telah didapatkan.



Gambar 6.2 Teknik Perataan (*spread plate method*)

Cara Goresan

1. Cairkan nutrisi agar dalam penangas air
2. Dinginkan sampai temperatur $\pm 50^{\circ}\text{C}$
3. Tuangkan media agar tersebut dalam petridish steril secara aseptik dan biarkan sampai dingin dan padat.
4. Ambil 1 ose suspensi bahan yang mengandung bakteri atau campuran bakteri secara aseptik, kemudian buat goresan pada permukaan agar seperti pada gambar

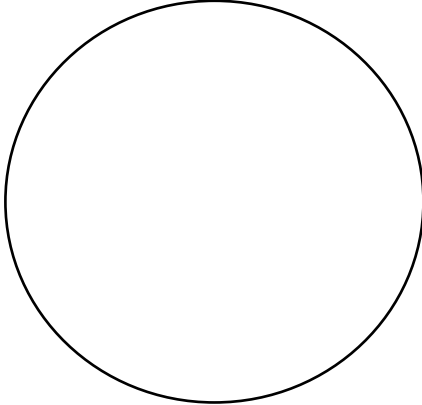


Gambar 6.3 Teknik goresan (*streak plate method*)

5. Beri label (etiket), kemudian dibungkus dan dibalik untuk mencegah terjadinya tetesan air (kondensat) pada permukaan agar hasil kondensasi
6. Sesudah inkubasi (\pm selama 24 jam) akan terlihat koloni-koloni yang terpisah. Tiap koloni yang terpisah mungkin berasal dari satu sel bakteri. Untuk petridish kontrol, dijaga tetap steril (tidak ada kontaminasi)
7. Pilihlah dari masing-masing tipe koloni, satu koloni saja yang merupakan satu jenis koloni

8. Pilih salah satu dari tipe koloni yang terpisah, murnikan lagi dengan cara sebaran (*pour plate method*)
9. Ambil 1 ose koloni yang terpisah secara aseptik dan periksalah kemurniannya dengan pengecatan Gram
10. Pindahkan koloni hasil isolasi ke dalam media nutrisi agar miring
11. Inkubasikan pada temperatur kamar selama 24-48 jam, biakan murni telah didapatkan.

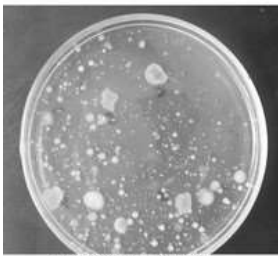
E. HASIL PENGAMATAN

	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">KETERANGAN :</div>
---	---

F. PERLATIHAN

1. Jelaskan dan kapan digunakan teknik spread plate (sebaran), pour plate (perataan/taburan), streak plate (goresan)!
2. Saat Anda memindahkan biakan dari tabung reaksi ke tabung reaksi berikutnya, maka di gunakan teknik ... sebutkan alasannya!
3. Gambarkan model teknik ketiganya dalam petridish!
4. Teknik isolasi bakteri dengan sampel tanah paling tepat menggunakan teknik apa? Sebutkan alasannya!

5. Pada gambar nampak koloni bakteri, coba Anda prediksikan ada beberapa isolat!



6. Dari gambar di samping, ada berapa isolat yang bisa Anda isolasi, dan dari kelompok apa (bakteri/kapang/khamir)!



ACARA VIII

PEMERIKSAAN ANTIBAKTERI DARI BAHAN ALAM DENGAN METODE DILUSI DAN DIFUSI

A. TUJUAN

1. Menentukan teknik yang tepat untuk mendapatkan informasi antibakteri dari bahan alam secara laboratoris.
2. Untuk mengetahui reaksi antibakteri dari bahan alam menggunakan bakteri Gram Positif dan Gram Negatif dengan menggunakan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*

B. PENDAHULUAN

Bakteri merugikan yang biasa disebut dengan bakteri patogen dapat dikendalikan dengan menggunakan bahan alam misalnya tanaman obat (ekstrak daun sirih, daun binahong, daun kelor, kunyit, lengkuas, dll). Antibakteri juga bisa didapatkan secara umum sebagai antibiotik. Antibiotik merupakan suatu sediaan kimiawi hasil sintesis dari bakteri yang juga dapat dibuat secara sintetik, dapat bersifat membunuh dan atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Sementara, penggunaan antibiotik komersil dari produk farmasi tidak dapat dilakukan tanpa resep dokter artinya penggunaan antibiotik berlebihan atau tanpa resep dapat menyebabkan timbulnya resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik tersebut. Untuk mengetahui suatu bahan mempunyai sifat antibiotik atau antibakteri perlu dilakukan observasi. Beberapa uji antibakteri secara mikrobiologi dapat dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi merupakan peristiwa berpindahannya suatu zat pada pelarut dari bagian berkonsentrasi tinggi ke bagian berkonsentrasi rendah, sedangkan dilusi adalah pengenceran yang berguna untuk melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Metode dilusi dibedakan menjadi 2 yaitu dilusi cair dan dilusi padat.

Metode difusi menggunakan media uji padat dan sampel dapat diaplikasikan dengan cakram kertas, sumuran atau silinder logam. Kemampuan zat aktif bahan alam pada metode difusi dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang diinokulasikan dan menghasilkan zona jernih berbentuk irradikal atau radikal. Batas terpendek sampai batas terpanjang disebut sebagai diameter hambatan.

Metode dilusi dibagi menjadi 2, yaitu dilusi cair dan padat. Metode dilusi cair digunakan untuk mengukur KHM (kadar hambat minimum) sementara metode dilusi padat digunakan untuk menentukan KBM (kadar bakterisidal minimum). Cara yang dilakukan pada metode dilusi cair adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Metode dilusi padat dilakukan dengan menginokulasi mikroba uji pada media agar yang mengandung agen antimikroba.

C. ALAT DAN BAHAN

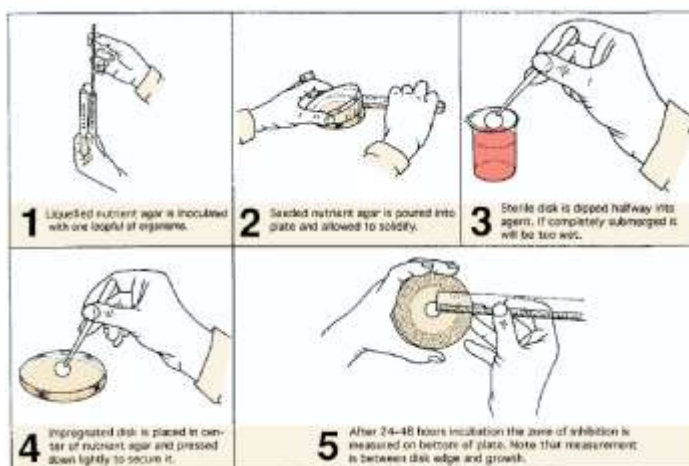
Alat : petridish, gelas ukur 10 ml, pinset, pipet, jangka sorong, cork borer, erlenmeyer, paper disk, tabung reaksi, inkubator.

Bahan : minyak atsiri, media NA atau Mueller hilton, mikroba (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), media MacConkey infusa daun sirih, infusa daun kelor, infusa daun bidara, infusa daun kersen, infusa daun binahong, infusa daun jambu biji.

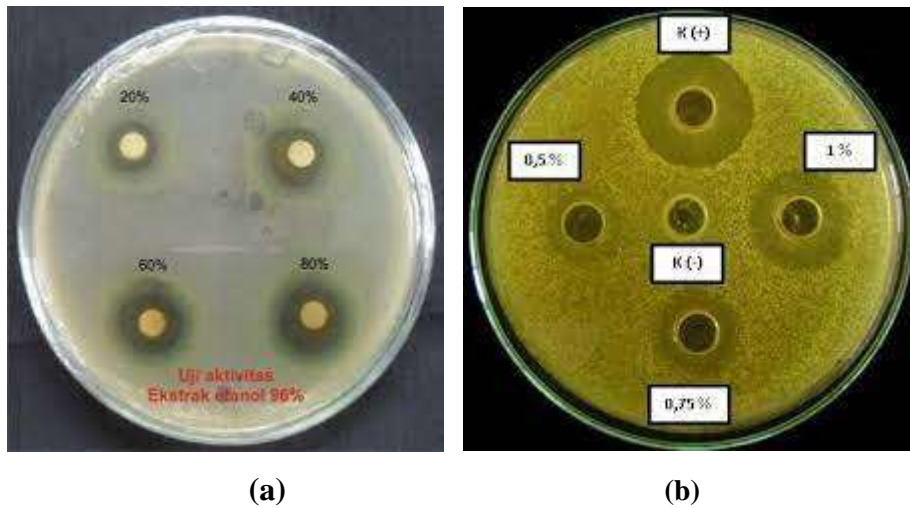
D. CARA KERJA

Difusi

1. Siapkan satu seri konsentrasi minyak atsiri
2. Cairkan media NA dalam erlenmeyer, tunggu suhunya hingga mencapai $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dan campurkan suspensi mikroba ke dalamnya. Segera tuangkan ke cawan petri dan diamkan hingga memadat
3. Teteskan sebanyak $10\mu\text{L}$ sampel yang diuji pada permukaan paper disk/ atau 100 mg dengan metode sumuran, biarkan mengering, lalu letakkan paper disk pada permukaan media. Teteskan kontrol positif (ampicillin) dan kontrol negatif pelarut dalam volume yang sama, biarkan mengering, lalu letakkan paper disk pada permukaan media
4. Inkubasi petridish tersebut pada suhu ruang selama ± 30 menit sampai dengan satu jam
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada posisi cawan petri terbalik. Ukur diameter hambatannya.



Gambar 7.1 Skema uji difusi

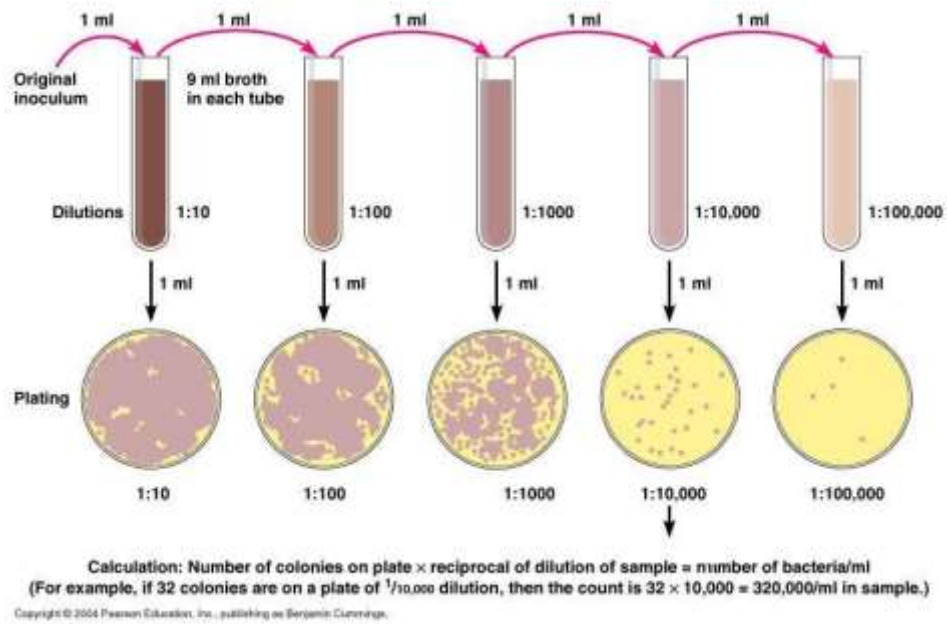


Gambar 7.2 Hasil pemeriksaan antibakteri metode difusi (a) disk (b) sumuran

Dilusi Cair

1. Siapkan tabung reaksi yang sudah disterilkan dan diberi label I, II, III, IV, V, VI, Kontrol Media, Kontrol Suspensi, Kontrol Pelarut, Kontrol Ekstrak, masing-masing tabung diisi 1 ml akuades kecuali tabung I dan Kontrol.
2. Lakukan pengenceran dengan cara sbb :
 - a) Tabung I diisi filtrat antibakteri dengan konsentrasi 50% sebanyak 2 ml, diambil dari tabung I sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung II (konsentrasi 25%).
 - b) Tabung II diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung III (konsentrasi 12,5%).
 - c) Tabung III diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung IV (konsentrasi 6,25%).
 - d) Tabung IV diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung V (konsentrasi 3,125%).
 - e) Tabung V diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung VI (konsentrasi 1,5625%).
 - f) Tabung VI diambil 1 ml dan dibuang.
3. Tabung KE diisi 1 ml medium uji dan 1 ml ekstrak.
4. Tabung KM diisi 2 ml medium uji.
5. Tabung KP diisi 1ml medium uji dan 1 ml akuades.
6. Tabung KS diisi 2 ml suspensi bakteri.
7. Semua tabung ditambah 1 ml suspensi bakteri yang di uji (*E.coli/B. Subtilis*), kecuali tabung kontrol, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
8. Dari tabung II – VI diambil sampel menggunakan cotton swab untuk dioleskan pada media MacConkey yang telah diberi label sesuai konsentrasi ekstrak.
9. KHM ditentukan dengan mengamati kekeruhan dan kejernihan dari masing-masing medium uji yang telah diinkubasi dan dibandingkan dengan larutan kontrol media. Konsentrasi paling rendah yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan jernihnya medium uji.

10. KBM ditentukan dengan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan bakteri dalam media agar setelah diinkubasi. Konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri (tidak ada pertumbuhan) merupakan nilai KBM (Fitrian, dkk. 2019)



Gambar 7.3 Pengenceran pada dilusi cair

E. HASIL PENGAMATAN

KETERANGAN : Difusi Padat

KETERANGAN : Difusi Cair

F. PERLATIHAN

1. Sebutkan alat dan bahan yang dibutuhkan untuk mengerjakan acara pemeriksaan antibakteri dengan menggunakan metode dilusi dan difusi!
2. Bagaimana anda menentukan ada sifat antibakteri pada isolat yang diperiksa?
3. Sebutkan fungsi dari cork borer dan paper disk Whatman-42 pada pemeriksaan antibakteri!
4. Pemeriksaan bakteri pada metode dilusi dibandingkan dengan pemeriksaan antibakteri dengan metode difusi, manakah yang lebih memberikan hasil yang komprehensif? Jelaskan!
5. Prediksi apa yang bisa Anda simpulkan dari kedua metode tersebut!
6. Buat diagram alir teknik pemeriksaan antibakteri menggunakan metode dilusi!
7. Buat diagram alir teknik pemeriksaan antibakteri dengan menggunakan metode difusi!

ACARA IX

FERMENTASI PANGAN DAN NON PANGAN

A. TUJUAN

1. Mengetahui proses fermentasi yang terjadi pada bahan pangan dan non pangan
2. Menguji hasil produk fermentasi pangan (organoleptik) dan non pangan (miniriset)

B. PENDAHULUAN

Pada bidang mikrobiologi industri, fermentasi mempunyai arti yang menggambarkan setiap proses untuk menghasilkan produk dari pembiakan mikroorganisme. Fermentasi bahan pangan adalah sebagai hasil kegiatan beberapa jenis mikroorganisme baik bakteri, khamir, dan kapang. Mikroorganisme yang memfermentasi bahan pangan dapat menghasilkan perubahan yang menguntungkan menjadi produk fermentasi yang diinginkan dan mencermati perubahan yang merugikan, kerusakan pada bahan pangan. Dari mikroorganisme yang memfermentasi bahan pangan, yang paling penting adalah bakteri pembentuk asam laktat, asam asetat, dan beberapa jenis khamir penghasil alkohol.

Berdasarkan sumber mikroorganisme, proses fermentasi dibagi 2 (dua) yaitu:

1. **Fermentasi spontan** *by design* adalah fermentasi bahan pangan dimana dalam pembuatannya tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, tetapi mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang baik secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhannya, dimana aktivitas dan pertumbuhan bakteri asam laktat dirangsang karena adanya garam, contohnya pada pembuatan asinan, terasi, dll.

2. **Fermentasi** adalah fermentasi yang terjadi dalam bahan pangan yang dalam pembuatannya ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, dipersiapkan dan diamati bahan baku, alat peralatan dan kondisi abiotiknya. Mikroorganisme tersebut akan tumbuh dan berkembangbiak secara aktif mengubah bahan yang difermentasi menjadi produk yang diinginkan, contohnya pada pembuatan yoghurt, yakult, tape, tempe, oncom, pickle, dll.

C. ALAT DAN BAHAN

Alat :

- Pembuatan tempe : kompor, panci perebusan, ember perendaman, kemasan (plastik dan atau daun pisang), pelubang, rak kayu, timbangan
- Pembuatan tape : wadah/baskom
- Pembuatan yoghurt/yakult : panci, pengaduk, baskom, kemasan plastik/kaca, inkubator sederhana.

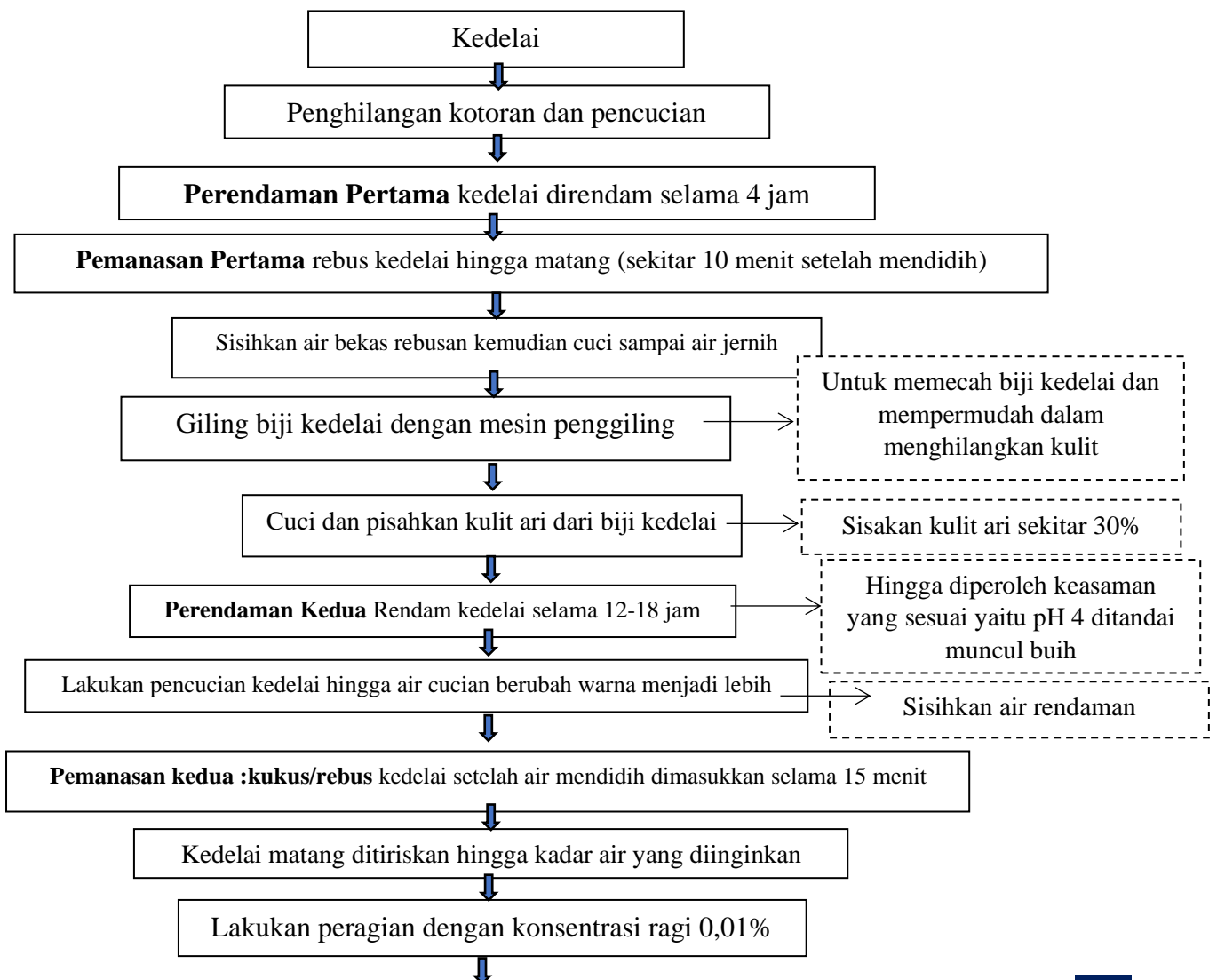
- Pembuatan pupuk organik cair : pengaduk kayu, inkubator sederhana, timbangan, gelas ukur, botol plastik/kaca, plastik penutup, karet, pH meter.
- Pembuatan Ecoenzim
- Pembuatan pupuk organik/pupuk kompos

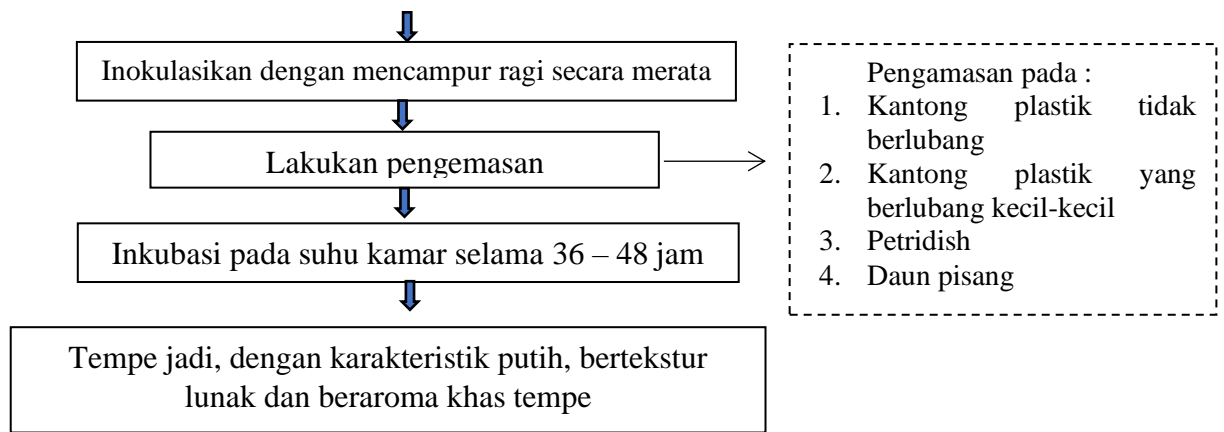
Bahan :

- Pembuatan tempe : kedelai, ragi tempe.
- Pembuatan tape : singkong/ketan yang telah ditanak, ragi tape, daun pisang.
- Pembuatan Yoghurt/ yakult : susu sapi/ susu UHT, susu skim, starter yoghurt/yakult, gula, perisa.
- Pembuatan pupuk organik cair/POC : sampah organik sisa dapur (pisang over masak, air cucian beras) susu bubuk (bisa yang sudah kadaluwarsa, kunyit bubuk, molase (tetes tebu)/ gula jawa, mol, air tebu, air sumur, starter
- Pembuatan Ecoenzim
- Pembuatan Pupuk organik/ pupuk kompos

D. CARA KERJA

Pembuatan Tempe Higienis (dengan dua kali perendaman dan dua kali pemanasan)





1. Catat jam pada saat inokulasi
2. Amati pertumbuhan jamur setelah diinkubasi selama 24-48 jam (catat pula jam pada waktu pengamatan)
3. Buat kesimpulan dari pengaruh tempat dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan jamur (pembentukan tempe)
4. Buat preparat dari jamur yang tumbuh pada tempe. Gambar dan beri keterangan pada tiap-tiap perlakuan dengan pengecatan Gram.
5. Lakukan uji organoleptik aroma, rasa, tekstur tempe

Pembuatan Tape

1. Singkong atau ketan yang telah ditanak, didinginkan
2. Setelah dingin diinokulasikan biakan jamur atau ragi tape
3. Masukkan ke dalam tempat untuk fermentasi atau dibungkus daun pisang atau plastik
4. Inkubasikan pada temperatur kamar selama 48 jam
5. Setelah selesai inkubasi ditentukan :
 - (a) Adanya gula secara kualitatif dan kuantitatif
 - (b) Adanya alkohol secara kualitatif dan kuantitatif
 - (c) Adanya pati secara kualitatif
6. Buat preparat jamur benang (kapang) dan khamir (yeast) yang terdapat dalam tape, selanjutnya gambar dan tentukan genusnya.
7. Lakukan uji organoleptik aroma, rasa dan tekstur tape

Pembuatan Yoghurt/Yakult

1. Panaskan (pasteurisasi) susu sapi/susu UHT pada suhu 60-70⁰C selama 10 menit. Pengadukan dilakukan terus agar susu tidak pecah. Pemberian gula bisa dilakukan sebelum pemanasan.
2. Dinginkan susu sampai suhu 45⁰C (agak hangat) untuk memberi kondisi yang optimal bagi pertumbuhan bakteri saat pemeraman.
3. Setelah agak dingin suhu 45⁰C, kemudian dilakukan inokulasi dengan ditambahkan starter bakteri kurang lebih 20 mL untuk 1L susu. Perbandingan campuran kedua bakteri

pada starter yoghurt adalah satu dibanding satu. Untuk pembuatan yakult prosedur sampai tahap ini sama dengan pembuatan yoghurt; namun inokulum untuk yakult digunakan bakteri *S. casei* yang terdapat pada produk yakult.

4. Susu yang sudah diinokulasi dengan bakteri asam laktat dalam starter dimasukkan dalam botol-botol atau gelas-gelas kecil dan diperam dalam inkubator pada suhu 43 derajat C selama 4 – 6 jam. Bila tidak ada inkubator, maka pemeraman dapat dilakukan pada suhu kamar selama 12 jam. Sela pemeraman kemasan harus dalam keadaan tertutup rapat.
5. Selesai pemeraman yoghurt atau yakult harus disimpan pada suhu dingin, yaitu di dalam ruang yang bersuhu kurang lebih 5⁰C. Ciri-ciri yoghurt yang rusak adalah encer, bau busuk, timbul gas, tumbuh kapang pada permukaan atas minuman yoghurt. Untuk yakult tanda kerusakan adalah bau busuk ada endapan di bagian bawah kemasan dan ada pemisahan warna menjadi lebih bening pada bagian atas.
6. Setelah jadi buat preparat bakteri yang terdapat dalam yoghurt atau yakult, selanjutnya gambar dan tentukan genusnya.
7. Lakukan uji organoleptik aroma, rasa dan tekstur tape

Pembuatan Pupuk Organik Cair (POC)

1. Siapkan wadah seperti ember/toples/drum
2. Timbang semua bahan yang telah ditentukan dan campurkan dengan pengaduk (tangan menggunakan sarung tangan) di dalam wadah yang telah disediakan
3. Tambahkan air tebu
4. Tambahkan air sumur sampai batas tertentu
5. Tutuplah wadah dengan plastik dan ikat dengan karet
6. Inkubasi selama 7 sampai 10 hari dengan tiap hari diaduk-aduk dan bila perlu dianginkan beberapa saat dan tutup kembali
7. Setelah selesai inkubasi, uji keberhasilan POC yang dihasilkan untuk mengecambahkan biji.

E. HASIL PENGAMATAN

1. Tabel uji organoleptik (untuk fermentasi pangan)

No.	Nama Sampel	aroma	rasa	tekstur

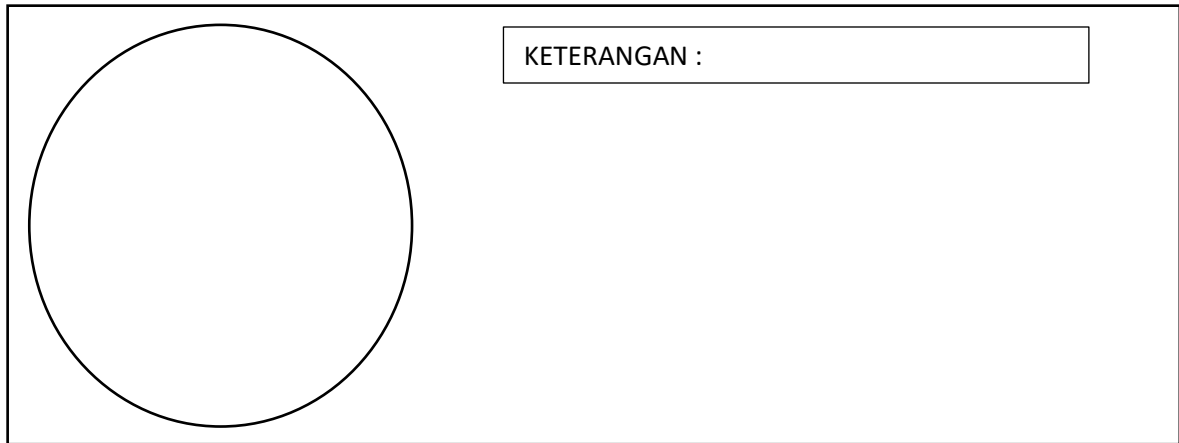
++++ = aroma, rasa, tekstur sesuai dengan produk yang dibuat

+++ = aroma, rasa, tekstur sesuai dengan produk yang dibuat namun masih ada kekurangan

++ = aroma, rasa, tekstur kurang sesuai dengan produk yang dibuat

+ = aroma, rasa, tekstur tidak sesuai dengan produk yang dibuat

2. Hasil pengamatan preparat



F. PERLATIHAN

1. Sebutkan produk makanan dan minuman yang termasuk produk fermentasi!
2. Apa saja produk fermentasi non pangan yang dimaksudkan?
3. Produk fermentasi dengan ada inovasi dapat diterapkan pada produk fermentasi apa saja? Sebutkan contohnya!
4. Bagaimana proses pembuatan tempe yang higienis dan mengikuti konsep GHP?
5. Bagaimana membuat produk fermentasi non pangan (pilih salah satu) yang dapat dibuktikan mempunyai khasiat untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman, beri contoh dan jelaskan!
6. Sebutkan beberapa produk fermentasi berbahan baku limbah!
7. Bagaimana memanfaatkan daun-daun kering di sekitar kampus untuk produksi pupuk organik?
8. Buatlah diagram alir (seperti pada pembuatan tempe) untuk pembuatan produk fermentasi meliputi: tape, yoghurt, yakult, asinan, terasi, tauco dan roti!

DAFTAR PUSTAKA

- Benson. 2001. Microbiological Application. Lab. Manual. 8th Ed. The McGraw Hill Co. New York
- Brock, T.D. & J.A. Phillips. 1985. General Microbiology: A Laboratory Manual. Academic Press., New York.
- Fitriana, dkk. 2019. Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *Jurnal Sainteks*. Vol. 16 No. 2.
- Gandjar, I., I. Rukmi, I. Subagyo & W. Mangunwardojo. 1985. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Harley–Prescott: 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed. The McGraw–Hill Companies,
- Pelczar, M.J. & E.S. Chan. 1977. Laboratory Exercise in Microbiology. 4th Ed. McGraw-Hill Book Co. New York.
- Seeley, H.W., P.J. Vandemark & J.J. Lee. 1991. Microbes in Action. 4th Ed. W.H. Freeman & Co. New York.
- Wistreich, G.A. & M.D. Lechtman. 1980. Laboratory Exercises in Microbiology. 4th Ed. Glencoe Publ. Co. Inc. London.

