



**MERDEKA
BELAJAR**

PANDUAN

PRAKTIKUM BIOPROSES

TAHUN AKADEMIK
2023-2024

Tim Penyusun :

Wa Ode Cakra Nirwana, S.T., M.T., Ph.D.

Dr. Safrina Hapsari, S.T., M.T.

Ardian Indra Bayu, S.T., M.Eng.

Rifa Rahma A., S.T.

LABORATORIUM TEKNIK BIOPROSES
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2023



kkdkhayati.pstk@gmail.com



<http://biokonversi.teknik.ub.ac.id/>

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	2
TATA TERTIB PRAKTIKUM	3
A. PRAKTIKAN	3
B. ASISTEN	4
DISTRIBUSI NILAI	5
FORMAT LEMBAR PENILAIAN	6
FORMAT PROPOSAL PRAKTIKUM	7
FORMAT LAPORAN SEMENTARA	7
FORMAT LAPORAN PRAKTIKUM	8
Pengenalan Alat	14
MODUL 1 STERILISASI, INOKULASI DAN ISOLASI MIKROORGANISME	30
MODUL 2 TEKNIK PERHITUNGAN KONSENTRASI MIKROORGANISME	46
MODUL 3 KINETIKA FERMENTASI	49
MODUL 4 IMOBILISASI SEL	53

TATA TERTIB PRAKTIKUM

A. PRAKTIKAN

1. Praktikan wajib membaca dan mematuhi segala ketentuan yang terkait dengan pelaksanaan praktikum sebelum masuk ke laboratorium.
2. Pada saat di laboratorium, praktikan wajib mengenakan jas laboratorium, sarung tangan, masker dan sepatu tertutup.
3. Praktikan dilarang memakai aksesoris yang berlebihan dan menggunakan alat komunikasi selama praktikum berlangsung.
4. Praktikan dilarang berkuku panjang
5. Praktikan dilarang menggunakan kontak lensa. Bagi yang memiliki mata minus/plus/silinder menggunakan kacamata.
6. Sebelum praktikum, praktikan wajib menyerahkan **Laporan Awal Praktikum dan Form P5. Keselamatan Laboratorium** ke asisten.
7. Praktikan wajib mengikuti **tes awal** pada pukul 13.00 – 13.10 WIB, apabila praktikan terlambat dan tidak mengikuti tes awal maka praktikan tidak mendapatkan nilai tes awal namun praktikan tetap diperbolehkan mengikuti praktikum
8. Praktikan **disarankan hadir maksimal 10 menit sebelum tes awal dimulai**.
9. Setelah praktikum selesai, masing-masing kelompok mengumpulkan **Laporan Sementara** sesuai format ke asisten masing-masing.
10. Laporan Praktikum.1
 - Laporan Praktikum dibuat oleh masing-masing praktikan sesuai dengan **Format Laporan Praktikum** yang telah ditentukan dan didasarkan pada data Laporan Sementara yang wajib dilampirkan.
 - Laporan Praktikum di nilai oleh asisten dengan diberi kesempatan untuk melakukan satu kali revisi. Setelah itu, dikumpulkan ke Laboran paling lambat 1 minggu setelah pengamatan terakhir dilakukan.
 - a. Laporan praktikum dikumpulkan 2 (dua) hari setelah pengamatan terakhir praktikum.
 - b. Laporan praktikum akan diperiksa oleh asisten paling lambat 2 (dua) hari setelah laporan praktikum dikumpulkan.
 - c. Apabila pengumpulan laporan akhir terlambat 1 (satu) hari akan dikenakan sanksi pengurangan nilai laporan sebesar 20%, 2 (dua) hari 50%, 3 (tiga) hari tanpa nilai.
11. Peminjaman dan pengembalian alat-alat praktikum dilakukan sesuai ketentuan laboratorium. Apabila terjadi kerusakan alat atau bahan yang terbuang, wajib diganti oleh praktikan dengan alat/bahan yang sama.

12. Sebelum meninggalkan laboratorium, praktikan harus membersihkan serta merapikan meja kerja, alat-alat praktikum dan bahan praktikum.
13. Meninggalkan tempat praktikum harus seijin asisten (maksimal 1x15 menit).
14. Ketidakhadiran karena sakit harus menyerahkan surat keterangan dokter dan praktikum dapat dilakukan di luar jadwal praktikum dengan persetujuan dari dosen penanggung jawab praktikum.
15. Ketidakhadiran karena kegiatan akademik dan non-akademik, wajib menyerahkan bukti dokumen resmi dan praktikum dapat dilakukan di luar jadwal praktikum dengan persetujuan dari penanggung jawab praktikum.
16. Praktikan wajib melaksanakan seluruh modul praktikum.

B. ASISTEN

1. Asisten wajib mengikuti workshop asisten dan membaca serta mematuhi ketentuan tata tertib laboratorium dan praktikum.
2. Asisten dilarang berkuku panjang.
3. Asisten dilarang menggunakan kontak lensa. Bagi yang memiliki mata minus/plus/silinder menggunakan kacamata.
4. Asisten wajib memberikan tes awal. Asisten menyiapkan materi dan menilai hasil tes awal dengan konsultasi intensif pada dosen pengampu modul praktikum.
5. Asisten yang tidak hadir, tugas dan kewajibannya dapat digantikan oleh PLP dan atau asisten yang lainnya dengan ada konfirmasi sebelumnya.
 - Ketidakhadiran karena sakit harus menyerahkan surat keterangan dokter.
 - Ketidakhadiran karena kegiatan akademik dan non-akademik, wajib menyerahkan bukti dokumen resmi.
 - Ketidakhadiran lebih dari 20% tidak mendapatkan sertifikat asisten.
6. Selama pelaksanaan praktikum:
 - Asisten wajib mengenakan jas laboratorium, sarung tangan, masker dan sepatu tertutup.
 - Asisten wajib memberikan pendampingan kepada praktikan.
 - Asisten dilarang meninggalkan laboratorium selama praktikum berlangsung tanpa alasan yang jelas.
 - Asisten memeriksa laporan awal.
7. Setelah praktikum selesai:
 - a. Asisten memeriksa dan memberikan persetujuan pada laporan sementara.
 - b. Asisten memeriksa peralatan yang telah digunakan oleh praktikan.

- c. Asisten memeriksa laporan akhir praktikum paling lambat 2 (dua) hari setelah laporan praktikum dikumpulkan oleh praktikan kemudian menyerahkan laporan praktikum yang telah diperiksa kepada praktikan untuk memberikan kesempatan 1 (satu) kali revisi.
8. Asisten wajib mengisi form nilai praktikum pada format yang telah ditentukan dan diserahkan kepada PLP paling lambat 2 minggu setelah praktikan mengumpulkan laporan akhir setelah satu kali revisi. Apabila asisten melebihi batas waktu yang telah ditentukan, maka nilai laporan praktikan otomatis diberi nilai 70.

DISTRIBUSI NILAI

No	Komponen Penilaian (per modul)	Persentase (%)
1	Tes Awal	10
2	Laporan Awal	5
3	Form P5. Keselamatan Laboratorium	5
2	Kemampuan menjalankan praktikum dan menerapkan safety	20
3	Laporan, Jika tidak mengumpulkan bab 1-3, mendapat nilai: 60 (maksimal nilai laporan 100)	30
4	Ujian Akhir Praktikum	30
TOTAL		100

FORMAT LEMBAR PENILAIAN

	<p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN RISET, DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS TEKNIK DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA Jl. Mayjen Haryono 167, Malang 65145, Indonesia Telp.: +62-341-587710, 587711 Fax: +62-341-574140 Website: http://teknikkimia.ub.ac.id E-mail : teknikkimia@ub.ac.id</p>
---	--

**LEMBAR PENILAIAN
PRAKTIKUM BIOPROSES
TAHUN AKADEMIK 2023/2024**

Photo 3 X 4

Nama :
NIM :
Hari / Grup :

No.	Percobaan	Nilai				TOTAL	Tanda Tangan Dosen
		Tes Awal (20%)	Praktikum & Safety (20%)	Laporan Praktikum (30%)	Ujian Akhir Praktikum (30%)		
1							
2							
3							
4							

FORMAT LAPORAN AKHIR PRAKTIKUM

1. Laporan Akhir Praktikum ditulis tangan pada kertas folio bergaris dengan **bolpoint warna hitam**. (Margin: kiri 4 cm, kanan, atas, bawah 3 cm)
2. Substansi laporan sesuai dengan penugasan tiap modul praktikum dengan pengarahan dari asisten.

Cover Laporan Praktikum

**LAPORAN AKHIR
PRAKTIKUM BIOPROSES
(TKK-61011)**

“JUDUL MODUL”



Group/ Hari, Tgl :
Nama Praktikan (NIM) : 1.
2.

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2023**

Isi Laporan Akhir Praktikum

MODUL 1 ”JUDUL MODUL”

Hari/Tanggal Praktikum :
Group :
Nama Praktikan (NIM) :
Asisten :

ABSTRAK

TUJUAN

DASAR TEORI

ALAT DAN BAHAN

PROSEDUR KERJA

HASIL DAN PEMBAHASAN

KESIMPULAN

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN (laporan sementara, hasil pengamatan, pustaka yang dikutip, dll)

Ketentuan Isi Laporan

1. Abstrak

Ringkasan setidaknya-tidaknya mengungkapkan tujuan, metode, hasil dan kesimpulan.

2. Tujuan

Tuliskan tujuan praktikum sesuai dengan percobaan yang telah dilakukan.

3. Dasar Teori

Dasar teori menguraikan teori, temuan, dan bahan referensi lain yang dijadikan landasan untuk melakukan suatu praktikum. Dasar teori dibawa untuk menyusun kerangka atau konsep yang akan digunakan dalam praktikum yang mengacu pada daftar pustaka. Kutipan maupun dasar teori yang digunakan wajib disertakan sumber pustaka dengan menuliskan nama pengarang dan tahun, misalnya: “Mikroorganisme dapat distabilkan pada matriks yang berbeda seperti menjebak dalam bahan berpori, penyerapan atau adhesi, penghambatan sel, dan ikatan kovalen serta ikatan ion (Hassanzadeh dkk., 2017)”.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

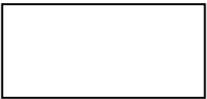
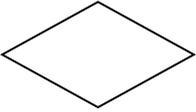
Tuliskan semua alat yang digunakan (tuliskan spesifikasi, ukuran dan jumlah)

b. Bahan

Tuliskan semua bahan yang digunakan beserta spesifikasinya, misalnya konsentrasi.

5. Prosedur Kerja

Buat dalam bentuk diagram alir secara singkat, jelas dan tidak berupa kalimat panjang. Jika menggunakan kata kerja, gunakan bentuk kata kerja pasif. Diagram alir dibuat dengan bagan-bagan yang mempunyai arus yang menggambarkan langkah atau prosedur dalam percobaan yang dibuat secara sederhana, terurai, rapi dan jelas dengan menggunakan simbol- simbol standar.

Bentuk simbol	Keterangan
	<u>Simbol proses</u> Menyatakan suatu proses atau langkah yang dilakukan dengan suatu alat atau instrument Contoh: diekstrak, dipipet, penimbangan, pengadukan
	<u>Simbol keputusan</u> Menunjukkan suatu proses tertentu yang akan menghasilkan dua kemungkinan. Contoh: filtrasi menghasilkan filtrat atau endapan
	<u>Simbol keying operation</u> Menyatakan langkah yang diproses menggunakan instrument. Contoh: diukur absorbansinya dengan spektrometer UV-Vis atau AAS, dianalisis dengan IR, HPLC, GC, dll.
	<u>Simbol manual input</u> Memasukkan data secara manual menggunakan suatu software. Contoh: Analisis data dengan excel, SPSS, minitab.

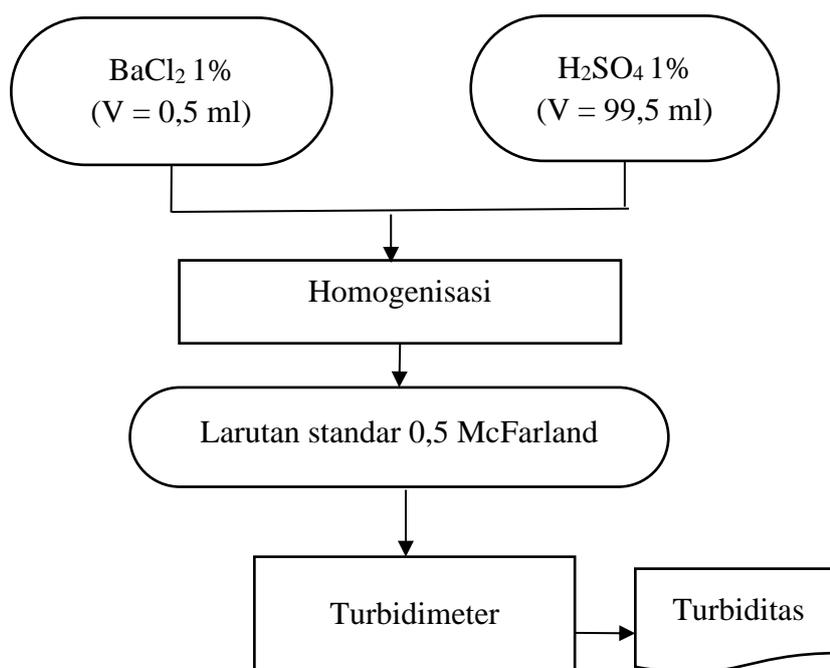
Flow Direction Symbols

	Simbol arus (<i>flow</i>) Menyatakan jalannya suatu proses atau langkah
---	--

Input/ Output Symbols

	Simbol input/ output Menyatakan proses input atau output tanpa tergantung jenis peralatannya.
	Simbol Dokumen Mencetak keluaran atau hasil dalam bentuk dokumen Contoh: absorbansi, kromatogram, spectra, dll.

Contoh Diagram Alir (Pembuatan Larutan Standar 0,5 McFarland):



Pada bab prosedur kerja, sertakan pula gambar rangkaian alat, berupa foto atau gambar.

6. Hasil dan Pembahasan

a. Hasil Pengamatan

Tuliskan semua data setiap langkah yang dilakukan sesuai dengan hasil percobaan. Data pengamatan dapat dibuat dalam bentuk tabel atau kalimat sederhana. Data pengamatan dituliskan sesuai hasil pengamatan pada laporan sementara praktikum. Penulisan data pengamatan yang baik akan memudahkan dalam penyusunan pembahasan dan kesimpulan.

b. Pembahasan

Jelaskan semua langkah yang telah dilakukan (bukan berisi cara kerja), hasil dan data yang telah dicapai, dan kesimpulan dari percobaan yang telah dilakukan. Pembahasan ditulis sesuai dengan mengikuti kaidah penulisan kalimat yang baik, yang terdiri dari subyek, predikat, obyek, dan keterangan. Gunakan berbagai sumber referensi sebagai pembandingan.

7. Kesimpulan

Kesimpulan berisi jawaban sesuai tujuan percobaan yang ditulis dalam kalimat sederhana.

8. Daftar Pustaka

Tuliskan semua referensi yang digunakan sesuai dengan ketentuan penulisan pustaka. Tidak diperbolehkan mengambil pustaka dari blog.

Contoh penulisan daftar pustaka:

Fatimah, Febrina Lia G, & Lina Rahmasari G. (2013). KINETIKA REAKSI FERMENTASI ALKOHOL DARI BUAH SALAK. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 2(2). <https://doi.org/10.32734/jtk.v2i2.1432>.

Hadiyanto, & Azim, M. (2016). Dasar-Dasar Bioproses. In *Center of Biomass and Renewable Energy (C-BIORE)*.

Stanbury, Peter F., Allan Whitaker, Stephen J. Hall. 1995. *Principles of fermentation technology 2nd edition*. Elsevier Science Ltd.

Mitchel, W. J. 1995. *City of Bits: Space, Place and the Infobahn*. Cambridge: MIT Press. http://www.mitpress.mitpress.mit.edu:80/City_of_Bits/Pulling_Glass/Index.html. (diakses 1 Agustus 2013).

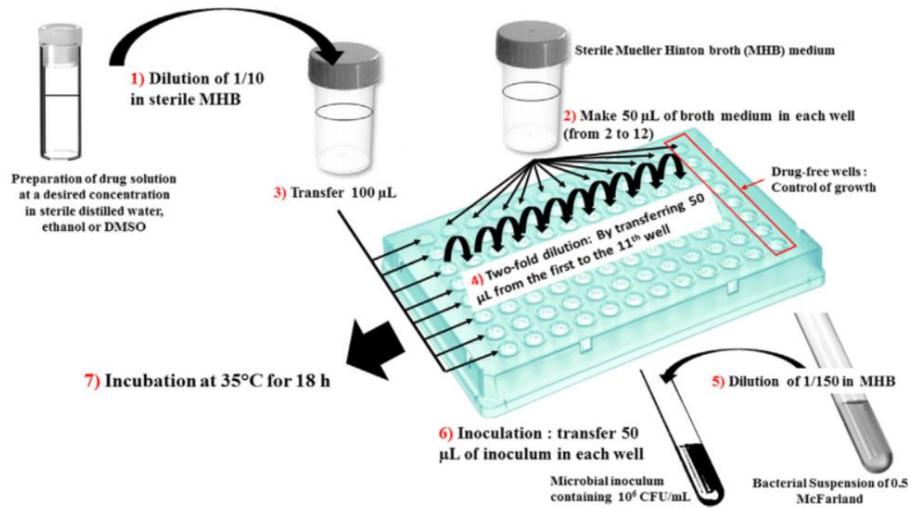
9. Penulisan Tabel dan Gambar

Contoh penulisan tabel dan gambar adalah sebagai berikut:

Tabel 1.1 Sifat fisik dimethyl ether

Sifat Fisik	Nilai
Titik didih, °C	-25
Titik kritis, °C	239,43
Densitas, g/cm ³ pada 20°C	0,67
Viskositas, kg/m.s pada 25°C	0,12-0,15
<i>Cetane number</i>	55-60
<i>Net Calorific Value</i> , kcal/kg	6900

Sumber: Geankoplis, 2004



Gambar 1.1. Mikrodilusi untuk uji antibakteri (Balouiri dkk., 2016)

PENGENALAN ALAT

Bioproses merupakan suatu kajian mengenai proses suatu bahan baku dengan menggunakan agen biologis untuk mendapatkan produk yang diinginkan. Dalam praktikum bioproses, beberapa peralatan yang digunakan haruslah steril agar dapat menunjang kegiatan yang berhubungan dengan mikroorganisme. Peralatan yang akan digunakan harus bebas dari mikroorganisme yang tidak diinginkan (kontaminan) yang dapat merusak media atau koloni suatu mikroorganisme. Sebelum melangkah ke kegiatan praktikum yang lebih jauh, maka yang pertama kali harus dikenali adalah fungsi dari peralatan di laboratorium. Peralatan di laboratorium terdiri dari alat-alat elektrik, alat-alat gelas dan keramik, serta alat-alat non gelas. Peralatan elektrik yang ada di laboratorium yaitu:

1. Autoklaf

Autoklaf merupakan alat pemanas tertutup yang digunakan untuk mensterilisasi suatu benda menggunakan uap bersuhu dan bertekanan tinggi (121°C, 15 lbs) selama kurang lebih 15 menit. Peningkatan tekanan pada autoklaf tidak dimaksudkan untuk membunuh mikroorganisme, melainkan meningkatkan suhu dalam autoklaf. Suhu yang tinggi inilah yang akan membunuh mikroorganisme. Autoklaf ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Autoklaf

2. Oven vacuum

Oven vacuum digunakan untuk menghilangkan zat dari sampel pada suhu rendah dengan cara mengurangi tekanan sehingga meminimalkan oksidasi selama pengeringan. Oven vacuum ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Oven Vacuum

3. Bioreaktor

Bioreaktor merupakan sebuah peralatan atau sistem yang mampu menyediakan sebuah lingkungan biologis yang dapat menunjang terjadinya reaksi biokimia dari bahan baku menjadi produk yang dikehendaki. Komponen utama bioreaktor terdiri atas tangki, sparger, impeller, baffle dan sensor untuk mengontrol parameter. Sensor berperan untuk mengontrol lingkungan dalam bioreaktor. Kontrol fisika meliputi sensor suhu, tekanan, agitasi, dan kecepatan aliran. Sedangkan, kontrol kimia meliputi sensor pH, kadar oksigen, dan perubahan komposisi medium. Bioreaktor ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Bioreaktor

4. *Laminar Air Flow*

Laminar Air Flow (LAF) adalah alat atau ruangan yang didesain untuk bekerja secara aseptis pada saat bekerja dengan objek mikroorganisme karena mempunyai pola pengaturan dan penyaring aliran udara sehingga menjadi steril. LAF dapat memproteksi suatu pekerjaan dari kontaminasi. LAF ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. *Laminar Air Flow* (LAF)

5. Inkubator

Inkubator adalah suatu alat yang digunakan untuk proses inkubasi dan perkembangbiakan suatu mikroorganisme pada suhu yang terkontrol. Inkubator memiliki alat pengatur suhu, sehingga suhu dapat diatur sesuai biakan mikroorganisme yang akan diinkubasi. Inkubator ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Inkubator

6. Mikroskop

Salah satu alat untuk mengamati mikroorganisme yaitu mikroskop, seperti pada Gambar 6. Mikroskop dapat memvisualisasikan objek yang sangat kecil (mikroorganisme) dengan memberikan gambar yang kontras dengan perbesaran tertentu.



Gambar 6. Mikroskop

7. Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah suatu instrumen yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu sampel pada panjang gelombang tertentu. Spektrofotometer UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Spektrofotometer UV-Vis

8. Neraca Analitik

Neraca analitik merupakan alat yang berfungsi untuk menimbang bahan yang akan digunakan dalam praktikum dengan tingkat ketelitian yang tinggi. Neraca analitik ditunjukkan pada Gambar 8. Penimbangan bahan dengan neraca analitik ini sebaiknya diletakkan diatas kaca arloji atau alumunium foil atau kertas yang bersih dan hindari meletakkan langsung bahan yang akan ditimbang diatas neraca.



Gambar 8. Neraca Analitik

9. *Hot plate and stirrer*

Hot plate and stirrer digunakan untuk mengaduk dan memanaskan larutan satu dengan larutan lain yang bertujuan untuk membuat suatu larutan homogen dengan bantuan pengaduk batang magnet (*magnetic stirrer*). *Hot plate and stirrer* ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. *Hot plate and stirrer*

10. *Vortex*

Vortex merupakan alat yang berfungsi untuk menghomogenkan suspensi sampel. *Vortex* ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. *Vortex*

11. *Shaker*

Shaker biasa digunakan untuk menghomogenkan sampel larutan yang ditempatkan pada labu erlenmeyer atau media lainnya dengan memanfaatkan gerakan dan getaran satu arah dengan kecepatan relatif lambat. *Shaker* ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. *Shaker*

12. *Moisture balance*

Moisture balance merupakan alat untuk mengukur tingkat kelembaban atau kadar air pada suatu sampel. *Moisture balance* ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. *Moisture balance*

Peralatan gelas dan keramik yang ada di laboratorium yaitu:

1. Mikropipet

Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1.000 μl , yang ditunjukkan pada Gambar 13. Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (*adjustable volume pipette*) antara 1-20 μl atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (*fixed volume pipette*) misalnya mikropipet 5 μl .



Gambar 13. Mikropipet

2. Kaca Benda dan Kaca Penutup

Kaca benda berguna untuk meletakkan objek pengamatan mikroskop. Kaca penutup berguna untuk menutup objek pengamatan mikroskopis yang akan diamati. Kaca benda dan kaca penutup ditunjukkan pada Gambar 14.



Gambar 14. Kaca benda dan kaca penutup

3. *Bunsen burner*

Bunsen burner digunakan untuk menciptakan kondisi yang steril saat inokulasi mikroorganisme. *Bunsen burner* ditunjukkan pada Gambar 15.



Gambar 15. *Bunsen burner*

4. Cawan petri (*petri dish*)

Cawan petri berfungsi untuk membiakkan mikroorganisme pada media padat. Media dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa digunakan berdiameter 15 cm dan dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml. Cawan petri ditunjukkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Cawan Petri

5. *Stir Bar*

Stir bar merupakan bagian utama dari *magnetic stirrer* berbentuk batang berwarna putih yang akan berputar di dalam larutan sehingga mempercepat proses pengadukan. *Stir bar* ditunjukkan pada Gambar 17.



Gambar 17. *Stir bar*

6. Tabung Reaksi dan Rak Tabung Reaksi

Tabung reaksi merupakan suatu alat yang digunakan untuk meletakkan sampel, dalam praktikum bioproses biasanya digunakan untuk membuat media agar miring. Tabung reaksi biasanya diletakkan pada rak tabung reaksi. Tabung reaksi yang diletakkan pada rak tabung reaksi ditunjukkan pada Gambar 18.



Gambar 18. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi

7. Pipet Ukur

Pipet ukur digunakan untuk mengambil larutan dengan ukuran tertentu. Ukuran dari pipet ukur ini bermacam-macam dari ukuran 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml dan seterusnya. Pipet ukur ditunjukkan pada Gambar 19.



Gambar 19. Pipet Ukur

8. Pipet Tetes

Pipet tetes merupakan jenis pipet yang digunakan untuk memindahkan larutan dari suatu wadah ke wadah lain dengan jumlah yang sangat sedikit dan dengan tingkat ketelitian pengukuran volume yang sangat rendah. Pipet tetes ditunjukkan pada Gambar 20.



Gambar 20. Pipet Tetes

9. *Beaker Glass*

Beaker Glass digunakan sebagai wadah penampung untuk melakukan proses pengadukan, pencampuran, hingga memanaskan cairan. *Beaker Glass* ditunjukkan pada Gambar 21.



Gambar 21. *Beaker Glass*

10. Gelas Ukur

Gelas ukur umum yang digunakan untuk mengukur volume cairan. Gelas ukur ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Gelas Ukur

11. Erlenmeyer

Erlenmeyer merupakan alat yang digunakan untuk meletakkan larutan atau untuk meletakkan bahan yang akan dicampurkan dalam bentuk cair. Erlenmeyer ditunjukkan pada Gambar 23.



Gambar 23. Erlenmeyer

12. Alcohol Refractometer

Alcohol Refractometer digunakan untuk mengukur kadar alkohol dari suatu bahan cair pada rentang tertentu dengan menggunakan fenomena bias yang muncul pada antarmuka prisma dan larutan sampel. *Alcohol Refractometer* ditunjukkan pada Gambar 24.



Gambar 24. *Alcohol Refractometer*

13. *Brix Refractometer*

Brix Refractometer digunakan untuk mengukur kadar gula dalam suatu bahan seperti buah-buahan, jus buah, kopi, minuman ringan, dan lain-lain. *Brix Refractometer* ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. *Brix Refractometer*

14. Alkoholmeter

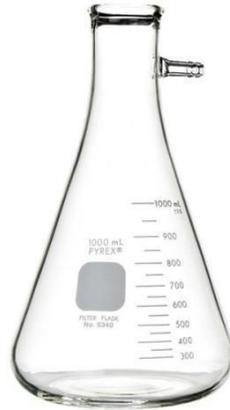
Prinsip kerja dari alkoholmeter berdasarkan berat jenis campuran antara alkohol dengan air. Cara pengukurannya yaitu memasukkan alkoholmeter ke dalam gelas ukur yang panjangnya melebihi alkoholmeter dan dalam gelas ukur tersebut telah berisi cairan etanol yang akan diukur. Alkoholmeter ditunjukkan pada Gambar 26.



Gambar 26. Alkoholmeter

15. *Filtering Flask*

Filtering flask mempunyai bentuk yang mirip dengan Erlenmeyer tetapi terdapat pipa di sisi atas pada lehernya. *Filtering flask* sering digunakan untuk penyaringan *Buchner* berpasangan dengan *corong Buchner* dan pompa vakum (pompa penghisap). *Filtering flask* ditunjukkan pada Gambar 27.



Gambar 27. *Filtering Flask*

16. *Corong Buchner*

Corong Buchner adalah sebuah peralatan laboratorium yang digunakan dalam penyaringan vakum. *Corong Buchner* ditunjukkan pada Gambar 28.



Gambar 28. *Corong Buchner*

17. Piknometer

Piknometer adalah alat yang digunakan untuk menentukan massa jenis dari suatu cairan. Piknometer ditunjukkan pada Gambar 29.



Gambar 29. Piknometer

18. *Spreader*

Spreader merupakan alat yang digunakan untuk menyebarkan biakan mikroorganisme yang terdapat pada medium pembiakan. *Spreader* ditunjukkan pada Gambar 30.



Gambar 30. *Spreader*

19. Batang Pengaduk

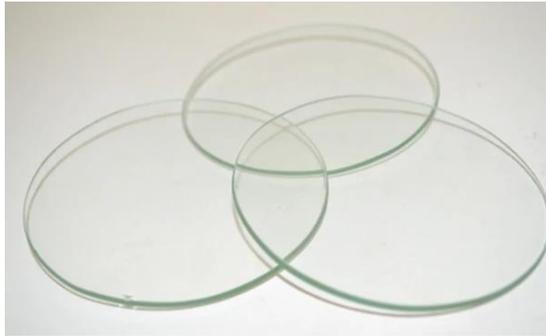
Batang pengaduk merupakan sebuah peralatan laboratorium yang digunakan untuk mencampur bahan kimia dan cairan untuk keperluan laboratorium. Biasanya terbuat dari kaca pejal. Batang pengaduk ditunjukkan pada Gambar 31.



Gambar 31. Batang Pengaduk

20. Kaca arloji

Kaca arloji/gelas arloji berbentuk bundar dengan beragam diameter ini memiliki beberapa fungsi, di antaranya: penutup gelas kimia ketika tengah proses pemanasan sampel (penguapan), sebagai tempat untuk mengeringkan padatan dalam desikator, sebagai tempat benda yang tengah berada dalam proses pengamatan dan sebagai tempat untuk menyimpan bahan yang akan ditimbang. Kaca arloji ditunjukkan pada Gambar 32.



Gambar 32. Kaca Arloji

Peralatan non gelas yang ada di laboratorium yaitu:

1. Jarum Inokulum

Jarum inokulum merupakan suatu alat yang digunakan untuk memindahkan biakan ke media baru. Jarum inokulum ditunjukkan pada Gambar 32. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat *nichrome* atau *platinum* sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) disebut ose dan yang berbentuk lurus disebut jarum inokulasi (*inoculating needle*). Ose cocok untuk melakukan *streak* di permukaan medium agar, sedangkan *inoculating needle* cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*).



Gambar 32. Jarum inokulum (jarum ose dan *inoculating needle*)

2. *Rubber Bulb*

Rubber bulb adalah alat bantu yang berfungsi untuk menyedot larutan yang dipasang pada pangkal pipet ukur. *Rubber bulb* ditunjukkan pada Gambar 33.



Gambar 33. *Rubber bulb*

3. *Syringe*

Syringe terdiri dari tabung dengan piston di dalamnya yang keluar dari ujung belakang. *Syringe* ditunjukkan pada Gambar 34.



Gambar 34. *Syringe*

4. Jangka sorong

Jangka sorong adalah alat ukur yang ketelitiannya dapat mencapai seperseratus milimeter. Terdiri dari dua bagian, bagian diam dan bagian bergerak. Jangka sorong ditunjukkan pada Gambar 35.



Gambar 35. Jangka Sorong

5. Botol aquadest

Botol cuci aquadest digunakan untuk menyimpan aquadest, dan digunakan untuk mencuci ataupun membilas bahan-bahan yang tidak larut dalam air. Botol cuci aquadest terbuat dari

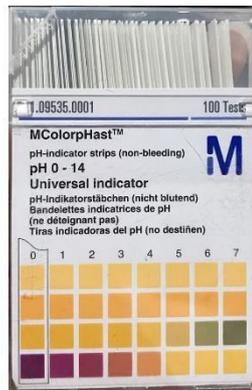
bahan plastik pilihan. Lapisan plastik yang tebal membuat botol cuci aquadest tidak mudah pecah. Botol aquadest ditunjukkan pada Gambar 36.



Gambar 36. Botol aquadest

6. Indikator pH universal

Indikator universal adalah indikator pH berisi larutan dari beberapa senyawa yang menunjukkan beberapa perubahan warna yang halus pada rentang pH antara 1-14 untuk menunjukkan keasaman atau kebasaan larutan. Indikator pH universal ditunjukkan pada Gambar 37.



Gambar 37. Indikator pH universal

MODUL 1 TEKNIK STERILISASI, INOKULASI, ISOLASI DAN PRESERVASI MIKROORGANISME

A. TUJUAN

- Mahasiswa mampu melakukan teknik sterilisasi alat dan media pertumbuhan mikroba melalui berbagai teknik dekontaminasi.
- Mahasiswa mampu melakukan inokulasi mikroorganisme secara aseptis
- Mahasiswa mampu melakukan teknik preservasi mikroorganisme.

B. DASAR TEORI

1. Media Pertumbuhan

Media pertumbuhan adalah tempat untuk menumbuhkan mikroorganisme. Mikroorganisme memerlukan nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan untuk bahan pembangun sel, untuk sintesa protoplasma dan bagian-bagian sel lain. Setiap mikroorganisme mempunyai sifat fisiologi tertentu, sehingga memerlukan nutrisi tertentu pula. Selain untuk menumbuhkan mikroorganisme, media dapat digunakan untuk isolasi, pengujian sifat-sifat fisiologi, dan perhitungan jumlah mikroorganisme.

Media tumbuh mikroorganisme adalah larutan berbentuk gel (semi-padat) atau cair yang mengandung berbagai zat nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Pada umumnya media pertumbuhan mengandung sumber energi, unsur-unsur C, N, S, P, H, O, buffer, mineral dan air. Media cair disebut kaldu (*broth*), sedangkan yang semi-padat disebut media agar, karena dipadatkan dengan 1,5–2,0% agar. Jenis polisakarida berupa agar berguna sebagai bahan pematat media karena:

1. Agar tidak dapat diuraikan oleh hampir semua jenis mikroorganisme
2. Agar tetap berbentuk padat pada kisaran suhu inkubasi yang luas (0–80°C)
3. Agar mencair pada titik didih air, tetapi tidak segera memadat pada suhu pendinginan 42°C. Hal ini memungkinkan pembuatan suspensi biakan mikroorganisme pada suhu 45°C untuk tujuan pengenceran biakan dan isolasi mikroorganisme.

Klasifikasi Media

1. Berdasarkan Konsistensinya
 - Media Cair: digunakan untuk membiakkan mikroba dalam jumlah dan waktu tertentu, untuk fermentasi dan berbagai uji biokimia, juga bisa digunakan untuk melakukan pengenceran berseri pada tahap isolasi mikroba. Contoh media cair adalah kaldu nutrient (nutrient broth), kaldu glukosa dan sebagainya.

- Media Padat: dibuat dengan menambahkan agar sebanyak 1,2-1,5% (12-15 g/l), pada media cair digunakan untuk tujuan isolasi, menumbuhkan biakan murni, mengamati morfologi koloni, dan menghitung jumlah koloni. Misalkan agar nutrient (nutrient agar =NA), agar kentang dekstroza (potato dextrose agar = PDA) dan sebagainya. Media padat dapat berupa media padat datar (di cawan petri), padat miring (di tabung reaksi) maupun padat tegak (di tabung reaksi).
 - Media Setengah Padat (Semi Solid): dibuat dengan menambahkan agar sebanyak 0,3-0,8 % (3-8 g/l) pada media cair, agar yang ditambahkan lebih sedikit dibandingkan dengan agar untuk media padat. Umumnya digunakan untuk menguji motilitas/pergerakan sel.
2. Berdasarkan Komposisi Bahan Media
- Media Sintetik (atau defined media): Komposisi kimia media diketahui dengan pasti dan tingkat kemurniannya tinggi. Media ini biasanya mengandung mineral dan sumber karbon seperti glukosa, sukrosa, acetate dll. Contoh: Media Mineral, media Czapek's Dox.
 - Media Semi-Sintetik (atau complex media): Media terbuat dari bahan kimia (seperti glukosa, fruktosa, mineral) yang di campur dengan bahan alami (seperti yeast extract, pepton, beef extract, kentang). Bahan alami tersebut tidak diketahui pasti komposisinya (*complex*) karena mengandung berbagai komponen seperti gula, protein, lipid, mineral dll. Contoh: media Potato Dextrose Agar (PDA), Nutrient broth (NB).
 - Media Non Sintetik: Media terbuat dari bahan alami dan tidak diketahui dengan pasti komposisi kimianya, misalkan tanah, nasi, daun-daunan.
3. Berdasarkan Fungsi
- Media Umum: Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba secara umum, misalkan media agar nutrient (NA) untuk bakteri dan media agar kentang dekstroza (PDA) untuk jamur.
 - Media Selektif: Media yang mengandung senyawa tertentu dan bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroba yang tidak dikehendaki, misalkan agar Endo untuk *Escherichia coli*.
 - Media Diferensial: Media mengandung senyawa tertentu sehingga mikroba yang di harapkan dapat tumbuh dengan menunjukkan ciri spesifik pada media berbeda dengan mikroba lainnya, misalnya agar pati, agar Eosin Biru Metilen.

- Media Pengaya atau Penyubur: Media ini digunakan untuk menyuburkan pertumbuhan mikroba. Hal ini umumnya dilakukan sebelum digunakan untuk starter fermentasi dan uji fisiologis.

2. Sterilisasi, Dekontaminasi dan Teknik Aseptis

2.1 Sterilisasi dan Dekontaminasi

Sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan suatu proses untuk mematikan semua mikroorganisme yang terdapat pada atau di dalam suatu benda. Hal ini diperlukan agar mikroba yang di tumbuhkan, diamati dan diisolasi terbebas dari mikroba lain (mikroba kontaminan). Steril merupakan syarat mutlak keberhasilan kerja dalam laboratorium mikrobiologi.

Selain sterilisasi, ada suatu proses yang mampu mengurangi populasi mikroba (sel vegetative) secara signifikan. Metode non-sterilisasi ini tidak merusak endospore, namun sangat bermanfaat dalam mengurangi resiko kontaminan dan pertumbuhan patogen pada bahan yang tidak bisa di sterilisasi. Metode ini disebut dengan dekontaminasi atau disinfeksi. Secara umum sterilisasi dan dekontaminasi dapat dilakukan dengan cara:

- a. Filtrasi: Sterilisasi dengan filter bakteriologis dan filter udara berefisiensi tinggi (HEPA).
- b. Pemanasan: Sterilisasi dengan panas kering (umumnya menggunakan alat oven, suhu efektif 160oC selama 2 jam), panas basah bertekanan (biasanya menggunakan pressure cooker, autoklaf, suhu efektifnya 121oC pada tekanan 1 atm (15 psi) dengan waktu 15 menit), pembakaran (biasanya menggunakan pembakaran spiritus/bunsen). Dekontaminasi dengan pasteurisasi, perebusan.
- c. Radiasi: Sterilisasi dengan paparan sinar ionisasi. Dekontaminasi dengan sinar ultraviolet (UV)
- d. Kimia: Sterilisasi dan Dekontaminasi dengan bahan-bahan kimia.

2.2 Teknik Aseptis

Bekerja dengan mikroorganisme membutuhkan teknik aseptis untuk mencegah ataupun mengurangi kontaminasi yang tidak diinginkan, karena setiap benda yang digunakan maupun pekerja di laboratorium dapat menjadi sumber kontaminasi. Ada beberapa cara untuk mengendalikan atau mengurangi kontaminan, diantaranya adalah:

- a. *Cleaning* (kebersihan) dan Sanitasi

Cleaning dan sanitasi sangat penting di dalam mengurangi jumlah populasi mikroorganisme pada suatu ruang/tempat. Prinsip *cleaning* dan sanitasi adalah

menciptakan lingkungan yang tidak menyediakan sumber nutrisi bagi pertumbuhan mikroba sekaligus membunuh sebagian besar populasi mikroba.

b. Disinfeksi

Adalah proses pengaplikasian bahan kimia (disinfektan) terhadap ruang kerja, peralatan, lantai, dinding atau lainnya untuk membunuh sel vegetatif microbial. Disinfeksi diaplikasikan pada benda dan hanya berguna untuk membunuh sel vegetatif saja, tidak mampu membunuh spora. Meja yang akan digunakan terlebih dahulu diberi disinfektan untuk membunuh mikroorganisme yang ada. Meja disemprot dengan alkohol 70% kemudian dilap dengan tissue. Selain itu, tangan juga disemprot dengan etanol 70%, kemudian barulah menyalakan Bunsen.

c. Antiseptis

Merupakan aplikasi senyawa kimia yang bersifat antiseptis terhadap permukaan tubuh untuk melawan infeksi atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme dengan cara menghancurkan atau menghambat aktivitas mikroba.

d. Sterilisasi

Proses menghancurkan semua jenis kehidupan sehingga menjadi steril.

2.3 Teknik Transfer Aseptis

Teknik transfer aseptis adalah suatu metode atau teknik untuk memindahkan atau mentransfer kultur bakteri dari satu tempat ke tempat lain secara aseptis agar tidak terjadi kontaminasi oleh mikroba lain ke dalam kultur. Teknik transfer aseptis ini sangat esensial dan kunci keberhasilan prosedur microbial yang harus diketahui oleh seorang yang hendak melakukan analisis microbial. Beberapa prosedur yang umum untuk menghindari kontaminasi dari peralatan utama yang kita pakai sebagai berikut:

- a. Jarum ose (*loop*). Jarum ose digunakan untuk memindahkan (inokulasi) mikroorganisme dari kultur cair atau padat ke medium lainnya. Sterilisasi jarum ose dilakukan dengan membakar jarum tersebut pada api Bunsen hingga berwarna merah. Setelah itu jarum ose dibiarkan beberapa saat di dekat Bunsen, baru digunakan untuk mengambil/memindahkan mikroorganisme. Sterilisasi ini dilakukan sebelum dan setelah jarum digunakan.
- b. Mulut tabung/Erlenmeyer. Sterilisasi mulut tabung reaksi atau Erlenmeyer dilakukan dengan api Bunsen, dengan terlebih dahulu membuka sumbat kapas kemudian melewati mulut tabung/Erlenmeyer pada api.

- c. Cawan petri. Sebelum cawan petri dibuka untuk diinokulasi maupun setelah inokulasi selesai (cawan petri ditutup), tepi cawan petri dilewatkan di api Bunsen. Selama inokulasi, bagian cawan petri yang terbuka, didekatkan ke api Bunsen untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh mikrobia yang berasal dari udara.

Adapun aturan yang harus diketahui, dipahami dan dipenuhi di dalam melakukan teknik transfer aseptis ini, seperti di bawah ini:

Sebelum Pelaksanaan:

- Memakai pakaian atau jas laboratorium yang bersih dan higienis sebelum masuk ke dalam laboratorium.
- Singkirkan semua barang yang tidak diperlukan dari meja dan ruang kerja
- Dianjurkan untuk mengenalkan masker yang bersih dan higienis
- Kenakan penutup rambut yang bersih dan higienis.
- Jangan sekali kali meletakkan tabung dan peralatan laboratorium lainnya di luar laboratorium.

Sebelum dan Setelah Pelaksanaan:

- Cuci tangan anda dengan bersih dan gunakan antiseptis
- Sanitasi dan desinfeksi ruang kerja (laboratorium dan sekitarnya) dengan desinfektan yang memadai, termasuk Laminar Air Flow dan Inkubator.
- Sterilisasi semua alat dan bahan sebelum digunakan.

Ketika Pelaksanaan Kultur:

- Jangan berbicara
- Bekerjalah di dekat api (pembakar Bunsen) dan di dalam Laminar Air Flow.
- Bukalah tabung atau cawan di atas api dan jauhkan dari hidung dan mulut anda.
- Usahakan jangan meletakkan tutup (kapas penutup) tabung reaksi di atas lantai/ alas meja atau laminar.
- Miringkan tutup cawan petri yang akan dibuka sebagai penghalang antara kultur dengan mulut dan hidung anda.
- Jangan buka tutup cawan petri terlalu lebar dan terlalu lama.
- Bekerjalah dengan cepat.

Setelah Pelaksanaan:

- Segera tutup semua tabung atau cawan yang masih terbuka.
- Singkirkan segera semua peralatan atau bahan sisa yang sudah tidak digunakan lagi.
- Bersihkan dan keringkan segera tumpahan-tumpahan media yang ada.
- Sanitasi dan desinfeksi ulang ruang kerja (laboratorium anda).

- Lepas pakaian kerja dan jas laboratorium anda sebelum meninggalkan ruang kerja anda.

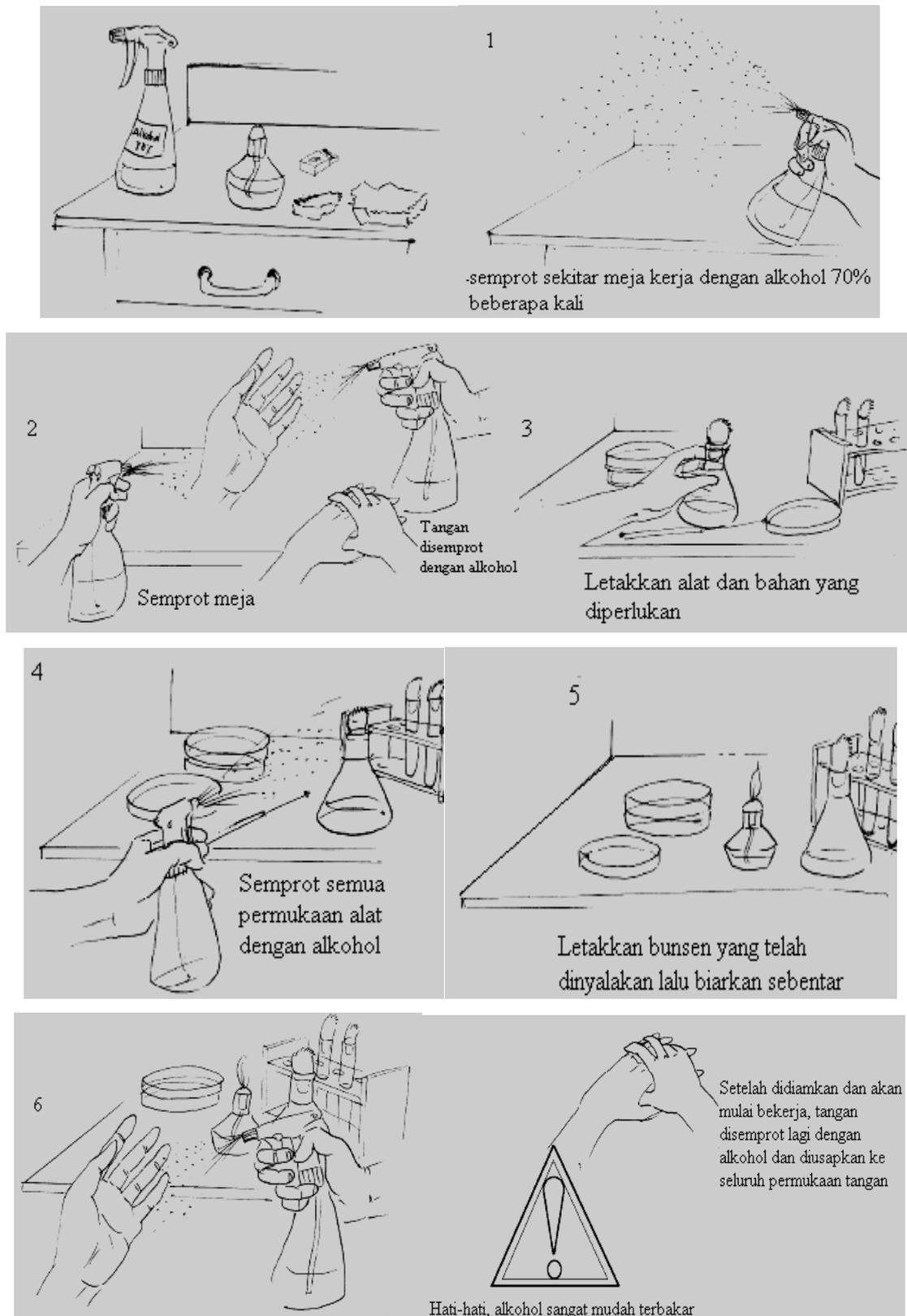
Di dalam teknik transfer aseptis ada beberapa teknik yang perlu dipahami, yaitu:

1. *Inoculating* (inokulasi) dengan jarum ose
 - a. Bakar jarum ose dari bagian pangkal dalam terus hingga ke bagian lup (ujung) sampai berpijar merah.
 - b. Biarkan selama beberapa detik sampai pijar menghilang, kemudia segera ambil tabung reaksi yang berisi kultur bakteri, buka penutupnya dengan ketiga jari tengah, manis dan kelingking sedangkan jari telunjuk dan ibu jari memegang jarum ose.
 - c. Bakar bibir tabung reaksi dengan cara memutar tabung sehingga semua bagian bibir tabung terkena api.
 - d. Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung reaksi, lalu segera lakukan di dekat pembakar Bunsen.
 - e. Bakar kembali bibir tabung rekasi dan segera tutup. Ingat, jarum ose jangan di bakar kembali karena akan membunuh bakteri yang akan diinokulasikan.
 - f. Ambil tabung reaksi lainnya yang akan diinokulasi, buka tutupnya dengan cara yang sama dengan cara (b) dan bakar bibirnya dengan cara yang sama dengan cara (c)
 - g. Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung tadi sebagaimana cara (d)
 - h. Bakar bibir tabung reaksi dan tutup sebagaimana cara (c)
 - i. Bakar kembali jarum ose sebagaimana cara (a)
 - j. Lakukan kembali dengan cara yang sama apabila diperlukan dilusi atau pengenceran.
2. *Pipetting* (mentransfer dengan pipet)
 - a. Ambil pipet yang telah steril, buka pembungkusnya dan pasang bola karetnya.
 - b. Bakar ujungnya dibakar atas Bunsen selama beberapa detik. Jangan terlalu lama karena dapat merusak ujung pipet.
 - c. Ambil tabung reaksi yang berisi kultur bakteri, buka penutupnya dengan kedua jari manis dan kelingking sedangkan jari telunjuk, jari tengah dan ibu jari memegang pipet.
 - d. Segera masukkan pipet ke dlaam tabung reaksi, tekan katup karet penghisap tombol (S) lalu segera keluarkan. Usahakan ketika memasukkan pipet jangan sampai menyentuh dinding tabung dan lakukan di dekat pembakar Bunsen.
 - e. Bakar kembali bibir tabung reaksi dan segera tutup.

- f. Ambil tabung reaksi lainnya yang akan diinokulasi, buka tutupnya dengan cara yang sama dengan cara (b) dan bakar bibirnya dengan cara (c)
 - g. Segera masukkan pipet ke dalam tabung tadi, kemudian keluarkan cairan yang telah diinokulasi dari pipet dengan menekan tombol (E).
 - h. Bakar bibir tabung reaksi dan tutup sebagaimana cara (C).
 - i. Pindahkan pipet dan ganti dengan pipet baru apabila akan melakukan *pipetting* kembali.
 - j. Lakukan kembali dengan cara yang sama apabila diperlukan dilusi atau pengenceran.
3. *Alcohol Flaming* (menstransfer dengan forcep yang dibakar dengan alcohol 98%) biasanya digunakan untuk meletakkan kertas cakram atau instrument lain ke dalam cawan petri yang berisi.
- a. Ambil forcep (pinset), celupkan ujungnya ke dalam alcohol. Lalu segera bakar ujungnya di atas Bunsen selama beberapa detik secara mendatar. Ingat, jangan miring.
 - b. Ambil kerats cakram steril atau instrument lainnya dengan forcep tadi.
 - c. Ambil tabung reaksi yang berisi zat antimicrobial, celupkan kertas cakram tadi ke dalam cairan di dalam tabung reaksi.
 - d. Ambil cawan petri yang telah berisi biakan bakteri di dalam agar, buka penutupnya dengan cara memiringkan beberapa derajat hingga hanya pada satu sisi bagian saja yang terbuka. Ingat jangan terlalu lebar mebukanya atau membuka seluruh tutupnya dari cawan.
 - e. Segera masukkan kertas cakram steril atau instrument lainnya dengan forcep secara hati-hati agar tidak merusak permukaan agar. Lakukan di dekat pembakar Bunsen
 - f. Segera tutup dan bakar kembali bibir cawan.
 - g. Lakukan kembali dengan cara yang sama apabila diperlukan.

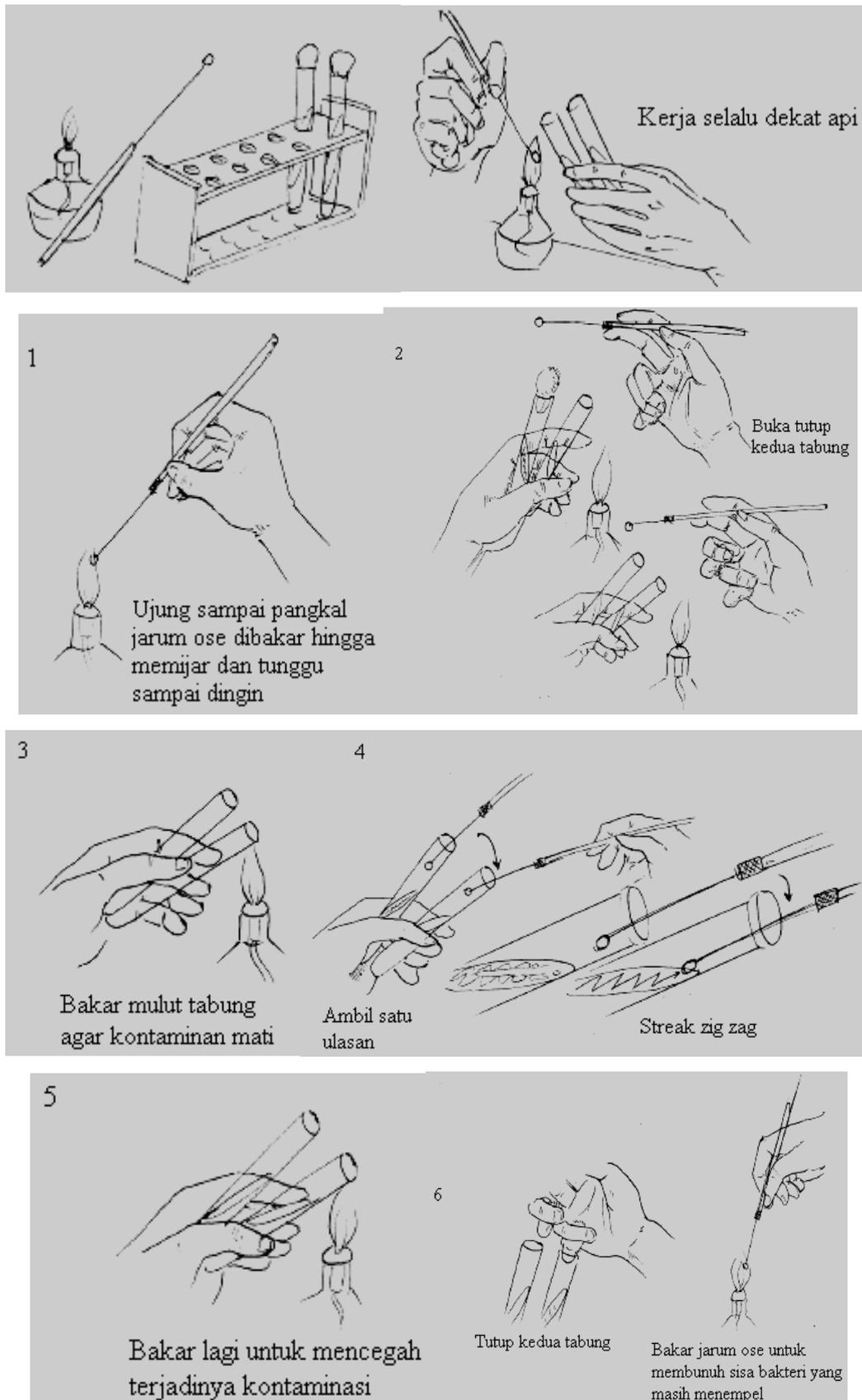
Cara Kerja Teknis Transfer Aseptis:

1) Desinfeksi meja kerja



Gambar 1.1 Langkah desinfeksi meja kerja

2) Memindahkan biakan secara aseptis



Gambar 1.2 Langkah inokulasi secara aseptis

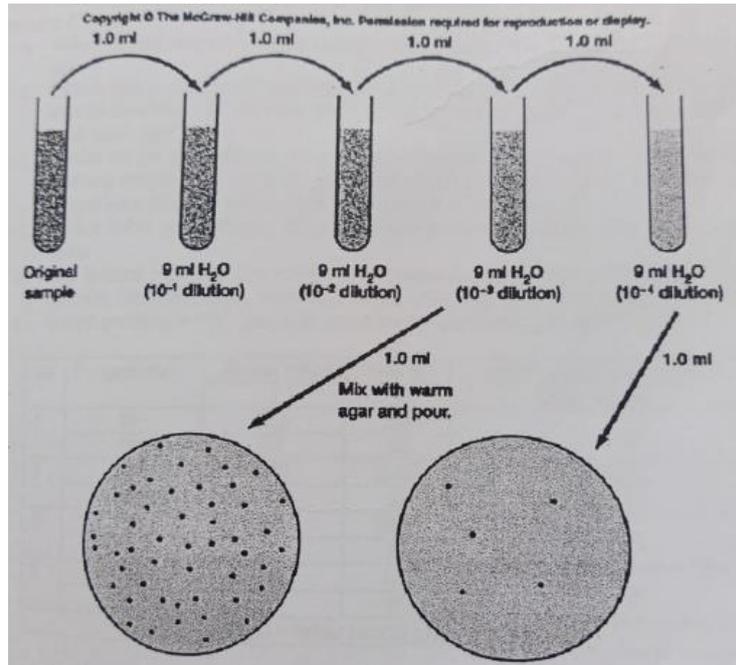
3. Inokulasi dan Isolasi Bakteri

Mikrobia di lingkungan mana saja pada umumnya berada dalam populasi campuran. Di alam sangat jarang mikrobia berada sebagai satu spesies tunggal. Dalam bidang mikrobiologi dan bioteknologi, ketersediaan biakan murni sangatlah penting. Karakter biakan (morfologi dan fisiologi) dari suatu spesies hanya dapat dipelajari apabila spesies tunggal mikrobia terpisah dari populasi campurannya. Selain itu pemeliharaan kemurnian spesies/isolate tunggal selama penyimpanan juga sangat perlu diperhatikan karena berkaitan dengan menjaga potensinya untuk menghasilkan produk atau metabolit tertentu. Untuk itu pertama-tama spesies tersebut harus dapat dipisahkan (di isolasi) dari spesies lain. Kemudian melalui teknik pemurnian, spesies tersebut ditumbuhkan menjadi biakan murni dimana sel selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal.

Teknik isolasi/pemisahan dilakukan dengan berbagai cara, antara lain: melakukan pengenceran berseri (dilusi) dilanjutkan dengan pembiakan pada media yang sesuai dengan metode cawan tuang (*pour plate*), cawan sebar (*spread plate*) atau cawan gores (*streak plate*). Metode ini didasarkan pada prinsip yang sama yaitu mengencerkan populasi mikroba sedemikian rupa sehingga individu spesies dapat dipisahkan dari lainnya. Setelah dibiakkan di media akan terlihat sejumlah koloni yang terpisah. Setiap koloni tersebut berasal dari satu sel tunggal yang memperbanyak diri saat inkubasi.

- **Teknik *Pour Plate* (Lempeng tuang)**

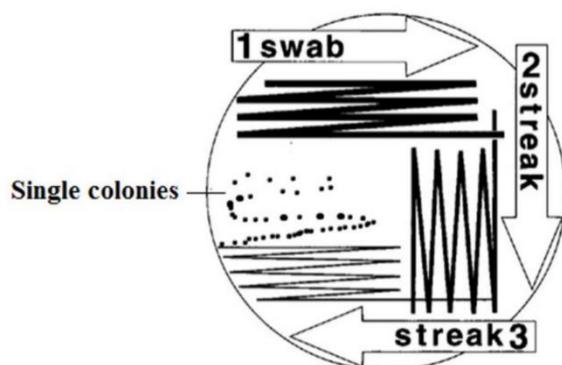
Teknik *pour plate* (lempeng tuang) adalah suatu teknik untuk memperoleh koloni murni dari populasi campuran mikroorganisme. Teknik ini dilakukan dengan mencampurkan media agar yang masih cair dengan stok kultur bakteri. Medium agar dicairkan dengan pemanasan dalam *waterbath* dan didinginkan (50°C), kemudian dituang ke cawan/plate. Teknik ini biasa digunakan pada uji TPC (*Total Plate Count*). Kelebihan teknik ini adalah mikroba yang tumbuh dapat tersebar merata pada media agar. Metode ini memboroskan bahan dan waktu, namun tidak memerlukan ketrampilan yang terlampau tinggi.



Gambar 1.3 Teknik Pengenceran Berseri

- **Teknik *Streak Plate* (Lempeng Gores)**

Teknik *streak plate* (lempeng gores) adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme dengan cara menstreak (mengoress) permukaan agar dengan jarum ose yang telah diinokulasikan dengan kultur bakteri. Teknik ini juga dapat digunakan untuk memperoleh koloni murni dari populasi campuran mikroorganisme selain teknik pour plate dan spread plate. Dengan teknik ini mikroorganisme yang tumbuh akan tampak dalam goresan-goresan inoculum bekas dari streak jarum ose. Metode ini dapat menghemat bahan dan waktu. Namun untuk memperoleh hasil yang baik, diperlukan ketrampilan yang biasanya dapat diperoleh dari pengalaman. Jika metode ini dilaksanakan dengan baik, akan memperoleh koloni tunggal mikroba seperti yang diinginkan. (Cari gambar/metode inokulasi untuk modul 1)



Gambar 1.4. Cawan goresan isolasi bakteri yang memperlihatkan:

Inokulasi massa dari suspense sel
 Goresan permulaan dari inokulasi massa dengan menggunakan ose yang dilewatkan nyala api dan didinginkan.
 Goresan kedua
 Goresan ketiga, koloni-koloni tunggal seharusnya tumbuh di areal ini

4. Preservasi Mikroorganisme

Perawatan mikroba merupakan kunci penting dalam bidang mikrobiologi. Perawatan mikroba untuk jangka pendek dan jangka panjang merupakan langkah penting dalam bidang penelitian mikrobiologi, agar aktivitas metabolismenya tetap tidak berubah. Tujuan perawatan (preservasi) mikroorganisme adalah untuk menahan laju aktivitas mikroba sehingga viabilitas tetap terjaga dan untuk mengawetkan isolat tanpa adanya perubahan yang signifikan. Metode pengawetan ditentukan oleh karakteristik mikroba, meliputi karakteristik morfologi, karakteristik fisiologis, biokimia, serta kemampuan tumbuh di lingkungan alami atau buatan. Teknik pengawetan dan konservasi mikroba membutuhkan waktu yang lama, panjang dan kompleks. Hal ini terkait dengan tujuan utama konservasi yaitu untuk menurunkan laju metabolisme mikroorganisme untuk mempertahankan viabilitas dan menyimpan isolat dengan baik agar karakteristik morfologinya tidak berubah. Teknik pelestarian jangka pendek adalah perpindahan kultur secara teratur (berkala). Penyimpanan isolat jangka pendek dan menengah meliputi penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air, manik-manik porselen steril, lembaran gelatin dan P₂O₅.

5. Morfologi Mikroorganisme

Secara umum, mikroorganisme dapat dibagi menjadi 3, yaitu ragi atau *yeast*, bakteri, dan jamur yang dapat diidentifikasi morfologinya. Pengamatan morfologi *yeast* dapat dilakukan secara makroskopik maupun mikroskopik. Pengamatan makroskopik yang perlu diperhatikan antara lain warna koloni, tekstur koloni, keadaan permukaan koloni, dan permukaan tepi koloni. Pengamatan mikroskopik yang perlu diperhatikan antara lain bentuk sel, ada tidaknya pertunasan (*budding*), banyaknya tunas pada tiap sel, askospora, dan ada tidaknya miselium semu (*pseudomycelium*) (Gandjar dkk., 1992).

Pengamatan morfologi kapang dapat dilakukan secara makroskopik maupun mikroskopik. Hal-hal yang perlu diperhatikan pada pengamatan makroskopis adalah tekstur permukaan koloni (berbutir-butir/granular, beludru/velvety, kapas/wooly, floccose), warna koloni, warna sebalik koloni (*reverse colony*), ada tidaknya zona pertumbuhan, ada tidaknya garis atau lingkaran konsentris (*zonation*), ada tidaknya garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni (*radial furrow*), ada tidaknya bau yang khas, dan ada tidaknya exudate drops. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pengamatan mikroskopik ialah struktur pendukung sel generatif (*sporangiofor* atau *konidiofor*), struktur penghasil sel generatif (*sporangium* atau *fialid*), bentuk dan ukuran sel generatif

(spora/konidia), dan keadaan miselium (bercabang atau tidak, berseptum atau tidak) (Gandjar dkk., 1992; Gandjar dkk, 2000). Morfologi makroskopis pada bakteri dapat diamati karakteristiknya melalui bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni dan warna koloni. Karakteristik morfologi secara mikroskopis yaitu meliputi sifat gram dan bentuk sel bakteri tersebut. (Zuraidah dkk., 2020)

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan:

- Cawan petri
- Pipet ukur 1 ml
- Pipet ukur 10 ml
- Tabung reaksi
- Ballpipet
- Spidol
- Erlenmeyer 250 ml
- Jarum ose
- Bunsen
- Vial tube

Bahan yang digunakan:

- Media NA (*Nutrient Agar*)
- Larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) atau buffer pepton
- Sampel tanah
- *Saccharomyces cerevisiae*
- Gliserol 60%

D. Prosedur Kerja

A. Teknik Inokulasi

- **Teknik *Streak Plate* (Lempeng Gores)**
 - a. Tuang media agar cair (*Nutrient Agar*) ke dalam cawan petri steril, lalu biarkan hingga memadat.
 - b. Bakar jarum ose dari bagian pangkal dalam terus hingga ke bagian lup (ujung) sampai berpijar merah.

- c. Bakar bibir tabung reaksi yang berisi kultur bakteri dengan cara memutar tabung sehingga semua bagian bibir tabung terkena api.
- d. Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung reaksi, lalu segera keluarkan. Usahakan ketika memasukkan jarum ose jangan sampai menyentuh dinding tabung dan lakukan di dekat pembakar Bunsen.
- e. Streak ke atas permukaan agar dengan perlahan – lahan. Ingat, usahakan jangan sampai agar hancur atau tergores.
- f. Inkubasi dilakukan pada suhu 30 C, untuk bakteri selama 24 jam. Inkubasi dilakukan dengan posisi cawan terbalik.

● **Teknik Isolasi dengan *Streak Plate* (Lempeng Gores)**

- a. Larutkan 0.1 g sampel tanah ke dalam 50 mL larutan garam fisiologis.
- b. Lakukan pengenceran (10^1 , 10^2 , 10^3 , ... 10^x kali) dari larutan sampel tanah (Gambar 1.3)
- c. Bakar jarum ose dari bagian pangkal dalam terus hingga ke bagian lup (ujung) sampai berpijar merah
- d. Bakar bibir tabung reaksi yang berisi kultur bakteri dengan cara memutar tabung sehingga semua bagian bibir tabung terkena api.
- e. Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung reaksi, lalu segera keluarkan. Usahakan ketika memasukkan jarum ose jangan sampai menyentuh dinding tabung dan lakukan di dekat pembakar Bunsen.
- f. Bagi empat permukaan atas cawan petri yang akan digores dengan spidol atau lainnya (mengikuti Gambar 1.4).
- g. Inokulasikan ke dalam cawan petri berisi *nutrient agar* yang telah memadat pada salah satu kuadran.
- h. Streak ke atas permukaan agar dengan perlahan – lahan. Ingat, usahakan jangan sampai agar hancur atau tergores.
- i. Sebelum berpindah dari satu kuadran ke kuadran berikutnya, lakukan pemanasan/pensterilan ose. Selanjutnya, streak ose dari ujung kuadran satu ke area kuadran kedua, begitu seterusnya hingga kuadran empat (arah streak pada permukaan agar mengikuti pembagian bidang pada Gambar 1.4).
- j. Inkubasi dilakukan pada suhu 30 C selama 24 jam dengan posisi cawan terbalik.
- k. Amati dan identifikasi mikroorganisme yang tumbuh pada media.

- **Teknik Preservasi**

- a. Sterilisasi larutan gliserol 60%
- b. Campurkan 0.5 mL suspensi sel *Saccharomyces* dalam media cair dan 0.5 mL gliserol 60% ke dalam vial menggunakan vortex dan diamkan pada suhu kamar selama 20 menit.
- c. Vial kemudian dimasukkan ke dalam kotak polystyrene, dengan dinding setebal 15 mm dan kapasitas 1 L kemudian dikemas dengan kertas dan kapas untuk insulasi.
- d. Chamber dimasukkan ke dalam refrigerator pada suhu 4°C selama 1 jam kemudian dimasukkan ke dalam freezer pada suhu -20°C.
- e. Amati hal yang terjadi pada suspensi sel.

Tugas:

1. Mengapa media yang dimasukkan dalam tabung reaksi jika ingin digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme harus dimiringkan?
2. Jelaskan keuntungan dan kerugian menggunakan media yang diletakkan dalam tabung reaksi dan *petri dish*!
3. Apa tujuan sterilisasi?
4. Sebut dan jelaskan jenis-jenis sterilisasi!
5. Jelaskan prinsip kerja autoklaf!
6. Mengapa sterilisasi dengan autoklaf menggunakan temperatur tinggi, tekanan tinggi dan dalam waktu yang singkat?
7. Apa perbedaan yang terjadi jika satu sampel dilakukan dengan aseptis sedangkan sampel yang lain secara non-aseptis?
8. Analisis hasil yang Anda dapatkan!
9. Apa fungsi dari streak mengikuti pola Gambar 1.4?
10. Mengapa *single colony* mikroorganisme disimpan di dalam larutan gliserol?

Daftar Pustaka:

ATCC®. Bacterial Culture Guide, tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages, 2015.

Dwijoseputro, D. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djemberan: Malang.

Gupte, Satish. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Binarupa Aksara.

Nuniek Hendriane, I. Tjondronegoro, Musfil A. S. 2001. *Diktat Kuliah Mikrobiologi Industri*. Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.

Pelczar, M. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Erlangga: Jakarta.

Petunjuk Praktikum M.K. *Mikrobiologi Pertanian Prodi Agroteknologi* (Agustus 2014-Januari 2015), Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah, Fakultas Pertanian, UNS.

S.M. Alnaimat and S. Abushattal, Laboratory manual in general microbiology for undergraduate students, Al-Hussein Bin Talal University, Jordan, 2012.

Winarni, D. 1997. *Diktat Teknik Fermentasi*. Program D3 Teknik Kimia FTI ITS: Surabaya.

MODUL 2 TEKNIK PERHITUNGAN KONSENTRASI MIKROORGANISME

A. Tujuan: Mahasiswa dapat menghitung konsentrasi mikroorganisme dengan metode *cell dry weight* (CDW) dan lempeng sebar (*spread plate*)

B. Dasar Teori:

Biomassa mikroba adalah salah satu variabel penting dalam riset yang berkaitan dengan mikrobiologi. Parameter ini sering kali diperlukan untuk penentuan kinetika pertumbuhan mikroba sebagai pengembangan efisiensi proses microbial (Li dan Mira de Orduna, 2010). Dalam penentuan konsentrasi mikroba, dua metode yang umum digunakan adalah *cell dry weight* (CDW) dan *spread plate*. Prinsip CDW adalah menentukan biomassa atau konsentrasi mikroorganisme dengan mengukur berat kering mikroorganisme. Sel dipisahkan dari media dengan sentrifus atau filtrasi, lalu dicuci, dikeringkan di oven, dan ditimbang. CDW dapat mewakili konsentrasi mikroba yang ada sebab peningkatan jumlah sel berbanding lurus dengan peningkatan massa sel total (Willey dan Woolverton, 2008).

Teknik *spread plate* (lempeng sebar) adalah suatu teknik untuk memperoleh koloni murni dari populasi campuran mikroorganisme. Teknik ini dilakukan dengan menyebarkan suspensi mikroba di permukaan media agar yang telah memadat dengan menggunakan rod-L (Batang L) atau spatula Drigalski. Dengan teknik ini mikroba hanya tumbuh di permukaan, bukan di bawah permukaan agar. Jumlah mikroba yang tumbuh dalam bentuk koloni juga bisa dihitung. Metode ini biasa digunakan untuk mengisolasi jamur meskipun juga umum digunakan untuk bakteri.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan:

- Mikropipet 1000 μL
- Pipet ukur 25 mL
- Filtering apparatus
- Kertas saring
- Pompa vakum
- Cawan petri
- Bola hisap
- *Centrifuge tube*
- Cawan arloji
- Neraca digital
- *Bunsen burner*
- Magnetic stirrer
- *Beaker glass*
- Labu erlenmeyer

- Batang L/spatula Drigalski
- Oven
- Spektrofotometer
- Shaker
- Inkubator
- Autoklaf
- Jarum ose
- Pinset
- Desikator

Bahan yang digunakan:

- Nutrient Broth
- Nutrient Agar
- Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
- Kertas alumunium foil
- Kertas coklat
- Aquades steril
- Plastik
- Kain Kasa
- Blue tip

D. Prosedur Kerja

D.1. Pembuatan media *nutrient broth* untuk metode *cell dry weight*

1. Melarutkan 1,3 g *Nutrient Broth* dalam 100 ml aquades di gelas beaker. Gunakan *magnetic stirrer* untuk menghomogenkan larutan.
2. Pindahkan media *nutrient broth* ke labu erlenmeyer dan tutup dengan penyumbat kain kasa.
3. Sterilisasi media *nutrient broth*, aquades, pipet ukur 25 mL (3 buah), pipet ukur 5 mL (1 buah) dan *centrifuge tube* menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
4. Dinginkan media sampai mencapai suhu ruang.
5. Mengambil 1 ose *Saccharomyces cerevisiae* dari media padat yang telah disediakan, kemudian di inokulasikan ke dalam 100 ml media *nutrient broth*
6. Menutup labu erlenmeyer dengan penyumbat kain kasa dan kertas coklat.
7. Menginkubasi *S. cerevisiae* pada suhu ruang selama 24 jam dengan kecepatan shaker 160 rpm.

D.2. Menghitung konsentrasi sel mikroba dengan metode *cell dry weight*

1. Membuat suspensi *S. cerevisiae* pada berbagai konsentrasi. Caranya adalah mencampurkan kultur *S. cerevisiae* yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dengan air steril dalam *centrifuge tube* dengan perbandingan 1:1, 1:2, 1:4 (v/v) dimana total volume pengenceran = 30 mL).
2. Menghomogenkan suspensi sel menggunakan vortex dengan kecepatan sedang atau menggunakan tangan dengan cara dikocok perlahan.
3. Mengukur dan mencatat nilai absorbansi masing-masing pengenceran pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer. Pastikan nilai absorbansi berada pada rentang 0,3-1. Jika nilai absorbansi lebih dari 1, diperlukan pengenceran lagi.
4. Catatan: volume sampel yang dibutuhkan untuk spektrofotometer = 3 mL.
5. Menimbang kertas saring kosong.
6. Menghomogenkan suspensi sel menggunakan vortex dengan kecepatan sedang atau menggunakan tangan dengan cara dikocok perlahan.
7. Menyaring 20 mL suspensi sel yang telah homogen menggunakan filtering apparatus yang dilengkapi pompa vakum. Teteskan suspensi sel secara bertahap pada bagian tengah kertas saring. Upayakan suspensi sel tidak menggenang di atas kertas saring.
8. Mengambil kertas saring menggunakan pinset dan meletakkannya ke dalam cawan petri
9. Meletakkan cawan petri berisi kertas saring dan sel ke dalam oven bersuhu 110 °C selama 20 menit.
10. Mengeluarkan cawan petri berisi kertas saring dan sel dari oven lalu meletakkannya ke dalam desikator ± 5 menit dan menimbanginya.
11. Mengulang prosedur no. 9 dan 10 hingga mendapatkan berat konstan.
12. Menghitung konsentrasi sel dengan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi sel (g/L)} = \frac{(A - B)}{C}$$

Di mana:

A = berat kertas saring dan sel kering (g)

B = berat kertas saring kosong (g)

C = volume sampel (L)

13. Membuat kurva kalibrasi dengan cara memplot antara absorbansi vs konsentrasi sel

D.3. Pembuatan media *nutrient agar* untuk metode *Spread Plate*

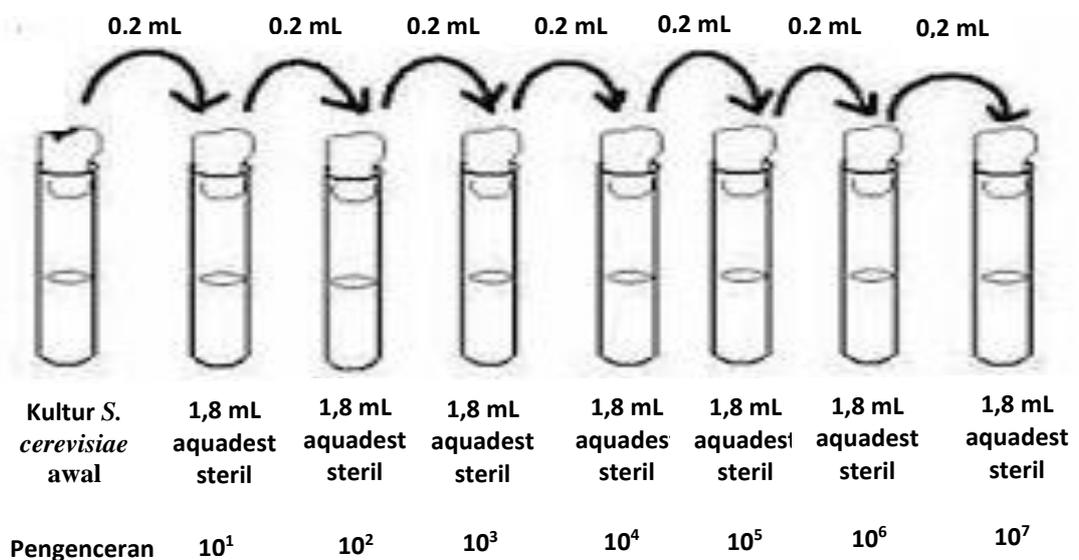
1. Melarutkan 2,8 g Nutrient Agar dalam 100 mL aquades di gelas beaker. (Untuk 5 cawan petri).

2. Tutup bagian atas gelas beaker dengan kertas aluminium foil lalu letakkan di atas *hotplate stirrer* dan setting kecepatan putarnya 300 rpm dan suhu 300°C.
3. Memindahkan media agar ke labu erlenmeyer lalu tutup erlenmeyer dengan penyumbat kain kasa dan kertas coklat
4. Mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
5. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, dinginkan media hingga suhu ± 50 °C agar tidak membentuk banyak embun di dalam cawan petri.
6. Menuangkan media ke dalam cawan petri ± 20 mL untuk setiap cawan petri.
7. Dinginkan media agar pada suhu ruang selama $\pm 3-4$ jam sampai memadat sebelum digunakan untuk menginokulasi sel mikroba.

D.4. Menghitung konsentrasi sel mikroba dengan metode *spread plate*

1. Melakukan pengenceran majemuk dari kultur sel *S. cerevisiae* dengan faktor pengenceran 10^1 sampai 10^{10} .

Contoh: Pengenceran 10^1 dilakukan dengan cara mencampurkan 0,2 ml kultur *S. cerevisiae* awal dengan 1,8 ml aquadest steril di dalam *centrifuge tube*. Selanjutnya pengenceran 10^2 dilakukan dengan cara mencampurkan 0,2 ml suspensi sel *S. cerevisiae* dari pengenceran 10^1 dengan 1,8 ml aquadest steril, dan seterusnya.



2. Menghomogenkan suspensi sel (pengenceran 10^5) menggunakan vortex dengan kecepatan sedang atau menggunakan tangan dengan cara dikocok perlahan.

3. Mentransfer 100 μL suspensi sel ke *nutrient agar* dalam cawan petri.
4. Sterilisasi batang L/spatula Drigalski dengan cara dicelupkan ke dalam etanol lalu bakar. Tunggu hingga tidak panas lagi.
5. Buka tutup cawan yang berisi media agar yang telah diinokulasi kemudian sebarkan inokulum secara merata dengan menggunakan batang L/spatula Drigalski. Usahakan jangan sampai agarnya hancur atau tergores.
6. Lakukan penyebaran tersebut hingga merata di permukaan agar.
7. Tutup cawan petri dan letakkan cawan petri pada posisi *upside down*.
8. Membakar batang L lalu mendinginkan. Selanjutnya mencelupkan batang L ke dalam etanol dan membakar kembali batang L, lalu dinginkan untuk proses selanjutnya.
9. Ulangi prosedur 2–8 untuk sampel suspensi lainnya (pengenceran $10^6 - 10^{10}$).
10. Bungkus cawan petri dengan kertas coklat dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 $^{\circ}\text{C}$.
11. Pastikan posisi cawan petri pada posisi *upside down*.
12. Setelah 24 jam, hitung jumlah koloni yang tumbuh pada permukaan agar.
13. Menghitung konsentrasi sel dengan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi sel (CFU/mL)} = \frac{\text{Jumlah koloni terhitung} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume sampel}}$$

Tugas:

1. Jelaskan perbedaan menghitung konsentrasi sel mikroorganisme menggunakan metode *cell dry weight* (CDW) dan metode *spread plate*.
2. Jika anda memiliki kultur fungi, yeast dan bakteri, metode perhitungan sel yang mana yang sesuai untuk ketiganya. Jelaskan.
3. Mengapa dalam metode *spread plate* diperlukan pengenceran sebelum dilakukan inokulasi pada media agar?
4. Lakukan analisa terhadap kurva kalibrasi yang diperoleh. Apakah kurva kalibrasi yang diperoleh memiliki R^2 mendekati 1? Jika tidak, apa penyebabnya dan bagaimana solusinya agar R^2 mendekati 1?

Daftar Pustaka:

- Li, E. & Orduna, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyzer with an infrared. *Letters in Applied Microbiology*, 50, pp. 283-288.
- Willey, J.A., Sherwood, R.M., & Woolverton, C.J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology 7th Ed. McGraw-Hill Companies, Inc. New York.

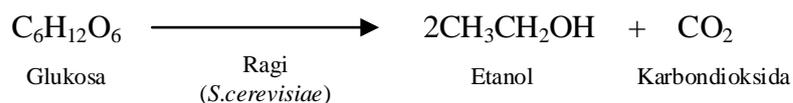
MODUL 3 KINETIKA FERMENTASI

A. Tujuan: Mahasiswa dapat menentukan parameter kinetika fermentasi glukosa menjadi alkohol

B. Dasar Teori

Fermentasi merupakan proses dimana substrat dikonversi menjadi produk-produk sebagai akibat dari pertumbuhan dan aktivitas metabolik mikroorganisme. Istilah ‘fermentasi’ (*fermentation*) berasal dari bahasa Latin *fervere* yang berarti mendidih, sehingga mendeskripsikan adanya tindakan ragi (*yeast*) pada ekstrak buah atau biji-bijian yang dicampur ragi (Stanbury dkk., 1995). Khamir mampu memfermentasi glukosa, fruktosa dan maltosa menjadi bioetanol namun masing-masing spesies mempunyai kecepatan yang berbeda di dalam menggunakan jenis gula yang ada. Mikroorganisme yang bertanggung jawab pada proses fermentasi meliputi bakteri, ragi (*yeast*), dan jamur (*fungi*). Pemilihan mikroorganisme biasanya didasarkan pada jenis karbohidrat yang digunakan sebagai medium. Proses-proses fermentasi kadang-kadang melibatkan satu komponen substrat dan satu mikroorganisme, tetapi kadang-kadang bisa melibatkan sebuah campuran yang kompleks dari substrat-substrat dan sejumlah mikroorganisme (Batt, 2016).

Berdasarkan substratnya, dikenal fermentasi karbohidrat dan fermentasi senyawa N organik. Macam-macam fermentasi karbohidrat antara lain: fermentasi alkohol oleh ragi atau bakteri, fermentasi asam laktat, fermentasi asam propionat, fermentasi asam butirat, fermentasi asam campuran, dan fermentasi butanadiol (Hendriani dkk., 2001). Fermentasi alkohol terutama dilakukan oleh ragi, khususnya *Saccharomyces cerevisiae* yang bersifat anaerob fakultatif. Pada fermentasi alkohol, biakan (*culture*) *Saccharomyces yeast starter* digunakan untuk menginisiasi fermentasi secepat mungkin. Berikut adalah reaksi fermentasi glukosa menjadi etanol:



Fermentasi etanol dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain yaitu substrat, suhu, nutrisi, pH, konsentrasi substrat dan waktu fermentasi (Prescott dkk., 1959). Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* mampu tumbuh dengan cepat dan mempunyai toleransi terhadap konsentrasi gula yang tinggi, mampu menghasilkan alkohol dalam jumlah yang banyak dan tahan terhadap alkohol tersebut (Simanjuntak, 2009). Untuk

memperoleh hasil fermentasi yang optimum, persyaratan untuk pertumbuhan ragi harus diperhatikan, yaitu pH dan kadar karbohidrat dari substrat, suhu selama fermentasi, kemurnian dari ragi itu sendiri. Suhu dan pH optimum untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, berturut-turut adalah 28–36°C dan 4,5–5,5 (Simanjuntak, 2009).

Kinetika fermentasi *batch* diperlukan untuk merancang ukuran fermentor dan peralatannya. Hasil kinetika fermentasi *batch* akan memperkirakan kecepatan pertumbuhan dan pembentukan produk (Russel, 1987). Model kinetika terdiri dari kinetika pertumbuhan sel, penggunaan substrat dan pembentukan produk. Pada kinetika pertumbuhan sel umumnya menggunakan model persamaan Monod (Persamaan 1). Persamaan Monod merupakan homolog dari persamaan Michaelis-Menten. Untuk mendapatkan parameter kinetika μ_{\max} dan K_s , maka persamaan Monod (1) dapat dilinierisasi.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{(K_s + S)} \dots\dots\dots (1)$$

dimana,

- μ = kecepatan spesifik (laju pertumbuhan spesifik mikroba)
- μ_{\max} = kecepatan maksimum spesifik
- S = konsentrasi substrat
- K_s = konstanta Monod

Pada kinetika penggunaan substrat dan pembentukan produk dapat dilakukan pendekatan dengan model persamaan Michaelis-Menten (Hadiyanto & Azim, 2016). Persamaan 2 menunjukkan persamaan dasar kecepatan reaksi penggunaan substrat dan pembentukan produk pada fermentasi. Untuk mendapatkan parameter kinetika r_{\max} dan K_m , maka persamaan Michaelis-Menten (1) dapat dilinierisasi (Fatimah dkk., 2013).

$$r = \frac{dC_p}{dt} = \frac{-dC_s}{dt}$$

$$r = \frac{dP}{dt} = \frac{-dS}{dt} = \frac{r_{\max} S}{(K_m + S)}$$

dimana,

- r = laju/kecepatan reaksi (gr/ml.jam)
- r_{\max} = laju/kecepatan reaksi maksimum (gr/ml.jam)
- S = konsentrasi substrat (gr/ml)

t = waktu (jam)

K_m = konstanta Michaelis-Menten

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan:

1. Fermentor
2. *Beaker glass*
3. Saringan
4. Suntikan (*syringe*)
5. Gelas ukur
6. Kaca arloji
7. Spatula
8. Erlenmeyer

Bahan yang digunakan:

1. Ragi
2. NPK
3. Urea
4. Glukosa
5. Akuades
6. NaOH 1 M
7. HCl 1 M
8. N₂

Prosedur Kerja

Bagian 1: Pembuatan Media Fermentasi

1. Sediakan 100 mL aquades
2. Tambahkan glukosa sebanyak 2 g ke dalam aquades
3. Tambahkan urea sebanyak 0,02 g dan NPK sebanyak 0,01 g
4. Aduk hingga homogen
5. Cek pH media fermentasi (pH= 5) menggunakan pH Universal
6. Tuangkan ke dalam fermentor (Erlenmeyer)
7. Sterilisasi larutan menggunakan autoklaf pada suhu 12 °C selama 15 menit

Bagian II: Fermentasi menggunakan ragi

1. Siapkan fermentor yang berisi media fermentasi
2. Tambahkan 2 g ragi ke dalam 10 mL akuades steril dan aduk
3. Tambahkan suspensi ragi ke dalam media fermentasi
4. Tutup fermentor yang sudah terhubung dengan saluran sparging dan sampling
5. Lakukan sparging media menggunakan gas N₂ selama 20 detik.
6. Lakukan pengamatan selama 7 hari

Bagian III: Pengamatan

1. Lakukan pengukuran absorbansi kultur *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan spektrofotometer dan tentukan konsentrasi sel menggunakan kurva kalibrasi (Modul 2).
2. Lakukan pengukuran konsentrasi ethanol menggunakan *alcohol refractometer*.
3. Lakukan pengukuran konsentrasi glukosa menggunakan *refractometer*.
4. Lakukan pengamatan aktivitas mikroorganisme di dalam fermentor.
5. Pengamatan setiap variabel dilakukan selama 7 hari.

Tugas

1. Tentukan nilai μ_{max} dan K_s pada proses fermentasi yang Anda lakukan
2. Jabarkan perubahan sel, produk maupun substrat selama pengamatan

Daftar Pustaka:

- Batt, Carl A. 2016. *Microbiology of Fermentations*. Elsevier.
- Fatimah, Febrina Lia G, & Lina Rahmasari G. (2013). KINETIKA REAKSI FERMENTASI ALKOHOL DARI BUAH SALAK. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 2(2). <https://doi.org/10.32734/jtk.v2i2.1432>.
- Hadiyanto, & Azim, M. (2016). Dasar-Dasar Bioproses. In *Center of Biomass and Renewable Energy (C-BIORE)*.
- Hendriani Nuniek, I. Tjondronegoro, Musfil A. S. 2001. *Diktat Kuliah Mikrobiologi Industri*. Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.
- Prescott, Cate, S. and Dunn, C.G. (1959), *Industrial Microbiology*, McGrawHill Book Company, Inc., New York.

Riswan Simanjuntak. 2009. *Studi Pembuatan Etanol dari Limbah Gula (Molase)*. Skripsi.
Departemen Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara.

Russel, P.D. (1987), *Fermentation and bioreactor design*, Elsevier applied science, London

Stanbury, Peter F., Allan Whitaker, Stephen J. Hall. 1995. *Principles of fermentation technology 2nd edition*. Elsevier Science Ltd.

MODUL 4 IMOBILISASI SEL

A. Tujuan:

- Mahasiswa dapat mengetahui prosedur pembuatan sel terimobilisasi
- Mahasiswa dapat memahami dan menguasai prosedur penggunaan sel terimobilisasi dalam fermentasi yang kemudian membandingkan hasilnya dengan fermentasi menggunakan *free cell*

B. Dasar Teori:

Imobilisasi merupakan suatu metode untuk menempatkan sel mikroba secara fisik pada suatu ruang tertentu dimana sel masih memiliki aktivitas katalitik serta dapat dipergunakan secara berkelanjutan dan berulang kali, dalam proses imobilisasi sel-sel biasanya tumbuh di permukaan atau terperangkap di dalam model, karena banyak mikroorganisme yang mampu melekat pada berbagai permukaan alami. Mikroorganisme dapat distabilkan pada matriks yang berbeda seperti menjebak dalam bahan berpori, penyerapan atau adhesi, penghambatan sel, dan ikatan kovalen serta ikatan ion (Hassanzadeh, dkk., 2017). Sel terimobilisasi dilekatkan pada suatu bahan inert dan tidak larut dalam bahan tersebut, misal dalam sodium alginat (Na-alginat) atau kalsium alginat (Ca-alginat) yang menyebabkan sel dapat lebih tahan terhadap perubahan kondisi seperti pH dan suhu (Sumo, 1993).

Imobilisasi dapat dilakukan terhadap sel maupun terhadap enzim. Imobilisasi enzim dapat dianggap sebagai metode yang merubah enzim dari bentuk larut dalam air “bergerak” menjadi keadaan “tak bergerak” yang tidak larut. Imobilisasi mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dan mempermudah memperoleh kembali enzim tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat/cair yang sederhana. Imobilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain melalui pengikatan kimiawi molekul enzim pada bahan pendukung, pengikatan silang intermolekuler sesama enzim, atau dengan cara menjebak enzim di dalam gel atau membran polimer (Palmer, 1991).

Imobilisasi sel berkembang setelah imobilisasi enzim. Dalam teknologi imobilisasi enzim terdapat hambatan pada regenerasi koenzim dan keterbatasan metode yang dapat diterapkan untuk menyusun molekul enzim dalam rangkaian tertentu, sehingga dapat melakukan tahapan reaksi katalis enzim yang berkesinambungan. Pencegahan terhadap hambatan tersebut dilakukan melalui penelitian-penelitian, sehingga terjadi pengembangan pada imobilisasi sel, yang dapat digunakan sebagai biokatalis. Hal ini memungkinkan untuk melakukan imobilisasi seluruh sel dan menjaga sel tetap hidup

(*viable*). Dalam prakteknya, metode yang digunakan adalah menjebak sel dalam gel dengan metode adsorpsi. Selain itu, pengontrolan perlu dilakukan untuk mencegah inaktivasi dari aktivitas metabolisme yang penting, sehingga pemisahan biokatalis dari produk lebih mudah dan membuat biokatalis lebih stabil (Sumo, 1993).

Dewasa ini, teknologi imobilisasi memegang peranan penting dalam perkembangan proses biokimia dalam suatu bioreaktor. Sel yang mengalami imobilisasi (*immobilized microbial cells*) telah banyak diterapkan dalam fermentasi misalnya produksi alkohol, asam amino, antibiotik atau pada degradasi polutan limbah cair.

Kekurangan penggunaan sel terimobilisasi adalah hambatan pada proses difusi baik substrat maupun produk yang terbentuk. Sedangkan kelebihan penggunaan sel terimobilisasi dibandingkan dengan sel bebas (*free cell*) antara lain sebagai berikut:

1. Imobilisasi menyediakan konsentrasi sel yang tinggi.
2. Imobilisasi memungkinkan penggunaan sel kembali dan mengurangi biaya *recovery* sel dan *recycle* sel.
3. Imobilisasi mengurangi masalah *wash out* sel pada laju alir yang tinggi.
4. Kombinasi konsentrasi sel yang tinggi dan laju alir yang tinggi (tanpa batasan *wash out*) menghasilkan produktivitas volumetric yang tinggi.
5. Imobilisasi menyediakan kondisi *micro environmental* yang menguntungkan seperti kontak antar sel, gradient nutrient-produk, *gradient* pH untuk sel sehingga menghasilkan kinerja biokatalis yang lebih baik (kecepatan pembentukan dan *yield* produk yang lebih tinggi).
6. Imobilisasi menyebabkan kestabilan genetik.
7. Imobilisasi menyediakan perlindungan terhadap kerusakan sel.

Secara umum, ada dua jenis sel imobilisasi yakni:

a. Imobilisasi Aktif

Imobilisasi ini dilakukan dengan dua metode yaitu metode penjeratan dan metode pengikatan. Metode penjeratan dilakukan secara fisik dalam matriks pendukung. Matriks pendukung yang bisa digunakan yaitu polimer *porous* (agar, *alginate*, *carrageenan*, *polyacrylamide*, *chitosan*, *gelatin*, *collagen*), porous metal screen, *polyurethane*, *silica gel*, *polystyrene*, dan selulosa triacetate. *Polymeric beads* harus cukup *porous* untuk keluar masuknya substrat dan produk. *Polymeric beads* biasanya dibentuk dengan menggunakan sel hidup di dalamnya.

b. Imobilisasi Pasif

Berbentuk *biological films* yang berbentuk lapisan-lapisan koloni sel yang tumbuh dan melekat pada permukaan pendukung yang padat. Material pendukung dapat bersifat inert atau aktif secara biologis. *Biological films* digunakan pada pengolahan limbah atau fermentasi mikroba dengan jamur.

Beberapa ahli menggolongkan metode imobilisasi dengan tiga kelompok, yaitu metode *carrier binding*, metode *cross linking*, dan metode *entrapping* (Ramakrishna & Prakasham, 2004). Pada metode *carrier binding*, enzim/sel diikatkan pada suatu matriks yang bersifat tidak larut dalam air. Sebagian matriks dapat digunakan bahan organik maupun anorganik. Metode *cross linking* didasarkan pada pembentukan ikatan intermolekuler antara molekul-molekul enzim/sel. Pada metode *entrapping*, imobilisasi enzim/sel didasarkan pada penempatan enzim/sel di dalam kisi dari suatu polimer atau di dalam membran yang bersifat semi permeabel. Teknik imobilisasi yang paling baik adalah yang memenuhi kriteria utama tidak terjadi perubahan konformasi enzim dan tidak mengganggu gugus fungsi di pusat aktif enzim sehingga enzim tetap dapat berfungsi.

Penjerat atau pembawa imobilisasi sel harus memiliki karakteristik antara lain:

1. Mudah digunakan serta ukuran dan porositas media penjerat dapat dikontrol, terutama pada skala industri.
2. Media penjerat berbentuk matrik stabil pada kondisi fermentasi (temperatur dan pH optimum).
3. Harga murah dan mudah didapat.
4. Mempunyai sifat mekanik yang stabil, sehingga dapat tahan dalam waktu yang lama dalam reaktor yang digunakan.
5. Penjerat harus *inert* terhadap mikroorganisme yang akan dijerat.
6. Substrat, produk, dan metabolisme lain harus dapat berdifusi secara bebas dengan media penjerat.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan:

1. Fermentor
2. *Beaker glass*
3. Saringan
4. Suntikan (*syringe*)
5. Gelas ukur
6. Kaca arloji

7. Spatula
8. Erlenmeyer

Bahan yang digunakan:

1. *Sodium alginate*
2. Ragi instan (*Saccharomyces cerevisiae*)
3. *Calcium chloride*
4. NPK
5. Urea
6. Glukosa
7. Akuades
8. NaOH 1 M
9. HCl 1 M
10. N₂

D. Prosedur Kerja

Bagian 1: Pembuatan media Fermentasi

1. Sediakan **100 ml** akuades
2. Tambahkan glukosa sebanyak **2 gram** ke dalam akuades
3. Tambahlan urea sebanyak **0,02 gram** dan NPK sebanyak **0,01 gram**
4. Aduk hingga homogen
5. Cek pH media fermentasi (pH = 5) menggunakan kertas pH universal. Untuk menetralkan media fermentasi bisa ditambahkan NaOH atau HCl
6. Tuangkan ke dalam fermentor (erlenmeyer)
7. Sterilisasi media fermentasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

Bagian 2: Pembuatan sel terimobilisasi

1. Timbang **0,2 gram** sodium alginat dan larutan ke dalam **10 ml** akuades, aduk hingga homogen
2. Tambahkan **2 gram** ragi ke dalam **10 ml** akuades, aduk hingga rata
3. Timbang **0,6 gram** *calcium chloride* dan larutkan ke dalam **40 ml** akuades. Aduk hingga homogen
4. Tambahkan suspensi ragi ke dalam larutan sodium alginat, aduk hingga rata

5. Ambil campuran larutan no 4 sebanyak **8 ml** dengan menggunakan *syringe* dan teteskan ke dalam larutan *calcium chloride* sehingga terbentuk pelet yang mengandung ragi
6. Biarkan pelet di dalam larutan *calcium chloride* selama 5 menit hingga pelet mengeras
7. Pisahkan pelet dari larutan *calcium chloride* dengan cara disaring dan bilas menggunakan akuades steril

Bagian 3: Fermentasi menggunakan *immobilized cell*

1. Siapkan fermentor berupa erlenmeyer yang berisi media fermentasi
2. Masukkan *immobilized cell* ke dalam fermentor
3. Tutup fermentor yang sudah terhubung dengan saluran *sparging* dan *sampling*
4. Lakukan *sparging* media menggunakan gas N₂ selama **20 detik**

Bagian 6 : Uji Kadar Glukosa dalam Proses Fermentasi dengan Sel Terimobilisasi

1. Lakukan pengukuran kadar glukosa setiap harinya selama 7 hari. Dengan mengambil sampel sebanyak 1-3 tetes.
2. Ukur kadar glukosa menggunakan refraktometer
3. Bandingkan hasil fermentasi menggunakan free cell (Modul 3) dan sel terimobilisasi (Immobilized Cell)

Tugas:

1. Bandingkan hasil alkohol yang diproduksi serta perubahan konsentrasi substrat pada *immobilized cell* dengan *free cell*
2. Mengapa hasilnya bisa mengalami perbedaan antara *free cell* dengan *immobilized cell*

Daftar Pustaka:

- Hassanzadeh, A.M., Khiabani, M.S., Sadrnia, M., Divband, B., Rahmanpour, O., Jabbari, V., Gholizadeh, P., dan Kafil, H.S. (2017). *Immobilization and microencapsulation of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum using zeolite base and evaluating their viability in gastroesophageal-intes-tine simulated*. *Ars Pharm*, 58 (4): 163-170.
- Palmer T., (1991), *Understanding Enzymes*. New York: Ellis Horwood.
- Ramakrishna, S. W. And R. S. Prakasham. (2004). *Microbial Fermentation with immobilized cells*. <http://k.tripod.com>. Faculty of Agriculture Technology and Engineering. Department of Food Science and Technology, Bogor Agricultural University. Bogor.
- Sumo, U.F., Sumantri, B., Subono, A., (1990). *Prinsip Bioteknologi*. Jakarta: Gramedia.