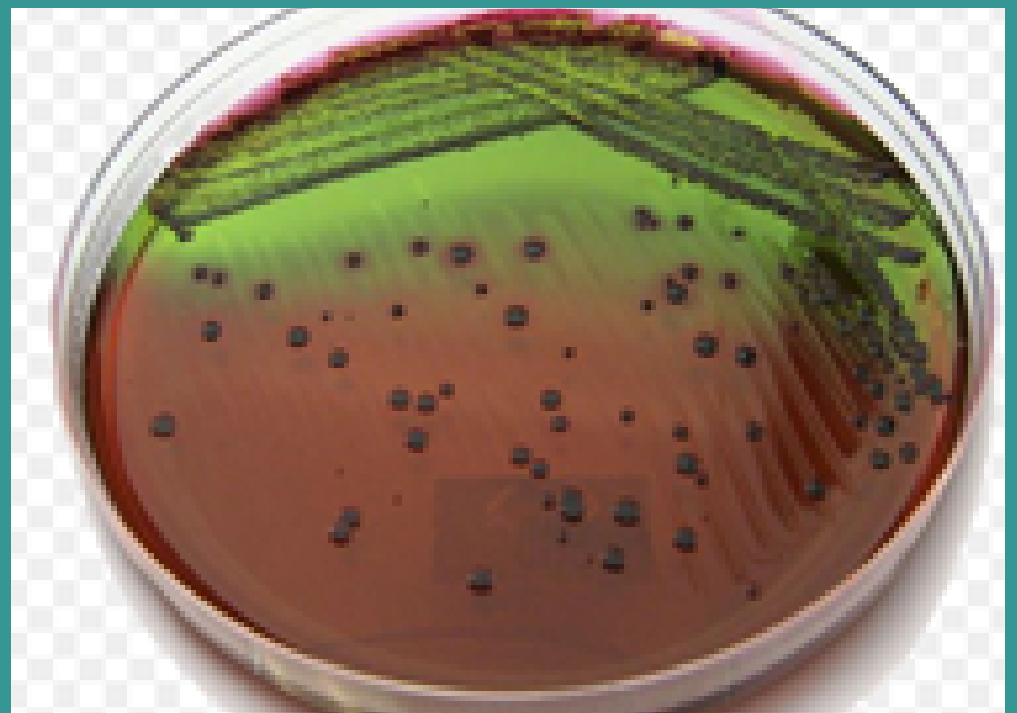


BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI & TA. HAYATI 2



Pengampu :

Rika Sebtiana K, S.TP., M.Si

Nuri Ardiantika S, S.Farm

**D3 ANALISIS FARMASI DAN MAKANAN
STIFAR YAYASAN PHARMASI SEMARANG
2023**

<i>Daftar Isi</i>		i
Kata pengantar		ii
Jadwal praktikum		iii
Tata tertib		iv
Bab 1.	Uji Bakteri Total <i>Coliform</i> dengan metode MPN	1
Bab 2.	Analisa Kontaminasi <i>E.coli</i> dengan uji IMViC	6
Bab 3.	Analisa Kontaminasi <i>Salmonella sp</i>	9
Bab 4.	Analisa Kontaminasi <i>St. aureus</i> pada Bahan Pangan	11
Bab 5.	Analisa Kontaminasi <i>Vibrio cholerae</i> pada Bahan Pangan.....	13
Bab 6.	Uji <i>Candida albicans</i> dan Uji <i>Bacillus cereus</i>	15
Bab 7.	Uji Koefisien Fenol	18
Bab 8.	Uji Biru Metil	21
Bab 9.	Produk Fermentasi	23
Bab 10.	Pengujian Daya Antibakteri	25
Bab 11.	Analisa Kontaminasi <i>Pseudomonas sp</i> pada Bahan Pangan	28
Bab 12.	Analisa Kontaminasi <i>Clostridium botulinum</i> pada Bahan Pangan...	30

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa ,berkat rahmat – Nya buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi dan TA Hayati 2 ini dapat diselesaikan. Materi yang tersaji pada buku petunjuk ini adalah bagaimana cara menguji bakteri *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas sp* dan *Clostridium botulinum* pada bahan pangan, Pengujian Angka Koefisien Fenol dari suatu desinfektan, Pengujian Metilen Blue untuk menentukan kualitas air susu, Pembuatan Produk Fermentasi dan Pengujian Daya Antibakteri.

Buku ini disusun untuk memenuhi kebutuhan mahasiswa dalam memahami dan melaksanakan praktikum Mikrobiologi dan TA Hayati 2 dengan sebaik-baiknya serta menunjang aplikasi ilmu lain di bidang farmasi dan makanan.

Buku ini masih jauh dari sempurna, sehingga kami mohon kritik dan saran demi kesempurnaan buku ini kedepannya.

Semarang, Februari 2023

Penyusun

Jadwal Praktikum

Bulan	Pertemuan Ke
Februari	
Pengarahan, pembagian kelompok, <i>study literature</i> (kontrak perkuliahan)	1
Preparasi media dan alat	2
Maret	
Pengujian bakteri total <i>Coliform</i> dengan metode MPN	3
Pengujian kontaminasi <i>E.coli</i> dengan Uji IMViC	4
Pengujian kontaminasi <i>Salmonella sp</i>	5
Pengujian kontaminasi <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Pengujian kontaminasi <i>Vibrio cholerae</i>	7
April	
UTS	10 – 29 April 2023
April-mei	
Pengujian <i>Candida albicans</i> dan <i>Bacillus cereus</i>	8
Pengujian Koefisien Fenol pada desinfektan	9
Mei	
Pembuatan produk Fermentasi	10
Uji Biru Metil	11
Pengujian daya antibakteri	12
Pengujian kontaminasi <i>Pseudomonas aeruginosae</i>	13
Juni	
Pengujian kontaminasi <i>Clostridium botulinum</i>	14
UAS	19 Juni – 1 Juli 2023

* perubahan jadwal menyesuaikan

TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI DAN TEKNOLOGI ANALISA HAYATI 2

1. Persiapan 15 menit sebelum acara praktikum dimulai baik secara daring maupun luring.
2. Mempersiapkan segala sesuatu (media, sampel, alat praktikum; **korek api**, lap bersih, gunting, kertas etiket, **spidol permanen**, kertas lensa, dan **filler**) yang akan digunakan untuk acara praktikum.
3. Memakai jas lab yang bersih untuk menghindari terjadinya infeksi atau kontaminasi.
4. Terlambat 15 menit berarti tidak diperbolehkan mengikuti pre-test.
5. Syarat kehadiran praktikum 100%. Apabila tidak memenuhi syarat tersebut maka tidak diperbolehkan mengikuti UTS maupun UAS.
6. Jika terpaksa berhalangan hadir pada acara praktikum, maka diwajibkan mengganti jam kehadiran dengan melaksanakan praktikum sendiri atau mengikuti praktikum pada kelompok lain dengan acara praktikum yang sama.
7. Nilai akhir merupakan rata-rata dari nilai pre-test, nilai laporan, nilai UTS dan nilai UAS.
8. Sebelum menggunakan alat praktikum, alat harus dicek kondisinya.
9. Pada saat praktikum, tidak diperbolehkan makan, minum kecuali ada hubungannya dengan acara praktikum misal: pengujian organoleptis, dan sebagainya.
10. Bila terjadi kecelakaan (tertusuk, terluka, mata terkena sesuatu) harus segera dilaporkan ke laboran, asisten atau dosen untuk dilakukan pertolongan.
11. Bila ada biakan yang tumpah ke lantai atau meja praktikum harus segera didesinfeksi untuk mencegah terjadinya kontaminasi.
12. Semua biakan mikroba yang sudah tidak dipakai lagi harus didesinfeksi dengan prosedur yang telah ditetapkan.
13. Selesai praktikum, alat yang akan dikembalikan ke laboran harus didesinfektan terlebih dahulu agar terbebas dari mikoba yang telah digunakan.
14. Sebelum meninggalkan laboratorium jangan lupa mematikan kompor, lampu, kran, dan mencuci tangan dengan sabun sampai bersih.
15. Setelah keluar dari laboratorium, jas laboratorium dilepas untuk menghindari kontaminasi yang berbahaya ke dalam tubuh.

PROSEDUR DESINFEKSI MEDIA YANG MENGANDUNG MIKROBA

1. Media yang mengandung mikroba disemprot dengan desinfektan seperti alkohol, lysol atau prosteck, diamkan selama 5 menit
2. Siapkan plastik warna hitam (double), pada bagian dalam plastik semprot dengan desinfektan.
3. Setelah media didesinfeksi selama 5 menit, keluarkan media dari wadahnya kemudian masukkan ke dalam plastik yang bagian dalamnya sudah disemprot desinfektan.
4. Setelah semuanya selesai, bungkus plastik tersebut dengan tali mati supaya tidak tumpah keluar.
5. Limbah siap dibuang di bak sampah.

PROSEDUR DESINFEKSI ALAT YANG DIGUNAKAN UNTUK MENUMBUHKAN MIKROBA

1. Masukkan alat-alat yang sudah selesai digunakan ke dalam panci berisi air sabun.
2. Rebus alat-alat dalam panci tersebut sampai mendidih, biarkan kondisi mendidih selama 20 menit.
3. Air rebusan dibuang ke dalam bak limbah.
4. Alat yang sudah direbus kemudian di cuci dengan sabun, kemudian dibilas sampai bersih dengan air mengalir.
5. Alat tersebut di lap sampai kering, kemudian siap dikembalikan ke laboran.

Bab 1. Uji Bakteri Total Coliform dengan Metode MPN

Tujuan Pembelajaran Khusus .

Mahasiswa dapat menghitung jumlah bakteri coliform dalam suatu sampel dengan metode MPN (*Most Probable Number*)

Hampir semua perairan yang ada di atas permukaan bumi dapat mengalami pencemaran, tidak terkecuali air yang terlihat jernih dan murni, dapat terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen yang dapat membahayakan kesehatan. Untuk mengetahui kualitas air, maka dilakukan pengujian ada tidaknya organisme indikator pencemaran perairan. Organisme indikator pencemaran perairan adalah organisme yang keberadaannya dalam perairan menunjukkan pernah tercemar oleh tinja manusia.

Beberapa ciri penting suatu organisme indikator ialah : Terdapat dalam air tercemar dan tidak ada dalam air yang tidak tercemar. Terdapat dalam air bila ada patogennya. Mempunyai kemampuan bertahan hidup yang lebih besar dari pada patogen. Mempunyai sifat yang seragam dan mantap. Tidak berbahaya bagi manusia dan hewan. Terdapat dalam jumlah yang lebih banyak dari pada patogen (Pelezar, 2005).

Mikroorganisme yang digunakan sebagai indikator pencemaran perairan adalah bakteri koliform. Sejumlah bakteri koliform merupakan bakteri dengan family Enterobacteriaceae (Kusuma, 2012). Adanya bakteri koliform dalam suatu badan perairan menunjukkan kemungkinan adanya mikroorganisme yang bersifat enteropatogenik atau toksik yang berbahaya bagi kesehatan.

Most Probable Number (MPN) merupakan metode untuk memperkirakan populasi mikroorganisme terutama pada situasi dimana mikroorganisme ada dalam jumlah yang sangat sedikit. Prinsip metode MPN adalah mengencerkan sampel sampai tingkat tertentu sehingga didapatkan konsentrasi mikroorganisme yang sesuai. Perhitungan metode MPN dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif, yaitu yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu atau dilihat dari timbulnya kekeruhan/ terbentuknya gas dalam tabung Durham.

Hal yang perlu diperhatikan pada metode MPN adalah :

1. Bakteri terdistribusi sempurna dalam homogenat sampel
2. Sel bakteri terpisah secara individual, tidak dalam bentuk rantai atau kumpulan
3. Jumlah yang didapatkan menggambarkan bakteri yang hidup saja.
4. Setiap individu tabung memiliki data yang independen

Pada pengujian uji bakteri total koliform dengan metode MPN ada beberapa tahap yang dilakukan yaitu :

1. Uji duga (*presumptive test*).

Pada tahap uji ini keberadaan coliform masi dalam tingkat probabilitas rendah, masih dalam dugaan. Uji ini untuk mendeteksi sifat fermentatif coliform dalam sampel.

2. Uji konfirmasi (*confirmed test*)

Beberapa bakteri selain coliform memiliki sifat fermentatif, maka diperlukan uji konfirmasi ini untuk mengetes kembali kebenaran adanya coliform dengan bantuan media selektif differensial.

3. Uji kelengkapan (*completed test*)

Uji kelengkapan ini kembali meyakinkan hasil uji konfirmasi dengan mendeteksi sifat fermentatif dan pengamatan mikroskop terhadap ciri coliform, bentuk batang, gram negatif dan tidak berspora (Fardiaz, 1989).

Metode MPN ini akan menghasilkan suatu nilai MPN. Nilai MPN adalah prakiraan jumlah unit tumbuh (*growth unit*) atau unit pembentuk koloni (*colony forming unit*). MPN dapat menggambarkan seberapa banyak sel individu yang tersebar dalam sampel. Satuannya per 100 ml / gram. Makin kecil nilai MPN maka kualitas air makin bagus dan layak minum.

Berdasarkan klasifikasi dari WHO, kadar koliform pada air yang baik atau *conformity* adalah 0 cfu/100 ml sampel. Sedangkan kadar koliform 1-10 cfu/100 ml sampel dinyatakan sebagai air yang *low risk*. Sedangkan air dengan *intermediate risk* merupakan air yang mengandung koliform 10-100 cfu/100 ml sampel. Air dengan total koliform 100-1000 cfu/100 ml sampel merupakan *high risk water* (Gwimbi, 2011)

Alat :

1. Erlemeyer 100 ml
2. Tabung reaksi
3. Tabung durham
4. Pipet ukur
5. Ose bulat
6. Inkubator

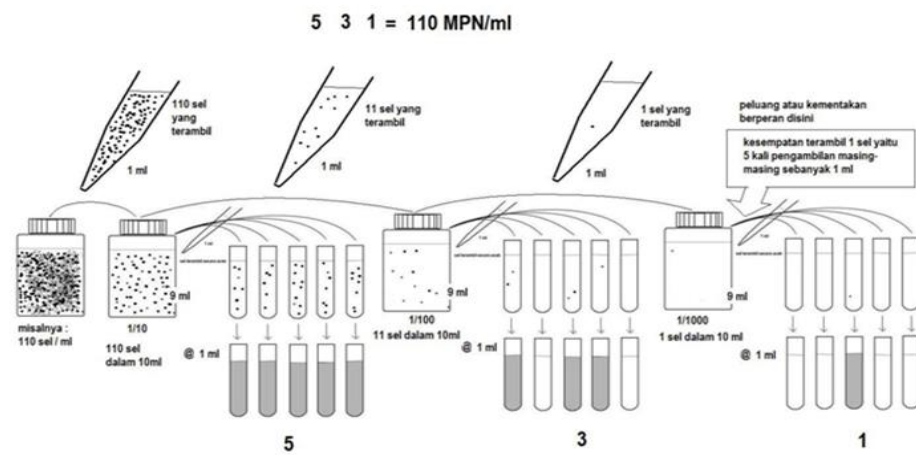
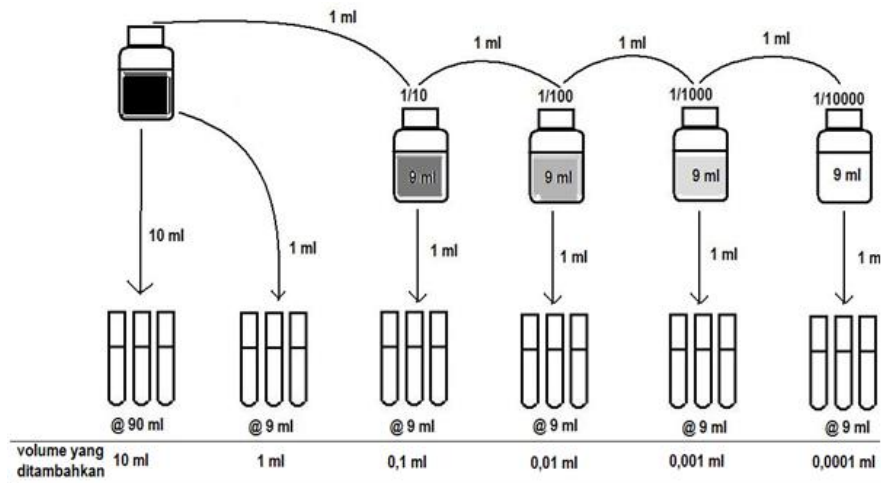
Bahan :

1. Media MCB
2. Media BGLBB
3. Garam fisiologis
4. Berbagai macam sampel
5. Biakan murni *E. coli*

7. Mortir stamper

Cara Kerja :

1. Sampel padat : dihaluskan dengan mortir stamper dan ditimbang 5 gr
Sampel cair : langsung dipipet sebanyak 5,0 ml
2. Masing-masing sampel dilarutkan dengan garam fisiologis (0,85%) sebanyak 45,0 ml, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} .
3. Dari pengenceran 10^{-1} tersebut, kemudian dipipet sebanyak 1,0 ml lalu dimasukkan ke dalam garam fisiologis 9,0 ml, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} .
4. Pengenceran 10^{-2} dipipet sebanyak 1,0 ml dimasukkan ke dalam garam fisiologis 9,0 ml sehingga didapatkan pengenceran 10^{-3} .
5. Dari masing-masing pengenceran dipipet sebanyak 1,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium MCB. Masing-masing pengenceran ditanam sebanyak 3 seri media MCB.
6. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam. Dibuat pula kontrol positif dan kontrol negatif.
7. Setelah 24-48 jam, amati perubahan yang terbentuk. Jika warna media semula merah/ ungu (tergantung merk media) berubah menjadi kuning/ kuning kecoklatan dan terbentuk gas, maka sampel diduga positif bakteri koliform.
8. Tabung reaksi yang diduga positif koliform diuji lanjut ke uji penegasan. Uji penegasan dilakukan dengan cara menanam masing-masing media MCB yang positif ke media BGLBB sebanyak 1 ose.
9. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Dibuat pula kontrol positif dan kontrol negatif BGLBB.
10. Amati adanya kekeruhan dan gas pada media BGLBB. Adanya gas ini ditandai dengan terangkatnya tabung durham di tabung reaksi atau ada gelembung yang terbentuk. Dari uji penegasan inilah dapat diketahui berapa jumlah mikroba, dengan cara mengkonversikan pada table MPN.



Tabel MPN untuk 3 seri tabung dengan 0,1, 0,01 dan 0,001 g inokulum (95 % confidence intervals)											
Tabung positif			MPN/g	Conf. lim.		Tabung positif			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		bawah	atas	0.10	0.01	0.001		bawah	atas
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Bab 2. Analisa Kontaminasi *E.coli* dengan Uji IMViC

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat mengetahui adanya kontaminasi *E.Coli* pada berbagai sampel dengan uji IMViC

Analisa kontaminasi *E. coli* dengan Uji IMViC merupakan lanjutan dari Uji Koliform menggunakan metode MPN. Setelah dilakukan uji Total koliform dengan metode MPN maka dapat diketahui air yang digunakan tercemar bakteri koliform atau tidak. Sebelum masuk ke Uji IMViC, dilakukan Uji **Jadi**, dengan menggunakan media padat EMB (Eosin Metilen Blue). Uji ini bertujuan untuk mengisolasi koloni bakteri koliform yang nyata. Pada media ini koliform akan membentuk koloni hijau kilat logam. Jika ada koloni hijau kilat logam maka dilanjutkan ke uji IMViC. **Uji IMViC** dilakukan untuk memberikan bukti biokimia bahwa organisme yang diisolasi benar-benar *E. coli* atau tidak. Setiap huruf (kecuali huruf i, digunakan untuk alasan **fonetik**, yaitu mempunyai arti sifat atau produk yang dapat digunakan untuk mencari *E. coli* dan untuk membedakannya dengan *Enterobacter aerogenes*. Akronim IMViC adalah singkatan dari **Indol, Metil Red, Voges Proskauer dan Citrat**.

E. coli adalah grup koliform yang mempunyai sifat dapat memfermentasikan laktosa dan memproduksi asam dan gas pada suhu 37 °C maupun 44,5 + 0,5 °C dalam waktu 48 jam. Sifat *E. coli* berbentuk batang, bersifat gram positif dan tidak membentuk spora serta dapat memfermentasikan laktosa dengan memproduksi asam dan gas, mereduksi nitrat menjadi nitrit, bersifat laktose positif dan oksidasi negatif. *E. coli* banyak digunakan untuk teknologi rekayasa genetika, biasa digunakan untuk vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang diinginkan untuk dikembangkan. *E.coli* juga merupakan penghuni normal saluran cerna manusia dan hewan berdarah panas.

E. coli pada media yang mengandung asam amino triptofan akan memproduksi enzim triptofanase, sehingga membentuk **indol**. Sedangkan *Enterobacter aerogenes* pada media tersebut tidak dapat mengkatabolisme triptofan, sehingga tidak menghasilkan indol. *E. coli* membentuk banyak asam pada media yang mengandung glukosa. Metil Red merupakan indikator asam basa yang berubah menjadi merah dalam medium yang sedikit asam. Dengan demikian uji metil red akan positif membentuk warna merah jika media ditumbuhi *E. coli*.

Uji voges proskauer digunakan untuk mengetahui apakah dalam proses pertumbuhan organisme terbentuk asetoin (asetil metil karbinol). Asetil metil karbinol merupakan produk antara (intermediate product) dari proses metabolisme karbohidrat. Senyawa ini apabila

ditambahkan α -naftol akan berwarna merah. *Reaksi ini harus dilihat dalam waktu 4 jam setelah ditambah reagen.* Uji Citrat digunakan untuk menentukan apakah organism yang diuji dapat tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Sitrat dapat memasuki sel *Enterobacter aerogenes*, sedangkan pada *E. coli* tidak.

Alat :

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Ose bulat
4. Ose lancip
5. Lampu spiritus
6. Inkubator

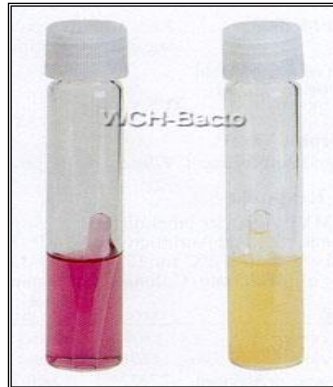
Bahan :

1. Media SIM
2. Media MR-VP
3. Media Simon Sitrat
4. Reagen Kovack
5. Reagen MR
6. Reagen VP

Cara kerja :

1. Dicairkan media EMB, kemudian tuang pada cawan petri. Biarkan memadat
2. Disiapkan media SIM (*posisi tegak*), Simon sitrat (*posisi miring*), MR-VP untuk pengujian terbentuknya asam dan MR-VP untuk pengujian adanya asetil metil karbinol (*posisi tegak*)
3. Diambil biakan pada media BGLBB yang positif coliform, tanam ke dalam media EMB dengan tehnik penanaman goresan.
4. Diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C . Amati adanya **koloni hijau kilat logam**.
5. Jika ada koloni hijau kilat logam, lanjutkan dengan menanam koloni tersebut ke media SIM dengan tehnik tusukan menggunakan ose lancip, pada media Simon sitrat dengan tehnik goresan pada permukaan menggunakan ose bulat dan tusukan menggunakan ose lancip, pada media MR-VP dengan menggunakan ose bulat.
6. Dibuat pula **kontrol positif** dan **negatif** untuk semua media.
7. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Diamati perubahan yang terjadi.
8. Pada media SIM ditambahkan reagent Kovack. Satu media Mr –VP ditambahkan reagent MR, satu media MR-VP lagi ditambahkan reagent α -naftol.

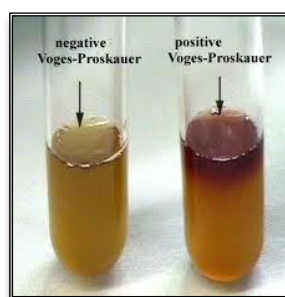
Hasil uji E.coli pada berbagai media



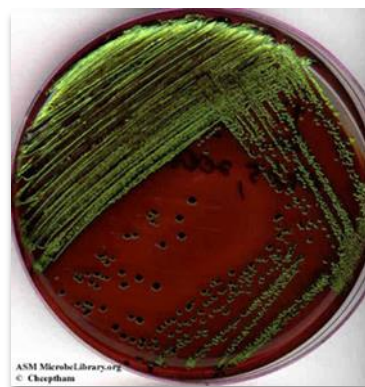
Hasil uji MCB



Hasil uji BGLBB



Hasil uji IMViC



Koloni *E. coli* pada media EMB

Bab 3. Analisa Kontaminasi *Salmonella* sp pada bahan pangan

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menganalisis adanya kontaminasi bakteri *Salmonella* sp pada bahan makanan

Salmonella adalah nama genus untuk sekelompok bakteri yang terdiri dari dua spesies yaitu *Salmonella bongori* dan *Salmonella enterik*. *Salmonella enterik* bertanggung jawab untuk sebagian besar infeksi *Salmonella* pada hewan berdarah panas, *Salmonella* sp. merupakan bakteri patogen gram negatif yang sering mencemari bahan pangan ataupun produk olahan pangan. Infeksi *Salmonella* pada bahan pangan seringkali menyebabkan *Food borne disease*.

Salmonella penyebab infeksi makanan terdiri dari beberapa spesies, al: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* dan *Salmonella typhi*. Infeksi oleh bakteri genus *Salmonella* (*Salmonellosis*) menyerang saluran gastrointestinal yang mencakup perut, usus halus, dan usus besar atau kolon.

Ciri-ciri fisik *Salmonella* adalah berbentuk batang yang tidak mempertahankan pewarna kristal violet pada saat pewarnaan gram karena dinding selnya tipis. *Salmonella* memiliki panjang antara 2 – 5 mikrometer dengan diameter 0,7-1,5 mikrometer dan memiliki flagela seperti ekor yang terbuat dari protein yang membantu dia bergerak.

Bakteri *Salmonella* dapat tumbuh pada suhu 5-47 derajat celcius, dan dapat bertahan hidup pada suhu 35-37° C. Pertumbuhan optimum terjadi pada suhu hangat, oleh karena itu, infeksi yang disebabkan bakteri *salmonella* lebih banyak terjadi pada musim panas atau musim kemarau.

Alat :

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Jarum ose
4. Mortir stemper
5. Pipet steril
6. Bunsen
7. Inkubator

Bahan :

1. Media BPW
2. Media SCB
3. Media SS
4. Media SIM
5. Media KIA
6. Media LIA
7. Sampel

Cara kerja :

1. Sampel padat di haluskan dengan menggunakan mortir stamper.
2. Timbang 5 gram sampel, masukkan ke dalam 45 ml media BPW sehingga diperoleh

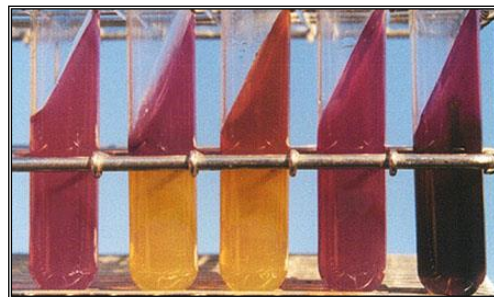
suspensi.

3. Pipet sebanyak 1.0 ml masukkan ke dalam media SCB 9,0 ml, inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
4. Setelah 24 jam, ambil suspensi dari media SCB sebanyak 0,1 tanam ke dalam media BSA dan 0,1 ml ke dalam media SS secara spread plate. Buat pula kontrol positif dan negatifnya.
5. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
6. Amati koloni yang tumbuh setelah diinkubasi.
7. Koloni yang mengindikasikan bakteri *Salmonella* diuji lanjut dengan uji deret (penanaman pada media **SIM, KIA, LIA**)
8. Amati koloni yang tumbuh pada media. Analisis menggunakan literatur pendukung.

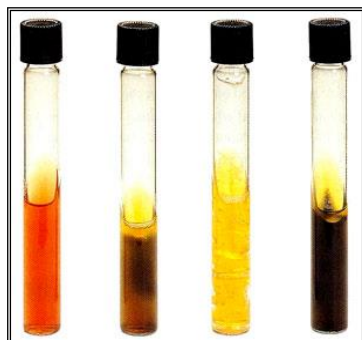
Hasil uji Salmonella spp pada berbagai media



Hasil Uji pada media TSIA



Hasil Uji pada media LIA



Hasil Uji pada media KIA



Hasil Uji pada media SIM

Bab 4. Analisa kontaminasi *Staphylococcus aureus* pada bahan pangan

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menganalisis adanya kontaminasi *Staphylococcus aureus* pada bahan makanan

Staphylococcus adalah organisme yang umumnya terdapat di berbagai bagian tubuh manusia, termasuk hidung, tenggorokan, dan kulit. *Staphylococcus* merupakan salah satu mikroba patogen yang menyebabkan peracunan makanan, yaitu penyakit yang ditimbulkan karena menelan toksin atau substansi beracun yang disekresi mikroba ke dalam makanan. Peracunan makanan dapat terjadi karena makanan secara langsung kontak dengan sumber infeksi, misalnya pengolahan makanan dengan menggunakan tangan. Makanan yang menunjang pertumbuhan *Staphylococcus* adalah kue-kue yang diisi saus terbuat dari telur dan susu, maupun makanan yang mengandung daging olahan.

Selama *Staphylococcus* tumbuh, toksin dilepaskan ke dalam makanan. Toksin ini diberi nama **enterotoksin**. Toksin ini bersifat tahan panas, karena bias bertahan pada suhu air mendidih selama 30 menit. Dibiarkannya makanan selama 8-10 jam, cukup untuk menghasilkan toksin dalam jumlah yang memadai untuk menyebabkan keracunan makanan. Walaupun makanan ini disimpan dalam lemari es berbulan-bulan, toksinnya tidak akan termusnahkan. Toksin yang termakan akan langsung menimbulkan gejala keracunan makanan, setelah 3 jam. Gejala yang ditimbulkan adalah mual, muntah, kejang perut dan diare

Cara pencegahan yang terbaik adalah menyimpan semua bahan makanan yang mudah busuk dalam lemari es (di bawah 6-7°C). Orang yang mengolah makanan tidak boleh mempunyai luka bernanah atau merupakan penular *Staphylococcus* toksigenik. Makanan yang sudah dipanasi kembali tidak boleh dibiarkan berjam-jam pada suhu kamar sebelum disajikan.

Alat:

1. Erlenmeyer
2. Cawan petri
3. Obyek glass
4. Pipet ukur 1 ml
5. Pipa bengkok drugalsky
6. Jarum ose
7. Inkubator

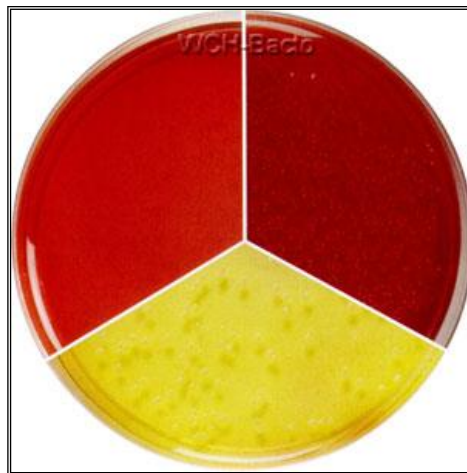
Bahan:

1. Media MSA
2. Kultur murni *Staphylococcus aureus*
3. Larutan H₂O₂ 10%
4. Sampel

Cara Kerja :

1. Siapkan media BPW dalam Erlenmeyer dan MSA dalam cawan petri.
2. Haluskan sampel yang akan diuji, kemudian timbang sebanyak 5 gram.
3. Masukkan dalam media BPW sebanyak 45 ml.
4. Ambil 0,1 ml suspensi sampel, tanam ke dalam media MSA secara *spread plate*.
5. Ratakan dengan pipet bengkok *drugalsky*.
6. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
7. Buat pula kontrol positif dan negatif pada media MSA.
8. Amati koloni yang tumbuh pada media MSA.
9. Lakukan uji katalase dengan menggunakan larutan H₂O₂ 5% pada objek glass sebanyak 1 ose kemudian diberi 1 ose koloni yang tumbuh pada media MSA
10. Lakukan pada kontrol positif dan negatif pada media MSA
11. Amati reaksi yang muncul lakukan analisis dengan literatur pendukung

Hasil uji Staphylococcus aureus pada media MSA



Hasil pada media MSA

Bab 5. Analisa kontaminasi *Vibrio cholerae* pada bahan pangan

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menganalisis bahan makanan yang terkontaminasi *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae termasuk bakteri pathogen yang dapat menyebabkan gastroenteritis akut, dengan gejala diare yang kadang disertai muntah dan kejang perut. Muntah dan diare biasanya sangat sering sehingga penderita banyak kehilangan cairan (sekitar 10-12 L per hari) dan elektrolit yang menyebabkan dehidrasi. Keadaan ini dapat menyebabkan kematian dalam beberapa jam, sampai beberapa hari dari permulaan penyakitnya.

Bakteri *Vibrio cholerae* terdapat dalam feses dan muntahan penderita sehingga bagi penularan. Mantan penderita dapat menjadi karier yang sangat berbahaya bagi penularan, karena di dalam fesesnya masih mengandung *Vibrio cholerae* sampai sekitar 7-14 hari.

Cara penularan penyakit dapat melalui makanan, minuman, dan sumber air yang telah terkontaminasi *Vibrio cholerae*. Penyakit yang ditimbulkan oleh *Vibrio cholerae* disebut Cholera asiatica. Masa inkubasi penyakit ini dari beberapa jam sampai 5 hari.

Alat:

1. Mortir stamper
2. Neraca digital
3. Kaca arloji
4. Erlenmeyer
5. Cawan petri
6. Pipet ukur 1 ml
7. Pipet ukur 5 ml
8. Pipa bengkok drugalsky

Bahan :

1. Media Pepton Water
2. Media Alkali Pepton
3. Media TCBS
4. Biakan murni *Vibrio cholerae*
5. Sampel

Cara Kerja :

1. Sampel dihaluskan dengan menggunakan mortir stamper.
2. Ditimbang sebanyak 5 gram, masukkan ke dalam media air pepton sebanyak 45,0 ml sehingga diperoleh suspensi sampel.
3. Dipipet sebanyak 5,0 ml, masukkan ke dalam media alkali pepton sebanyak 45,0 ml.
4. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Dipipet sebanyak 0,1 ml, tanam ke media TCBS secara spread plate.
6. DiBuat pula kontrol positif dan negatifnya.
7. DiInkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
8. Diamati koloni yang tumbuh pada media TCBS.
9. Dianalisis dengan literature pendukung.

Hasil uji Vibrio cholerae pada media TCBS



Vibrio cholerae pada media TCBS

*Bab 6. Uji Candida albicans pada sediaan kosmetik dan
Uji Bacillus cereus pada makanan dan obat tradisional*

Tujuan Pembelajaran Khusus

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi *Candida albicans* pada sediaan kosmetik.
2. Mahasiswa dapat mengidentifikasi *Bacillus cereus* dalam makanan dan obat tradisional

A. Prosedur Uji *Candida albicans* pada sediaan kosmetik

Alat

Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur 1 ml, ose bulat, obyekglass, mikroskop

Bahan

Minyak mineral steril, Tween 80 , Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbate 20 (FCDSLPL) atau Casein Peptone Lecitin Polisorbate Broth (CPLPB), Kultur murni *Candida albicans*, Media NB, Media SDA/ PDA, Pewarna Lactofenol cutton blue, Sampel kosmetik (lotion dan cream)

Cara Kerja :

1. Sediaan kosmetik yang akan diuji kandungan *Candida albicans*nya tidak boleh mengandung zat penghambat pertumbuhan mikroba (pengawet), karena zat ini akan mempengaruhi hasil pengujian.
2. Oleh karena itu sebelum diuji, sediaan kosmetik harus dihomogenisasi dengan FCDSLPL atau CPLPB sebagai salah satu cara menginaktivasi zat pengawet tersebut.
3. Sediaan kosmetik yang berbentuk krim atau yang mengandung minyak supaya dapat larut pada media, maka terlebih dahulu harus ditambahkan dengan minyak mineral steril sebanyak 1:1, selanjutnya ditambahkan dengan tween 80 sebanyak 1-2 ml setiap 10 gram sampel, baru dilarutkan ke dalam pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10.
4. Dari hasil homogenisasi dan penyiapan contoh, dipipet pengenceran 1:10 sebanyak 1 ml, masukkan ke dalam media TSB sebanyak 9 ml. Inkubasikan pada suhu 20-25°C selama 48 jam.
5. Setelah 48 jam, amati adanya pertumbuhan pada media tersebut, lakukan penanaman pada media SDA/PDA secara spread plate.
6. Inkubasikan pada suhu 20-25°C selama 48 jam.
7. Amati koloni yang tumbuh pada media tersebut, dengan ciri-ciri koloni putih krem,

licin, cembung, dan berbau seperti bau tape.

Untuk menegaskan apakah betul koloni yang tumbuh adalah *Candida albicans*, maka perlu dilakukan pengamatan secara mikroskopis.

1. Siapkan obyek glass, bersihkan obyek glass tersebut dengan alkohol supaya bebas lemak.
2. Letakkan 1 tetes lactofenol cottonblue pada obyek glass tersebut.
3. Ambil 1 ose koloni dari media PDA atau SDA, kemudian tutup dengan deck glass/ gelas penutup.
4. Amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10X40.
5. *Candida albicans* dapat membentuk pseudomiselium (sel yang panjang bersekat), blastospora (spora pada ujung sel) dan klamidospora (spora yang besar dan berdinding tebal).

B. Prosedur Uji *Bacillus cereus* dalam makanan dan obat tradisional

Alat:

Cawan petri, Tabung reaksi, Ose bulat, Ose lancip, Pipa bengkok drugalsky

Bahan:

Kultur murni *Bacillus cereus*, Media BPW, Media NB yang ditambahkan nitrat 0,5%, Media SIM, Media NA, Media MR-VP, Pereaksi alfa-naftilamin, Larutan asam sulfanilat, Larutan kalium hidroksida 40%, Sampel makanan atau obat tradisional

Cara Kerja:

1. Sampel makanan sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam media BPW sebanyak 45 ml.
2. Sedangkan sampel obat tradisional dihomogenisasi dengan FCDSLP atau CPLPB terlebih dahulu sebagai salah satu cara menginaktivasi zat pengawet, baru dipipet 5 ml dimasukkan ke dalam media BPW sebanyak 45 ml.
3. Media BPW diinkubasi selama 30 menit, kemudian ditanam ke media NA secara spread plate dan media NB yang telah ditambahkan Nitrat.
4. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
5. Lakukan pewarnaan bakteri pada koloni dari media NA, sedangkan pada media Nitrat Broth dilakukan uji reduksi nitrat.
6. Untuk uji reduksi nitrat, tambahkan pereaksi nitrat (2 tetes larutan asam sulfanilat dan 2 tetes larutan alfa-naftilamin)

7. Jika timbul warna jingga menunjukkan reduksi nitrat positif. *Bacillus cereus* dapat mereduksi nitrat.
8. **Uji Voges Proskauer.** Ambil 1 ose dari NA, inokulasikan pada media MR-VP.
9. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah itu tambahkan 0,6 ml larutan alfa-naftol dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida 40% ke dalam 1 ml biakan, diamkan selama 2-4 jam.
10. Warna merah muda hingga merah menyala menunjukkan reaksi positif *B. cereus* memberikan reaksi positif.
11. **Uji Motilitas.** Dengan menggunakan ose lancip ambil koloni dari media NA, tanam ke dalam media SIM secara tusukan sampai ke dasar media.
12. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Bila terdapat pertumbuhan yang menyebar di sekitar daerah tusukan, berarti motilitas positif. *B. cereus* adalah bakteri motil.

Bab 7. UJI KOEFISIEN FENOL

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menentukan koefisien fenol dari suatu desinfektan

Zat-zat antimikroba yang dipergunakan, baik untuk antiseptik maupun desinfektan harus diuji keefektifannya. Cara menentukan daya antimikroba zat-zat tersebut adalah dengan melakukan Uji Koefisien Fenol. Tes ini dilakukan untuk membandingkan aktivitas suatu produk desinfektan/ antiseptik dengan daya bunuh fenol dalam kondisi test yang sama.

Desinfektan yang akan diuji dibuat seri pengenceran tertentu, demikian pula dengan fenol. Masing-masing pengenceran fenol dan produk yang dicoba dikontakkan dengan biakan bakteri seperti : *Salmonella typhi* atau *Staphylococcus aureus*. Mikroba yang dikontakkan dihitung waktunya. Apabila dalam waktu 5 menit mikroba masih hidup tetapi pada waktu 10 menit mikroba sudah mati, maka pengenceran desinfektan maupun fenol tersebut dianggap efektif sebagai antimikroba.

Angka koefisien fenol didapatkan dari perhitungan perbandingan larutan desinfektan dan larutan fenol yang membunuh dalam waktu 10 menit dan tidak membunuh dalam waktu 5 menit. Semakin besar angka koefisien fenol suatu desinfektan berarti semakin efektif desinfektan tersebut. Desinfektan yang berada di pasaran sudah ditentukan konsentrasi pemakaiannya, hal ini menunjukkan bahwa desinfektan tersebut telah melalui proses pengujian sebelum dipasarkan.

ALAT:

Tabung reaksi, ose, pipet ukur, tangas es 0-5°C, termometer, pencatat waktu

BAHAN :

Media nutrient Broth, larutan pengencer aqua dest, bakteri uji *Salmonella sp*, larutan desinfektan, kristal fenol

CARA KERJA :

A. PEMBUATAN LARUTAN FENOL BAKU

1. Buat larutan fenol baku berkadar 5% dengan cara menimbang 5 gram kristal fenol, dan melarutkannya dalam 100 ml aquades steril
2. Buat pengenceran larutan baku fenol, besarnya pengenceran disesuaikan sedemikian rupa sehingga masuk dalam kisaran daya bunuh bakteri uji selama kontak 5 hingga 15 menit

3. Masing-masing hasil pengenceran diambil sebanyak 5 ml dan ditempatkan dalam tabung reaksi

B. PENGENCERAN LARUTAN DESINFEKTAN

1. Buat pengenceran larutan desinfektan sesuai lampiran
2. Untuk larutan desinfektan komersial, petunjuk pemakaian dijadikan standar dalam menentukan besarnya tingkat pengenceran larutan desinfektan tersebut.
3. Sebagai contoh: Jika dalam etiket pemakaian harus diencerkan 1:200, maka dapat dibuat tingkat pengenceran mulai 1:140, 1:180, 1:200, 1:220, 1:240
4. Dari masing-masing hasil pengenceran, diambil 5 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi.

C. INOKULASI BAKTERI UJI

1. Setiap tingkat pengenceran, baik larutan baku fenol maupun desinfektan, disiapkan masing-masing 3 buah tabung media NB
2. Semua tabung pengenceran maupun bakteri uji, selama uji dilakukan ditempatkan dalam waterbath suhu 20°C
3. Kocok suspensi bakteri uji dan setelah itu dengan menggunakan pipet steril inokulasikan sebanyak 0,5 ml ke dalam tabung-tabung pengenceran. Inokulasi dilakukan dengan mendekatkan ujung pipet ke permukaan medium
4. Tentukan masa kontak bakteri uji pada pengenceran larutan baku fenol serta desinfektan selama 5, 10 dan 15 menit
5. Lima menit setelah inokulasi, pengenceran baku fenol dan desinfektan dikocok, kemudian dengan menggunakan ose diinokulasikan ke dalam 1 tabung media NB (pengenceran 1)
6. Selang waktu tertentu (sesuai hasil penghitungan waktu) dari tabung pengenceran 2, diinokulasikan ke dalam tabung ke-2 demikian seterusnya hingga tabung terakhir.
7. Setelah semua tabung media NB diinokulasi dengan bakteri uji, media diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
8. Dibuat *kontrol positif (fertilitas medium)* serta *kontrol negatif (sterilitas medium)*
9. Diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada masing-masing media NB.
10. Apabila ada tabung yang diragukan, lakukan pengecekan dengan melakukan inokulasi pada medium NA, kemudian ke medium selektif untuk Salmonella.
11. Penentuan koefisien fenol didasarkan atas hasil bagi antara faktor pengenceran tertinggi dari desinfektan dengan faktor pengenceran tertinggi larutan baku fenol yang masing-masing dapat membunuh bakteri uji dalam jangka waktu kontak 10 menit tetapi tidak membunuh dalam jangka waktu kontak 5 menit.

TABEL PENGECERAN
LARUTAN BAKU FENOL DAN DESINFEKTAN (volume dalam ml)

(5%) ml	Aquades steril	Jumlah volume	Volume pengurangan	Volume akhir	pengenceran
5	0	5	0	5	1:20
5	5	10	5	5	1:40
2	4	6	1	5	1:60
2	6	8	3	5	1:80
1	4	5	0	5	1:100
1	5	6	1	5	1:120
1	6	7	2	5	1:140
1	7	8	3	5	1:160
1	8	9	4	5	1:180
1	9	10	5	5	1:200
1	10	11	6	5	1:220
1	11	12	7	5	1:240
1	12	13	8	5	1:260
1	13	14	9	5	1:280
1	14	15	10	5	1:300
1	15	16	11	5	1:320
1	16	17	12	5	1:340
1	17	18	13	5	1:360
1	18	19	14	5	1:380
1	19	20	15	5	1:400

Bab 8. UJI BIRU METIL

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat melakukan deteksi kuantitas bakteri pada susu dengan cara mengamati proses reduksi senyawa biru metil yang ditambahkan pada susu

Kandungan zat gizi dalam air susu merupakan substrat yang baik bagi banyak bakteri, baik bakteri patogen maupun bakteri non patogen. Air susu yang terdapat dalam kelenjar susu dapat dikatakan steril. Setelah keluar dari ambung susu baru terjadi kontaminasi. Kontaminan tersebut dapat berasal dari ambung, tubuh sapi, udara sekitar, alat-alat yang digunakan untuk pemerahan susu, dan orang-orang yang melakukan pemerahan.

Pengujian mikrobiologis air susu perlu dilakukan untuk mengetahui mutu susu sebelum diolah lebih lanjut ataupun dikonsumsi. Salah satu tehnik pengujian air susu adalah dengan menggunakan Uji Biru Metil. Uji ini memberikan gambaran perkiraan jumlah bakteri yang terdapat dalam air susu. Uji biru metilen dilakukan dengan cara menambahkan zat warna biru metil ke dalam air susu kemudian diinkubasi sambil diamati terjadinya perubahan warna dari biru menjadi putih. Larutan biru metil apabila teroksidasi akan berwarna biru, sedangkan bila tereduksi akan berubah menjadi putih.

Daya reduksi pada susu disebabkan oleh aktivitas enzim-enzim ekstraseluler bakteri dalam susu. Semakin tinggi jumlah bakteri dalam air susu, semakin banyak jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan maka warna biru pada biru metil akan semakin cepat berubah menjadi putih. Waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi biru metil dinamakan **waktu reduksi biru metil (Methylene Blue Reduction Time = MBRT)**. Waktu reduksi dianggap sudah selesai jika kira-kira 4/5 bagian dari susu telah berubah warna menjadi putih. Kelebihan metode reduksi biru metal adalah waktu uji relatif cepat dibandingkan dengan metode ALT.

Pada uji reduksi biru metil juga dapat diperkirakan jumlah koloninya, dengan dasar perhitungan waktu reduksinya. Berikut adalah Perkiraan hubungan jumlah koloni dengan waktu reduksi dalam Uji Biru Metilen.

Waktu reduksi biru metilen (jam)	Perkiraan jumlah koloni ($\times 10^4$ per ml)
0,5-3,5	80 atau lebih
4,0	40
4,5	25
5,0	15
5,5	10
6,0	6
6,5-8,0	2,5
8,0	1,0

Kelemahan metode reduksi biru metal adalah kurang praktis apabila diperlakukan pada susu yang mengandung bakteri sedikit, misal pada susu yang sudah dipasteurisasi. Di samping itu dengan metode ini memerlukan waktu pengamatan yang terus menerus minimal 6 jam. Metode ini juga tidak bias digunakan untuk menentukan jenis bakteri yang terdapat di dalam susu.

Berdasarkan mudarnya warna biru pada biru metilen, maka dapat ditentukan mutu/ klasifikasi air susu, yaitu:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1. Mutu I (sangat baik) | : memudar lebih dari 8 jam |
| 2. Mutu II (baik) | : memudar antara 6-8 jam |
| 3. Mutu III (cukup / sedang) | : memudar antara 2-6 jam |
| 4. Mutu IV (tidak baik) | : memudar kurang dari 2 jam |

ALAT :

1. Tabung reaksi
2. Inkubator
3. Pipet ukur
4. Stopwatch

BAHAN :

1. Susu segar
2. Susu pasteurisasi
3. Susu dalam kemasan
4. Susu basi

Cara Kerja:

1. Masukkan 1,0 ml larutan biru metilen ke dalam tabung reaksi steril.
2. Tambahkan sampel susu sebanyak 10,0 ml, masukkan ke dalam tabung reaksi tersebut.
3. Homogenkan dengan cara diputar-putar perlahan-lahan sebanyak 3 kali.
Jangan sekali-kali dikocok. Inkubasikan tabung reaksi tersebut pada suhu 37°C.
4. Setelah 5 menit balik-balikkan tabung reaksi untuk mencampurkan zat biru metilen dengan susu. Setelah itu tidak boleh lagi dibalik atau diaduk.
5. Amati perubahan warnanya tiap 30 menit.
6. Catat MBRTnya yaitu pada saat 4/5 bagian sudah berubah warnanya

Bab 9. PRODUK FERMENTASI (Keju)

Tujuan pembelajaran khusus

Mahasiswa dapat mempelajari cara membuat produk fermentasi yaitu Keju

Keju adalah makanan yang dihasilkan dengan memisahkan zat-zat padat dalam susu melalui proses pengentalan atau koagulasi dengan bantuan bakteri atau enzim tertentu yang disebut rennet. Hasil dari proses tersebut nantinya dikeringkan, diproses, dan diawetkan dengan berbagai macam cara. Produk-produk keju bervariasi ditentukan dari tipe susu, metode pengentalan, temperatur, metode pemotongan, pengeringan, pemanasan, juga proses pematangan keju dan pengawetan. Umumnya, hewan yang dijadikan sumber air susu adalah sapi, unta, kambing, domba, kuda, atau kerbau.

Proses dasar pembuatan keju adalah sebagai berikut:

1. Pasteurisasi susu: dilakukan pada susu 70°C, untuk membunuh seluruh bakteri patogen.
2. Pengasaman susu, tujuannya agar enzim rennet dapat bekerja optimal. Pengasaman dapat dilakukan dengan penambahan lemon jus, asam tartrat, cuka, atau bakteri asam laktat. Proses fermentasi akan mengubah laktosa (gula susu) menjadi asam laktat sehingga derajat keasaman (pH) susu menjadi rendah dan rennet efektif bekerja.
3. Penambahan enzim rennet. Rennet memiliki daya kerja yang kuat, dapat digunakan dalam konsentrasi yang kecil. Perbandingan antara rennet dan susu adalah 1:5.000. Kurang lebih 30 menit setelah penambahan rennet ke dalam susu yang asam, maka terbentuklah *curd*. Bila temperatur sistem dipertahankan 40 derajat celsius, akan terbentuk *curd* yang padat. Kemudian dilakukan pemisahan *curd* dari *whey*.
4. Pematangan keju (*ripening*). Untuk menghasilkan keju yang berkualitas, dilakukan proses pematangan dengan cara menyimpan keju ini selama periode tertentu. Dalam proses ini, mikroba mengubah komposisi *curd*, sehingga menghasilkan keju dengan rasa, aroma, dan tekstur yang spesifik. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan seperti temperatur dan kelembaban udara di ruang tempat pematangan. Dalam beberapa jenis keju, bakteri dapat mengeluarkan gelembung udara sehingga dihasilkan keju yang berlubang-lubang

ALAT :

Panci , pengaduk , termometer , wadah

BAHAN :

1 liter susu murni atau modifikasi, biang yoghurt (yoghurt dengan kandungan bakteri hidup/bakteri probiotik)

Cara kerja :

1. Disiapkan susu (bisa dimodifikasi macam-macam susu)
2. Dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit
3. Didinginkan suhu 37°C , ditambahkan kultur kerja 5% v/v atau dengan penambahan asam laktat (food grade)
4. Diinkubasi 37°C selama 6 jam
5. Ditambahkan rennet komersial 0,06 ml/L
6. Diinkubasi 37°C selama 2 jam
7. Setelah terbentuk curd dipotong, dipanaskan pada suhu 40°C selama 30 menit, disaring sehingga terpisah antara fresh cheese dan whey
8. Fresh cheese ditambahkan garam 2 %, dikemas dalam wadah
9. Pendiaman pada waktu tertentu (optional)



Produk olahan susu (keju)

Bab 10. Pengujian daya antibakteri

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat melakukan pengujian daya antibakteri terhadap suatu sampel

Antibakteri ialah obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri, penyebab infeksi pada manusia, harus bersifat toksisitas selektif, artinya suatu obat berbahaya bagi parasit tetapi tidak membahayakan inang.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, antibakteri terbagi menjadi 2, yaitu bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan bakterisidal (membunuh bakteri). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM), sedangkan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba disebut dengan kadar bunuh minimal (KBM).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri, diantaranya pH lingkungan, komponen perbenihan, stabilitas zat aktif, besarnya inokulum, masa pengeraman, dan aktivitas metabolik bakteri. Bakteri yang aktif dan tumbuh cepat, lebih peka terhadap daya kerja zat aktif daripada bakteri yang berada dalam keadaan istirahat.

Salah satu metode pengujian antibakteri yang bisa dilakukan adalah metode difusi yang dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas.

Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. **Metode lubang** yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. **Metode cakram kertas** yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri.

Penyiapan media

Media untuk uji antibakteri disesuaikan dengan jenis bakteri yang akan dianalisis. Sebagai contoh MSA untuk analisis adanya *Staphylococcus sp*, EMB untuk analisis adanya bakteri *E.coli* dan sebagainya. Media dibuat dalam volume tertentu selanjutnya disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Regenerasi Bakteri

Bakteri sebelum digunakan untuk uji aktivitas antibakteri, terlebih dahulu dilakukan regenerasi dengan membuat biakan agar miring, kemudian dari biakan tersebut diambil masing-masing satu ose bakteri stok, kemudian diinokulasi ke dalam tabung yang berisi 5 ml media NB cair steril, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (dikultur). Hasil kultur tersebut diambil sejumlah tertentu (μl) kemudian disuspensikan ke media cair steril, selanjutnya diinkubasi 3-4 jam dan disamakan kekeruhannya dengan standar Mc Farland I (10^8 CFU/ ml) dengan cara mensuspensikannya dalam larutan NaCl 0,9% steril hingga didapat kekeruhan yang sama dengan standar.

Pembuatan Larutan ½ Mc Farland

Komposisi larutan ½ Mc Farland:

BaCl ₂ . 2H ₂ O	0,048 M	0,5 ml
H ₂ SO ₄	0,18 M	99,5 ml

Larutan H₂SO₄ 0,18 M dipipet 99,5 ml dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, selanjutnya larutan BaCl₂. 2H₂O 0,048 M dipipet sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam labu takar yang sama, ditambahkan aquadest hingga tanda, digojok hingga homogen.

Skala McFarland

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

Panjang gelombang 600 nm

Penyiapan lempeng agar

Disiapkan cawan petri sebanyak jumlah replikasi yang diperlukan sesuai dengan desain pengujian yang digunakan.

- **Lapis dasar.** Ke dalam tiap cawan dituang media agar sebanyak 10 ml, kemudian dibiarkan memadat.
- **Lapis atas.** Dituang 10 ml media yang sudah disuspensikan **bakteri tertentu**. Diletakkan 6 *cylinder cup* dengan jarak yang sudah diatur, setelah memadat *cylinder cup* di ambil hingga terbentuk sumuran yang siap dituang sampel uji

Penyiapan larutan baku pembanding dan larutan uji

A. Larutan baku pembanding

Dibuat larutan baku pembanding dari suatu antibiotik atau sediaan obat yang ada dipasaran dengan konsentrasi tertentu. Larutan baku pembanding ini digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian daya anti bakteri.

B. Larutan uji

Dibuat sampel uji dengan konsentrasi tertentu dan volume tertentu untuk diuji pada media yang telah disiapkan

Pengujian sampel dengan metode cylinder cup

Sampel uji dengan berbagai konsentrasi dan kontrol positif disiapkan kemudian dituang ke dalam sumuran media. Kontrol negatif terhadap larutan pengencer juga disiapkan. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening di sekitar sumuran mengindikasikan bahwa terdapat aktivitas antibakteri yang disebabkan oleh senyawa yang diuji. Diukur dengan jangka sorong.

Bab 11. Analisa Kontaminasi *Pseudomonas sp* pada Bahan Pangan

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menganalisa kontaminasi *Pseudomonas sp* pada Bahan Pangan.

Bakteri *Pseudomonas sp* memiliki karakteristik seperti Gram negatif, berbentuk batang (rods) atau kokus (coccus), aerob obligat, motil mempunyai flagel polar. Bakteri ini oksidase positif, katalase positif, nonfermenter dan tumbuh dengan baik pada suhu 4 °C atau dibawah 43 °C. Bakteri genus ini memproduksi beberapa enzim seperti protease, amylase, dan lipase. Selain itu bakteri *Pseudomonas* juga dapat menguraikan protein, karbohidrat, dan senyawa organik lain menjadi CO₂, gas amoniak, dan senyawa-senyawa lain yang lebih sederhana (Suyono & Farid, 2011).

Bakteri *Pseudomonas sp* senang hidup di lingkungan yang bersuhu antara 15 – 30 °C (Kordi, 2014). Bakteri *Pseudomonas sp* mempunyai batas-batas pH tertentu untuk pertumbuhannya. Bakteri *Pseudomonas sp* pH 5,3 – 9,7 umumnya berkembang dengan baik pada pH antara 5,5 – 9 (Kordi, 2004). pH rendah merupakan keadaan yang optimal bagi berkembangbiaknya beberapa jenis bakteri pathogen seperti bakteri *Pseudomonas sp* dan perubahan pH yang menyolok dapat menyebabkan ikan menjadi stress.

Organisme pembusuk pada ikan diantaranya bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Escherichia coli* (Purwani dan Retnaningtyas, 2008). Menurut Jay (2005) bakteri pembusuk yang terdapat pada ikan diantaranya adalah *Pseudomonas* (32-60%) dan *Bacillus* (<18%).

Alat:

1. Mortir stamper
2. Neraca digital
3. Kaca arloji
4. Erlenmeyer
5. Cawan petri
6. Pipet ukur 1 ml
7. Pipet ukur 5 ml
8. Pipa bengkok drugalsky

Bahan :

1. Media Buffer Pepton Water
2. Media *Pseudomonas* Cetrimide Agar
3. Biakan murni *Pseudomonas sp*

Cara Kerja :

1. Sampel dihaluskan dengan menggunakan mortir stamper.
2. Ditimbang sebanyak 5 gram, masukkan ke dalam media *buffer pepton water* sebanyak 45,0 ml sehingga diperoleh suspensi sampel.
3. Dipipet sebanyak 5,0 ml, masukkan ke dalam media *Pseudomonas Cetrinide Agar* sebanyak 45,0 ml.
4. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Dipipet sebanyak 0,1 ml, tanam ke media *Pseudomonas Cetrinide Agar* secara *spread plate*.
6. Dibuat pula kontrol positif dan negatifnya.
7. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
8. Diamati koloni yang tumbuh pada media *Pseudomonas Cetrinide Agar*

Bab 12. Analisa Kontaminasi *Clostridium botulinum* pada Bahan Pangan

Tujuan Pembelajaran Khusus

Mahasiswa dapat menganalisa kontaminasi *Clostridium botulinum* pada Bahan Pangan.

Clostridium botulinum merupakan bakteri yang hidup di tanah, oleh karena itu mudah mengkontaminasi bahan makanan, baik yang berkadar karbohidrat tinggi maupun yang berkadar protein tinggi (MacDonald *et al*, 1985). *Clostridium botulinum* menghasilkan spora yang tahan panas dan neurotoksin. Bakteri ini mempunyai morfologi koloni beragam, bersifat gram positif berbentuk batang dengan spora di daerah subterminal. Karakter yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri ini ialah kemampuan hemolitik (positif), pembentukan lesitinase (positif), pembentukan lipase (positif), hidrolisis gelatin (positif), fermentasi glukosa (positif), fermentasi laktosa (negatif) (Hobbs *et al*, 1971; Levett, 1991).

Isolasi bakteri *Clostridium* dilakukan dengan menumbuhkannya pada media *Robertson's Cooked Meat Medium* (RCMM) pH 8,5 dengan penambahan antibiotik polimiksin sulfat 1%. Media terdiri atas protease pepton 1%, NaCl 0.5%, sukrosa 1%, ekstrak khamir 2%, seujung sudip CaCO_3 dan 10 gram daging. Sebelum digunakan, media selalu dipanaskan dahulu dalam air mendidih selama 10 menit untuk mengeluarkan oksigen dari media. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 3 hingga 4 hari. Isolat yang tumbuh dipindahkan ke media agar darah yang terdiri atas *blood agar base* 4% dan darah domba 5% yang telah mengalami defibrinasi (Hobbs *et al*, 1971). Koloni yang diduga positif sebagai *Clostridium botulinum* diuji beberapa karakter fisiologinya seperti pembentukan lesitinase dan lipase, fermentasi glukosa dan laktosa, pewarnaan Gram dan degradasi gelatin.

Daging olahan yang diawetkan dengan metode pengasapan terkontaminasi oleh bakteri *Clostridium botulinum*, dari bakteri *Clostridium botulinum* kemudian menghasilkan toksin *botulinum* yang dapat merusak produk makanan olahan sehingga mengakibatkan kematian lebih dari 50%. Oleh karena itu metode pengasapan ditinggalkan dan beralih menggunakan pengawet sintetis yaitu NaNO_2 yang ternyata juga menimbulkan permasalahan antara lain methemoglobinemia dan *blue baby syndrom*. Zat toksin *botulinum* adalah suatu zat toksin yang unik karena tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim getah pencernaan manusia sehingga sangat mematikan. Zat toksin ini akan terurai apabila dipanaskan pada 80 °C selama 30 menit atau dididihkan selama 10 menit (Pulungan, 2019)

Alat:

1. Mortir stamper
2. Neraca digital
3. Kaca arloji
4. Erlenmeyer
5. Cawan petri
6. Pipet ukur 1 ml
7. Pipa bengkok drugalsky

Bahan :

1. Media *Thyoglycolate*
2. Media Agar Darah
3. Biakan murni *Clostridium botulinum*

Cara Kerja :

1. Sampel dihaluskan dengan menggunakan mortir stamper.
2. Ditimbang sebanyak 5 gram, masukkan ke dalam media *buffer pepton water* sebanyak 45,0 ml sehingga diperoleh suspensi sampel.
3. Dipipet sebanyak 0,1 mL, masukkan ke dalam media Agar Darah sebanyak 20 mL.
4. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam.
5. Dibuat pula kontrol positif dan negatifnya.
6. Diamati koloni yang tumbuh pada media Agar Darah.

Daftar Pustaka

- Levett PN. 1991. *Anaerobic Microbiology. A Practical Approach*. Oxford: Oxford Univ.
- MacDonald KL, Spengler RF, Hatheway CL, Hargrett NT, Cohen ML. 1985. Type A botulism from sauteed onions. *JAMA* 253:1275-1278.
- Pulungan, Ainil Fitri. 2019. *Dampak Pengawet Nitrit pada Daging Olahan Sosis terhadap Kesehatan Manusia*. Sleman: CV. Budi Utama.