

**Penuntun Praktikum**

# **MIKROBIOLOGI**

*Penanggung Jawab Praktikum:*

*Dr.phil.nat. Periadnadi*

*Dr.phil.nat. Nurmiati*

*Dr. Anthoni Agustien, MS*

*Dr. Nasril Nasir*

*Dr. Fuji Astuti Febrina, MS*

*Dra. Feskaharny Alamsyah, Msi.*



**Laboratorium Mikrobiologi**

**Jurusan Biologi**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**UNIVERSITAS ANDALAS,**

**2015**

## **TATA TERTIB PRAKTIKUM**

Untuk menjaga keamanan Praktikan :

- Harus telah mengenakan jas lab saat memasuki laboratorium dan bekerja dengan peralatan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi dan terkena bahan kimia berbahaya.
- Jas Lab yang dipakai haruslah berlabel HIMABIO atau Polos, tidak dibenarkan memakai Jas Lab bermerek Jurusan atau Fakultas lain.
- Dilarang keras makan, merokok dan minum di Laboratorium
- Sebelum dan sesudah bekerja, meja praktikum dibersihkan dengan desinfektan.
- Dilarang membuang sisa bahan praktikum, biakan sisa atau habis pakai dan pewarna sisa di sembarang tempat. Bahan tersebut harus dibuang di tempat yang telah disediakan. Sisa bahan praktikum harus dibuang ke tempat Sampah Induk.
- Demi keamanan, sebelum meninggalkan Laboratorium disarankan untuk mencuci tangan dengan sabun antiseptik secara seksama.

## PENGENALAN ALAT

### 1. Autoklaf (*Autoclave*)

*Autoclave* adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam Mikrobiologi melalui penggunaan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi. atau sekitar 1 atm. dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi<sup>2</sup> (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121°C.

Cara Penggunaan :

1. Sebelum melakukan sterilisasi, periksa dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka harus ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
2. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol bertutup, maka tutup harus dikendorkan.
3. Tutup autoklaf dengan pas dan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
4. Nyalakan autoklaf, diatur *timer* dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C.
5. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15 menit dimulai sejak tekanan mencapai 1 atm.
6. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada penunjuk tekanan menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

### 2. Inkubator (*Incubator*)

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroba pada suhu yang terkontrol. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu untuk inkubator produksi Heraeus B5042 misalnya adalah 10-70°C.

### 3. Hot plate stirrer dan Stirrer bar

*Hot plate stirrer* dan *Stirrer bar (magnetic stirrer)* berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (*plate*) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Pengadukan dengan bantuan batang magnet *Hot plate* dan *magnetic stirrer* mampu menghomogenkan

sampai sangat lambat sampai 1600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425°C.

#### 4. *Colony counter*

Alat ini berguna untuk mempermudah perhitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan petri karena adanya kaca pembesar dan lampu. Selain itu alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni sangat banyak. Jumlah koloni pada Cawan Petri dapat ditandai dan dihitung otomatis yang dapat di-*reset*.

#### 5. Mikropipet (*Micropipete*) dan Tip

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 µl. Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1µl sampai 20 µl, atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (*fixed volume pipette*) misalnya mikropipet 5 µl. dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip.

##### Mikropipet Tip

Cara Penggunaan :

1. Sebelum digunakan *Thumb Knop* sebaiknya ditekan berkali-kali untuk memastikan lancarnya mikropipet.
2. Pasang Tip bersih ke ujung mikropipet.
3. Tekan *Thumb Knop* sampai hambatan pertama / *first stop*, jangan ditekan lebih ke dalam lagi.
4. Masukkan tip ke dalam cairan sedalam 3-4 mm.
5. Tahan pipet dalam posisi vertikal kemudian lepaskan tekanan dari *Thumb Knop* maka cairan akan masuk ke tip.
7. Pindahkan ujung tip ke tempat penampung yang diinginkan.
8. Tekan *Thumb Knop* sampai hambatan kedua / *second stop* atau tekan semaksimal mungkin maka semua cairan akan keluar dari ujung tip.
6. Jika ingin melepas tip putar *Thumb Knob* searah jarum jam dan ditekan maka tip akan terdorong keluar dengan sendirinya, atau menggunakan alat tambahan yang berfungsi mendorong tip keluar.

#### 6. Cawan Petri (*Petri Dish*)

Cawan Petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.

#### 7. Tabung reaksi (*Reaction Tube / Test Tube*)

Di dalam Mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-uji biokimiawi dan memelihara mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk

menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Kapas dapat dijadikan penutup mulut tabung yang berisi biakan. Untuk alasan efisiensi, media yang ditambahkan berkisar 10-12 ml tiap tabung.

#### **8. Labu Erlenmeyer (*Erlenmeyer Flask*)**

Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml, dsb.

#### **9. Gelas ukur (*Graduated Cylinder*)**

Berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu Erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan.

#### **10. Mortar dan *Pastle***

Mortar dan penumbuk (*pastle*) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.

#### **11. Beaker Glass**

*Beaker glass* merupakan alat yang memiliki banyak fungsi. Di dalam Mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media media, menampung akuades dll..

#### **12. Lampu spiritus /Pembakar Bunsen (*Bunsen Burner*)**

Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar Bunsen. Api yang menyala dapat membuat aliran udara karena oksigen dikonsumsi dari bawah dan diharapkan kontaminan ikut terbakar dalam pola aliran udara tersebut. Untuk sterilisasi jarum ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Perubahan Bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas atau metanol.

#### **13. Jarum ose/Inokulum**

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat chrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) dan disebut ose atau *inoculating loop/transfer loop*, dan yang berbentuk lurus disebut *inoculating needle/Transfer needle*. *Inoculating loop* cocok untuk melakukan *streak* di permukaan agar, sedangkan *inoculating needle* cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*

**14. Pinset**

Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotik.

**15. pH Indikator Universal**

Kertas pH ini berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.

**17. Pipet Filler/Bola Karet**

*Filler* adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan *filler* merupakan karet yang resisten bahan kimia. *Filler* memiliki 3 saluran yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (*aspirate*) berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (*suction*) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (*exhaust*) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.

## MEDIUM

Media pertumbuhan :

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Dengan media pertumbuhan dapat dilakukan isolat mikroorganisme menjadi kultur murni dan juga memanipulasi komposisi media pertumbuhannya.

Bahan-bahan media pertumbuhan

### 1. Bahan dasar

1. Air (H<sub>2</sub>O) sebagai pelarut
2. Agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk memadatkan media. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C. Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti Agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding Agar.
3. Silica gel, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematok media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.

### 2. Nutrisi atau zat makanan

Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P; unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan/*trace element*.

- Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikrobanya. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik.
- Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea dan Vitamin-vitamin.

### 3. Bahan tambahan

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya *phenol red* (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba non- target/kontaminan.

### 4. Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media

- Agar, agar dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya adalah sebagai pematok (*gelling*) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus dimasak dan dipanasi, pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.
- Pepton, *peptone* adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot,

liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.

- *Meat extract*. *Beef extract* mengandung basa organik terbuat dari otak, limpa, plasenta dan daging sapi.
- *Yeast extract*. *Yeast extract* terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alcohol. *Yeast extract* mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (B complex).
- Karbohidrat. Karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umumnya digunakan dalam amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol, dll. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5-1%.

## Macam-Macam Media Pertumbuhan

### 1. Medium berdasarkan sifat fisik

- **Medium padat** yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat..
- **Medium semi solid** (setengah padat) yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya bakteri yang tumbuh pada media NfB (*Nitrogen free Bromthymol Blue*) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media, jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. Semisolid juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media *Nitrate Broth*, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata diseluruh media.
- **Medium cair** yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (Nutrient Broth), LB (Lactose Broth).

### 2. Medium berdasarkan komposisi

- Medium sintesis yaitu media yang komposisi zat kimianya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya *Glucose Agar*, *Mac Conkey Agar*.
- Medium semi sintesis yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung agar, dekstrosa dan ekstrak kentang. Untuk bahan ekstrak kentang, kita tidak dapat mengetahui secara detail tentang komposisi senyawa penyusunnya.
- Medium non sintesis yaitu media yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya *Tomato Juice Agar*, *Brain Heart Infusion Agar*, *Pancreatic Extract*.

### 3. Medium berdasarkan tujuan

- Media untuk isolasi, media ini mengandung semua senyawa esensial untuk pertumbuhan mikroba, misalnya Nutrient Broth, Blood Agar.
- Media selektif/penghambat, media yang selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Contohnya Medium Agar Susu Skim (Skim Milk Agar).
- Media diperkaya (*enrichment*), media diperkaya adalah media yang mengandung komponen dasar untuk pertumbuhan mikroba dan ditambah komponen kompleks seperti darah, serum, kuning telur. Media diperkaya juga

bersifat selektif untuk mikroba tertentu. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media ini tidak hanya membutuhkan nutrisi sederhana untuk berkembang biak, tetapi membutuhkan komponen kompleks, misalnya *Blood Tellurite Agar*, *Bile Agar*, *Serum Agar*, dll.

- Untuk peremajaan kultur, media umum atau spesifik yang digunakan untuk peremajaan kultur.
- Media untuk menentukan kebutuhan nutrisi spesifik. Media ini digunakan untuk mendiagnosis atau menganalisis metabolisme suatu mikroba. Contohnya adalah *Koser's Citrate medium*, yang digunakan untuk menguji kemampuan menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon.
- Media untuk karakterisasi bakteri. Media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan spesifik suatu mikroba. Kadang-kadang indikator ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan kimia. Contohnya adalah *Nitrate Broth*, *Lactose Broth*, *Arginine Agar*.
- Media Diferensial. Media ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari campurannya berdasar karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial, misalnya TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) yang mampu memilih *Enterobacteria* berdasarkan bentuk, warna, ukuran koloni dan perubahan warna media di sekeliling koloni..

## PEMBUATAN MEDIA

### *Nutrient Agar (NA)*

- Timbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut:
  - Beef extract 3 g
  - Pepton 5 g
  - Agar 15 g
  - Akuades s.d 1000 ml
- Akuades sebanyak 100 ml dibagi menjadi dua satu bagian untuk melarutkan *Beef extract* dan *peptone* dan sebagian lagi untuk melarutkan agar. Sebaiknya air untuk melarutkan agar lebih banyak. Larutkan agar pada sebagian air tersebut dengan mengaduk secara konstan dan diberi panas. Dapat menggunakan kompor gas atau *hot plate stirrer* (jangan sampai *overheat*, karena akan terbentuk busa dan memuai sehingga tumpah).
- Sementara itu sebagian akuades digunakan untuk melarutkan *peptone* dan *beef extract*. Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen.
- Kemudian pH media diukur dengan mencelupkan kertas pH indikator. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH dan cukupkan volumenya menjadi 1.000 ml. Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf.
- Tuang media steril ke cawan petri steril secara aseptis. Jika diinginkan media tegak atau miring pada point ke 5, media langsung dituang ke tabung kemudian disterilisasi.

### *Nutrient Broth*

Komposisi untuk media NB sama dengan NA tetapi tidak memakai agar sebagai pematat. Proses pembuatannyapun lebih sederhana, tinggal melarutkan *peptone* dan *beef extract* kemudian ditampung dalam labu Erlenmeyer atau tabung reaksi dan siap disterilisasi. Proses pembuatan ini tidak memerlukan panas, *peptone* dan *beef extract* akan mudah larut sempurna pada air suhu kamar jika diaduk

### *Potato Dextrose Agar (PDA)*

- Timbang komponen media dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut:
  - Kentang 200 g
  - Dextrose (D-Glukosa) 10 g
  - Agar 15 g
  - Akuades sampai 1.000 ml
- sebelum ditimbang, sebaiknya kentang dikupas dan diiris kecil-kecil
- Rebus kentang dalam sebagian akuades sampai lunak, kemudian diambil ekstraknya dengan menyaring dan memerasnya menggunakan kain penyaring dan ditampung di *Beaker glass*.
- Agar dilarutkan dengan *Hot Plate Stirrer* dalam 200 ml akuades lalu setelah larut dapat ditambahkan dekstrosa dan dihomogenkan lagi melalui pemanasan. Setelah semua larut, ekstrak kentang dan agar-dekstrosa dicampur dan dihomogenkan.
- Atur pH media menjadi 5-6 dengan meneteskan HCl/NaOH dan cukupkan volumenya menjadi 1.000 ml. Media dituang ke dalam erlenmeyer atau ke tabung reaksi kemudian siap untuk disterilisasi.

## STERILISASI

Sterilisasi yaitu proses atau kegiatan membebaskan suatu bahan atau benda dari semua bentuk kehidupan.

### Macam-macam sterilisasi

Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi.

1. Sterilisasi secara mekanik (filtrasi) menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22 mikron atau 0.45 mikron) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.
2. Sterilisasi secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan & penyinaran.
  - a. Pemanasan. Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat pada api secara langsung, contoh alat: jarum inokulum, pinset, batang L, dll.
  - a. Panas kering: sterilisasi dengan oven kira-kira 60-180°C. Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca misalnya erlenmeyer, tabung reaksi dll.
  - b. Uap air panas: konsep ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi.
  - c. Uap air panas bertekanan: menggunakan autoklaf
3. Penyinaran dengan UV. Sinar Ultra Violet juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan interior Safety Cabinet dengan disinari lampu UV
4. Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan antara lain alkohol.

### Sterilisasi dengan autoklaf

Autoklaf adalah alat untuk memsterilkan berbagai macam alat & bahan yang menggunakan tekanan 15 psi (2 atm) dan suhu 121°C. Untuk cara kerja penggunaan autoklaf telah disampaikan di depan. Suhu dan tekanan tinggi yang diberikan kepada alat dan media yang disterilisasi memberikan kekuatan yang lebih besar untuk membunuh sel dibanding dengan udara panas. Biasanya untuk memsterilkan media digunakan suhu 121°C dan tekanan 15 lb/in<sup>2</sup> (SI = 103,4 Kpa) selama 15 menit. Alasan digunakan suhu 121°C atau 249,8°C adalah karena air mendidih pada suhu tersebut jika digunakan tekanan 15 psi. Untuk tekanan 0 psi pada ketinggian di permukaan laut (*sea level*) air mendidih pada suhu 100°C, sedangkan untuk autoklaf yang diletakkan di ketinggian sama, menggunakan tekanan 15 psi maka air akan mendidih pada suhu 121°C. Ingat kejadian ini hanya berlaku untuk sea level, jika di laboratorium terletak pada ketinggian tertentu, maka pengaturan tekanan perlu disetting ulang.

Misalnya autoklaf diletakkan pada ketinggian 2700 kaki dpl, maka tekanan dinaikkan menjadi 20 psi supaya tercapai suhu 121°C untuk mendidihkan air. Semua bentuk kehidupan akan mati jika dididihkan pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Pada saat sumber panas dinyalakan, air dalam autoklaf lama kelamaan akan mendidih dan uap air yang terbentuk mendesak udara yang mengisi autoklaf. Setelah semua udara dalam autoklaf diganti dengan uap air, katup uap/udara ditutup sehingga tekanan udara dalam autoklaf naik. Pada saat tercapai tekanan dan suhu yang sesuai, maka proses

sterilisasi dimulai dan *timer* mulai menghitung waktu mundur. Setelah proses sterilisasi selesai, sumber panas dimatikan dan tekanan dibiarkan turun perlahan hingga mencapai 0 psi. Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekanan mencapai 0 psi. Untuk mendeteksi bahwa autoklaf bekerja dengan sempurna dapat digunakan mikroba pengguji yang bersifat termofilik dan memiliki endospora yaitu *Bacillus stearothermophilus*, lazimnya mikroba ini tersedia secara komersial dalam bentuk *spore strip*. Kertas *spore strip* ini dimasukkan dalam autoklaf dan disterilkan. Setelah proses sterilisasi lalu ditumbuhkan pada media. Jika media tetap bening maka menunjukkan autoklaf telah bekerja dengan baik.

Beberapa media atau bahan yang tidak disterilkan dengan autoklaf adalah :

- Bahan tidak tahan panas seperti serum, vitamin, antibiotik, dan enzim
- Pelarut organik, seperti fenol
- Buffer dengan kandungan detergen, seperti SDS

Untuk mencegah terjadinya presipitasi, pencoklatan (media menjadi coklat) dan hancurnya substrat dapat dilakukan pencegahan sbb :

- Glukosa disterilkan terpisah dengan asam amino (*peptone*) atau senyawa fosfat
- Senyawa fosfat disterilkan terpisah dengan asam amino (*peptone*) atau senyawa garam mineral lain.
- Senyawa garam mineral disterilkan terpisah dengan agar
- Media yang memiliki pH > 7,5 jangan disterilkan dengan autoklaf
- Jangan mensterilisasi larutan agar dengan pH < 6,0

Erlenmeyer hanya boleh diisi media maksimum  $\frac{3}{4}$  dari total volumenya, sisa ruang dibiarkan kosong. Jika mensterilkan media 1L yang ditampung pada erlenmeyer 2L maka sterilisasi diatur dengan waktu 30 menit.

Sterilisasi dengan penyaringan (filtrasi)

Sterilisasi dengan penyaringan dilakukan untuk mensterilisasi cairan yang mudah rusak jika terkena panas atau mudah menguap (*volatile*). Cairan yang disterilisasi dilewatkan ke suatu saringan (ditekan dengan gaya sentrifugasi atau pompa vakum) yang berpori dengan diameter yang cukup kecil untuk menyaring bakteri. Virus tidak akan tersaring dengan metode ini. Sterilisasi dengan penyaringan dapat dilakukan dengan berbagai cara

Cara kerja menggunakan Non-disposable filtration apparatus

- Sterilkan saringan (dapat menggunakan saringan Bekerfeld, Chamberland Zeitz), membran penyaring (kertas saring) dan erlenmeyer penampung.
- Pasang atau rakit alat-alat tersebut secara aseptis (sesuai gambar), lalu isi corong dengan larutan yang akan disterilkan.
- Hubungkan katup erlenmeyer dengan pompa vakum kemudian hidupkan pompa.
- Setelah semua larutan melewati membran filter dan tertampung di erlenmeyer, maka larutan dapat dipindahkan ke dalam gelas penampung lain yang sudah steril dan tutup dengan kapas atau aluminium foil yang steril.

Tyndalisasi

Konsep kerja metode ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air dan tidak tahan tekanan atau suhu tinggi lebih tepat disterilkan dengan metode ini. Misalnya susu yang disterilkan dengan suhu tinggi akan mengalami koagulasi dan bahan yang berpati disterilkan pada suhu bertekanan pada kondisi pH asam akan terhidrolisis.

Cara kerja :

- Bahan dimasukkan kedalam erlenmeyer atau botol dan ditutup rapat dengan sumbat atau aluminium foil.
- Erlenmeyer/botol lalu dimasukkan kedalam alat sterilisasi (alat standar menggunakan *Arnold Steam Sterilizer* atau dandang).
- Nyalakan sumber panas dan tunggu hingga termometer menunjukkan suhu  $100^{\circ}\text{C}$  kemudian hitung waktu mundur hingga 30 menit (uap panas yang terbentuk akan mematikan mikroba).
- Setelah selesai alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan.
- Setelah 24 jam, bahan tersebut di sterilkan lagi dengan cara yang sama, sedang waktu ini dimaksudkan untuk memberi kesempatan spora atau sel vegetatif yang belum mati untuk tumbuh sehingga mudah dibunuh.

#### Sterilisasi dengan udara panas (*Dry heat sterilization*)

Sterilisasi dengan metode ini biasanya digunakan untuk peralatan gelas seperti cawan petri, pipet ukur dan labu erlenmeyer. Alat gelas yang disterilisasi dengan udara panas tidak akan timbul kondensasi sehingga tidak ada tetes air (embun) didalam alat gelas.

- Bungkus alat-alat gelas dengan kertas payung atau aluminium foil
- Atur pengatur suhu oven menjadi  $180^{\circ}\text{C}$  dan alat disterilkan selama 2-3 jam.

## ISOLASI MIKROORGANISME

### Pengertian

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari Campuran berbagai macam sel. Di dalam laboratorium populasi bakteri ini dapat diisolasi menjadi kultur murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat dan kemampuan biokimiawinya.

### Teknik Pengambilan Sampel

Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel. Berikut merupakan prosedur pengambilan sampel.

#### 1. Sampel tanah

Jika mikroorganisme yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah, maka cara pengambilannya disesuaikan dengan tujuan dan kebutuhan. Misal jika yang diinginkan mikroorganisma rhizosfer maka sampel diambil dari sekitar perakaran dekat permukaan hingga ujung perakaran..

#### 2. Sampel air

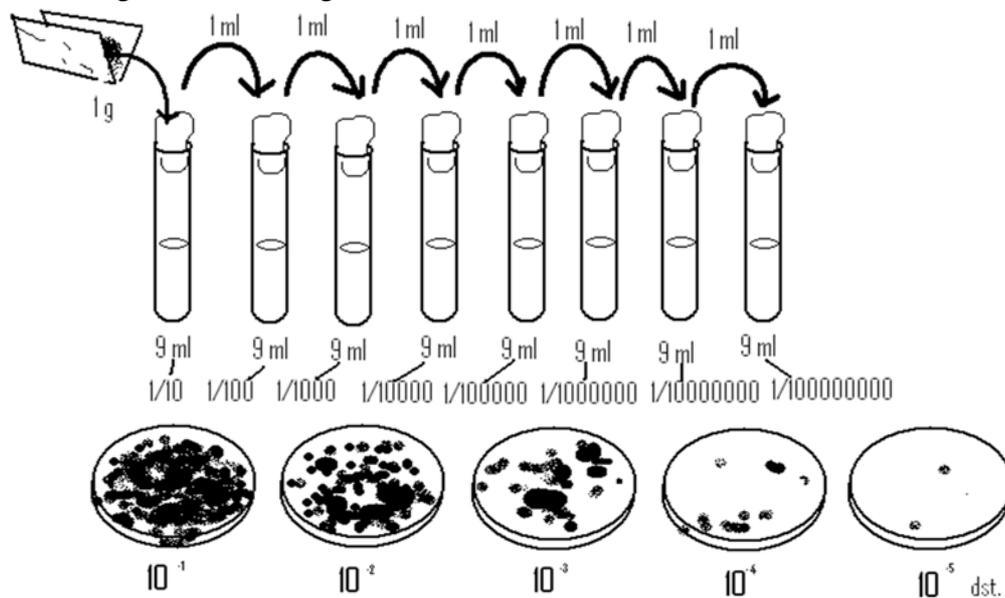
Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air. Bila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan dengan tali, jika ingin mengambil sampel dari air keran maka sebelumnya keran dialirkan dulu beberapa saat dan mulut kran dibakar.

### Isolasi Dengan Cara Pengenceran (*Dilution*)

1. Teknik Preparasi Suspensi. Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

- a. *Swab* (ulas), dilakukan menggunakan *cotton bud* steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan *cotton bud* memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari *cotton bud* kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika *cotton bud* dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal pepton water.
- b. *Rinse* (bilas) ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. *Rinse* merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam akuades dengan perbandingan 1 : 9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan akuades 45 ml yang terdapat dalam *beaker glass*.
- c. *Maseration* (pengancuran), sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antar alain bakso, biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi

## 2. Teknik Pengenceran Bertingkat



Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisma dari pengenceran sebelumnya.

Cara Kerja :

- a. Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10<sup>-1</sup>) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel

dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan ingat akuades yang digunakan jika memakai teknik rinse dan swab sudah termasuk pengencer  $10^{-1}$ . Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya (pengocokan yang benar dapat dilihat pada gambar disamping)

- b. Diambil 1 ml dari tabung  $10^{-1}$  dengan pipet ukur kemudian pindahkan ke tabung  $10^{-2}$  secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindehan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

### 3. Teknik Penanaman

#### a. Teknik penanaman dari suspensi

Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat.

Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir.

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

*Spread plate* adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut :

Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.

Batang L atau batang drugal diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.

Kemudian disebarkan dengan menggosokannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroorganisme dapat mati karena panas.

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

Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ( $>45^{\circ}\text{C}$ ) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar) sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya  $\text{O}_2$  dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ( $>45^{\circ}\text{C}$ )

Teteskan 1 ml secara aseptis. suspensi sel kedalam cawan kosong

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

Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk *spread plate* dan 1 ml untuk *pour plate* karena *spread plate* ditujukan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada *spread plate*.

b. Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

Bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.

Cara Kerja Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah :

- Tanah seberat 1 g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran  $10^{-1}$  secara aseptis dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai  $10^{-8}$
- Tiga pengenceran terakhir diambil 0,1 ml untuk ditanam secara spread plate pada medium NA, setelah selesai, diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1x24 jam
- Koloni akan tumbuh pada ketiga cawan tersebut kemudian dipilih koloni yang relatif terpisah dari koloni lain dan koloni yang mudah dikenali
- Koloni yang terpilih kemudian ditumbuhkan atau dimurnikan ke NA baru dengan teknik streak kuadran
- Inkubasi 1x24 jam.

Cara Kerja Isolasi Jamur dari Tanah :

- Tanah dalam cawan petri dipanaskan dengan oven pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dengan cawan petri untuk membunuh sel vegetatif tetap bertahan
- Tanah yang telah dioven diambil 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung pengenceran bertingkat
- Tiga pengenceran terakhir diambil untuk ditanam secara *spread plate* ke media PDA yang ditambah *streptomycin* atau *penicillin*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 5-7 hari
- Koloni jamur yang tumbuh dimurnikan dan ditanam pada medium PDA baru,
- Inkubasi pada suhu ruang 5-7 hari.

## MORFOLOGI MIKROBA

**Kompetensi :** mahasiswa dapat mengenali bentuk dan morfologi sel dan koloni mikroorganisme

### a. Bakteri

a.1 mengamati morfologi koloni bakteri a.1.1 pada media cawan

a.1.2 pada agar miring a.1.3 pada agar tegak

a.1.4 pada media cair

a.2 mengamati morfologi sel bakteri

a.2.1 dengan pewarnaan sederhana a.2.2 dengan pewarnaan negatif a.2.3 dengan pewarnaan gram

a.2.4 dengan pewarnaan endospora

a.3 mengamati motilitas bakteri a.3.1 pengamatan langsung

a.3.2 pengamatan tidak langsung

### b. Yeast

b.1 mengamati morfologi koloni yeast (pada agar cawan)

b.2 mengamati morfologi sel yeast (dengan pewarnaan sederhana)

### c. Kapang

c.1 mengamati morfologi koloni kapang (pada agar cawan)

c.2 mengamati morfologi sel kapang (dengan metode *slide culture*)

## Bakteri

### A. Mengamati Morfologi Koloni Bakteri

Kegiatan ini merupakan tindakan pertama kali jika ingin mempelajari suatu jenis bakteri lebih lanjut, khususnya untuk tujuan identifikasi. Setelah mendapatkan kultur murni maka biakan yang diinginkan ditumbuhkan ke berbagai bentuk media untuk dikenali ciri koloninya.

Ciri-ciri yang perlu diperhatikan adalah sebagai berikut :

Ukuran; *pinpoint/punctiform* (titik)

*Small* (kecil) *Moderate* (sedang) *Large* (besar)

➤ Pigmentasi : mikroorganisme kromogenik sering memproduksi pigmen intraseluler, beberapa jenis lain memproduksi pigmen ekstraseluler yang dapat terlarut dalam media

➤ Karakteristik optik : diamati berdasarkan jumlah cahaya yang melewati koloni.

➤ *Opaque* (tidak dapat ditembus cahaya), *Translucent* (dapat ditembus cahaya sebagian), *Transparent* (bening)

### A. Mengamati Morfologi Bakteri

Sel bakteri dapat teramati dengan jelas jika digunakan mikroskop dengan perbesaran 100x10 yang ditambah minyak imersi. Jika dibuat preparat ulas tanpa pewarnaan, sel bakteri sulit terlihat. Pewarnaan bertujuan untuk memperjelas sel bakteri dengan menempelkan zat warna ke permukaan sel bakteri. Zat warna dapat mengabsorpsi dan membiaskan cahaya, sehingga kontras sel bakteri dengan sekelilingnya ditingkatkan.

Zat warna yang digunakan bersifat asam atau basa. Pada zat warna basa, bagian yang berperan dalam memberikan warna disebut kromofor dan mempunyai muatan positif. Sebaliknya pada zat warna asam bagian yang berperan memberikan zat warna memiliki

muatan negatif. Zat warna basa lebih banyak digunakan karena muatan negatif banyak banyak ditemukan pada permukaan sel. Contoh zat warna asam antara lain *Crystal Violet*, *Methylene Blue*, *Safranin*, *Base Fuchsin*, *Malachite Green* dll. Sedangkan zat warna basa antara lain *Eosin*, *Congo Red* dll.

#### Pewarnaan

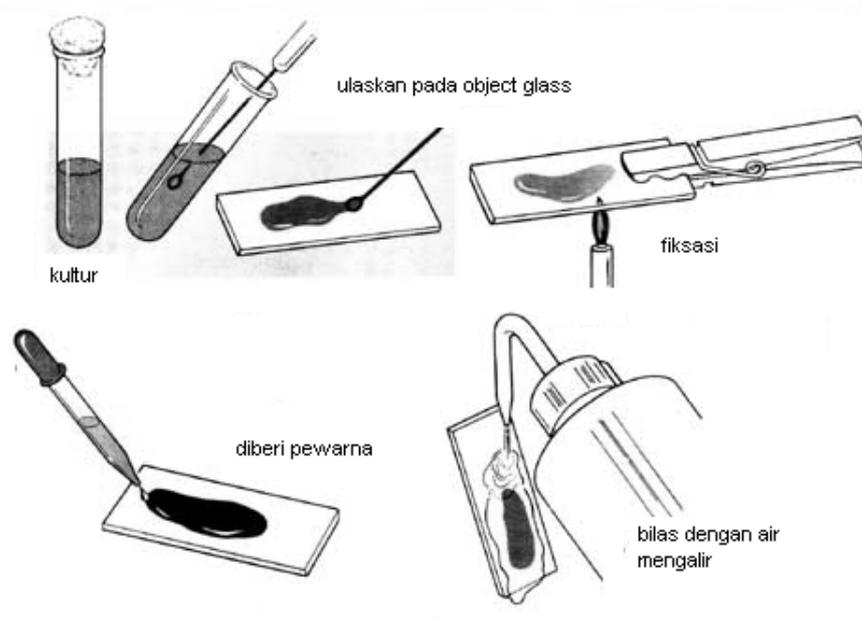
- Pewarnaan sederhana
  - pewarnaan positif
  - pewarnaan negatif
- Pewarnaan diferensial
  - pewarnaan gram
  - pewarnaan acid fast dll.
- Pewarnaan khusus
  - pewarnaan endospora
  - pewarnaan flagella dll.

#### B.1. Pewarnaan Sederhana (Pewarnaan Positif)

Sebelum dilakukan pewarnaan dibuat ulasan bakteri di atas *object glass* yang kemudian difiksasi. Jangan menggunakan suspensi bakteri yang terlalu padat, tapi jika suspensi bakteri terlalu encer, maka akan diperoleh kesulitan saat mencari bakteri dengan mikroskop. Fiksasi bertujuan untuk mematikan bakteri dan melekatkan sel bakteri pada *object glass* tanpa merusak struktur selnya.

#### Cara Kerja :

- Bersihkan *object glass* dengan kapas
- Jika perlu tuliskan kode atau nama bakteri pada sudut *object glass*
- Bila menggunakan biakan cair maka pindahkan setetes biakan dengan pipet tetes atau dapat juga dipindahkan dengan jarum inokulum. Jangan lupa biakan dikocok terlebih dahulu. Jika digunakan biakan padat, maka biakan dipindahkan dengan jarum inokulum, satu ulasan saja kemudian diberi akuades dan disebarkan supaya sel merata.
- Keringkan ulasan tersebut sambil memfiksasinya dengan api bunsen (lewatkan di atas api 2-3 kali)
- Setelah benar-benar kering dan tersebar selanjutnya ditetesi dengan pewarna (dapat digunakan *Methylen blue*, *Safranin*, *Crystal Violet*) dan tunggu kurang lebih 30 detik.
- Cuci dengan akuades kemudian keringkan dengan kertas *tissue*
- Periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10).

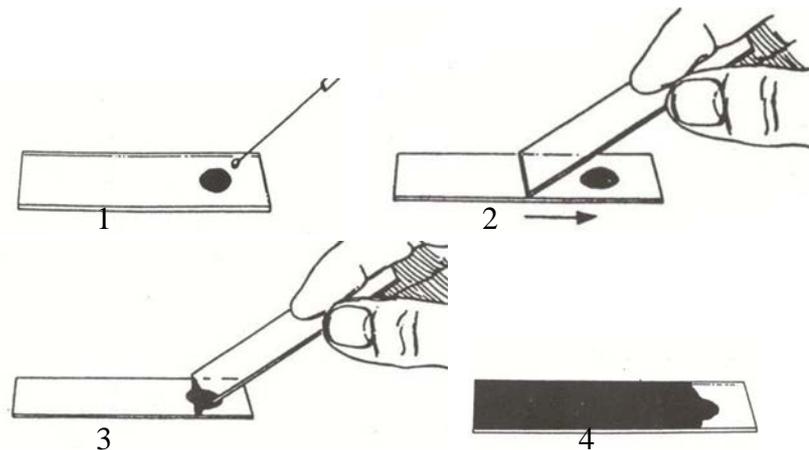


## B.2 Pewarnaan Negatif

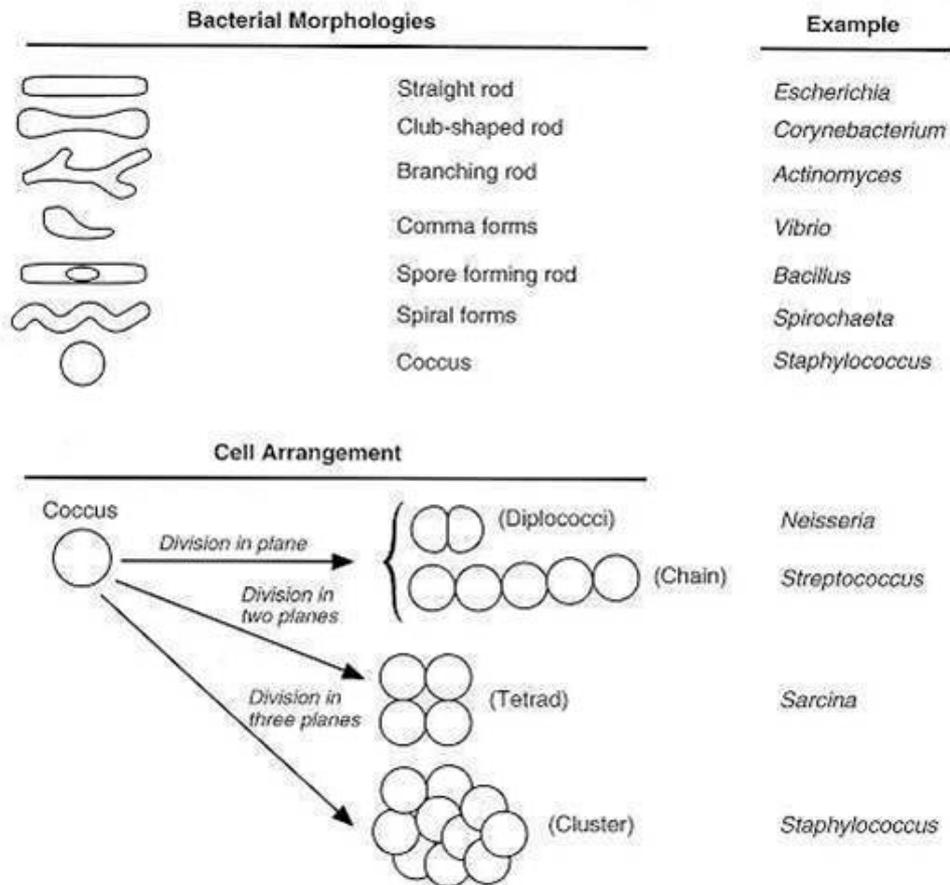
Beberapa bakteri sulit diwarnai dengan zat warna basa. Tapi mudah dilihat dengan pewarnaan negatif. Zat warna tidak akan mewarnai sel melainkan mewarnai lingkungan sekitarnya, sehingga sel tampak transparan dengan latar belakang hitam.

Prosedur:

- Ambil dua object glass, teteskan nigrosin atau tinta cina di ujung kanan salah satu object glass
- Biakan diambil lalu diulaskan atau diteteskan dalam tetesan nigrosin tadi, lalu dicampurkan
- Tempelkan sisi object glass yang lain kemudian gesekkan ke samping kiri
- Biarkan preparat mengering di udara, jangan difiksasi atau dipanaskan di atas api.



Setelah dilihat di mikroskop, maka akan tampak bentuk sel bakteri. Berikut merupakan berbagai bentuk sel bakteri



### A.3. Pewarnaan Gram

Adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi. Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis. Sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel. Berikut merupakan prosedur pewarnaan Gram:

Cara Kerja :	Dampak/Hasil
1. Teteskan sampel pada kaca objek dan fiksasi dengan bunsen	Sel bakteri tertempel pada permukaan kaca (object glass)
2. Teteskan kristal violet sebagai pewarna utama pada kedua preparat, usahakan semua ulasan terwarnai dan tunggu selama $\pm 1$ menit	Kristal ungu (CV) akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri gram positif dan gram negatif

3.Cuci dengan air mengalir	
4.Teteskan lugol,s iodine, tunggu ± 1 menit	Adanya <i>lugol's iodine</i> menyebabkan adanya ikatan CV dengan <i>iodine</i> yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada gram positif dapat terbentuk CV iodin- ribonukleat pada dinding sel
5.Cuci dengan air mengalir	
6.Beri larutan pemucat (ethanol 96%/aseton) setetes demi setetes hingga ethanol yang jatuh berwarna jernih. Jangan sampai terlalu banyak ( <i>overdecolorize</i> )	Penetesan etanol absolut menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks <i>CV-iodine</i> akan lepas dari permukaan sel gram negatif, sedangkan pada gram positif <i>CV-iodine</i> tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening
7.Cuci dengan air mengalir	
8.Teteskan <i>counterstain</i> (safranin) dan tunggu selama ± 45 detik	Safranin akan mewarnai sel gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan gram positif tidak terpengaruh. <i>Counterstain</i> hanya berfungsi sebagai pengontras saja
9.Cuci dengan air mengalir	
10.Keringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu biarkan mengering di udara.	

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pewarnaan gram adalah sbb:

- Fase yang paling kritis dari prosedur di atas adalah tahap dekolorisasi yang mengakibatkan *CV-iodine* lepas dari sel. Pemberian ethanol jangan sampai berlebih yang akan menyebabkan *overdecolorization* sehingga sel gram positif tampak seperti gram negatif. Namun juga jangan sampai terlalu sedikit dalam penetesan etanol (*underdecolorization*) yang tidak akan melarutkan *CV-iodine* secara sempurna sehingga sel gram negatif seperti gram positif.
- Preparasi pewarnaan gram terbaik adalah menggunakan kultur muda yang tidak lebih lama dari 24 jam. Umur kultur akan berpengaruh pada kemampuan sel menyerap warna utama (CV), khususnya pada gram positif. Mungkin akan menampilkan gram variabel yaitu satu jenis sel, sebagian berwarna ungu dan sebagian merah karena pengaruh umur. Walaupun ada beberapa species yang memang bersifat gram variabel seperti pada genus *Acinetobacter* dan *Arthrobacter*.
- Setelah didapatkan koloni tunggal, pengamatan ciri-ciri morfologi koloni hampir sama dengan ciri morfologi bakteri.

## B. Mengamati Morfologi Sel *Yeast*

*Yeast* merupakan fungi mikroskopik uniseluler, tidak membentuk hifa (beberapa spesies dapat membentuk pseudohifa). Bentuk selnya bervariasi dapat berbentuk bulat, bulat telur, bulat memanjang dengan ukuran 1-9x20  $\mu\text{m}$ . Beberapa spesies yeast memiliki sifat dimorfisme yaitu bentuk sel tunggal dan bentuk hifa atau pseudohifa. Pseudohifa adalah hifa yeast yang terbentuk dari rangkaian sel hasil pembelahan aseksual secara budding, tetapi tidak melepaskan diri dari induk. Morfologi internal sel mudah dilihat dan terdiri dari inti dan organel seperti mitokondria, grannula lemak dan glikogen.

### B.1 Melihat bentuk sel *Yeast*

Cara Kerja :

- Tumbuhkan *Sacharomyces cereviceae* pada glukosa cair selama 24 jam.
- Ulaskan suspensi biakan pada object glass lalu teteskan *Methilene Blue* hingga rata (jangan difiksasi).
- Tutup preparat dengan *cover glass*.
- Amati dengan perbesaran 40x10 atau 100x10.

### B.2 Melihat bentuk spora sel *Yeast*

Cara kerja :

- Buat preparat ulas dari biakan yeast pada Goodkova Agar yang berumur 10 hari.
- Fiksasi dengan api bunsen.
- Warnai dengan cara Shager dan Fulgen yaitu:

Tetesi preparat dengan *Malachite Green* dan biarkan 30-60 detik. Panasi preparat dengan api bunsen selama  $\pm 30$  detik (sampai timbul uap). Cuci preparat dengan air mengalir. Keringkan dengan tissue kemudian biarkan pada udara terbuka. Amati di bawah mikroskop. Perhatikan spora yang berwarna

## Kapang Jamur

Jamur merupakan mikroba dengan struktur talus berupa benang-benang (*hifa*) yang terjalin seperti jala (*mycelium*). Hifa dapat bersekat (*septat*) dengan inti tunggal/ lebih dan hifa tidak bersekat (*aseptat*). Penampakan morfologi koloni pada umumnya seperti benang (*filamentous*) yang pertumbuhannya membentuk lingkaran. Morfologi koloninya dapat dengan mudah dibedakan dengan bakteri walaupun ada beberapa jenis bakteri yang koloninya mirip jamur, seperti dari kelompok Actinomycetes atau *Bacillus mycoides*. Koloni kapang memiliki keragaman warna yang muncul dari sporanya.

## A. Mengamati morfologi koloni kapang

Cara kerja :

- Tanam/pindahkan biakan kapang dengan jarum inokulum *needle* yang diletakan di tengah-tengah cawan petri.
- Inkubasi selam beberapa hari.
- Amati pertumbuhan koloni (miselium) yang menyebar.
- Inkubasi pada suhu kamar selama 3x24 jam.
- Ambil preparat dan diamati di bawah mikroskop.

### B.3 Prosedur yang lebih sederhana, cara kerja :

- Sterilkan cawan petri yang berisi kapas yang di atasnya terdapat *object glass* dan *cover glass*.

- Siapkan media PDA dan dijaga supaya tetap cair.
- Teteskan media PDA pada *object glass* secara aseptis lalu tunggu memadat (teteskan jangan terlalu banyak).
- Belah media yang memadat dengan jarum inokulum yang berujung L.
- Ulaskan spora jamur yang akan diamati pada belahan tersebut.
- Tutup dengan *cover glass* tepat di atas media dan tekan hingga merata.
- Inkubasi selama 2x24 jam.
- Amati pertumbuhan miselium dan spora pada *object glass* dengan perbesaran sedang

Penghitungan jumlah bakteri secara keseluruhan (langsung)

Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Petroff-Hauser Chamber* atau *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu.

Ruang hitung terdiri dari 1 kotak besar dengan luas 1 mm<sup>2</sup>. Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel bakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.

Cara kerja (digunakan kotak sedang) :

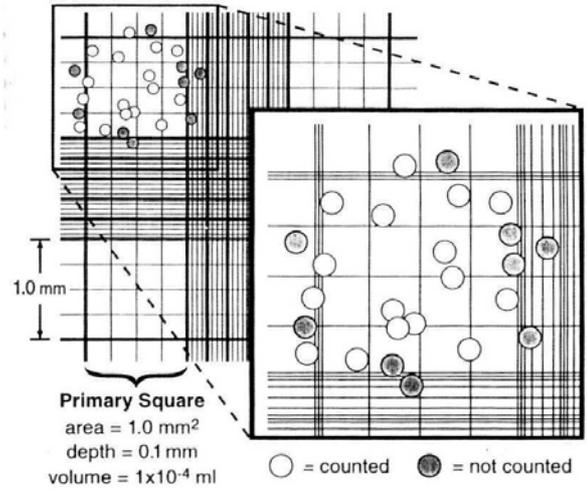
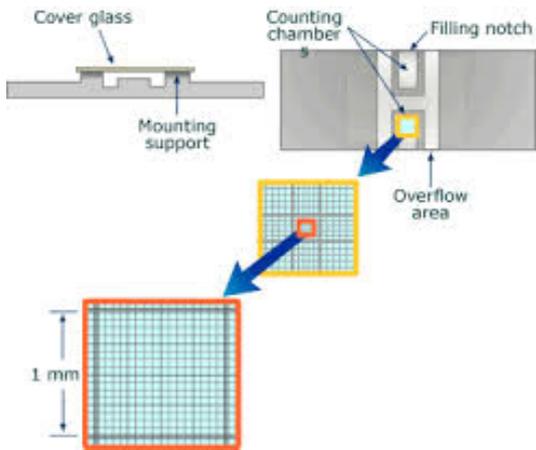
- Bersihkan *Petroff-Hauser Counting Chamber* atau *Haemocytometer* dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan *tissue*.
- Letakkan *cover glass* di atas alat hitung.
- Tambahkan ± 50 µl suspensi sel *yeast* (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
- Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
- Letakkan alat hitung pada meja objek kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
- Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10
- Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

Rumus:

$$X = y/5 \times 25 \times 10 \times 10^3$$

X = Jumlah sel/ml

Y = Jumlah penghitungan pada 5 kotak sedang



## ANTIMIKROBA DAN OLIGODINAMIK

### Pengertian dan Jenis Disinfektan

Zat antimikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Zat antimikroba dapat bersifat membunuh mikroorganisme (*microbicidal*) atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (*microbiostatic*). Disinfektan yaitu suatu senyawa kimia yang dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan benda mati seperti meja, lantai dan pisau bedah. Adapun antiseptik adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme pada jaringan tubuh, misalnya kulit. Efisiensi dan efektivitas disinfektan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

- Konsentrasi
- Waktu terpapar
- Jenis mikroba
- Kondisi lingkungan: temperatur, pH dan jenis tempat mikroba hidup

Beberapa jenis disinfektan diantaranya adalah:

Jenis	Keterangan
Senyawa fenol : Fenol Cresol Hexachlorophene Resorcinol Thymol	Merusak membran sel Mendenaturasi protein Konsentrasi kerja : 2-5%
Alkohol : Ethyl Isopropil	Pelarut lemak Denaturasi dan koagulasi protein Konsentrasi kerja : 50-75%
Senyawa halogen : Senyawa chlorin : Sodium hypochlorite Chloramine Senyawa iodine : Povidone-iodine (betadine)	Agen oksidasi Presipitasi protein Klorin bereaksi dengan air membentuk asam hipoklorit yang bersifat bakterisidal
Logam berat : Senyawa Hg Senyawa Zn Senyawa Cu dll.	Bereaksi dengan gugus SH (sulfhidril) pada enzim yang menyebabkan denaturasi.
Agen aktif permukaan : Sabun Detergen emulsifier	Menciptakan tegangan permukaan yang rendah Merusak membran sel Memindahkan sel secara mekanis
Senyawa kationik : Senyawa amonium kuarterner <i>benzalconiumchloride</i>	Tegangan permukaan yang rendah
Senyawa anionik : Sodium Tertracycl Sulphate	Daya kerja sama dengan senyawa aktif permukaan
Asam ( $H^+$ ) Basa ( $OH^-$ )	Merusak dinding sel dan membran sel Koagulasi protein
Pewarna : Crystal Violet	Memiliki avinitas terhadap asam nukleat

## PENGUJIAN ZAT DISINFEKTAN

Cara kerja :

1. Inokulasikan *E. coli* dan *Bacillus* sp. Pada NA cawan sengan *streak* kontinyu.
2. Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam larutan disinfektan (alkohol 70%, *Lysol* 5%, betadin, dan hipoklorit 5%). Setelah diangkat, sisa tetes larutan yang berlebihan pada kertas cakram diulaskan pada dinding wadah karena dikhawatirkan larutan akan meluas di permukaan agar jika larutan terlalu banyak.
3. Kertas cakram diletakkan dipermukaan agar dengan pinset. Tekan dengan pinset supaya kertas cakram benar-benar menempel pada agar.
4. Inkubasi selama 48 jam pada 37<sup>0</sup>C.
5. Zona hambat yang terbentuk diukur diameternya, bandingkan daya kerja berbagai disinfektan.

Pengujian pengaruh daya oligodinamik

Logam-logam berat seperti Hg, Cu, Ag dan Pb bersifat racun terhadap sel meskipun hanya dalam kadar rendah. Logam mengalami ionisasi dan ion-ion tersebut bereaksi dengan bagian sulfhidril pada protein sel sehingga menyebabkan denaturasi. Daya hambat atau mematikan dari logam dengan konsentrasi yang rendah disebut daya oligodinamik.

Cara Kerja :

- Inokulasikan *E.coli* dan *Bacillus* sp. pada cawan NA dengan streak kontinyu
- Letakan koin tembaga dan seng ke dalam cawan dengan pinset
- Inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 48 jam
- Hitung zona hambat yang terbentuk dengan mengukur diameter daerah yang jernih atau tidak ada pertumbuhan

Pengertian dan Jenis Antibiotik

Antibiotik adalah bahan yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau sintetis yang dalam jumlah kecil mampu menekan menghambat atau membunuh mikroorganisme lainnya. Antibiotik memiliki spektrum aktivitas antibiosis yang beragam.

Antibiotik dikelompokkan berdasarkan gugus aktifnya, misal antibiotik *macrolide*, antimikroba peptida. Adapun penamaannya biasanya berdasarkan gugus kimiawinya ataupun mikroorganisma produsernya, misalnya:

**ragam antibakteria:**

- Penicillin dan cephalosporin
- Erythromycine
- Sulfa drugs
- Trimethoprim dan sulfamethoxazole
- Polymyxin B
- Quinolone
- Tetracycline

- Antifungi :
  - Nystatin
  - Azoles

Prosedur difusi-kertas cakram-agar yang distandardisasikan (metode Kirby- Bauer) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibiotik untuk bakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik.

Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer :

- Konsentrasi mikroba uji
- Konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram
- Jenis antibiotik.
- pH medium.

Cara kerja pengujian antibiotik dengan metode Kirby-Bauer :

Celupkan *cotton bud (cotton swab)* dalam biakan bakteri kemudian tekan kapas ke sisi tabung agar air tiris

Ulaskan pada seluruh permukaan cawan Mueller-Hinton Agar secara merata

Biarkan cawan selama 5 menit

Kertas cakram dicelupkan dalam larutan antibiotik dengan konsentrasi tertentu.

Angkat, biarkan sejenak agar tiris, selanjutnya letakkan kertas cakram pada permukaan agar.

Kertas cakram ditekan menggunakan pinset supaya menempel sempurna di permukaan agar.

Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam.

Ukur diameter zona hambat (mm) kemudian bandingkan dengan tabel sensitivitas antibiotik.

Cara menginterpretasikan :

Ukur diameter zona hambat (zona jernih)

Misal didapatkan zona hambat suatu bakteri berdiameter 26 mm untuk

*Erythromycin*.

Maka interpretasinya adalah bakteri tersebut peka terhadap antibiotik *Erythromycin*.

*Resistent* : tahan *Intermediate* : medium *Susceptible* : peka

## AKTIVITAS ENZIMATIS MIKROORGANISME

**Kompetensi :** mahasiswa mengetahui beberapa teknik uji aktivitas enzimatik. Aktivitas enzimatis mikroorganisme :

a. Uji aktivitas eksoenzim :

- Uji amilolitik
- Uji lipolitik
- Uji proteolitik

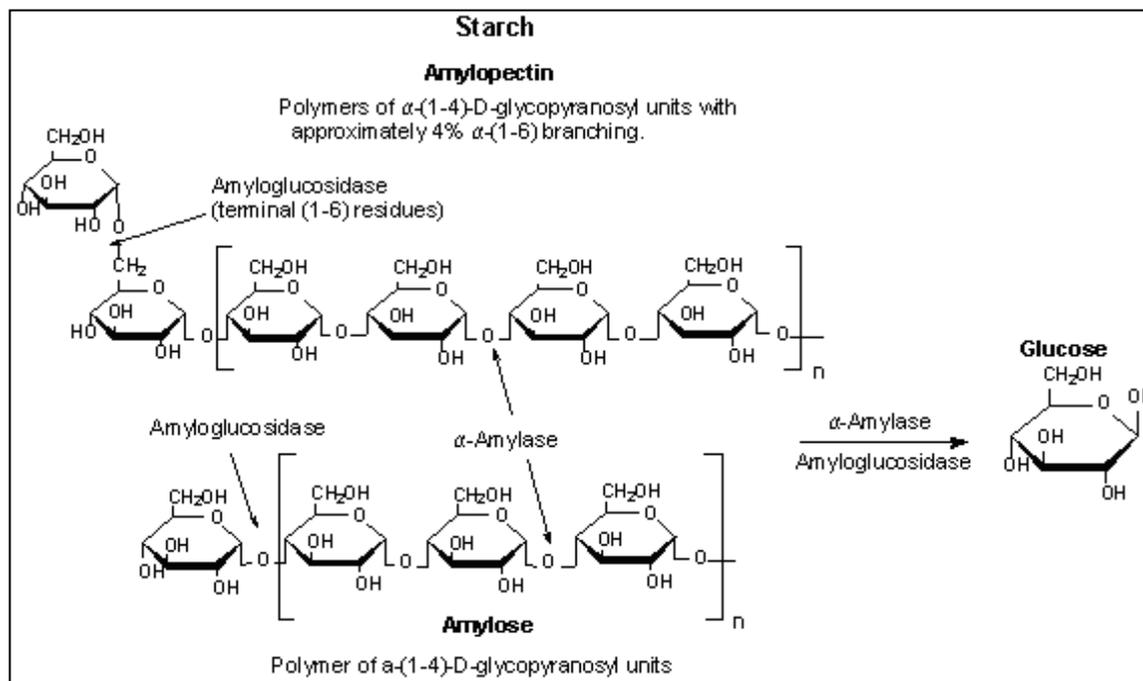
b. Uji aktivitas endoenzim :

- Uji oksidase
- Uji katalase
- Uji Triple Sugar Iron Agar

### Uji Amilolitik

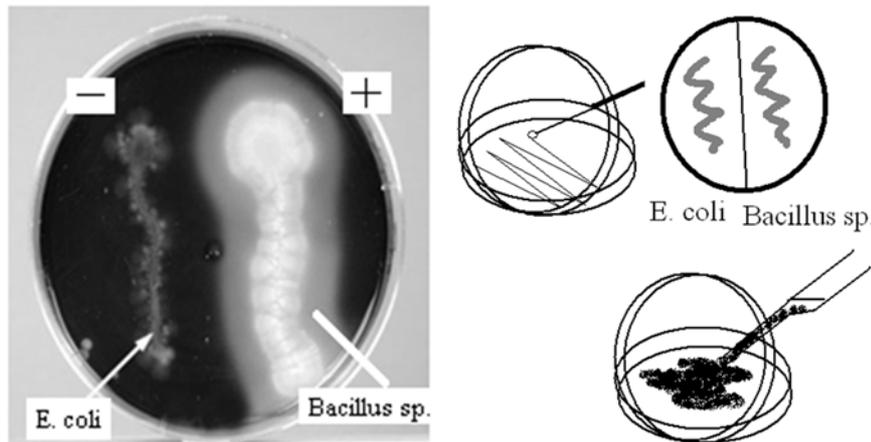
Amilum adalah senyawa yang memiliki berat molekul tinggi, terdiri atas polimer glukosa yang bercabang-cabang yang diikat dengan ikatan glikosidik. Degradasi amilum membutuhkan enzim amilase yang akan memecah/menghidrolisis menjadi polisakarida yang lebih pendek (*dextrin*), dan selanjutnya menjadi maltosa. Hidrolisis akhir maltosa menghasilkan glukosa terlarut yang dapat ditransport masuk ke dalam sel. Indikator yang dipakai pada uji amilolitik adalah *iodine*. Amilum akan bereaksi dengan *iodine* membentuk warna biru hitam yang terlihat pada media.

Prosedur di bawah ini menunjukkan aktivitas amilase. NA yang tersuspensi pati digunakan sebagai media. Indikator yang dipakai adalah *iodine*. Amilum akan bereaksi dengan *iodine* membentuk kompleks warna biru hitam yang terlihat pada media. Warna biru hitam terjadi jika *iodine* masuk ke dalam bagian kosong pada amilum yang berbentuk spiral.



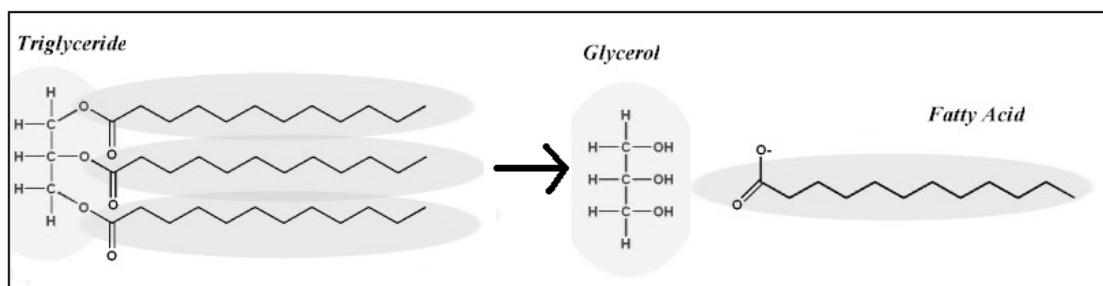
### Cara Kerja :

- Inokulasi *Nutrient Agar* yang mengandung pati (2 g/l) dengan *E.coli* dan *Bacillus* sp. secara streak.
- Inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C
- Setelah selesai inkubasi, tetesi cawan dengan *Iugol's iodine* secukupnya sehingga seluruh permukaan media terkena.
- Hidrolisis zat pati terlihat sebagai zona jernih di sekeliling koloni, sedangkan hasil negatif ditunjukkan warna sekitar koloni tetap biru hitam.



### Uji Lipolitik

Lipid misalnya trigliserida merupakan sumber energi bagi sejumlah mikroorganisma. Untuk mendapatkan energi dari lipid, mikroba menghasilkan enzim lipase dan esterase yang memecah ikatan ester menghasilkan gliserol dan asam lemak. Terdapat berbagai macam prosedur untuk mengetahui aktivitas lipase diantaranya adalah dengan menggunakan media *Trybutirin Agar*, *Rodhamine Agar* dan *Spirit Blue Agar*. Pada prinsipnya metode-metode di atas menggunakan indikator yang mampu mendeteksi keberadaan asam lemak yang terbentuk akibat hidrolisis lemak.





## Fermentasi Roti

Fermentasi berasal dari Bahasa Latin “fervere” yang berarti merebus (to boil). Arti kata dari Bahasa Latin tersebut dapat dikaitkan dengan kondisi cairan bergelembung atau mendidih. Keadaan ini disebabkan adanya aktivitas ragi pada ekstraksi buah-buahan atau biji-bijian. Gelembung-gelembung karbondioksida dihasilkan dari katabolisme anaerobik terhadap kandungan gula.

Fermentasi mempunyai arti yang berbeda bagi ahli **biokimia** dan **mikrobiologi**. Arti fermentasi pada bidang biokimia dihubungkan dengan pembangkitan energi oleh katabolisme senyawa organik. Pada bidang mikrobiologi fermentasi mempunyai arti yang lebih luas, yang menggambarkan setiap proses untuk menghasilkan produk dari pembiakan mikroorganisme.

Roti adalah proses tepung terigu yang difermentasikan dengan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*), air dan atau tanpa penambahan makanan lainnya lalu dipanggang. Kedalam adonan dapat ditambahkan gula, garam, susu atau susu bubuk, lemak, pengemulsi dan bahan-bahan pelezat seperti coklat, keju, kismis dan lain-lain

Manfaat roti diperkaya dengan berbagai macam zat gizi. Sebut saja beta karoten, thiamin (vit B1), riboflavin (vit B2), niasin, serta sejumlah mineral berupa zat besi, iodium, kalsium dan sebagainya. Roti juga diperkaya dengan asam amino tertentu untuk meningkatkan mutu protein bagi tubuh. Kandungan protein yang terdapat dalam roti mencapai 9,7 persen, lebih tinggi ketimbang nasi yang hanya 7,8 persen. Selain itu tidak seperti nasi yang hanya memiliki kadar pati 4-8 persen, dalam roti terdapat 13 persen pati

Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan roti dapat digolongkan bahan utama dan bahan pembantu. Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan roti adalah tepung terigu, air, ragi roti, dan garam. Bahan pembantu adalah bahan-bahan yang menyertai bagian utama dalam pembuatan roti untuk mendapatkan aroma, rasa dan tekstur yang diinginkan. Bahan pembantu ini terdiri dari *shortening*, *bread improver*, susu skim, telur, gula, bahan pengisi serta *flavoring*. Pemberian anti oksidan (asam askorbat, bromat), dan anti kapang seperti kalium propionat dan kalsium pospat ditambahkan untuk memperpanjang keawetan

Dalam pembuatan roti dikenal adanya proses fermentasi yang menghasilkan potongan roti (*loaves*) dengan bagian yang porus dan tekstur roti yang lebih lembut. Metode ini didasarkan pada terbentuknya gas akibat proses fermentasi yang menghasilkan konsistensi adonan yang *frothy* (porus seperti busa). Dalam proses fermentasi roti telah terjadi proses fermentasi alkohol namun produknya non alkohol.

## PROSES FERMENTASI DALAM PENGOLAHAN ROTI

### Pengertian Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu cara untuk mengubah substrat menjadi produk tertentu yang dikehendaki dengan menggunakan bantuan mikroba. Pengertian lainnya adalah suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Sebagai suatu proses fermentasi memerlukan:

1. Mikroba sebagai inokulum
2. Tempat (wadah) untuk menjamin proses fermentasi berlangsung dengan optimal.
3. Substrat sebagai tempat tumbuh (medium) dan sumber nutrisi bagi mikroba.



**Gambar 1: Skema Proses Fermentasi**

### Fermentasi roti

Roti adalah salah satu bentuk industri pengolahan hasil pertanian. Roti merupakan salah satu bentuk makanan pokok yang cukup diminati masyarakat Indonesia. Sebagai contoh roti tawar ataupun sejenis roti basah yang sering dikonsumsi oleh sebagian masyarakat Indonesia khususnya yang tinggal di wilayah perkotaan. Umumnya mereka memiliki roti karena roti dapat dijadikan makanan alternatif pengganti nasi. Selain itu roti merupakan makanan instan yang siap saji

Proses fermentasi pada pengolahan roti sudah dilakukan sejak lama. Proses tersebut dilakukan untuk menghasilkan potongan roti (*loaves*) dengan bagian yang porus dan tekstur roti yang lebih lembut. Metode ini didasarkan pada terbentuknya gas akibat proses fermentasi yang menghasilkan konsistensi adonan yang *frothy* (porus seperti busa).

Pembentukan gas pada proses fermentasi sangat penting karena gas yang dihasilkan akan membentuk struktur seperti busa, sehingga aliran panas ke dalam adonan dapat berlangsung cepat pada saat *baking*. Panas yang masuk ke dalam adonan akan menyebabkan gas dan uap air terdesak ke luar dari adonan, sementara terjadi proses gelatinisasi pati sehingga terbentuk struktur *frothy*

Pengaruh fermentasi menurut jenis dan fungsi pada saat proses baking dapat dilihat pada Tabel di bawah ini :

### Pengaruh fermentasi adonan menurut jenis dan fungsinya pada proses *baking*

Pengaruh	Jenis	Fungsi
Primer	Pembentukan metabolit fungsional (karbon dioksida, etanol, asam laktat, asam asetat)	Volume, tekstur, rasa, umur simpan
Sekunder	Degradasi senyawa makromolekul (pentosan, $\alpha$ -glukan, protein)	Konsistensi, tekstur, umur simpan
Tersier	Pembentukan metabolit prekursor (prekursor flavor: komponen reaksi <i>Maillard</i> )	Flavor, warna

Gas yang terdispersi dan terperangkap di dalam adonan dalam bentuk gelembung dibutuhkan untuk pembentukan pori. Terbentuknya dinding pori yang elastis (*extensible*) tergantung pada kandungan protein yang spesifik yang dapat membentuk film yang elastis. Karakteristik semacam ini diperlihatkan oleh gluten (*gliadin* dan *glutenin*) yang merupakan jenis protein yang terkandung di dalam tepung gandum. Ketika tepung gandum dicampur dengan air, gluten akan membentuk massa viskoelastis yang mengikat semua bahan adonan terutama pati menjadi suatu jaringan. Lapisan film yang terbentuk bersifat impermiabel terhadap gas, sehingga dapat memerangkap gas dan membentuk pori. Selanjutnya pada saat proses pemanggangan (*baking*) terjadi gelatinisasi pati dan koagulasi gluten yang dapat membentuk *crumb* dan tekstur yang lembut.

Lama penyiapan dan fermentasi roti sangat bervariasi yang harus dapat dikendalikan dengan baik. Penggunaan proporsi khamir yang tinggi akan menyebabkan pembentukan gas yang cepat. Hal ini dapat menyulitkan dalam pengaturan waktu fermentasi dan penyiapan adonan. Untuk itu, penjadwalan yang ketat dibutuhkan saat penyiapan adonan karena pengembangan volume adonan terjadi dengan cepat. Pengakhiran proses fermentasi sangat mempengaruhi volume dan bentuk akhir produk *bakery*

## Proses yang Terjadi Dalam Fermentasi Roti

### Pengembangan Adonan

Penggunaan mikroorganisme dalam pengembangan adonan masih menjadi fenomena yang asing bagi masyarakat yang tidak familiar dengan pabrik roti. Udara (oksigen) yang masuk ke dalam adonan pada saat pencampuran dan pengulenan (*kneading*) akan dimanfaatkan untuk tumbuh oleh khamir. Akibatnya akan terjadi kondisi yang anaerob dan terjadi proses fermentasi. Gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan selama proses fermentasi akan terperangkap di dalam lapisan film gluten yang impermiabel. Gas akan mendesak lapisan yang elastis dan *extensible* yang selanjutnya menyebabkan pengembangan (penambahan volume) adonan.

### Asidifikasi.

Selama proses fermentasi selain dihasilkan gas CO<sub>2</sub> juga dihasilkan asam-asam organik yang menyebabkan penurunan pH adonan. Karena tingginya kapasitas penyangga (*buffer capacity*) protein di dalam adonan, maka tingkat keasaman dapat ditentukan dengan menentukan total asam adonan. Proses asidifikasi ini dapat dijadikan sebagai indikator bahwa fermentasi adonan berjalan dengan baik. Dengan demikian pengukuran pH mutlak diperlukan dalam pengendalian proses .

### **Produksi Flavor.**

Terbentuknya alkohol, penurunan pH, dan terbentuknya metabolit lainnya secara langsung akan berperan sebagai prekursor flavor dan rasa roti. Akibat proses fermentasi tersebut dapat menghasilkan roti dengan mutu organoleptik yang ekselen .

## **Pengendalian Fermentasi**

Banyak faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adonan, namun tetap harus diingat bahwa dalam proses fermentasi tersebut yang dipentingkan adalah pengembangan adonan. Pengembangan adonan sendiri merupakan akibat dari peningkatan tekanan internal akibat gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan. Dengan demikian, beberapa parameter yang mempengaruhi laju pengembangan adonan → ekstensibilitas dan elastisitas film protein, viskositas adonan, dan tentu saja aktivitas khamirnya. Hal-hal yang mempengaruhi proses fermentasi :

**a.Suhu.** Aktivitas khamir sangat dipengaruhi oleh suhu medium. Pada kisaran suhu 20-40oC, peningkatan suhu adonan 1oC akan meningkatkan laju fermentasi sampai 12%. Oleh karena itu, pada proses produksi sangat vital untuk dilakukan pemantauan dan pengendalian suhu dan menjadi catatan bahwa apabila suhu adonan melebihi 55oC maka khamir akan mati

**b.Dosis Khamir.** Lama penyiapan dan fermentasi roti sangat bervariasi yang harus dapat dikendalikan dengan baik. Penggunaan proporsi khamir yang tinggi akan menyebabkan pembentukan gas yang cepat. Hal ini menyulitkan pengaturan waktu fermentasi dan penyiapan adonan. Untuk itu, penjadwalan yang ketat dibutuhkan saat penyiapan adonan karena pengembangan volume adonan terjadi dengan cepat. Pengakhiran proses fermentasi sangat mempengaruhi volume dan bentuk akhir produk *bakery*. Pada suhu tersebut di atas, laju fermentasi tergantung pada jumlah khamir yang digunakan. Setelah fermentasi 1 jam akan terjadi sedikit penurunan pertumbuhan khamir 2-5%. Kemudian segera meningkat kembali setelah tersedia nutrisi untuk pertumbuhannya. Selain jumlah khamir keberadaan gula sebagai sumber nutrisi juga mempengaruhi laju pengembangan adonan

**c.pH.** Proses fermentasi oleh khamir terjadi secara optimal diantara pH 4 dan 6. Pada proses pembuatan roti, pH adonan pada akhir fermentasi adalah sekitar 5,2. Apabila menggunakan kultur starter untuk sourdough, pH adonan dapat lebih rendah

## **Fungsi Bahan Dasar Membuat Roti**

### **Tepung terigu**

Tepung terigu → bahan utama dalam membuat roti. Tepung terigu mengandung protein yang terhidrasi menghasilkan gluten. Gluten adalah zat elastis yang dapat diregangkan untuk menyediakan struktur untuk sebuah roti beragi. Di antara jenis tepung lain, hanya tepung terigu yang dapat membentuk struktur gluten ini. Kandungan gizi tepung terigu yang baik akan mempunyai komposisi kadar air 13%, kadar protein 12-13%, kadar hidrat arang 72-73%, kadar lemak 11/2 %, pada saat bercampur dengan air yang berfungsi sebagai kerangka roti, membuat adonan tidak mudah pecah pada waktu diroll dan menahan gas CO<sub>2</sub> hasil fermentasi. Gas CO<sub>2</sub> yang tertahan dalam kerangka jaringan gluten dapat lolos kembali apabila kerangka gluten yang terbentuk tidak kuat, akibatnya roti menjadi kempes kembali setelah dioven

Kualitas tepung terigu dipengaruhi oleh moisture yaitu kadar air tepung terigu dengan kandungan protein 11-13% umum digunakan dalam membuat roti. Kualitas protein diukur dengan kemampuan gluten untuk memperluas dan mempertahankan gas yang dihasilkan selama proses fermentasi. Kualitas gluten ini yang baik menghasilkan roti yang mengembang bagus. Tepung terigu yang digunakan juga mempengaruhi sifat-sifat roti seperti volume, warna kulit yang golden brown, warna remah (crumb) roti, tekstur dan rasa roti.

### **Air**

Fungsi air dalam membuat roti

1. Sebagai pengikat, berhidrasi dengan bahan kering. Jumlah air perlu diatur agar adonan dapat ditangani dengan baik jangan sampai terlalu lembut dan lengket. Adonan sangat menentukan kualitas roti. Perbandingan air yang digunakan dalam formulasi roti, paling baik adalah 55 hingga 65% berdasarkan berat tepung. Air adalah bahan membuat roti yang jumlahnya terbanyak kedua setelah tepung terigu.
2. Sebagai media untuk pengendalian suhu dalam membuat adonan roti.
3. Pelarut untuk bahan lainnya, membentuk adonan selama proses pencampuran membuat roti.
4. Air memegang peranan untuk *gelatinisasi* pati (starch) selama proses baking.

### **Ragi**

Ragi berfungsi sebagai bahan pengembang dalam membuat roti. Ragi dalam adonan akan menghasilkan gas karbondioksida, alkohol, asam, dan panas sebagai akibat dari fermentasi. Proses fermentasi berfungsi melembutkan gluten, mengembangkan adonan, dan berefek pada rasa. Formula ragi dalam bervariasi dari 2 sampai 5% berdasarkan berat tepung untuk ragi segar (fresh yeast). Ragi tersedia dalam 3 bentuk: 1. Basah (compressed yeast) 2. Ragi kering (dry instant yeast) 3. Cair (cream yeast)

### **Garam**

Garam berperan dalam rasa dan menstabilkan fermentasi serta kekuatan gluten. Penambahannya berkisar 1,5-2,5% dari berat tepung terigu

### **Margarin**

Margarin pada umumnya dibuat dari minyak nabati. Margarin merupakan emulsi yang terdiri atas lemak nabati, air dan garam dengan perbandingan (80:18:2). Margarin dapat dikonsumsi tanpa dimasak. Sifat fisik margarin pada suhu kamar adalah berbentuk padat, berwarna kuning, dan bersifat plastis.

Margarin merupakan salah satu sumber energi dengan vitamin A, D, E dan K serta memiliki jumlah kalori yang lebih sedikit dari pada mentega biasa. Margarin memberi cita rasa gurih, mengurangi remah roti, mempermudah pemotongan, serta dapat memperlunak kulit roti, berfungsi untuk memperpanjang daya simpan, memperkeras tekstur agar tidak meleleh pada suhu kamar, dan mempertinggi titik didih untuk memenuhi tujuan pengovenan. Ciri-ciri margarin yang menonjol → bersifat plastis, padat pada suhu ruang, agak keras pada suhu rendah, teksturnya mudah dioleskan, serta segera dapat mencair di dalam mulut

### **Telur**

Telur → bahan makanan sumber protein hewani yang bernilai gizi tinggi., telur berfungsi sebagai pengembang adonan, membentuk warna, perbaikan rasa, menambah nilai gizi, sebagai pelembut atau pengempuk, sebagai penambah aroma dan zat gizi. Jika telur tidak digunakan dalam adonan maka adonan harus ditambahkan cairan walaupun hasilnya kurang lunak. Roti yang lunak dapat diperoleh dengan penggunaan kuning telur yang lebih banyak. Kuning telur banyak mengandung **lesitin** (emulsifier). Kadar air kuning telur sekitar 50%. Sementara putih telur, kadar air 86%. Putih telur mempunyai sifat creaming yang lebih baik dibandingkan kuning telur. Telur merupakan sumber zat protein hewani bernilai gizi tinggi. Fungsi lain telur → sebagai pengental, perekat atau pengikat .

Nilai Gizi yang terkandung dari kuning telur dan putih telur berbeda, kuning telur memiliki kadar protein 16% dan kadar lemak 31%, sedangkan putih telur memiliki kadar protein 13 %. Oleh karena itu bagian telur yang mempunyai nilai gizi paling tinggi sebagai bahan makanan yaitu kuning telur. Pada bagian kuning telur terdapat asam amino essensial yang sering disebut triptofane. Garam yang banyak terdapat didalam kuning telur adalah garam ferum dan fosfor, akan tetapi garam tersebut sedikit mengandung kalsium, vitamin yang banyak terdapat dalam telur adalah vitamin B, kompleks dalam jumlah cukup

### **Gula**

Gula adalah karbohidrat murni yang tidak tersusun atas nutrien lainnya seperti, lemak, protein, vitamin, dan mineral karena gula itu karbohidrat yang murni maka gula disebut sebagai kalori kosong. Gula pasir atau sukrosa adalah disakarida yang tersusun dari satu gugus glukosa dan satu gugus fruktosa

Fungsi gula sebagai makanan ragi, memberi rasa, mengatur fermentasi, memperpanjang umur roti (shelf life), menambah kandungan gizi, membuat tekstur roti menjadi lebih empuk, memberi daya pembersihan pada roti dan memberi warna cokelat yang menarik pada kulit

karena proses **maillard** atau karamelisasi. Gula ditambahkan pada jenis roti tertentu untuk melengkapi karbohidrat yang ada untuk fermentasi dan untuk memberi rasa yang lebih manis.

### Susu

Tujuan pemakaian susu dalam pembuatan produk bakery yaitu untuk memperbaiki gizi karena susu mengandung protein (kasein), gula laktosa dan kalsium, memberikan pengaruh terhadap warna kulit (terjadi pencoklatan protein dan gula), digunakan untuk mengoles permukaan roti, memperkuat gluten karena kandungan kalsium, menghasilkan kulit yang enak dan crispy serta bau *aromatic smell*. Jenis susu yang banyak digunakan dalam proses bakery → susu bubuk, full krim dan skim.

**Susu bubuk full krim** mengandung lemak yang tinggi sehingga memberikan kelembutan dan aroma yang menyenangkan. **Susu skim** banyak mengandung protein kasein yang cenderung meningkatkan penyerapan dan daya menahan air, sehingga mengeraskan adonan dan memperlambat proses fermentasi adonan roti. Keuntungan susu skim → kandungan air dan lemaknya rendah sehingga dapat disimpan lebih lama dan tidak cepat tengik. Kadar air susu skim adalah 2,5% dan kandungan lemaknya 1,1% (Wheat associates, 1983).

## Proses Produksi Roti

### Penyiapan Bahan

Menyiapkan semua bahan-bahan yang akan digunakan dalam proses pembuatan roti baik bahan baku maupun bahan penunjang.

### Penimbangan

Semua bahan ditimbang sesuai formula/resep, dilakukan dengan benar. Untuk jenis bahan baku tepung terigu cakra kembar, mentega, garam dan bahan penunjang lainnya yang merupakan bahan yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit, tetapi sangat penting agar roti yang dihasilkan dapat berkualitas baik

Tabel 1. Resep pembuatan roti bakery jenis roti pisan;

Bahan	Jumlah
Tepung terigu	1 k g
Gula	20 g
Susu bubuk	100 g
Kuning telur	9 butir
Ragi Roti	35 g
Margarin	150 g

Sumber : Perusahaan Roti Milano (2009).

### Pencampuran

Semua bahan dicampur ke dalam mixer dalam langkah

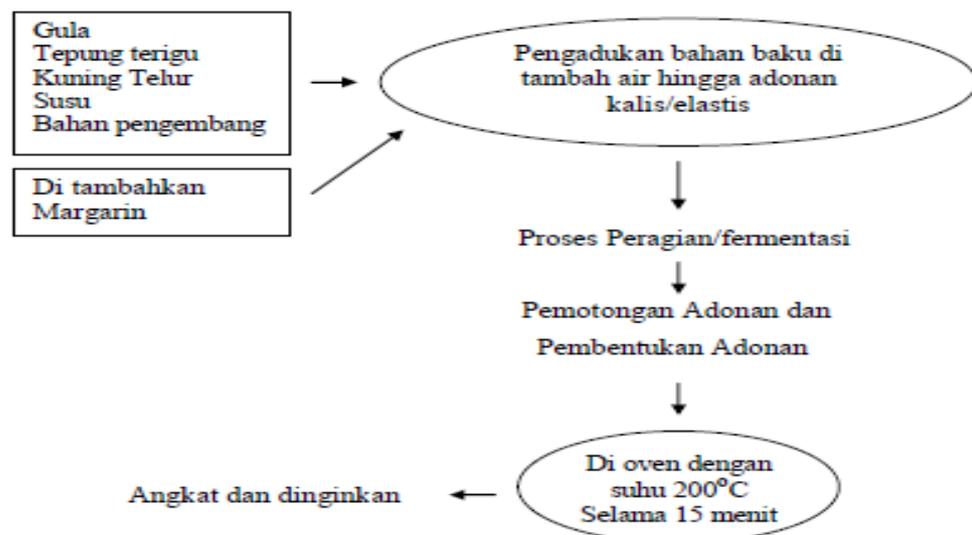
1. masukkan semua bahan kering dan kuning telur, diaduk kecepatan rendah.
2. Lalu air dimasukkan sedikit demi sedikit.

3. Setelah tercampur rata kemudian ragi roti dan mentega dimasukkan. Adonan diaduk dengan kecepatan sedang hingga kalis.
4. Pengadukkan dihentikan setelah adonan menjadi kalis. **Kalis** adalah pencapaian pengadukan maksimum sehingga terbentuk permukaan film pada adonan. Tanda-tanda adonan roti telah kalis adalah jika adonan tidak lagi menempel di wadah atau di tangan atau saat adonan dilebarkan, akan terbentuk lapisan tipis elastis.

**Peragian/fermentasi.** : Setelah adonan roti kalis dilanjutkan dengan proses fermentasi, yaitu adonan dibiarkan beberapa saat. Adonan difermentasi dalam suhu hangat, tertutup lap basah yang bersih, selama 1 jam.

**Pemotongan dan Pembentukan Adonan** : Adonan ditimbang dengan berat 50g, dan di roll pin. Pada tahap ini adonan yang telah homogen dibentuk lembaran adonan. Tebal tipisnya lembaran adonan diusahakan sama, agar tingkat kematangan dan ukuran rotinya sama.  
**Pengovenan** : Pengovenan roti, suhu yang digunakan 200°C selama 15 menit.

**Diagram Alir Proses Produksi**



**Gambar 8.** Diagram alir proses pembuatan adonan