

PANDUAN PRAKTIKUM TEKNOLOGI FERMENTASI



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2013**

Praktikum 1. Isolasi Acetobacter xylinum

Pada Media Cair Fermentasi Nata de Coco

1. Pendahuluan

Isolasi adalah suatu cara untuk memisahkan satu mikrobia dari mikrobia lainnya yang bertujuan untuk mendapatkan spesies tunggal dengan sifat-sifat yang diinginkan. Untuk mengetahui jenis mikroorganisme yang hidup dalam bahan pangan dapat dilakukan isolasi mikrobia, dengan cara menggosokkan suspensi campuran sel pada suatu media padat di dalam cawan petri kemudian menginkubasikannya, sehingga setiap sel akan tumbuh membentuk koloni dan memudahkan untuk memisahkannya.

Pada praktikum ini akan dilakukan isolasi *Acetobacterium xylinum* dari media cair fermentasi nata de coco, menggunakan cara tuang dan cara gores pada lempeng agar media selektif (hasil modifikasi), untuk selanjutnya diamati dengan mikroskop. Bakteri *Acetobacterium xylinum* dapat diisolasi dari media cair fermentasi nata dengan menggunakan metode *screening* (penapisan). Metode *screening* terbagi menjadi beberapa tahap, tapi umumnya terbagi dalam dua tahap yaitu tahap primer atau penduga dan tahap sekunder atau penguat. Pada tahap primer *screening* dapat dilakukan dengan cara tuang (*pour plate*) atau cara gores (*streak plate*) pada lempeng agar. Pada tahap sekunder dilakukan pengamatan melalui mikroskop, dengan melakukan pewarnaan gram untuk memastikan kemurnian dari isolat tersebut.

2. Cara Kerja

a. Pembuatan Media selektif

Panaskan 1 L air kelapa hingga mendidih. Kemudian ditambahkan 15 gram bataco agar, 1,5 gram ammonium sulfat, 1,5 gram asam sitrat, yang di campur hingga pH-nya 4.

b. Primer Screening metode tuang atau Gores

Metode Tuang

Sebanyak 1 ml media cair fermentasi nata de coco diencerkan menggunakan 9 ml larutan buffer fosfat sampai pengenceran 10^{-6} . Kemudian sebanyak 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} di masukkan ke dalam 2 buah cawan petri yang di tambahkan media PCA dengan menggunakan metode tuang. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Amati jumlah, bentuk dan warna koloninya. Kemudian hitung nilai Standard Plate Count (jumlah koloni)

Metode Gores

Siapkan media PCA beku pada cawan petri dan media cair fermentasi nata de coco. Kemudian sebarkan secukupnya media cair fermentasi nata de coco dengan menggunakan pipet ukur. Setelah itu gores dengan menggunakan loop secara kuadran. Kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 2 hari. Amati jumlah, bentuk dan warna koloninya. Kemudian hitung nilai SPC

c. Secunder Screening

lakukan pewarnaan gram, amati dibawah mikroskop.

1. Pendahuluan

Yoghurt adalah bahan makanan yang berasal dari susu sapi, yang merupakan hasil pemeraman susu dalam bentuk mirip bubur atau es krim yang mempunyai rasa agak asam sebagai hasil fermentasi oleh bakteri-bakteri tertentu. Pembuatannya telah berevolusi dari pengalaman beberapa abad yang lalu dengan membiarkan susu yang tercemar secara alami menjadi masam pada suhu tinggi, mungkin sekitar 40-50°C. Akhir-akhir ini ditemukan pula bahwa yoghurt dapat pula dibuat dari susu skim, full krim atau bahkan dari kacang kedelai (disebut *Soyghurt*).

Yoghurt dibuat dengan menambahkan bakteri yang menguntungkan ke dalam susu yang tidak dipasteurisasi (untuk mengatur keseimbangan antara bakteri dan enzim dari susu) pada suhu dan kondisi lingkungan yang dikontrol. Bakteri akan mengolah gula susu alami menjadi asam laktat. Hal itu akan meningkatkan keasaman sehingga menyebabkan protein susu menyusut menjadi masa yang padat atau kental. Peningkatan keasaman (pH 4-5) juga mencegah proliferasi (perbanyakkan sel) dari bakteri patogen lainnya.

Umumnya kultur yoghurt melibatkan dua atau lebih bakteri yang berbeda untuk proses fermentasi, biasanya yaitu *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus thermophilus* dan genus *Lactobacillus*, seperti *L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.casei* dan *L.bifidus*. Karena kultur yoghurt mengandung enzim-enzim yang dapat memecah laktosa, beberapa individu yang menderita lactose intolerant dapat menikmati yoghurt tanpa efek yang merugikan. Secara nutrisi, yoghurt memang kaya akan protein dan beberapa vitamin B serta mineral penting lainnya.

Dalam pembuatan yoghurt secara alam pembuatan yoghurt secara alami, susu yang akan difermentasi dipanaskan samapai 90⁰C selama 15 – 30 menit, kemudian didinginkan sampai 43⁰C, diinokulasikan dengan 2% kultur campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophillus* dan dibiarkan pada suhu ini selama kira-kira 3 jam sampai tercapai kemasam yang dikehendaki 0,85 -0,90% dan pH 4,0 – 4,5 kemudian produk didinginkan samapai 5⁰C untuk dikemas.

Lactobacillus bulgaricus dan *Streptococcus thermophillus* merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang berperan dalam pembuatan yoghurt. Bakteri *Lactobacillus*

bulgaricus merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, katalase negatif, bersifat anaerobic/aerotolerant homofermentatif, dengan suhu optimum pertumbuhan adalah sekitar $40^{\circ} - 45^{\circ}\text{C}$. sedangkan bakteri *Streptococcus thermophilus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat/kokus, katalase negatif, bersifat anaerobic, dengan suhu optimum pertumbuhan sekitar $40^{\circ} - 45^{\circ}\text{C}$. kedua jenis bakteri ini terkandung dalam yoghurt dengan jumlah $\pm 10^6 - 10^7$ sel/ml dari masing – masing jenis bakteri.

Praktikum kali ini akan dilakukan isolasi bakteri asam laktat pada yoghurt. Yoghurt yang digunakan bermacam-macam antara lain yoghurt cup, *activia*, yoghurt (warung), dan yoghurt botol.

2. Cara Kerja

a. Isolasi Bakteri Asam Laktat Pada Yoghurt

Pada isolasi bakteri asam laktat ini ada dua metode yang dipakai, yaitu metode tuang dan metode gores.

Metode Tuang

Pada metode tuang, diambil 1 ml sampel dari yoghurt, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat 9ml NaCl fis. Setelah itu buat pengenceran hingga 10^{-4} . Ambil masing – masing 1 ml dari pengenceran 10^{-3} dan pengenceran 10^{-4} . Tuangkan ke dalam cawan petri yang telah diberi media MRS, media MRS dipilih karena media tersebut merupakan media khusus untuk menumbuhkan bakteri asam laktat. Setelah itu inkubasi pada suhu 45°C selama 2 hari.

Metode gores

Pada metode gores dilakukan dengan cara membekukan MRS agar terlebih dahulu di dalam cawan petri steril. Selanjutnya dilakukan penggoresan sampel dengan menggunakan bantuan ose yang steril ke permukaan agar. Lalu dilakukan inkubasi selama 2 hari pada suhu 45°C .

Praktikum 3. Uji Aktivitas Antimikroba

1. Pendahuluan

Antibakteri atau antimikroba adalah bahan yang dapat membunuh atau menghambat aktivitas mikroorganisme dengan bermacam-macam cara. Senyawa antimikroba terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya atau tujuan penggunaannya. Bahan antimikroba dapat secara fisik atau kimia dan berdasarkan peruntukannya dapat berupa desinfektan, antiseptic, sterilizer, sanitiser dan sebagainya (Lutfi 2004).

Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel dapat dibedakan atas beberapa kelompok sebagai berikut diantaranya merusak dinding sel, mengganggu permeabilitas sel, merusak molekul protein dan asam nukleat, menghambat aktivitas enzim, menghambat sintesa asam nukleat. Aktivitas antimikroba yang dapat diamati secara langsung adalah perkembangbiakannya. Oleh karena itu antimikroba dibagi menjadi dua macam yaitu antibiotik dan desinfektan. Antibiotik adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri walaupun dalam konsentrasi yang rendah. Antibiotik digunakan untuk menghentikan aktivitas mikroba pada jaringan tubuh makhluk hidup sedangkan desinfektan bekerja dalam menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroba pada benda tak hidup, seperti meja, alat gelas, dan lain sebagainya.

Praktikum bertujuan menguji aktivitas antimikroba dari bahan-bahan yang diujikan seperti penicillin, streptomycin, betadine, detol, ekstrak kunyit, dan ekstrak cengkeh.

2. Cara Kerja

Suasana steril harus diciptakan dari awal praktikum hingga akhir praktikum. Terlebih dahulu, tangan dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air hingga bersih. Tangan dikeringkan dan kemudian tangan dan meja dibasahi dengan alcohol 70% hingga tangan dan area kerja steril serta kering. Bakteri yang terdapat di dalam Erlenmeyer, dipipet 0,2 ml menggunakan pipet kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media PCA. Kemudian bakteri sudah ada dalam media PCA, diratakan secara menyeluruh pada media PCA dengan menggunakan spreader. Lalu

media yang telah rata oleh bakteri dibagi menjadi dua bagian. Kertas cakram yang berbentuk lingkaran kecil dibasahi oleh bahan antimikroba yaitu penicillin, streptomycin, betadine, detol, ekstrak cengkeh, dan ekstrak kunyit. Kertas cakram juga dibasahi oleh larutan larutan fisiologis (larfis) 0,85% yang digunakan sebagai pembanding. Kerta cakram yang telah dibasahi bahan antimikroba dan larfis tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri sebelumnya dengan menggunakan pinset.

Praktikum 4. Pembuatan Inokulum Tape

1. Pendahuluan

Tape merupakan makanan fermentasi tradisional yang sudah tidak asing lagi. Tape dibuat dari beras, beras ketan, atau dari singkong (ketela pohon). Berbeda dengan makanan-makanan fermentasi lain yang hanya melibatkan satu mikroorganisme yang berperan utama, seperti tempe atau minuman alkohol, pembuatan tape melibatkan banyak mikroorganisme. Inokulum tape, atau sering disebut ragi tape, telah lama diteliti. Pembuatan tape termasuk jenis heterofermentasi, yaitu menggunakan lebih dari satu macam biakan dari jenis mikroba yang berbeda. Pada fermentasi tape, ragi sebagai starter fermentasi dalam hal ini ragi pasar mengandung berbagai macam mikroba. Mikroba yang diduga paling berperan dalam fermentasi tape adalah *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis burtonii*, dan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu dijumpai pula bakteri asam laktat (*Pediococcus*) dan bakteri amilolitik (*Bacillus*).

Pada praktikum ini akan dibuat inokulum/ragi tape dengan menggunakan 2 macam sampel yang kemudian akan dibandingkan perbedaan populasi mikrobanya dan mutu tape yang dihasilkan. Bahan baku dari tape ini adalah bahan pangan yang mengandung kadar pati tinggi, dimana proses utamanya dalam fermentasinya adalah pemecahan pati menjadi gula oleh enzim amilase (sakarifikasi pati) dalam hal ini dilakukan oleh kapang, dan dilanjutkan fermentasi alkohol oleh khamir.

Penggunaan kayu manis dan bawang putih dalam praktikum ini karena kayu manis mengandung senyawa zat anti mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan. Penambahan kayu manis ini juga bertujuan untuk menstimulir dan memberi nutrisi terhadap mikroorganisme tersebut.

2. Cara Kerja

a. Pembuatan Substrat Ragi Tipe A dengan Kayu Manis

Pada pembuatan inokulum dengan menggunakan tipe A ini, hal pertama yang dilakukan adalah menyiapkan 5g kayu manis yang kemudian dicampurkan dengan

95g tepung beras + 5ml suspensi ragi tape pasar. Kemudian aduk dengan mencampur air sedikit demi sedikit hingga terbentuk adonan yang kalis. Penggunaan tepung beras ini bertujuan untuk menyediakan nutrisi dan media untuk pertumbuhan mikroba. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa bahan baku dari tape adalah pati. Tepung terigu merupakan salah satu bahan pangan yang mengandung pati, sehingga cocok untuk digunakan dalam pembuatan inokulum tape.

Setelah terbentuk adonan kalis, buat bulatan pipih yang diletakkan di atas Loyang yang dilapisi kertas roti. Kemudian inkubasikan selama 2 hari pada suhu 40°C, Inokulum tape yang telah dikeringkan digunakan untuk pengenceran.

Setelah adonan tersebut dikeringkan, ambil 1g kemudian lakukan pengenceran hingga 10^{-4} . lakukan metode tuang dengan menggunakan media NA. Pengenceran yang diamati pertumbuhannya adalah pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} yang ditumbuhkan pada media NA (umum untuk semua mikroba) yang kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30°C.

Praktikum 5. Pengujian Viabilitas Sel Khamir dan Uji Aktivitas Ragi

1. Pendahuluan

Mikroba utama dalam ragi roti ini adalah jenis khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Sel khamir ini memiliki sifat-sifat fisiologi yang stabil, sangat aktif dalam memecah gula, terdispersi dalam air, mempunyai daya tahan simpan yang lama, dan tumbuh dengan sangat cepat.

Pada saat pengamatan di mikroskop kita dapat melihat dan membedakan antara sel khamir yang mati dan hidup, yang ditandai dengan warna bening, yang menunjukkan sel khamir tersebut hidup dan yang berwarna biru menunjukkan sel khamir yang mati karena menyerap *metylen blue*. Jika viabilitas sel rusak, membran luar sel tidak dapat menahan cairan yang keluar masuk sel. Ini dapat menyebabkan warna biru dari *Methylen Blue* masuk ke dalam sel, dan sel terlihat berwarna biru. Sedangkan sel yang masih hidup terlihat tidak berwarna di bawah mikroskop. Sel yang masih hidup masih memiliki viabilitas sel yang baik, sehingga membran luar selnya dapat mengatur apapun yang keluar masuk sel. Sel khamir yang masih hidup ini dapat menahan *Methylen Blue*, sehingga menjadi tidak berwarna.

2. Cara Kerja

a. Pengujian Viabilitas Sel Khamir

Ragi yang digunakan dalam praktikum kali ini yaitu fermipan. Ragi fermipan dibuat menjadi suspensi. Pada perlakuan pertama pengujian viabilitas sel khamir, bertujuan untuk mengamati jumlah sel khamir yang hidup dan yang mati. Sebelumnya 0,1 g ragi roti ditambahkan dengan 10 ml aquades steril didalam erlenmeyer, yang selanjutnya dikocok, lalu ambil satu ose sampel dan di inokulasi pada objek glas, suspensi ditetesi lagi dengan *Methylen Blue*, lalu lakukan pengamatan di bawah mikroskop.

b. Pengujian Aktivitas Ragi

Pertama-tama 40 gram tepung ditambahkan 0,44 gram fermipan. Tepung yang digunakan merupakan tepung yang memiliki kadar gluten yang tinggi sehingga cocok untuk pembuatan roti. Campuran tepung cakra dan fermipan kemudian ditambahkan dengan aquades hangat sedikit demi sedikit hingga terbentuk adonan roti yang kalis.

Adonan kalis dapat diidentifikasi dengan terbentuknya adonan yang tidak lengket dan apabila dibelah adonan tidak menjadi pecah.

Pengamatan yang dilakukan adalah pengembangan volume adonan roti yang telah dibuat. Volume adonan dapat berkembang karena khamir menghasilkan gas CO₂ yang membuat adonan mengembang. Peningkatan volume adonan diamati setiap 10 menit selama 1 jam. Adonan dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditutup dengan *cling wrap*. Pengembangan volume yang meningkat dapat terjadi karena suhu adonan masih optimal bagi sel khamir dan karena nutrisi yang dibutuhkan sel khamir masih banyak tersedia dalam tepung adonan, sehingga pertumbuhan khamir meningkat.

Praktikum 6. Pembuatan Inokulum Tempe

1. Pendahuluan

Tempe adalah produk fermentasi yang amat dikenal oleh masyarakat Indonesia dan mulai digemari pula oleh berbagai kelompok masyarakat Barat. Tempe dapat dibuat dari berbagai bahan. Tetapi yang biasa dikenal sebagai tempe oleh masyarakat pada umumnya ialah tempe yang dibuat dari kedelai. Tempe mempunyai ciri-ciri putih, tekstur kompak. Pada dasarnya cara pembuatan tempe meliputi tahapan sortasi dan pembersihan biji, hidrasi atau fermentasi asam, penghilangan kulit, perebusan, penirisan, pendinginan, inokulasi dengan ragi tempe, pengemasan, inkubasi dan pengundukan hasil. Tahapan proses yang melibatkan jamur dalam pembuatan tempe adalah saat inokulasi atau fermentasi.

Kualitas tempe amat dipengaruhi oleh kualitas starter yang digunakan untuk inokulasinya. Inokulum tempe disebut juga sebagai starter tempe, dan banyak pula yang menyebutkan dengan nama ragi tempe. Starter tempe adalah bahan yang mengandung biakan jamur tempe, digunakan sebagai agensia pengubah kedelai rebus menjadi tempe akibat tumbuhnya jamur tempe pada kedelai dan melakukan kegiatan fermentasi yang menyebabkan kedelai berubah sifat/karakteristiknya menjadi tempe. Kapang dari jenis *Rhizopus* merupakan organisme terpenting dalam fermentasi tempe. Spesies kapang lain yang sering ditemukan dalam tempe ialah *R. oryzae*, *R. oligosporus*, *R. stolonifer*, *R. arrhizus*. Di antara soesies tersebut *R. oryzae* dan *R. oligosporus* memegang peran utama dalam fermentasi tempe. Miselium *R. oryzae* lebih panjang daripada *R. oligosporus*, sehingga tempe yang dihasilkannya tampak lebih padat dan kompak daripada jika hanya *R. oligosporus* yang digunakan dalam fermentasi tempe. Akan tetapi jika tempe yang akan diproduksi lebih diutamakan nilai gizinya, maka *R. oligosporus* memegang peranan terpenting. Hal ini disebabkan karena selama fermentasi berlangsung *R. oligosporus* mensintesis lebih banyak enzim protease, sedangkan *R. oryzae* mensintesis lebih banyak enzim amilase.

Inokulum merupakan salah satu faktor yang penting dalam proses fermentasi tempe. Inokulum yang umumnya digunakan pada fermentasi tempe adalah seperti usar dan inokulum bubuk. Inokulum bubuk dibuat dengan menggunakan berbagai macam

substrat seperti beras, kedelai, dan onggok yang dimasak dan diinokulasi dengan spora kapang dari biakan murni atau dari tempe yang telah dikeringkan.

Inokulum tempe disebut juga dengan starter tempe dan banyak pula yang menyebut dengan nama ragi tempe. Starter atau inokulum tempe adalah bahan yang mengandung biakan jamur tempe, digunakan sebagai agensia pengubah kedelai rebus menjadi tempe akibat tumbuhnya jamur tempe pada kedelai dan melakukan kegiatan fermentasi yang menyebabkan kedelai berubah sifat karakteristiknya menjadi tempe.

2. Cara Kerja

tempe yang telah dipotong tipis-tipis dimasukan kedalam oven pada suhu 40⁰C untuk dikeringkan yang selanjutnya ditumbuhkan untuk dijadikan tepung. Tepung tempe tersebut kemudian dicampur dengan beras yang sebelumnya telah dicuci dan dimasak. Aduk campuran tersebut hingga merata. Setelah selesai inkubasi, keringkan inokulum tersebut selama beberapa hari, kemudian tumbuk hingga berbentuk tepung (19:1) yang kemudian dimasukan kedalam plastik, lalu inkubasikan 2-3 hari.

Lakukan pengamatan cara TPC, lakukan pengenceran hingga 10⁻³. Kemudian dua pengenceran terakhir masukan ke dalam cawan petri dengan metode tuang. setelah itu inkubasikan selama beberapa hari.