

**MODUL
PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN**



Oleh

**Intan Nurul Azni
Muhammad Fajri Ramadhan
Julfi Restu Amelia**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PANGAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS SAHID
2022**

DAFTAR ISI

TEKNIK PENANAMAN	3
ISOLASI MIKROBA	6
PRAKTIKUM PENGGUNAAN MIKROSKOP	14
UJI EFEKTIVITAS STERILISASI	17
PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI	18
IDENTIFIKASI BAKTERI KOLIFORM	21
UJI EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA DARI BUMBU DAN REMPAH	24

TEKNIK PENANAMAN

Menanam suatu mikroorganisme perlu memerhatikan faktor-faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen (gas, O₂ atau udara). Cara menumbuhkan mikroorganisme anaerob sangat berbeda dengan aerob. Salah satu metode untuk menanam mikroorganisme yaitu dengan menggores. Teknik penanaman mikroorganisme dengan goresan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru. Cara gores digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada medium-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 dikultur lebih lanjut. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan medium yang basah. Pencegahan terjadinya penyebaran koloni harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya

Alat

Jarum inokulasi (ose)
Cawan petri
Sumber api

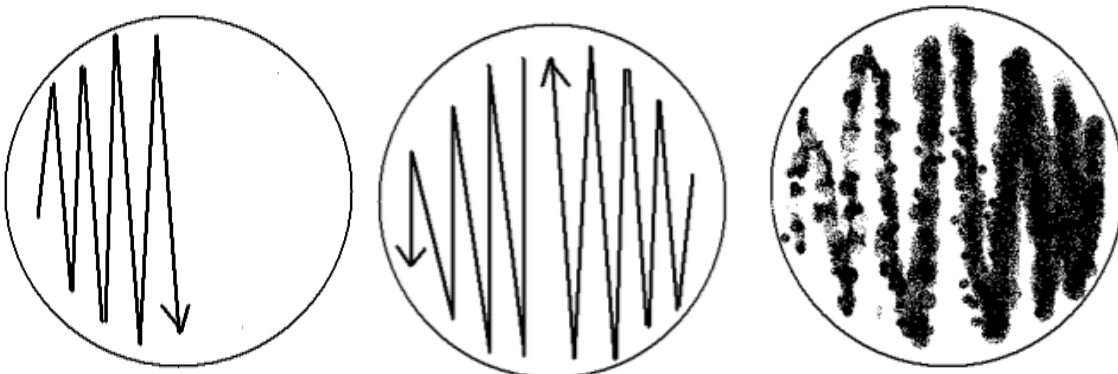
Bahan

Media PCA
Susu Pasteurisasi
Alkohol 70%
Buffer Fosfat untuk 2 kali pengenceran

Cara kerja

A. Goresan Sinambung

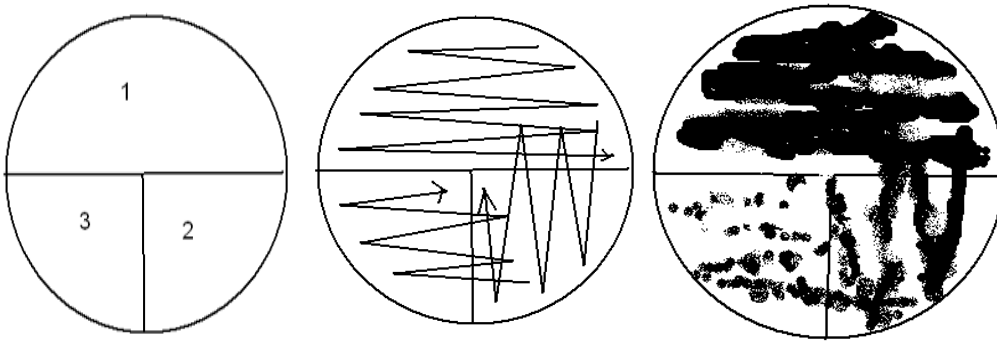
- 1) Jarum ose disentuhkan pada susu pasteurisasi dan gores secara kontinu sampai setengah permukaan agar.
- 2) Jangan pijarkan ose, lalu putar cawan 180° lanjutkan goresan sampai habis.
- 3) Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau media baru (Gambar 1).



Gambar 1. Teknik Goresan Sinambung

B. Goresan T

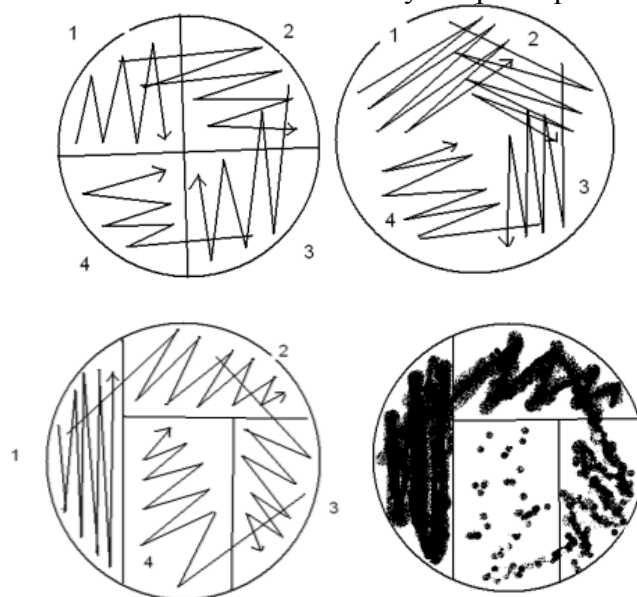
- 1) Cawan dibagi menjadi 3 daerah bagian menggunakan spidol marker.
- 2) Daerah 1 diinokulasi dengan *streak zig-zag*.
- 3) Jarum inokulan dipanaskan dan tunggu dingin, kemudian *streak zig-zag* dilanjutkan pada daerah 2 (*streak* pada gambar). Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna.
- 4) Lakukan hal yang sama pada daerah 3 (Gambar 2).



Gambar 2. Teknik Goresan T

C. Goresan Kuadran (*Streak Quadran*)

Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat daerah. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroba. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.



Gambar 3. Teknik Goresan Kuadran

REFERENSI

Widodo LU. 2013. *Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi*. Universitas Terbuka: Jakarta

ISOLASI MIKROBA

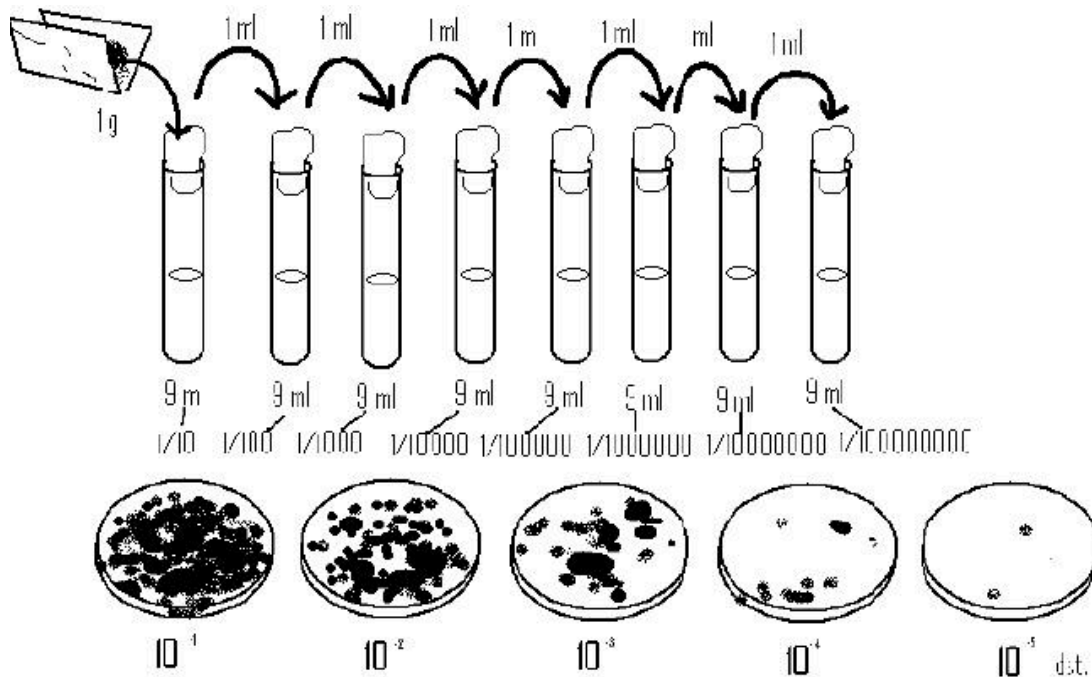
Pendahuluan

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai jenis. Di dalam laboratorium, populasi mikroba dapat diisolasi dari sumber/ habitat seperti udara, tanah, air, makanan, dan lainnya. Hasil isolasi umumnya merupakan biakan mikroba campuran dan perlu dimurnikan untuk memperoleh biakan murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat fisiologi, dan biokimiawinya.

Isolasi dapat dilakukan menggunakan beberapa teknik berikut:

1. Teknik Pengenceran Bertingkat

Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan.



Gambar 1. Teknik Pengenceran Bertingkat

Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1:9 untuk sampel dari pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroba dari pengenceran sebelumnya. Cara kerjanya adalah sebagai berikut:

Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan 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. Pengocokan dilakukan dengan cara membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen atau dengan menggunakan alat vortex. Kemudian diambil 1 ml dari tabung 10⁻¹ dengan mikropipet kemudian dipindahkan ke tabung 10⁻² secara aseptis kemudian

dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa tip mikropipet yang digunakan harus selalu diganti.

2. Teknik Penanaman

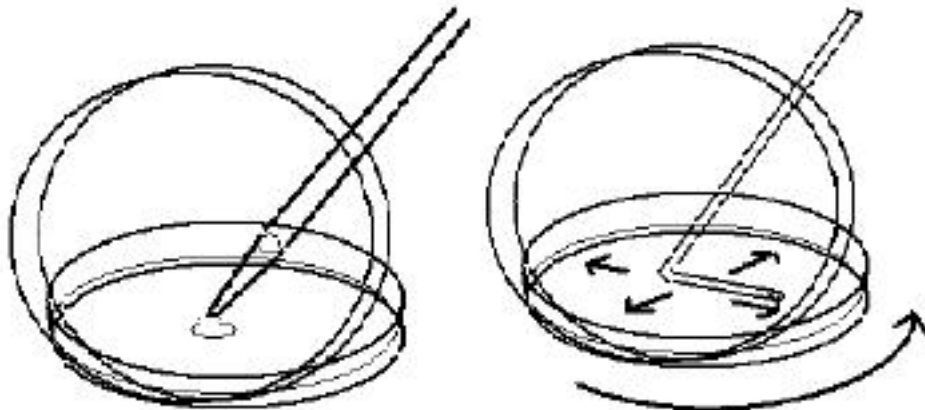
a. Teknik penanaman dari suspensi

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

a.1. *Spread Plate* (agar tabur ulas)

Teknik ini adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi (terutama bakteri) di permukaan media untuk memperoleh biakan murni. Adapun cara kerjanya sebagai berikut:

Ambil 0,1 mL suspensi menggunakan mikropipet kemudian teteskan di atas permukaan media yang telah memadat. Batang L diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar di atas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik. Suspensi diratakan menggunakan batang L pada permukaan media supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.



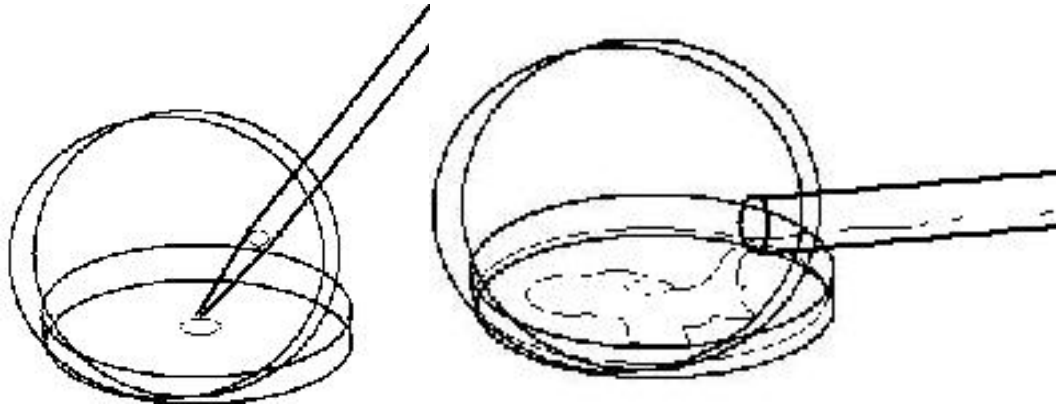
Gambar 2. Teknik *Spread Plate*

Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas menyebabkan sel mikroba mati karena panas.

a.2. *Pour Plate* (agar tuang)

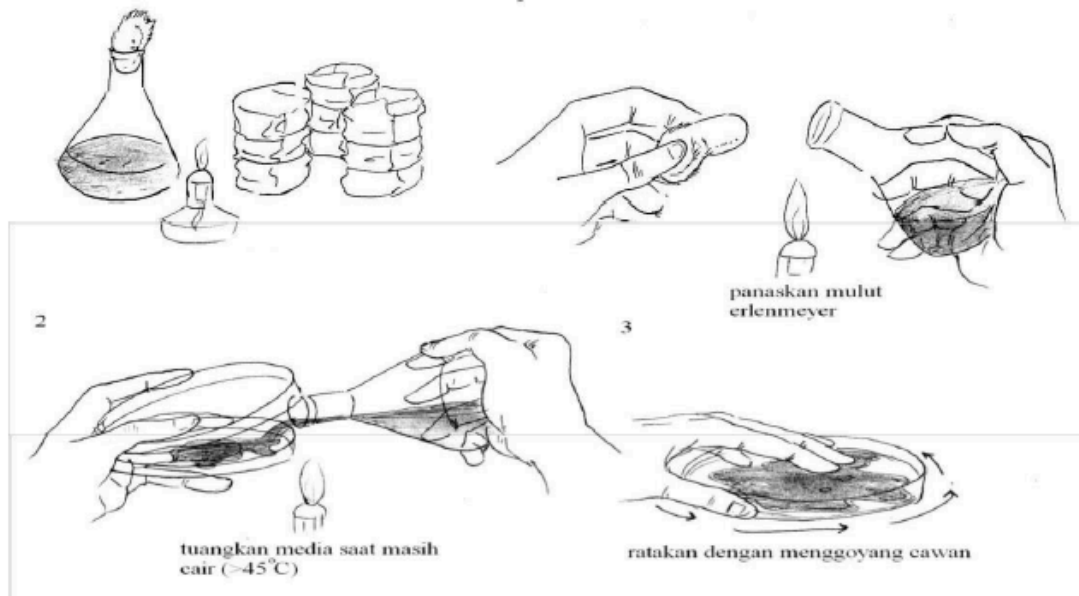
Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi (terutama bakteri) ke dalam cawan petri kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan pertumbuhan bakteri di permukaan dan di dalam agar media sehingga terdapat sel yang tumbuh. Adapun prosedur kerja yang dilakukan sebagai berikut:

Siapkan cawan steril, suspensi yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ($\pm 45^{\circ}\text{C}$). Teteskan 1 mL secara aseptis suspensi sel ke dalam cawan kosong.

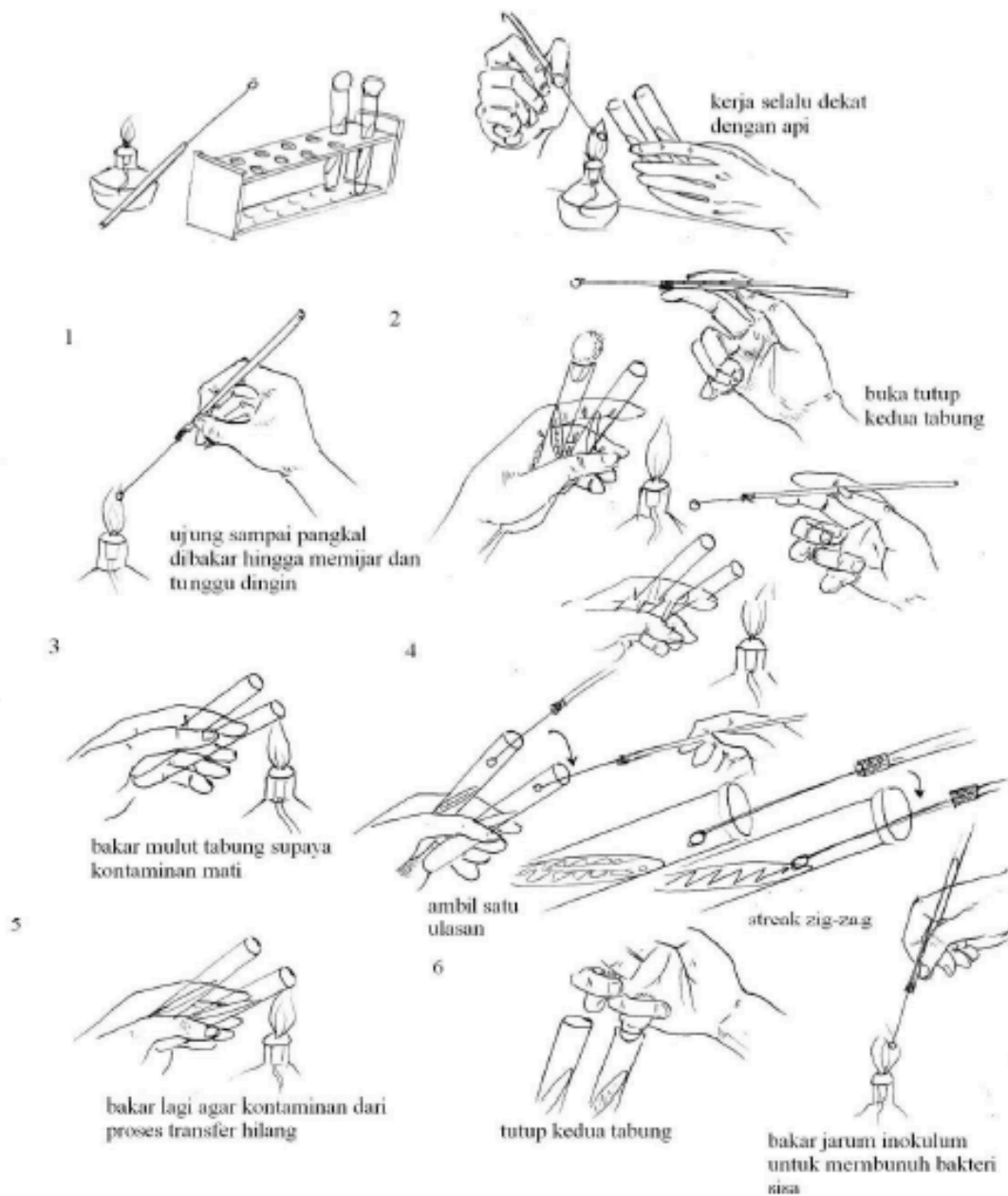


Gambar 3. Teknik *Pour Plate*

Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi.



Gambar 4. Menuang Media Secara Aseptis



Gambar 5. Memindahkan Biakan Secara Aseptis

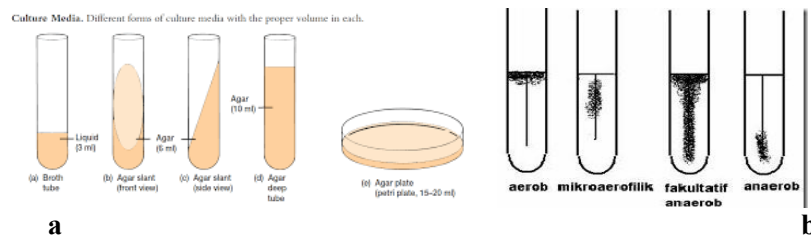
a.3 Agar Tegak

Media tegak dimasukkan untuk untuk melihat pertumbuhan bakteri dalam merespon oksigen dari luar dalam arah tegak, untuk mendeteksi apakah bakteri tersebut bakteri aerob, anaerob, atau mikroaerofilik. Pembuatan agar tegak dilakukan dengan cara memasukkan agar ke dalam tabung reaksi sampai setengah tinggi tabung lalu ditunggu sampai padat. Untuk pengujian bakteri menggunakan agar tegak digunakan ose tegak lurus. Pertama, panaskan ose pada di bunsen hingga berpijar, lalu dianginkan di pinggir api. Masukkan ose ke dalam medium biakan bakteri, lalu masukkan ke media tegak lurus dengan cara menusukkan ke dalam agar dengan tegak sampai bagian bawah agar. Inkubasi media pada

suhu 30°C selama 48 jam. Amati apakah ada pertumbuhan di dalam media agar, atau hanya pertumbuhan di permukaan agar.

a.4 Agar Miring

Media agar miring dimaksudkan untuk melihat sebaran pertumbuhan bakteri dengan luas permukaan agar yang lebih besar. Agar miring biasanya digunakan untuk membuat stok biakan atau *culture stock* bakteri aerob. Pembuatan agar miring dilakukan dengan cara memasukkan agar ke dalam tabung reaksi sampai seperempat tinggi tabung lalu dimiringkan (jangan sampai agar keluar dari tabung) dan ditunggu sampai padat. Untuk pertumbuhan atau pengujian mikroba pada agar miring dilakukan dengan cara panaskan ose dengan ujung bulat pada bunsen hingga berpijar lalu dianginkan dipinggir api. Setelah cukup dingin, ose dimasukkan ke dalam biakan bakteri dan dimasukkan ke media agar miring dengan hanya ditempelkan dipermukaan agar. Amati koloni yang terbentuk.



Gambar 6. Agar Miring dan Agar Tegak

Bahan per kelompok

PCA → 1 cawan petri 30 mL
4 tabung @9 ml Buffer Fosfat
Susu pasteurisasi

Alat per kelompok

4 Cawan petri steril
2 Hockey stick
1 Ose untuk agar tegak
1 ose untuk agar miring
4 Tabung reaksi
Pipet volumetrik
Tabung reaksi steril

Cara kerja

A. Pengenceran

1. Ambil 1 ml sampel susu pasteurisasi dan masukkan ke buffer fosfat steril (9 ml) dalam tabung reaksi yang telah disteril, homogenkan
2. Lalu ambil 1 ml lagi dari pengenceran pertama dan masukkan ke pengenceran selanjutnya, sampai 2x pengenceran
3. Sampel susu dengan pengenceran 2x siap dicawakan (duplo)

B. Spread plate

1. Tuangkan agar yang telah di steril ke dalam cawan petri steril (duplo)

2. Biarkan sampai media agar padat
3. Teteskan 0,1 ml sampel ke atas media dan ratakan dengan cara diputar dengan menggunakan hockey stick steril
4. Inkubasi media dengan cara membalik cawan petri dan inkubasi pada suhu 30° C atau pada suhu ruang selama 24 jam, lalu amati

C. *Pour plate*

1. Taruh sampel sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri steril
2. Tuangkan agar yang telah di steril ke dalam cawan petri dan goyangkan membentuk angka 8 sampai sampel tercampur merata
3. Biarkan sampai media agar padat
4. Inkubasi media dengan cara membalik cawan petri dan inkubasi pada suhu 30° C atau pada suhu ruang selama 24 jam, lalu amati

D. Agar tegak

1. Tuang agar ke tabung reaksi steril sebanyak 9 mL
2. Celupkan ose lurus ke susu pasteurisasi, lalu tusuk ke agar di tabung reaksi yang telah membeku
3. Inkubasi media dengan cara membalik cawan petri dan inkubasi pada suhu 30° C atau pada suhu ruang selama 24 jam, lalu amati

E. Agar miring

1. Tuang agar ke tabung reaksi steril sebanyak 7 mL
2. Rebahkan tabung reaksi dengan sudut 30°, tunggu hingga agar membeku
3. Celupkan ose bulat ke susu pasteurisasi, lalu gores ke agar di tabung reaksi yang telah membeku
4. Inkubasi media dengan cara membalik cawan petri dan inkubasi pada suhu 30° C atau pada suhu ruang selama 24 jam, lalu amati

REFERENSI

Program Studi Agroteknologi. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi. 2016. Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur: Surabaya.

Yunilas. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Peternakan. 2017. Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara: Medan.

PRAKTIKUM PENGGUNAAN MIKROSKOP

Mikroskop berasal dari bahasa Yunani, yang terdiri dari kata *micros* = kecil dan *scopein* = melihat. Mikroskop merupakan alat yang digunakan untuk melihat objek yang terlalu kecil, seperti mikroorganisme. Ilmu yang mempelajari benda kecil dengan menggunakan alat ini disebut mikroskopi, dan kata mikroskopik berarti sangat kecil, tidak mudah terlihat oleh mata. Mikroskop merupakan alat optik yang terdiri dari satu atau lebih lensa yang memproduksi gambar yang diperbesar dari sebuah benda yang diletakkan di bidang fokal dari lensa tersebut. Berdasarkan sumber cahayanya, mikroskop terdiri dari dua jenis yakni mikroskop cahaya dan mikroskop elektron. Berdasarkan kegiatan pengamatannya, mikroskop cahaya terbagi menjadi mikroskop diseksi untuk mengamati bagian permukaan dan mikroskop monokuler dan binokuler untuk mengamati bagian dalam sel.

Alat-alat:

- Mikroskop cahaya
- Gelas Objek
- Bunsen
- Jarum ose
- Rak tabung reaksi
- *Pencil glass*

Bahan:

- Suspensi bakteri
- Minyak imersi
- Kapas
- Alkohol 70%
- Tissue/kertas saring
- Akuades
- Gentian violet
- Tempe
- Tapai
- Oncom

Prosedur:

Persiapan Mikroskop

1. Siapkan mikroskop, pasang lensa okuler dan lensa objektif, diafragma dibuka selebar-lebarnya.
2. Sambil dilihat melalui lensa okuler, cermin diatur dan diarahkan kepada sumber cahaya untuk mendapatkan cahaya terang semaksimal mungkin
3. Diafragma ditutup kembali

Persiapan Preparat (lihat gambar di bawah)

4. Semprotkan meja kerja dengan alkohol 70% dan lap hingga kering
5. Sediakan gelas objek yang bersih dan bebas lemak
6. Jarum ose dipijarkan pada bunsen, tunggu sampai kira-kira dingin
7. Ambil 2 ose biakan dan disebar di atas gelas objek seluas 1-2 cm². Preparat dibiarkan mengering di udara atau dapat dipercepat pengeringannya dengan menghangatkannya di atas api
8. Jarum ose dipijarkan lagi sebelum ditaruh di tempatnya (rak tabung reaksi)
9. Preparat yang telah kering direkatkan dengan melewatkan di atas api sebanyak 3 kali.
10. Teteskan Gentian Violet di atas gelas objek di area preparat, biarkan selama 1-2 menit
11. Cuci dengan akuades dan biarkan mengering di udara atau ditaruh di antara 2 helai kertas saring/tissue, kemudia ditekan hingga kering (jangan digosok)
12. Semprotkan meja kerja dengan alkohol 70% dan lap hingga kering

Pengamatan dengan Mikroskop

1. Letakkan preparat basah tersebut di meja preparat mikroskop dan dijepit. Bagian preparat yang ada spesimen diletakkan tepat di lubang meja preparat
2. Nyalakan lampu mikroskop dan atur sedemikian rupa sehingga jumlah sinar yang melalui spesimen maksimal
3. Lensa objektif berkekuatan rendah didekatkan pada spesimen sampai jaraknya kira-kira 0,5 cm
4. Secara hati-hati naikkan lensa objektif dengan menggunakan knop pengatur kasar, sehingga spesimen tepat pada fokus
5. Gunakan knop pengatur halus untuk menajamkan fokus
6. Setelah spesimen tepat pada fokus, atur kaca dan diafragma iris sehingga terlihat bayangan paling jelas. Jangan sekali-kali memegang lensa dengan tangan
7. Untuk memperoleh gambar yang tepat, geserlah gelas objek ke kiri, ke kanan, ke depan, atau ke belakang, dengan mengaturnya menggunakan knop penyangga spesimen
8. Setelah menemukan objek, teteskan minyak imersi sebanyak 1 tetes pada bagian yang terdapat spesimen
9. Gunakan lensa objektif berkekuatan tinggi (*high power*) dengan cara memutar lensa objektif. Cara selanjutnya sama dengan penggunaan lensa berkekuatan rendah.
10. Laporkan bentuk dan ukuran biakan
11. Preparat yang sudah selesai dilihat, harus dimasukkan ke dalam wadah yang berisi desinfektan (karbol, lisol, detol, dll)
12. Setelah mikroskop selesai digunakan, harus segera dibersihkan sebelum disimpan. Lensa-lensa okuler, objektif, kondensor, dan cermin dibersihkan dengan kapas yang dibasahi dengan xylol atau bensin. Bagian-bagian lain yang dicat boleh dibersihkan dengan kapas atau kain yang bersih tanpa xylol atau bensin. Sesudah bersih dimasukkan ke dalam kotaknya dan ditutup rapat. Kalau tidak ada kotak mikroskop, dapat disimpan dalam lemari yang tidak lembab.

UJI EFEKTIVITAS STERILISASI

Alat-alat (per kelompok)

- 1 cawan petri yang disteriliasi kering (a)
- 1 cawan petri yang disteriliasi basah (b)
- 4 cawan petri untuk inkubasi sampel dengan media PCA (c)
- 4 cawan petri untuk inkubasi sampel dengan media PDA (d)
- Lampu spiritus
- Kapas swab steril
- Tabung reaksi
- Mikropipet dan tips

Bahan (per kelompok)

- Media PCA
- Media PDA
- Buffer fosfat

Prosedur

1. Gunakan kapas swab steril untuk menyeka bagian dalam cawan petri a dan b dengan cara zigzag. 1 kapas swab untuk 1 cawan petri.
2. Celupkan kapas swab tersebut ke dalam 10 mL larutan buffer fosfat steril yang ada di dalam tabung reaksi. Homogenkan.
3. Ambil sampel poin 2 sebanyak masing-masing 1 mL dan masukkan ke dalam cawan petri c dan d. Tuang media PCA dan PDA ke dalam cawan petri yang sudah berisi sampel.
4. Setelah semua agar dalam cawan petri membeku, inkubasikan cawan-cawan petri tersebut (posisi cawan terbalik) pada suhu 30°C selama 48 jam.

$$\frac{\text{Jumlah koloni/cm}^2}{1} = \frac{\text{Rata-rata koloni dari 2 agar cawan} \times 10}{\text{luas permukaan yang diswab (cm}^2\text{)}} \times$$

PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI

Tujuan

Untuk mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

Prinsip

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri terdiri dari 2 jenis, yaitu faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik: pH, kadar air, potensial oksidasi-reduksi, kandungan nutrisi, kandungan antimikroba, dan struktur biologi. Faktor ekstrinsik: suhu penyimpanan, kelembaban relatif, konsentrasi gas, dan aktivitas mikroorganisme lainnya.

pH: umumnya mikroorganisme tumbuh secara optimal pada pH sekitar 7 (6,6-7,5). *E. coli* dan *S. aureus* dapat tumbuh dengan baik pada pH 6-7.

Alat

Cawan petri steril
Mikropipet
Autoklaf
Inkubator

Bahan

Plate Count Agar (PCA)
PCA yang mengandung NaCl 1%; 3%; dan 5%
PCA yang mengandung sukrosa 1%; 3 %; dan 5%
PCA pH 4,0; pH 7,0; dan pH 10,0
Staphylococcus aureus

Prosedur

A. Pengaruh suhu

1. Ambil masing-masing 1 mL larutan buffer fosfat yang berisi *S. aureus* lalu *plating* ke dalam 3 buah cawan petri steril (a).
2. Tuangkan PCA pada tiap-tiap cawan petri (a).
3. Tandai cawan petri dengan suhu inkubasi 5°C, 25°C, dan 44°C. Tandai pula dengan nama bakteri yang akan diinokulasikan.
4. Inkubasikan selama 48 jam pada tempat berikut:
 - a. 5°C di dalam lemari es
 - b. 25°C pada suhu ruang
 - c. 44°C di dalam inkubator
5. Hitunglah jumlah koloni dengan rumus berikut:

$$\text{Jumlah koloni/mL} = \text{Rata-rata koloni dari 2 agar cawan} \times \text{FP}$$

B. Pengaruh tekanan osmotik

a. Pengaruh NaCl

1. Ambil masing-masing 1 mL larutan buffer fosfat yang berisi *S. aureus* lalu *plating* ke dalam 3 buah cawan petri steril.
2. Tuangkan PCA dengan konsentrasi NaCl 1%; 3%; dan 5% pada tiap-tiap cawan petri.

3. Tandai cawan petri dengan konsentrasi NaCl 1%; 3%; dan 5%. Tandai pula dengan nama bakteri yang akan diinokulasikan.
4. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 30°C
5. Hitunglah jumlah koloni dengan rumus berikut:

Jumlah koloni/mL = Rata-rata koloni dari 2 agar cawan x FP

b. Pengaruh sukrosa

1. Ambil masing-masing 1 mL larutan buffer fosfat yang berisi *S. aureus* lalu *plating* ke dalam 3 buah cawan petri steril.
2. Tuangkan PCA dengan konsentrasi sukrosa 1%; 3%; dan 5% pada tiap-tiap cawan petri.
3. Tandai cawan petri dengan konsentrasi sukrosa 1%; 3%; dan 5%. Tandai pula dengan nama bakteri yang akan diinokulasikan.
4. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 30°C
5. Hitunglah jumlah koloni dengan rumus berikut:

Jumlah koloni/mL = Rata-rata koloni dari 2 agar cawan x FP

C. Pengaruh pH

1. Ambil masing-masing 1 mL larutan buffer fosfat yang berisi *S. aureus* lalu *plating* ke dalam 3 buah cawan petri steril.
2. Tuangkan PCA dengan pH 4,0; 7,0; dan 9,0 pada tiap-tiap cawan petri.
3. Tandai cawan petri dengan pH 4,0; 7,0; dan 9,0. Tandai pula dengan nama bakteri yang akan diinokulasikan.
4. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 30°C
5. Hitunglah jumlah koloni dengan rumus berikut:

Jumlah koloni/mL = Rata-rata koloni dari 2 agar cawan x FP

Referensi:

- Suriawati J. Buku Panduan praktikum analisa hayati. Jakarta: Jurusan Analisa Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Jakarta II Departemen Kesehatan RI; 2007.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Edisi ke-7. New York: Springer; 2005.
- <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf>

IDENTIFIKASI BAKTERI KOLIFORM

Bakteri koliform merupakan jenis bakteri yang sering dipakai sebagai salah satu indikator kualitas air adanya cemaran mikroba. Keberadaan bakteri koliform dapat diketahui dengan adanya kotoran pada air, makanan, maupun minuman. Koliform merupakan bakteri yang dicirikan sebagai bakteri berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora, aerobik dan anaerobik fakultatif yang memfermentasi laktosa dengan menghasilkan asam yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung yang telah diinkubasi pada media yang sesuai. Bakteri koliform dibedakan menjadi 2 kelompok, yakni koliform fekal dan non fekal. Salah satu jenis koliform fekal yakni *Escherichia coli* yang merupakan bakteri yang berasal dari kotoran hewan atau manusia. Berdasarkan hal tersebut, keberadaan *Echerichia coli* pada air menunjukkan bahwa air tersebut pernah terkontaminasi feses manusia dan berpotensi mengandung mikroorganisme patogen usus. Salah satu jenis koliform non-fekal yakni *Enterobacter aerogenes* yang biasa ditemukan pada hewan atau tanaman-tanaman yang telah mati.

Tujuan

Praktikum ini bertujuan untuk menetapkan nilai duga terdekat (MPN) koliform pada sampel air serta dapat melakukan identifikasi bakteri koliform dengan benar.

Indikator belajar

Setelah melakukan praktikum ini, mahasiswa diharapkan mampu:

1. Melakukan pengenceran dan pemupukan sampel makanan/minuman untuk menghitung mikroba dengan metode MPN
2. Menentukan hasil uji positif dengan ciri-ciri pembentukan gas yang terperangkap dalam tabung Durham
3. Menentukan hasil uji positif dengan ciri-ciri adanya kekeruhan pada media uji
4. Menganalisis nilai MPN dari sampel air
5. Menganalisis keberadaan koliform pada sampel dengan media *Eosine Methylene Blue Agar* (EMBA)

Prinsip

Metode *Most Probable Number* (MPN) atau Angka Paling Mungkin (APM) merupakan salah satu cara untuk menentukan banyaknya mikroba secara tidak langsung. Metode MPN menggunakan medium cair di dalam tabung reaksi, di mana perhitungan berdasarkan jumlah tabung positif, yaitu yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan, atau terbentuknya gas dalam tabung Durham untuk mikroba pembentuk gas.

Kelompok koliform merupakan bakteri indikator untuk uji kualitas mikrobiologi air dengan menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN). Kelompok koliform mencakup bakteri yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif, batang Gram negatif dan tidak membentuk spora. Koliform memfermentasikan laktosa dengan pembentukan asam dan gas dalam waktu 48 jam pada suhu 35°C.

Kelompok koliform dibagi menjadi dua, yaitu yang berasal dari tinja dan bukan tinja (contoh: tanah). Koliform asal tinja mampu menghasilkan gas dalam kaldu dalam waktu 24 jam pada suhu 41-44,5°C dan koliform bukan asal tinja pada suhu 37°C.

Koliform dipilih menjadi bakteri indikator terjadinya pencemaran, karena kriteria di bawah ini:

1. Koliform terdapat dalam air tercemar dan tidak terdapat dalam air tidak tercemar
2. Koliform terdapat dalam jumlah besar jika air tercemar
3. Mudah berkembang biak dan mudah dideteksi
4. Berkorelasi dengan bakteri patogen

Pengujian MPN Koliform terdiri dari dua tahap, yaitu tahapan Praduga/*Presumptive* dan tahapan uji Penegas/Konfirmasi. Pada tahapan uji praduga, jika terdapat hasil positif, menunjukkan adanya pertumbuhan mikroorganisme yang mampu memfermentasikan Laktosa menjadi asam dan gas, namun jika hasil negatif, hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan mikroorganisme yang tidak mampu memfermentasikan laktosa atau tidak ada mikroorganisme yang tumbuh.

Jika terdapat hasil positif pada tahapan uji Penegas, menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri Koliform. Jika menunjukkan hasil negatif, mengindikasikan tidak adanya pertumbuhan bakteri Koliform sehingga nilai MPN Koliform didapatkan dari jumlah tabung positif tiap pengenceran pada tahapan uji Penegas yang dirujuk ke tabel MPN. Dari tabung yang positif, isolasikan ke dalam media *Eosine Methylene Blue Agar* (EMBA). Jika hasil positif, maka akan dihasilkan koloni berwarna gelap pada bagian tengah dan berwarna hijau kilap logam (hijau metalik).

Bahan

Buffer phosphat

Lactose Broth (LB)

Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)

Eosine Methylene Blue Agar (EMBA)

Sampel 1, 2, 3

Sampel kontrol positif *E. coli* (Buffer fosfat dengan *E. coli*)

Alat

Tabung reaksi

Mikropipet 1mL dan tips

Tabung Durham

Autoklaf

Inkubator

Gelas ukur

Aluminium foil

Vortex

Jarum ose

Neraca analitik

Bunsen

Prosedur Uji MPN

1. Ambil 1mL sampel, masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9mL larutan buffer phosphat (pengenceran 10^{-1}).
2. Siapkan 2 tabung reaksi masing-masing berisi 9mL buffer phosphat. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel, pipet 1mL pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung buffer phosphat

pertama hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} dan dihomogenkan. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-3} .

Metode 3 tabung

3. **Uji praduga:** Untuk setiap pengenceran disiapkan 3 tabung reaksi berisi 9mL LB yang dilengkapi tabung Durham. Ke dalam tiap tabung dari masing-masing seri dimasukkan 1mL suspensi pengenceran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah 24 jam dicatat dan diamati adanya gas yang terbentuk di dalam tiap tabung. Kemudian inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam dan dicatat tabung-tabung yang menunjukkan gas positif.
4. **Uji penegas:** Biakan dari tabung yang menunjukkan uji praduga positif dipindahkan 1 ose ke dalam tabung reaksi berisi 10mL BGLB yang telah dilengkapi tabung Durham. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Dilakukan pengamatan terhadap pembentukan gas.
5. Jumlah tabung yang positif dirujuk pada tabel APM dan dinyatakan sebagai APM koliform.
6. Tabung yang positif diisolasikan ke dalam EMB-agar dan simpan dalam inkubator selama 2x24 jam pada suhu 37°C .
7. Amati koloni yang mencirikan koliform yaitu koloni bersifat gelap pada bagian tengah dan berwarna hijau metalik.

Referensi:

- Kusumaningrum HD, Suliantari, Nurjanah, Haritadi RD, Nurwitri CC. Penuntun praktikum mikrobiologi pangan. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor; 2012.
- Suriawati J, Rachmawati SR, Nugroho PD, Marwandha E, Wahyuti S, Patimah, dkk. Buku pedoman praktikum analisa hayati. Jakarta: Jurusan Analisa Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Jakarta II Departemen Kesehatan RI; 2010.
- Djasmari W, Fuad A. Penuntun praktik analisis mikrobiologi. Bogor: Akademia Kimia Analis; 2013.

UJI EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA DARI BUMBU DAN REMPAH

Alat-alat

- Cawan petri steril
- Lampu spirtus
- Cakram dari kertas saring
- Tip mikropipet untuk membuat sumur
- Mortar steril
- Mikropipet
- Tip biru dan kuning steril
- Gelas ukur steril
- Tusuk gigi

Bahan

- Media PCA (untuk 4 cawan)
- Suspensi *S. aureus* (10^8 CFU/mL)
- Akuades steril
- Bumbu-bumbu dan rempah-rempah (bawang putih, bawang merah, cabai rawit, jahe, kunyit, sereh, pala, cengkeh)

Prosedur Metode Cakram

5. *Plating* media PCA yang berisi *S. aureus* (100:1) ke cawan petri steril. Tunggu hingga agar membeku (a)
6. Haluskan bumbu/rempah dan encerkan dengan akuades steril
7. Celupkan 4 buah cakram ke dalam larutan bumbu/rempah
8. Letakkan keempat cakram tersebut pada agar (a) dengan menggunakan pinset steril
9. Inkubasikan pada suhu 35°C selama 48 jam
10. Hitung zona bening yang terbentuk dengan menghitung rata-rata luas zona bening yang terbentuk

Prosedur Metode Sumur

1. *Plating* media PCA yang berisi *S. aureus* ke cawan petri steril. Tunggu hingga agar membeku (b)
2. Haluskan bumbu/rempah dan encerkan dengan akuades steril
3. Buat 4 buah sumur pada agar (b) dengan menggunakan bagian belakang tip mikropipet
4. Masukkan larutan bumbu/rempah ke dalam 4 sumur
5. Inkubasikan pada suhu 30°C selama 48 jam
6. Hitung zona bening yang terbentuk dengan menghitung rata-rata luas zona bening yang terbentuk

Note: ukur diameter cakram dan sumur sebelum perlakuan

