



Universitas
Esa Unggul

**MODUL PRAKTIKUM
TEKNOLOGI FERMENTASI**

Disusun Oleh:
Reza Fadhilla, S.TP., M.Si

**FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2019**

Daftar Isi

Halaman:

DAFTAR ISI	1
Percobaan 1. Pengenalan peralatan lab mikrobiologi.....	5
Percobaan 2. Preparasi alat, media pengayaan, pertumbuhan, dan pengenceran.....	6
Percobaan 3. Pembuatan serta pembiakan kultur stok dan kultur kerja	9
Percobaan 4. Pembuatan tepung tapioka asam menggunakan kultur BAL homofermentatif.....	12
Percobaan 5. Pembuatan tepung tapioka asam menggunakan kultur BAL heterofermentatif	12
Percobaan 6. Pembuatan tepung tapioka asam menggunakan kultur BAL campuran.....	12
Percobaan 7. Pembuatan hidrolisat protein menggunakan kultur BAL homofermentatif.....	15
Percobaan 8. Pembuatan hidrolisat protein menggunakan kultur BAL heterofermentatif	15
Percobaan 9. Pembuatan hidrolisat protein menggunakan kultur BAL campuran.....	15
Percobaan 10. Uji antibakteri supernatan tepung tapioka	18
Percobaan 11. Uji antibakteri supernatan tepung ISP	18
Percobaan 12. Fermentasi produk pangan sinbiotik.....	20

KETENTUAN UMUM LAB TERPADU UNIVERSITAS ESA UNGGUL

1. **Sapa** [Assalamualaikum, Selamat Pagi, Selamat Siang, dll].
2. **Tertib dan Disiplin** [Baris sebelum dan sesudah praktikum, datang dan pulang tepat waktu, Hp dan tas disimpan dalam loker, hanya praktikan yang boleh berada di lingkungan lab, meminta izin kepada laboran jika ingin keluar masuk ruang lab].
3. **Mengerti Materi Praktikum** [Kuis lisan akan diberikan laboran sebelum masuk ruangan lab sesuai dengan materi praktikum yang akan dilaksanakan].
4. **Fokus Praktikum** [Perhatian praktikan hanya tertuju pada kerja praktikum, jangan bercanda ketika praktikum berlangsung].
5. **Menjaga Aset Lab** [Memeriksa peralatan sesudah dan sebelum praktikum, lapor kepada laboran jika ada kerusakan alat, merusak-mencuri-penyalahgunaan alat lab baik sengaja maupun tidak merupakan pelanggaran dan ditindak sesuai aturan dan mengganti biaya kerusakan alat].
6. **Rapi dan Bersih** [Jas lab/pakaian lab harus rapi, bersih dan dikancing dengan baik, wanita berambut panjang harus diikat, sesudah dan sebelum praktikum meja, lantai, alat harus dalam keadaan bersih, membawa tisu-kain lap dan kantong plastik untuk wadah sampah].
7. **Utamakan K3 dan Pakai APD** [Memakai baju lab Esa Unggul, sepatu tertutup, menyiapkan masker dan sarung tangan pribadi, mengetahui letak APD yang sudah dikenalkan].
8. **Taat Peraturan** [Tidak diperkenankan mengambil alat dan bahan tanpa persetujuan asisten lab terpadu].

STANDAR OPERASIONAL

PERATURAN DAN TATA TERTIB LABORATORIUM

1. Mahasiswa yang diperkenankan menggunakan laboratorium dan melakukan praktikum adalah mahasiswa yang terdaftar secara akademik (Praktikan)
2. Praktikan Wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 5 menit sejak praktikum dimulai, praktikan dianggap tidak hadir.
3. Jika berhalangan hadir, praktikan harus dapat memberikan keterangan tertulis dan resmi terkait dengan alasan ketidakhadirannya.
4. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan telah mengenakan jas praktikan.
5. Praktikan wajib membawa lembar kerja praktikum, serbet, dan masker (APD)
6. Praktikan mengisi daftar absensi dengan menunjukkan segala sesuatu yang wajib dibawa.
7. Praktikan tidak diperbolehkan makan dan minum di dalam laboratorium selama praktikum berlangsung.
8. Praktikan tidak diperbolehkan bersenda gurau yang mengakibatkan terganggunya kelancaran praktikum.
9. Praktikan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing, serta lantai disekitarnya.
10. Setelah menggunakan reagen praktikan wajib meletakkan kembali pada tempatnya semula.
11. Praktikan dilarang menghambur-hamburkan reagen praktikum dan membuang sisa bahan praktikum dengan memperhatikan kebersihan dan keamanan.
12. Jika akan meninggalkan ruang laboratorium, praktikan wajib meminta izin kepada dosen atau asisten jaga.

STANDAR OPERASIONAL**PEMBELIAN BAHAN HABIS PAKAI**

Percobaan 1: Pengenalan dan penggunaan alat-alat laboratorium

Tujuan:

1. Mahasiswa dapat mengenal beberapa macam alat yang digunakan di laboratorium serta mengetahui cara penggunaannya.
2. Penjabaran prosedur praktikum teknologi fermentasi

Teori:

Pengenalan alat-alat mikrobiologi dan cara penggunaannya merupakan suatu keharusan bagi orang-orang yang akan berkecimpung dalam bidang ilmu bioteknologi dan ilmu pangan. Keberhasilan suatu praktikum atau penelitian sangat ditentukan oleh penguasaan praktikan atau peneliti terhadap alat-alat yang digunakannya. Di dalam laboratorium ada berbagai macam alat mulai dari yang sederhana seperti alat-alat gelas sampai pada peralatan yang cukup rumit.

Pada praktikum ini mahasiswa akan diperkenalkan dan diajarkan menggunakan alat-alat yang umum dipakai di laboratorium mikrobiologi. Dengan demikian setelah melakukan praktikum mahasiswa akan mempunyai keterampilan dalam mempergunakan peralatan tersebut.

Percobaan 2. Preparasi Alat dan Media Pertumbuhan – Pengenceran

Tujuan:

Untuk mengetahui pembuatan media kultur, larutan pengencer, dan media agar perhitungan BAL yang akan digunakan dalam pekerjaan-pekerjaan mikrobiologi.

Untuk mengetahui dan memastikan proses sterilisasi untuk mematikan mikroba patogen dan perusak pada media-media tersebut.

Teori:

Media adalah suatu substrat dimana mikroorganisme dapat tumbuh yang disesuaikan dengan lingkungan hidupnya. Media kultur berdasarkan konsistensinya dibedakan atas tiga macam, yaitu:

- a. Media cair (liquid medium) adalah medium berbentuk cair yang dapat digunakan untuk tujuan menumbuhkan atau membiakan mikroba, penelaah fermentasi, uji-uji lain Contohnya: Nutrient Broth (NB), Lactose Broth (LB) dan kaldu sapi.
- b. Media semi padat (semi solid medium), biasanya digunakan untuk uji mortalitas (pergerakan) mikroorganisme dan kemampuan fermentasi. Contohnya: Agar dengan konsentrasi rendah 0,5%.
- c. Media padat (solid medium) adalah medium yang berbentuk padat yang dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba dipermukaan sehingga membentuk koloni yang dapat dilihat, dihitung dan diisolasi. Contohnya: Nutrient Agar (NA), Plate Count Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA), gelatin, silika gel dan beberapa limbah pertanian berbentuk padat.

Media berdasarkan fungsinya, yaitu:

1. Media diperkaya (enriched medium) adalah medium yang ditambah zat-zat tertentu (serum, darah, ekstrak tumbuhan dan lain-lain), digunakan untuk menumbuhkan mikroba heterotrof.
2. Media selektif (selective medium) adalah media yang ditambah zat kimia tertentu yang bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroba lain sehingga dapat mengisolasi mikroba tertentu, misalnya media yang mengandung kristal violet pada kadar tertentu, dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif tanpa mempengaruhi bakteri gram

negatif. Contohnya: Endo Agar, EMB (Eosin Metilena Biru) Agar SSA (Salmonella Shyella Agar), VRB (Violet Red Bile Agar)

3. Media diferensial (differential medium) adalah media yang ditambahkan zat kimia tertentu yang menyebabkan mikroba membentuk pertumbuhannya atau mengadakan perubahan tertentu hingga dapat membedakan tipenya. Contohnya: TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
4. Media penguji (assay medium) adalah media dengan susunan tertentu digunakan untuk pengujian-pengujian vitamin, asam amino, antibiotik dan lain-lain.
5. Media untuk perhitungan jumlah adalah media spesifik yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroba. Contohnya: Plate Count agar (PCA).

Larutan pengencer/ larutan fisiologis adalah larutan yang digunakan untuk mengencerkan contoh pada analisis mikrobiologi. Pengenceran dilakukan untuk memperoleh contoh dengan jumlah mikroba terbaik untuk dapat dihitung yaitu antara 30 sampai 300 sel mikroba per ml. Pengenceran biasanya dilakukan 1:10, 1:100, 1:1000, dan seterusnya.

Alat dan Bahan:

Alat-alat yang digunakan antara lain: Tabung reaksi bertutup dan tanpa tutup, Sumbat tabung (kapas), Rak tabung, Cawan petri, Pembakar Spiritus, Erlenmeyer 100ml, Hot Plate, Spatula, Inkubator, Autoklaf

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: Media Nutrient Agar (NA), Plate Count Agar (PCA), Nutrient Broth (NB), NaCl

Cara Kerja:

Pembuatan Larutan Fisiologis (NaCl 0,85%)

Ditimbang 0.8 gram NaCl dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100ml.. Dilarutkan dengan 100ml air, lalu dihomogenkan. Dipanaskan di hot plate sambil diaduk hingga larutan mendidih. Ditutup dengan aluminium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Pembuatan Media PCA

Ditimbang 2,35 g PCA dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100ml. Dilarutkan dengan 100ml air, lalu dihomogenkan. Dipanaskan di hot plate sambil diaduk hingga larutan mendidih. Ditutup dengan alumunium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Pembuatan Media NA

Ditimbang 2,3 g NA dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100ml. Dilarutkan dengan 100ml air, lalu dihomogenkan. Dipanaskan di hot plate sambil diaduk hingga larutan mendidih. Ditutup dengan alumunium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Pembuatan Media NB

Ditimbang 0.8 g NB dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100ml. Dilarutkan dengan 100 ml air, lalu dihomogenkan. Dipanaskan di hot plate sambil diaduk hingga larutan mendidih. Ditutup dengan alumunium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Percobaan 3. Pemiakan dan Pembuatan Kultur Stok dan Kultur Kerja

Tujuan:

Untuk mengetahui metode penganyaan, mengetahui fungsi kultur stok dan kultur kerja BAL homofermentatif (*Lactobacillus plantarum*) dan BAL heterofermentatif (*Lactobacillus casei*).

Teori:

Pemeliharaan kultur bertujuan untuk mencegah kontaminasi dan perubahan genetik serta untuk mempertahankan tingkat aktivitas dan viabilitas sel serta mutu genetik. Oleh karena itu, tahap ini merupakan tahap yang paling menentukan kelangsungan industri. Bila tidak dipertahankan, maka mutu dan jumlah produksi akhir juga tidak bisa dipertahankan. Mikroba mudah sekali mengalami mutasi secara spontan, sehingga mutu genetik kultur relatif sulit dipertahankan dan dapat menyebabkan penurunan kemampuan dalam menghasilkan metabolit. Dalam industri fermentasi terdapat dua katagori kultur, yaitu:

1. Kultur induk, adalah kultur yang digunakan sebagai stock, dipelihara dengan sangat teliti dan hati-hati, diperbaharui paling banyak sekali dua tahun. Setiap kali diperbaharui biakan berpeluang untuk mengalami kontaminasi atau mutasi sehingga mutu strain perlu diperiksa kembali. Kultur ini tidak pernah dipergunakan untuk keperluan rutin atau sebagai starter.
2. Kultur kerja, yaitu kultur yang dibiakan dari kultur induk. Kultur digunakan sebagai inokulum dalam proses fermentasi selanjutnya, diperbaharui dan dibiakan / diperbanyak secara periodik. kultur ini harus diperiksa pada setiap kali diperbaharui dan digunakan

Penyimpanan mikroba dalam laboratorium dapat dilakukan untuk jangka pendek ataupun jangka panjang. Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan memindahkan secara berkala jangka pendek misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru. Beberapa cara penyimpanan jangka pendek antara lain adalah penyimpanan dalam medium agar, minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porselin.

Penyimpanan jangka pendek hanya dilakukan untuk penyimpanan kultur kerja. Sedangkan penyimpanan jangka panjang ditujukan untuk menyimpan kultur induk. Metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan ialah metode liofilisasi atau kering beku (freeze drying) dan kriopreservasi (cryopreservation).

Alat dan Bahan:

Alat-alat: cawan petri, tabung reaksi, gelas piala, gelas ukur, labu takar, erlenmeyer, pipet, mikropipet, gelas pengaduk, sudip, jarum ose, bunsen, autoklaf, oven, dan inkubator.

Bahan-bahan: kultur murni, MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*), MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*), akuades/ KH_2PO_4 ,

Cara Kerja:

Pembiakan kultur stok dan kultur kerja

Praktikum diawali dengan pembiakan kultur, Kultur murni disegarkan pada media MRSB dengan cara memasukkan 1 ml kultur murni ke dalam 10 ml MRSB, kemudian diinkubasikan pada suhu 39°C selama 24 jam, media ini disebut sebagai kultur stok. Kemudian sebanyak 2% kultur stok diinokulasikan ke dalam larutan susu skim steril 10%. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 39°C selama 24 jam yang hasilnya disebut kultur kerja.

Pemeliharaan kultur stok dan kultur kerja

Pemeliharaan kultur stok yaitu dengan metode tusukan pada chalk semi solid. Kultur ditusukan ke media chalk semi solid, kemudian diinkubasikan pada suhu $43\text{-}45^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Setelah diinkubasi kultur disimpan dalam refrigerator. Pada saat akan digunakan kembali, kultur diambil sebanyak 1 loop dari media chalk semi solid kemudian diinokulasikan ke dalam MRSB dan diinkubasi pada suhu 43°C selama 24 jam.

Sedangkan kultur kerja diperbaharui setiap minggu agar aktivitasnya tidak berkurang dengan cara menginokulasi kembali dalam media skim.

Pengamatan

Analisis pH

Susu diambil sebanyak 10 ml dan dapat langsung diukur dengan pH meter. Untuk sampel padat, diambil sebanyak 10 gram dan ditambahkan aquades 10 ml, dihomogenisasi, kemudian pH diukur dengan menggunakan pH meter.

Total Bakteri Asam Laktat

Homogenat diambil sebanyak 1 ml dan dilakukan pengenceran desimal hingga 1:10⁸. Sampel dari tiga pengenceran tertinggi dipipet sebanyak 1 ml secara aseptis dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu dituang agar MRSA. Kemudian cawan petri yang sudah berisi larutan dan MRSA digoyang dengan secara mendatar agar sampel menyebar secara rata. Setelah agar membeku pada cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Penghitungan total BAL berdasarkan metode BAM (2001).

Percobaan 4. Pembuatan Tepung Tapioka Asam Menggunakan Kultur BAL Homofermentatif

Percobaan 5. Pembuatan Tepung Tapioka Asam Menggunakan Kultur BAL Heterofermentatif

Percobaan 6. Pembuatan Tepung Tapioka Asam Menggunakan Kultur BAL Campuran

Tujuan:

Untuk mengetahui proses fermentasi tapioka asam, mengetahui pengaruh penambahan starter cair bakteri asam laktat secara tunggal maupun campuran dalam memperbaiki atau mempercepat proses fermentasi tapioka asam, serta mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik mutu dan sifat fungsional tapioka asam.

Teori:

Ubi kayu atau singkong (*Manihot utilissima Pohl*) merupakan salah satu komoditas pertanian jenis umbi-umbian yang sangat penting di Indonesia sebagai sumber pangan. Hal ini didukung dengan jumlahnya yang sangat banyak di Indonesia. Umbi ubi kayu biasanya diolah menjadi tepung ubi kayu dan tapioka. Tepung ubi kayu adalah tepung yang dihasilkan dari penghancuran umbi ubi kayu yang telah dikeringkan sedangkan tapioka adalah tepung yang dihasilkan dari pati umbi ubi kayu yang telah dikeringkan. Pati umbi ubi kayu atau tapioka banyak digunakan di industri pangan dan umumnya berupa tapioka tanpa modifikasi (pati alami atau native starch).

Namun penggunaan tapioka alami pada produk bakery masih sangat terbatas karena kapasitas pengembangan (*expanding capability*) saat pemanggangan yang rendah. Hal ini disebabkan tapioka tidak mengandung gluten. Gluten adalah sejenis protein yang terdapat dalam tepung terigu. Tepung terigu memiliki kandungan gluten yang tinggi sehingga dapat membentuk adonan yang viskoelastis dan dapat menahan gas selama fermentasi oleh ragi.

Tapioka asam adalah salah satu produk modifikasi dari tapioka alami yang dihasilkan melalui proses fermentasi dilanjutkan dengan pengeringan. Produk ini secara dibuat dengan cara fermentasi melalui perendaman tapioka

dalam air selama 30 sampai 90 hari. Tapioka asam memiliki nilai expanding capability yang tinggi. Tapioka asam dapat menghasilkan produk bakery dengan struktur berongga dan bebas gluten. Pembuatan produk bakery menggunakan tapioka asam tidak lagi membutuhkan bahan tambahan pengembang seperti bahan kimia maupun ragi.

Kelompok bakteri asam laktat yang berperan dalam fermentasi spontan tapioka asam yaitu *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* dan *Lactobacillus perolens*. Proses fermentasi spontan dengan cara perendaman dalam air selama selang waktu tertentu membutuhkan waktu fermentasi yang lama dan pertumbuhan mikroorganisme yang tidak terkendali.

Alat dan Bahan:

Alat-alat: cawan petri, tabung reaksi, gelas piala, gelas ukur, labu takar, erlenmeyer, pipet, mikropipet, gelas pengaduk, sudip, jarum ose, bunsen, autoklaf, oven, dan inkubator.

Bahan-bahan: Tepung tapioka (mocaf), kultur kerja BAL homofermentatif (*Lactobacillus plantarum*), heterofermentatif (*Lactobacillus casei*), akuades, pengencer NaCl, dan gula.

Cara Kerja:

Proses Pembuatan Tapioka Asam

Fermentasi tapioka dilakukan dengan penambahan starter cair BAL pada pati basah. Sebanyak 100 ml akuades yang ditambahkan 10% gula disterilkan menggunakan erlenmeyer. Setelah selesai sterilisasi, selanjutnya sebanyak 40% tapioka dan 5% kultur starter dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Pengadukan erlenmeyer perlahan dengan cara digoyang. Kemudian inkubasi pada suhu 39-40°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya pengamatan dilakukan terhadap cairan fermentasi dan endapan pati.

Pengamatan:**pH**

Sampel cairan fermentasi sebanyak 10 ml diukur pH menggunakan alat pH meter yang sudah dikalibrasi.

Total Asam

Sampel cairan fermentasi sebanyak 10 ml dimasukkan dalam erlenmeyer. Kemudian diberi indikator phenolptalein dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N yang sudah distandarisasi.

$$\text{Total Asam (mg/ml)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90 \times \text{fp}}{\text{ml sampel dititrasi}}$$

Keterangan:

fp = faktor pengenceran

N NaOH = Normalitas NaOH

90 = bobot molekul asam laktat

Total Bakteri Asam Laktat

Analisis BAL mengikuti metode yang digunakan oleh Burns et al. (2008) dengan modifikasi pada cara homogenisasi. Homogenat diambil sebanyak 1 ml dan dilakukan pengenceran desimal hingga 1:10⁸. Sampel dari tiga pengenceran tertinggi dipipet sebanyak 1 ml secara aseptis dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu dituang agar MRSA. Kemudian cawan petri yang sudah berisi larutan dan MRSA digoyang dengan secara mendatar agar sampel menyebar secara rata. Setelah agar membeku pada cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Penghitungan total BAL berdasarkan metode BAM (2001).

Tabel Pengamatan

Kultur starter	pH	Total asam	Total BAL
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
<i>Lactobacillus casei</i>			
Kultur campuran (1:1)			

Percobaan 7. Pembuatan Hidrolisat Protein Menggunakan Kultur BAL Homofermentatif

Percobaan 8. Pembuatan Hidrolisat Protein Menggunakan Kultur BAL Heterofermentatif

Percobaan 9. Pembuatan Hidrolisat Protein Menggunakan Kultur BAL Campuran

Tujuan:

Untuk mengetahui proses pembuatan hidrolisat secara fermentasi, mengetahui pengaruh penambahan starter cair tunggal maupun campuran bakteri asam laktat dalam dalam proses fermentasi, dan mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik mutu dan sifat fungsional hidrolisat protein.

Teori:

Kacang-kacangan merupakan bahan pangan yang memiliki kandungan protein, mineral, vitamin, dan serat pangan yang tinggi, serta telah lama dikenal sebagai sumber protein pelengkap. Protein memiliki manfaat yang penting bagi tubuh, yakni: pembangun struktur, biokatalis, pengatur pH, sebagai salah satu sumber energi, dan sebagai pembawa sifat turunan. Kedelai merupakan salah satu kacang-kacangan yang memiliki protein yang tinggi. Kadar protein kedelai bisa mencapai 35% berdasarkan bobot keringnya, bahkan pada varietas unggul kadar proteinnya mencapai 40% - 43%.

Hasil fermentasi kedelai mengandung senyawa isoflavan, yaitu genistein, daidzein, glisitein, dan 6,7,4'-trihidroksi-isoflavan yang bermanfaat untuk kesehatan. Senyawa isoflavan tersebut bermanfaat sebagai antioksidan, antikanker, antiosteoporesis dan hipokolesterolemik. Saat fermentasi maka terjadi kenaikan kadar protein. Hal ini disebabkan fermentasi mampu meningkatkan kadar protein kasar (crude protein) kacang. Pada proses tersebut, aktifitas enzim proteolitik menyebabkan pemecahan komponen protein yang kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana, seperti asam amino bebas, sehingga lebih banyak lagi asam amino yang terukur.

Hidrolisat protein merupakan protein yang mengalami proses hidrolisis atau degradasi secara kimia maupun secara enzimatik. Melalui teknik hidrolisis, protein dari suatu bahan dapat diubah menjadi senyawa asam amino L, nukleotida, dan berbagai ragam peptida. Hidrolisis secara enzimatik merupakan pilihan metode paling aman. Hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan dibanding secara kimiawi, karena dapat menghasilkan asam-asam amino bebas dan peptida dengan rantai pendek yang bervariasi. Hal ini akan lebih menguntungkan karena memungkinkan untuk memproduksi hidrolisat fragmen peptida yang berbeda. Hidrolisat protein mempunyai range aplikasi yang sangat luas terkait dengan sifat fungsional atau sifat nutrisinya.

Alat dan Bahan:

Alat-alat: cawan petri, tabung reaksi, gelas piala, gelas ukur, labu takar, erlenmeyer, pipet, mikropipet, gelas pengaduk, sudip, jarum ose, bunsen, autoklaf, oven, dan inkubator.

Bahan-bahan: *Isolat Soy Protein* (ISP), kultur kerja BAL homofermentatif (*Lactobacillus plantarum*), heterofermentatif (*Lactobacillus casei*), akuades, pengencer NaCl, dan gula.

Cara Kerja:

Proses Pembuatan Hidrolisat protein

Fermentasi isolat soy protein (ISP) dilakukan dengan penambahan starter cair BAL. Sebanyak 100 ml akuades yang ditambahkan 10% gula disterilkan menggunakan erlenmeyer. Setelah selesai sterilisasi, selanjutnya sebanyak 40% ISP dan 5% kultur starter dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Pengadukan erlenmeyer perlahan dengan cara digoyang. Kemudian inkubasi pada suhu 39-40°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya pengamatan dilakukan terhadap cairan fermentasi dan endapan pati.

Pengamatan

pH

Sampel cairan fermentasi sebanyak 10 ml diukur pH menggunakan alat pH

meter yang sudah dikalibrasi.

Total Asam

Sampel cairan fermentasi sebanyak 10 ml dimasukkan dalam erlenmeyer. Kemudian diberi indikator phenolptalein dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N yang sudah distandarisasi.

$$\text{Total Asam (mg/ml)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90 \times \text{fp}}{\text{ml sampel dititrasi}}$$

Keterangan:

fp = faktor pengenceran

N NaOH = Normalitas NaOH

90 = bobot molekul asam laktat

Total Bakteri Asam Laktat

Analisis BAL mengikuti metode yang digunakan oleh Burns et al. (2008) dengan modifikasi pada cara homogenisasi. Homogenat diambil sebanyak 1 ml dan dilakukan pengenceran desimal hingga 1:10⁸. Sampel dari tiga pengenceran tertinggi dipipet sebanyak 1 ml secara aseptis dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu dituang agar MRSA. Kemudian cawan petri yang sudah berisi larutan dan MRSA digoyang dengan secara mendatar agar sampel menyebar secara rata. Setelah agar membeku pada cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Penghitungan total BAL berdasarkan metode BAM (2001).

Tabel Pengamatan

Kultur starter	pH	Total asam	Total BAL
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
<i>Lactobacillus casei</i>			
Kultur campuran (1:1)			

Percobaan 10. Uji Antibakteri Supernatan Tepung Tapioka

Percobaan 11. Uji Antibakteri Supernatan Tepung ISP

Tujuan:

Untuk mengetahui bioaktivitas metabolit sekunder asal BAL dari sumber bahan baku berbeda dan mengetahui proses pengujian metode uji sumur.

Teori:

Kelompok yang telah diketahui sebagai bakteri asam laktat saat ini adalah termasuk ke dalam genus *Lactococcus*, *Streptococcus* (hanya satu spesies saja), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, dan lainnya.

Salah satu karakteristik yang terpenting dari BAL yakni kemampuannya dalam menghasilkan sifat antimikroba. Beberapa dari mereka telah diketahui karakterisasinya, tetapi juga masih banyak yang diidentifikasi dari spesies atau strain dan kandungan nutrisi, sifat fisik, dan suasana kimia dari tempat tumbuh. Bakteri asam laktat berperan sebagai senyawa antimikroba melalui hasil metabolitnya seperti asam organik, bakteriosin, H_2O_2 , CO_2 , serta diasetil.

Antimikroba ini dapat mencegah atau membunuh mikroorganisme yang menjadi target seperti jamur, kapang, bakteri vegetatif, spora, dan bahkan virus. Aktivitas antimikroba bervariasi tergantung dari hasil metabolismenya masing-masing.

Alat dan Bahan:

Alat-alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, cawan petri, ose, hot plate stirrer, gelas ukur, gelas piala, tabung erlenmeyer, timbangan digital, mikropipet, tip, pemanas bunsen, jangka sorong digital, pH meter, autoklaf, oven, buret, vortex, inkubator, refrigerator, sentrifuge.

Bahan-bahan yang digunakan: media agar, supernatan fermentasi

Cara Kerja:

Uji aktivitas senyawa antibakteri

Isolat bakteri uji berupa *Escherichia coli* disegarkan kembali dalam media NA miring selama 18 jam. Kemudian bakteri indikator diinokulasi dalam 10 ml NB dan diinkubasi dengan shaker water bath pada suhu 37°C selama 18 jam. Sebanyak 20 µl bakteri uji dipindahkan ke dalam 20 ml media *Mueller Hinton Agar* (MHA) cair dengan suhu media 40°C. Campuran media MHA cair dan bakteri uji dituangkan ke dalam cawan petri steril.

Uji potensi senyawa antibakteri dari bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur agar (*agar well diffusion*). Media agar yang telah padat dibuat sumur dengan menggunakan pipet Pasteur steril/tip berdiameter 5 mm. Kemudian sebanyak 50 µl supernatan hasil fermentasi dimasukkan ke dalam masing-masing sumur yang telah dibuat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona bening pada masing-masing bakteri indikator.

Zona bening yang dihasilkan di sekeliling sumur menunjukkan adanya daya hambat. Areal penghambatan diukur berdasarkan diameter areal bening yang terbentuk di sekitar sumur.

Tabel Pengamatan

Kultur starter	Asal Supernatan (zona bening mm)	
	Tapioka	ISP
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>		
Kultur campuran (1:1)		

Percobaan 12. Pembuatan Yogurt Sinbiotik

Tujuan:

1. Untuk mengetahui proses pembuatan yogurt dan yogurt kacang
2. Untuk mengetahui karakteristik bakteri asam laktat

Teori:

Yoghurt adalah susu yang disengaja diasamkan dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, sedangkan yoghurt yang dibuat dari bahan kedele (susu kedele), disebut soyghurt. Dibanding dengan yoghurt, soyghurt mempunyai beberapa keuntungan yaitu lebih sedikit memerlukan bibit (starter), pembuatannya dapat dilakukan pada suhu kamar biasa dan lebih kaya akan cita rasa. Dilihat dari segi gizi, soyghurt mengandung kadar protein lebih tinggi dibandingkan yoghurt.

Alat dan Bahan:

1. Alat-alat: timbangan digital, inkubator, pH meter, cawan petri
2. Bahan-bahan: susu kacang **hasil percobaan 5**, alkohol, media MRSA, media MRSB, pengencer NaCl, karagenan (0,5%), pektin (0,5%), gula cair, kultur bakteri

Cara Kerja:

1. Sebelum pembuatan yogurt, lakukan peremajaan kultur starter yogurt dengan cara menginokulasikan 5% starter stok pada susu dan diinkubasi 18 jam pada suhu 37°C.
2. Susu kacang yang sudah dipersiapkan ditambah sukrosa dan susu skim, dan dipasteurisasi suhu 75-85°C selama 10 menit
3. Setelah pasteurisasi susu kacang didinginkan sampai suhu 37-40°C dan diinokulasi kultur yogurt, dan diinkubasi suhu 37°C selama 12-14 jam.
4. Dilakukan cara kerja yang sama terhadap kontrol menggunakan susu full cream

Tabel Formulasi

Bahan-Bahan	Label Perlakuan		
	A	B	C
Kontrol	Full cream	Full cream	Full cream
Bahan utama	Kedelai	Kacang hijau	Kacang merah
Pektin	0,5%	0,5%	0,5%
Karagenan	0,5%	0,5%	0,5%
Skim powder	5%	5%	5%
Full krim	5%	5%	5%
Gula	5%	5%	5%
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2%	2%	2%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2%	2%	2%

Pengamatan: Karakteristik Fisik

Perlakuan	Susu Kacang			Rendemen (%)	pH
	Warna	Rasa	Aroma		
A					
B					
C					

Pengamatan: Uji Organoleptik

No	Nama Panelis	Kontrol (K) Sampel (S):.....							
		Warna		Aroma		Tekstur		Rasa	
		K	S	K	S	K	S	K	S
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
Total									
Rerata									
Nilai Tingkat Kesukaan									
Sangat suka (1), suka (2), Agak suka (3), Netral (4),									
Agak tidak suka (5), Tidak suka (6), Sangat tidak suka (7)									

Daftar Pustaka

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland (US): AOAC.
- [BAM] Bacteriological Analytical Manual. 2001. Aerobic Plate Count. New York (US): Food and Drug Administration.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. SNI 2981.01:2009. Yoghurt. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2011. SNI 3141.1:2011. Definisi Susu Segar. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Buckle KA, Edwards RA, Fleet GH, Wootton M. 2007. Ilmu Pangan. Purnomo H, Adiono, penerjemah. Jakarta (ID): Univ Indonesia Pr.
- CODEX Alimentarius Commission. 2003. CODEX standard for fermented milks. Alimentarius Commission. No. CODEX Stan 243-2003.
- Buckle, K. A., R. A. Edwards, G. H. Fleet & M. Wootton. 2007. Ilmu Pangan. Terjemahan H. Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Clark S, Castello M, Drake A, Bodyfelt F. 2009. The Sensory Evaluation of Dairy Product. New York (US): Springer.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. PT Gramedia, Jakarta.
- Kandler O, Weiss N. 1995. Bergeys Manual : Systematic Bacteriology. Baltimore[US]. The Williams and Wilkins Company.
- Pelczar, M. J. & E. C. S. Chan. 2007. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Terjemahan R. S. Hadioetomo, T. Imas, S. D. Tjitrosomo & S. L. Angka. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Waluyo, L. 2008. Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. UMM Press, Malang.
- Winarno, F.G. 1992. Kimia Pangan dan Gizi. PT Gramedia. Jakarta