

TEKNIK PENGAMATAN MIKROBA

PUJIATI



TEKNIK PENGAMATAN MIKROBA

Pujiati



TEKNIK PENGAMATAN MIKROBA

Penulis:

Pujiati

Editor:

Muh. Syamsul Hadi

Perancang Sampul:

Muh. Syamsul Hadi

Penata Letak:

Muh. Syamsul Hadi

Cetakan Pertama, November 2022

Diterbitkan Oleh:

UNIPMA Press Universitas PGRI Madiun

Jl. Setiabudi No. 85 Madiun Jawa Timur 63118

E-Mail: upress@unipma.ac.id

Website: kwu.unipma.ac.id

Anggota IKAPI: No. 207/Anggota Luar Biasa/JTI/2018

ISBN:

978-623-6318-93-5

Hak Cipta dilindungi oleh Undang-Undang

All right reserved

DAFTAR ISI

I. MIKROBA	
A. Pengertian	1
B. Jenis-Jenis Mikroba.....	2
a. Bakteri	2
b. Fungi.....	3
c. Virus.....	6
C. Pemanfaatan Mikroba pada berbagai Bidang Kehidupan	7
II. II.NUTRISI PERTUMBUHAN MIKROBA	
A. Pengertian dan Fungsi dari Nutrisi Mikroba	13
1. Pengertian Nutrisi Mikroba.....	13
2. Fungsi Nutrisi Mikroba	13
B. Jenis-Jenis Mikroba.....	14
1. Penggolongan Nutrisi Mikroba	16
2. Penggolongan MikrobaBerdasarkan Nutrisi.....	18
C. Interaksi antara mikroba dalam penggunaan nutrient.....	21
D. Pengertian dan Fungsi Media Pertumbuhan Mikroba.....	22
E. Persyaratan media Pertumbuhan Mikroba	23
F. Klasifikasi media pertumbuhan mikroba	23
III. TEKNIK PENGAMATAN MIKROBA	
A. Isolasi Mikroba	30
1. Sterilisasi.....	31
2. Pengertian Desinfeksi	35
3. Preparasi sampel	38
4. Pengenceran bertingkat	39
5. Penanaman sampel mikroba	40
a) Metode Streak.....	40
b) Metode Spread plate.....	41
c) Metode Pour Plate	42
d) Karakterisasi Makroskopis	43
e) Karakterisasi Mikroskopis	46
f) Uji Fisiologis/Biokimia.....	49
g) Karakterisasi Molekuler	53
B. Penghitungan Pertumbuhan Mikroba	56

C. Kurva Pertumbuhan Mikroba	63
D. Faktor Pertumbuhan Mikroba	70
E. Pengukuran Pertumbuhan Mikroba	72
F. faktor biotik dan abiotik yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba	74
G. Isolasi Mikroba Potensial	81
1. Isolasi Mikroba Potensial Biofertilizer	82
2. Isolasi Mikroba Penghasil Antibiotik	92
DAFTAR PUSTAKA.....	95

Kata Pengantar

Buku Teknik Pengamatan Mikroba ini membahas tentang pengertian mikroba, jenis, nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba, serta teknik pengamatannya meliputi proses isolasi, metode penanamannya, karakterisasi dari yang sederhana hingga penggunaanteknologi yang modern yaitu tingkat molekuler. Buku ini juga dilengkapi hasil-hasil riset terkait isolasi dan uji potensi beberapa mikroba potensial yang ada di sekitar kita. Diharapkan buku ini dapat dimanfaatkan khususnya untuk mahasiswa sebagai referensi dalam mata kuliah mikrobiologi, biologi terapan, bioteknologi maupun ilmu lain yang relevan serta juga dapat digunakan oleh instansi-intansi terkait.

Penulis

I. MIKROBA

A. Pengertian

Mikroorganisme atau mikroba adalah organisme yang berukuran sangat kecil sehingga diperlukan mikroskop untuk melihatnya (Surah Maida, 2019). Mikroorganisme disebut juga organisme mikroskopis. Mikroorganisme biasanya uniseluler (uniseluler) atau multiseluler (multiseluler). Namun, beberapa protista uniseluler masih terlihat dengan mata telanjang, dan beberapa spesies multiseluler tidak terlihat dengan mata telanjang (Mawarsih et al., 2018). Manfaat mikroba di bidang pertanian belum sepenuhnya disadari, bahkan seringkali diposisikan sebagai komponen habitat berbahaya karena pandangan umum mikroba lebih selektif terfokus pada mikroorganisme patogen penyebab penyakit tanaman. Meskipun sebagian besar spesies mikroba adalah mikroflora yang menguntungkan, proses siklus alami di permukaan dan lapisan persiapan lahan yang penting untuk aktivitas pertanian tidak terjadi tanpa adanya aktivitas mikroba (Saraswati, 2015).

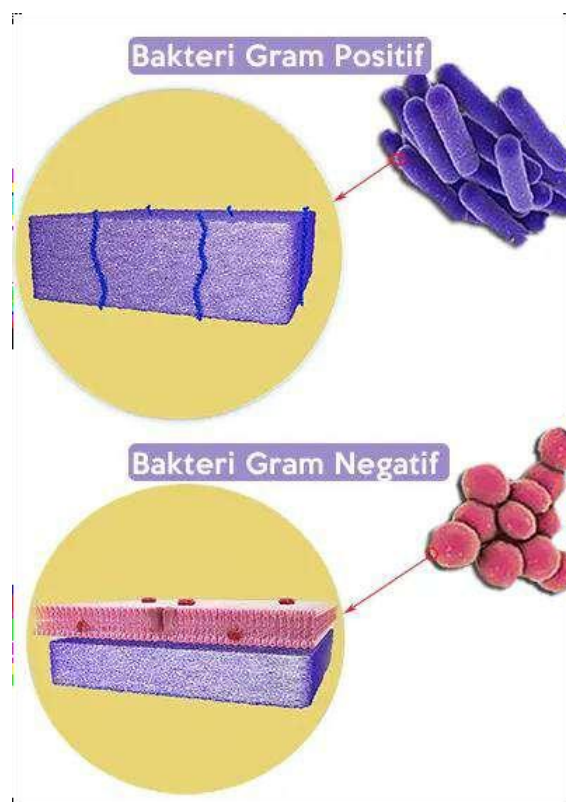
Beberapa mikroorganisme tanah yang berguna dan sering digunakan sebagai pupuk hayati antara lain bakteri pengikat nitrogen non-simbiosis, bakteri pengikat nitrogen simbiosis, jamur mikoriza, mikroorganisme efektif (EM), dan bakteri pelarut fosfat. Ketika digunakan bersama-sama dengan baik dalam sistem pertanian organik, mikroba tanah ini dapat memberikan dampak positif pada ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan tanaman, lingkungan yang penting bagi upaya pengendalian hama untuk meningkatkan

pertumbuhan dan produktivitas tanaman secara efektif (Faizah M; Anggi Yuliani; Alif Riswandar; Al Ayubi., 2019).

B. Jenis-Jenis Mikroba

1) Bakteri

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme prokariotik (bersel tunggal) yang hidup berkoloni tanpa selubung inti tetapi dapat hidup di mana saja. Menurut klasifikasinya, bakteri dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.



Sumber: <https://learniseasy.com/wp-content/uploads/2020/03/dinding-sel-bakteri-gram-positif-dan-gram-negatif.webp>

Beberapa bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif merupakan flora normal pada tubuh manusia. Flora normal adalah mikroba yang menempati suatu daerah tanpa menimbulkan penyakit pada inang yang ditempati (Holderman et al., 2017). Contoh bakteri gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)(Surah Maida, 2019).

2) Fungi

Fungi merupakan kelompok mikroba yang tergolong dalam eukariotik heterotrofik dan tersebar luas di alam, bersifat saprofit yang mendapatkan nutrisi melalui penguraian bahan organik (Ihsan, 2021). Fungi memiliki filamen dan merupakan mikroba mayoritas dalam tanah (Guan et al., 2018). Dalam kegiatan pertanian fungi memainkan peran penting sebagai simbiosis mutualistik, patogen, dan saprofit, di mana mereka memobilisasi nutrisi dan mempengaruhi lingkungan fisikokimia, atau dapat dimanfaatkan sebagai agen biocontrol dan sebagai pupuk hayati (Walker & White, 2005). Metabolisme fungi juga bertanggung jawab untuk detoksifikasi polutan organik dan untuk bioremediasi logam berat dan bahan kimia bandel lainnya di lingkungan (termasuk air limbah dan air tanah).

Berdasarkan pada cara dan ciri reproduksinya, jamur dikelompokkan dalam empat kelas, yaitu Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, dan Deuteromycota. Masing-masing penjelasannya adalah sebagai berikut:

1. Zygomycota

Kelompok kelas ini memiliki tiga jenis hifa, yaitu hifa yang menjalar di permukaan substrat disebut stolon, hifa yang menembus ke dalam substrat seperti akar disebut rizoid, dan hifa yang menjulang ke atas dan membentuk sporangium disebut sporangiosfor. Sporangium atau kotak spora akan menghasilkan sporangiospora/spora (Eugene N P, P., Mongan, R., & Yunus, 2019). Zygomycota dapat bereproduksi secara aseksual (spora nonmotile yang dihasilkan oleh sporangium) dan seksual (konjugasi) (Wardani, 2018).

2. Ascomycota

Fungi kelas ini memiliki konidiospora, konidiosfor, askospora, serta mengalami perkembangbiakan secara aseksual dan seksual. Pada reproduksi aseksualnya dihasilkan spora konidium pada ujung hifa khusus yang disebut konidiofor. Umumnya askus dibentuk di dalam tubuh buah yang disebut askokarp atau askoma. Bentuk askusnya ada bermacam-macam antara lain sebagai berikut:

- Askus tanpa askokarp
- Askus yang askokarpnya berbetuk seperti mangkok disebut apotesium
- Askus yang askokarpnya berbentuk bola tanpa ostiolum disebut kleistotesium
- Askus yang askokarpnya berbentuk botol dengan leher dan memiliki ostiolum disebut peritesium (Wardani, 2018).

3. Basidiomycota

Bentuk tubuh buah dari Basidiomycota menyerupai payung, bentuk dan warnanya bermacam-macam. Tubuh buahnya ini disebut basidiocarp (Rahma et al., 2018). Daur hidup Basidiomycota dimulai dari pertumbuhan spora basidium atau pertumbuhan konidium menjadi benang hifa yang bersekat dengan satu inti, kemudian hifa membentuk miselium. Hifa dari dua jenis yang berbeda (+ dan -) ujungnya bersinggungan dan dinding selnya larut. Inti sel dari salah satu sel pindah ke sel yang lain sehingga terjadilah sel dikariotik yang tumbuh menjadi tubuh buah dengan bentuk tertentu misalnya seperti payung (Wardani, 2018). Secara umum, struktur jamur Basidiomycota terdiri atas empat bagian berikut ini.

- Tudung, yaitu bagian atas berbentuk seperti payung.
- Tangkai, terletak di bawah tudung.
- Lamella, letaknya di bawah tudung berbentuk lembaran.
- Annulus, posisinya melingkari batang berbentuk cincin (Khosy'in, 2021).

4. Deuteromycota

Deuteromycota disebut juga "fungi imperfecti" atau jamur tidak sempurna. Jamur ini bereproduksi secara asexual dengan menghasilkan konidia atau menghasilkan hifa khusus yang disebut konidiofor. Kemungkinan jamur ini merupakan suatu peralihan jamur yang tergolong Ascomycota ke Basidiomycota tetapi tidak diketahui hubungannya (Wardani, 2018).

3) Virus

Virus adalah mikroorganisme yang berukuran sangat kecil dan memiliki molekul asam nukleat, DNA atau RNA yang terbungkus dalam lapisan pelindung protein (kapsid) (Hambali, 2019). Virus dapat bereproduksi dengan replikasi dan hanya dapat dilakukan didalam sel inang (parasit obligat intraseluler) (Agustina, 2019).

Virus hanya bersifat hidup dan dapat memperbanyak diri bila berada di dalam organ hidup dari makhluk hidup lain sehingga dinamakan parasit intraseluler obligat. Kondisi demikian disebabkan virus tidak memiliki kelengkapan metabolik, pembangkit energi dan sintesis sendiri. Virus hanya tergantung kepada sel inangnya. Walaupun demikian, virus memiliki informasi genetik untuk melakukan produksi dan untuk mengambil alih sistem pembangkit energi dan mensintesis sel inangnya yang berada dalam gen-gen virus.

Virus dapat berpindah dari satu sel inang ke sel inang lainnya dalam bentuk paket-paket bahan genetis DNA atau RNA berukuran kecil. Bahan genetis ini terkemas dalam satu selubung protein dengan berbagai bentuk. selubung ini berfungsi melindungi bahan genetis ketika virus berada di luar sel inang dan membantu untuk masuk ketika virus menginfeksi sel inang .

Virus yang memiliki struktur yang telah lengkap, matang serta mampu menginfeksi dinamakan virion. Virus bakteri (bakteriofage) sampai saat ini masih merupakan model paling baik untuk menelaah virus.

C. Pemanfaatan Mikroba pada berbagai Bidang Kehidupan

Produk biologi aktif yang terdiri atas mikroba yang berfungsi meningkatkan efisiensi pemupukan, kesuburan, dan kesehatan tanah disebut sebagai pupuk hayati (pupuk mikroba) (Saraswati, 2015).

Mikroba digunakan membantu proses pengomposan sehingga unsur hara dapat dilepaskan dari ikatan bahan organik dan menjadi dalam bentuk tersedia bagi tanaman (Sofian et al., 2021). Contoh lain yaitu penambahan pupuk organik hayati yang didalamnya terdapat bakteri pelarut fosfat yang dapat membantu proses pelarutan fosfat dari bahan organik yang ditambahkan (Saraswati, 2015).

1) Bidang Pertanian

Beberapa mikroba tanah seperti Rhizobium, azospirillum dan Azotobacter, bakteri pelarut fosfat, ektomikoriza, dan endomikoriza dapat dimanfaatkan sebagai biofertilizer pada pertanian organik. Bakteri rhizobium adalah salah satu kelompok bakteri yang berkemampuan sebagai penyedia hara bagi tanaman yang bekerja dengan cara menambat N bebas dari udara. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini tidak menyebabkan perubahan morfologi perakaran, meningkatkan jumlah akar rambut, menyebabkan percabangan akar lebih berperan dalam penyerapan hara. Keuntungan lain dari bakteri ini, bahwa apabila saat berasosiasi dengan perakaran tidak dapat menambat nitrogen, maka pengaruhnya adalah meningkatkan penyerapan nitrogen yang ada di dalam tanah.

2) Bidang Peternakan

Dalam bidang peternakan pemanfaatan mikroorganisme antara lain adalah probiotik untuk ternak yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh ternak. Contoh mikroorganisme yang memiliki potensi sebagai probiotik untuk ternak antara lain *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* dst.

3) Bidang Perikanan

a) Peranan mikroba dalam bidang perikanan meliputi:

- Pengawetan

Dengan mikroba, ikan dapat menjadi tahan lama. Contoh pengawetan pada ikan yaitu oleh bakteri asam laktat.

- Menambah cita rasa

Dengan menggunakan mikroba, hasil produksi perikanan menjadi lebih banyak memiliki rasa. Contoh kecap ikan, terasi, nata de seaweed.

- Menambah daya guna

Dengan menggunakan mikroba, produk hasil perikanan dapat memiliki banyak fungsi, seperti peralatan kosmetik dan pengobatan.

b) Peranan mikroba patogen dalam bidang budidaya perikanan.

- Meningkatkan kualitas air

Mikroba patogen dapat meningkatkan kualitas air, seperti pengamatan senyawa amonia yang beracun bagi ikan dengan menggunakan bakteri nitrifikasi.

- Adanya interaksi dengan plankton

Dengan adanya mikroba yang menempel pada tubuh plankton, dan plankton dimakan oleh ikan, maka secara tidak langsung ikan mengkonsumsi gizi yang lebih, sehingga pertumbuhan ikan semakin cepat.

- Meningkatkan imun inang

Dengan menggunakan mikroba, sistem kekebalan ikan atau inang menjadi lebih kuat, karena bakteri antagonis yang berada dalam sistem pencernaan ikan dapat membunuh bakteri lain. Sehingga pencernaan ikan menjadi lebih sehat.

4) Bidang Energi dan lingkungan

Mikroorganisme banyak dimanfaatkan untuk bahan bakar hayati (metanol dan etanol), bioremediasi, dan pertambangan. Selain itu, mikroorganisme yang ada di lingkungan berperan dalam perputaran/siklus materi dan energi terutama dalam siklus biogeokimia dan berperan sebagai pengurai (dekomposer). Mikroorganisme tanah berfungsi merubah senyawa kimia di dalam tanah, terutama pengubahan senyawa organik yang mengandung karbon, nitrogen, sulfur dan fosfor menjadi senyawa anorganik dan bisa menjadi nutrisi bagi tumbuhan. Mikroorganisme pada lingkungan alami juga dapat di gunakan sebagai indikator baik buruknya kualitas lingkungan, baik perairan maupun terestrial.

5) Bidang pertambangan

Mikroba tertentu mampu untuk memperbaiki keadaan diatas, misalnya dengan menggunakan beberapa bakteri aerobic ototrophic (*Thiobacillus oxidans* dan *Thiobacillus ferrooxidans*). Kedua spesies bakteri ini bila ditumbuhkan dalam keadaan lingkungan yang mengandung bijih tembaga akan menghasilkan asam dan mengoksidasikan bijih tersebut disertai pengendapan (pemisahan) logam tembaganya. Proses ini yang dinamakan pelindihan (leaching). Dengan teknik ini dapat memperbaiki cara pemisahan logam dari bijih dan tidak mengakibatkan polusi udara.

6) Bidang Kesehatan

- Pembuatan antibiotic

Antibiotika adalah suatu zat yang dihasilkan oleh organisme tertentu dan Antibiotika dapat diperoleh dari jamur atau bakteri yang Pembuatan antibiotik dilakukan dengan Proses fermentasi penisilin didahului oleh tahapan seleksi strain *Penicillium chrysogenum* pada media agar dan perbanyakkan. *chrysogenum* yang dihasilkan dapat mencapai konversi yield maksimum Selama proses fermentasi berlangsung dilakukan Temperatur operasi dijaga konstan selama fermentasi penisilin berlangsung dihasilkan jumlahnya telah maksimum, maka cairan hasil fermentasi tersebut untuk memisahkan miselia dan penisilin. diperoleh filtrat berupa cairan jernih yang mengandung penisilin. ekstraksi dan kristalisasi dilakukan untuk mendapatkan penisilin yang siap

mengeluarkan zat penisilin yang dapat mematikan bakteri yang hidup

- Pembuatan vaksin

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit. Vaksin dapat berupa galur virus atau bakteri yang telah dilemahkan sehingga tidak menimbulkan penyakit. Vaksin dapat juga berupa organisme mati atau hasil-hasil pemurniannya (protein, peptida, pertikel serupa virus, dsb). Vaksin akan mempersiapkan sistem kekebalan manusia atau hewan untuk bertahan terhadap serangan patogen tertentu, terutama bakteri, virus, atau toksin.

- Pembuatan hormone insulin

Rekayasa DNA dapat digunakan untuk memproduksi hormon. Contohnya adalah hormon insulin. Hormon ini dapat diproduksi melalui rekayasa genetika bakteri dengan vector plasmid E.Coli.

7) Bidang Pangan

Mikroorganisme yang menguntungkan dalam bidang pangan berperan dalam prosesBerbagai jenis makanan dan minuman hasil fermentasi, seperti tape, tempe, kecap, oncom, tauco, bekacem, sosis, keju, bir, brem, tuak, anggur, dan sebagainya telah lama dikenal dan melengkapi menu makanan atau minuman sehari – hari. Makanan dan minuman tersebut diolah dengan cara fermentasi (peragian) dengan menggunakan mikroba. Proses

fermentasi yang melibatkan kemampuan mikroba sesuai dengan kondisi proses dan hasilnya,

dibagi menjadi 2 bentuk :

- Fermentasi secara alkoholis, apabila hasilnya didapatkan alkohol. Misalnya dalam pembuatan beberapa jenis minuman : bir, anggur, sider dan sebagainya.
- fermentasi secara non-alkoholis, bila hasilnya tidak didapatkan senyawa alkohol, tetapi dalam bentuk asam organik, vitamin, asam amino dan sebagainya. Misal, pembuatan tempe, kecap, tauco, oncom, terasi, yoghurt. Proses fermentasi merupakan proses unik yang dilakukan oleh mikroba, yakni cepat, murah, aman, hemat energi, dan nilai organoleptik rata-rata sesuai dengan selera.

II. NUTRISI PERTUMBUHAN MIKROBA

A. Pengertian dan Fungsi dari Nutrisi Mikroba

1. Pengertian Nutrisi Mikroba

Mikroorganisme membutuhkan bahan organik dan anorganik dari lingkungannya selama pertumbuhannya. Zat-zat ini disebut nutrisi. Nutrisi adalah zat organik dan anorganik yang dibutuhkan organisme untuk berfungsinya, pertumbuhan, dan kesehatan sistem tubuh. Mikroba membutuhkan nutrisi untuk kebutuhan energi, bahan pembangun sel, sintesis protoplasma, dan bagian tubuh lainnya. bagian seluler lainnya. Setiap mikroorganisme memiliki sifat fisiologis tertentu dan oleh karena itu juga membutuhkan nutrisi tertentu.

2. Fungsi Nutrisi Mikroba

Setiap nutrisi memiliki perannya sendiri dalam fisiologi sel. Unsur ini dimasukkan ke dalam medium dalam bentuk kation garam anorganik, yang jumlahnya bervariasi sesuai kebutuhan. Beberapa kelompok mikroba, seperti diatom dan alga tertentu, membutuhkan silika (Si), biasanya tersedia dalam bentuk silikat untuk membangun dinding sel. Bakteri tertentu, ganggang biru-hijau, dan bakteri fotosintetik yang hidup di laut membutuhkan kadar natrium yang cukup tinggi. Mikroorganisme membutuhkan nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan bahan pembangun sel, dan untuk

mensintesis protoplasma dan bagian seluler lainnya. Setiap mikroorganisme memiliki sifat fisiologis tertentu dan oleh karena itu juga membutuhkan nutrisi tertentu. Komposisi kimia sel mikroba relatif tetap, baik itu unsur kimia maupun senyawa yang terkandung di dalam sel tersebut.

Natrium tidak dapat digantikan oleh kation monovalen lainnya. Organisme hidup dapat menggunakan makanan dalam bentuk padat atau cair (larutan). Tubuh yang dapat menggunakan makanan dalam bentuk padat diklasifikasikan sebagai holomorfik, sedangkan yang menggunakan makanan dalam bentuk cair diklasifikasikan sebagai holomorfik. Tumbuhan utuh juga dapat menggunakan makanan dalam bentuk padat, tetapi makanan tersebut harus dicerna terlebih dahulu secara ekstraseluler dengan bantuan enzim ekstraseluler. Pencernaan di luar sel disebut pencernaan *in vitro*. (Sri Sulastri, 2012)

B. Jenis-jenis Nutrisi Mikroba

Sebagian besar komponen seluler adalah karbon, oksigen, hidrogen, nitrogen, dan fosfor, yang merupakan komponen utama membran, protein, asam nukleat, dan struktur seluler lainnya. Mikroba paling membutuhkan elemen ini untuk menyusun komponen selulernya. Oleh karena itu, mereka disebut makronutrien. Unsur-unsur yang hampir tidak diperlukan mikroorganisme lain untuk membentuk konstituen selulernya disebut mikronutrien, seperti nikel, vanadium, boron, klorin, natrium, selenium, silika, dll. (Kusnadi, 2008).

Tabel 1. Peran masing-masing nutrisi Makronutrien

Elemen	Ketersediaan di Lingkungan	Peran
Carbon (C)	CO ₂ , Komponem organik	Penyusun bahan-bahan organik sel
Hidrogen (H)	H ₂ O, Komponen organik	Penyusun air sel, bahan-bahan organik sel
Oksigen (O)	H ₂ , O ₂ , Komponen organik	Penyusun air sel, bahan ² sel, aseptor elektron dlm respirasi aerob
Nitrogen (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , Komponen nitrogen organic	Penyusun protein, asam nuklein, beberapa koenzim
Phosphor (P)	PO ₄ ⁻	Sintesis, penyusun asam nuklein, fosfolipida, koenzim ²
Sulfur (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , Komponen sulfur	Penyusun protein-protein, beberapa koenzim
Kalium (K)	K ⁺	Salah satu dari kation anorganik sel, kofaktor untuk beberapa enzim

Sumber: (Siti Umiyatie, 2010)

Tabel 2. Peran masing-masing nutrisi Mikronutrien

Jenis	Peran
Boron (Bo)	Antibiotik poliketid, pembentukan sel
Magnesium (Mg)	Kation seluler, untuk pengikatan enzim pada substrat
Cobalt (Co)	Penyusun vitamin B12, transkarboksilase
Copper (Cu)	Penyusun derivate-derivat koenzimnya, unsur anorganik penyusun enzim-enzim tertentu
Besi (Fe)	Penyusun sitokrom, katalase, peroksidase, oksigenase, protein home atau non home

Manganase (Mn)	Aktivator kebanyakan enzim
Molibdenium (Mo)	Nitrogenase, reduktase, sulfid oksidase
Klor (Cl)	Penyusun garam

Sumber: (Siti Umiyatie, 2010)

1. Penggolongan Nutrisi Mikroba

Nutrisi yang digunakan oleh jasad hidup dapat berfungsi sebagai sumber energi, bahan pembangun sel, dan sebagai aseptor atau donor elektron. Garis besarnya nutrisi dibagi menjadi tujuh golongan yaitu air, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron, sumber mineral, sumber oksigen, dan sumber nitrogen. (Sumarsih, 2008)

Air

Semua jasad khemosintetik memerlukan suatu sumber energi dalam bentuk donor H yaitu berupa substrat yang dapat dioksidasi. Air merupakan komponen utama di dalam sel mikrobia dan medium. Fungsi air sebagai sumber oksigen untuk bahan organik sel pada respirasi. Selain itu air berfungsi sebagai pelarut dan alat pengangkut dalam metabolisme.

Sumber energi

Beberapa sumber energi bagi mikroorganisme yaitu senyawa organik dan/atau anorganik yang dapat dioksidasi dan sinar matahari.

sumber karbon

Organisme dan bakteri fotosintesis yang memperoleh energi dari oksidasi senyawa organik biasanya menggunakan bentuk karbon yang paling teroksidasi, CO₂, sebagai satu-satunya sumber utama karbon seluler. Konversi CO₂ menjadi bahan

penyusun sel organik adalah proses reduksi yang membutuhkan asupan energi bersih.

Sumber nitrogen

Salah satu unsur yang dibutuhkan oleh semua organisme untuk mensintesis protein, asam nukleat dan senyawa lain yang mengandung nitrogen. Atmosfer bumi mengandung hampir 80% N₂. Diperkirakan bahwa atmosfer di atas setiap hektar lahan subur mengandung lebih dari 30.000 ton nitrogen. Selama pertumbuhan, mikroorganisme melepaskan enzim proteolitik yang memecah senyawa protein menjadi asam amino. Pertumbuhan membutuhkan nitrogen dalam jumlah besar karena nitrogen terkandung dalam protein dan asam nukleat. Setiap organisme berbeda dalam hal memperoleh nitrogen, beberapa menggunakan nitrogen dari udara, sementara yang lain menggunakan sumber nitrogen anorganik seperti garam amonium. Tetapi yang lain menggunakan sumber nitrogen organik, seperti asam glutamat dan asparagin.

Sumber oksigen

Oksigen dalam sel berupa air. Selain itu, oksigen juga terdapat dalam karbon dioksida dalam bentuk senyawa organik. Selain itu, ada banyak organisme yang bergantung pada oksigen molekuler (O₂ atau oksigen molekuler). Jika metana atau hidrokarbon aromatik rantai panjang digunakan sebagai sumber karbon, oksigen yang berasal dari molekul oksigen hanya akan dimasukkan ke dalam materi seluler.

✚ Sumber aseptor elektron

Biooksidasi adalah proses memperoleh dan mentransfer elektron dari substrat. Karena elektron dalam sel tidak dapat eksis dalam bentuk bebas, pasti ada sesuatu yang dapat menangkapnya dengan segera. Akseptor elektron semacam itu disebut akseptor elektron. Akseptor elektron merupakan oksidan, yang dapat digunakan sebagai akseptor elektron pada mikroorganisme adalah O_2 , senyawa organik, NO_3^- , NO_2^- , N_2O , SO_4^- , CO_2^- dan Fe^+ .

✚ Sumber mineral penting.

Mineral merupakan bagian integral dari sel. Unsur utama penyusun sel adalah karbon, oksigen, nitrogen, hidrogen, dan fosfor. Unsur mineral lain yang dibutuhkan oleh mikroorganisme adalah K, Ca, Mg, Na, S, dan Cl. Pada saat yang sama, Fe, Mn, Co, Cu, Bo, Zn, Mo dan Al dibutuhkan dalam jumlah yang sangat kecil. Selain sebagai komponen seluler, unsur mineral juga berperan sebagai pengatur tekanan osmotik, kadar ion hidrogen, permeabilitas, dan potensial oksidasi reduksi suatu medium.

2. Penggolongan Mikroba Berdasarkan Nutrisi

a. Berdasarkan atas kebutuhan karbon

Mikroba dibedakan menjadi jasad autotrof dan heterotrof.

✚ Autotrof adalah organisme yang membutuhkan sumber karbon dalam bentuk anorganik, seperti karbon dioksida dan senyawa karbonat.

✚ Heterotrof adalah organisme yang membutuhkan sumber karbon berupa senyawa organik. Heterotrof dibagi lagi menjadi saprofit dan parasit.

- Saprofit adalah jasad yang dapat memanfaatkan bahan organik yang diambil dari sisa-sisa jasad hidup atau mati.
- Parasit adalah tubuh yang hidup pada organisme lain dan menggunakan bahan dari tubuh inangnya (host). Parasit yang dapat menyebabkan penyakit pada inangnya disebut patogen.

b. Berdasarkan sumber energi

Jasad dibedakan menjadi dua jasad fototrof dan khemotrof

- ✚ Jasad fototrof jika menggunakan energi cahaya; dan
- ✚ khemotrof, jika menggunakan energi dari reaksi kimia.

c. Berdasarkan sumber energi dan karbonnya,

Jasad dibedakan menjadi 4, yaitu: fotoototrof, fotoheterotrof, khemoototrof dan khemoheterotrof. Perbedaan dari keempat jasad tersebut sbb:

Tabel 3. Perbedaan nutrisi berdasarkan sumber energi dan karbon

Jasad	Sumber Karbon	Sumber Energi
Fotoototrof	Zat Anorganik	Cahaya Matahari
Fotoheterotrof	Zat Organik	Cahaya Matahari
Khemotrof	Zat Anorganik	Oksidasi zat anorganik
Khemoheterotrof	Zat Organik	Oksidasi zat organik

d. Berdasarkan atas sumber donor elektron

Jasad digolongkan menjadi jasad litotrof dan organotrof.

- ✚ Jasad litotrof ialah jasad yang dapat menggunakan donor elektron berupa senyawa anorganik, seperti H_2 , NH_3 , H_2S , dan S .

✚ Jasad organotrof adalah jasad yang menggunakan donor elektron berupa senyawa organik

- e. Berdasarkan energi dan sumber donor elektron
- f. Organisme dapat dibagi menjadi 4 kategori, yaitu: organisme energi cahaya, organisme energi kimia, organisme kemo-energi, dan organisme kemo-energi. Perbedaan keempat tipe tubuh tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Perbedaan nutrisi berdasarkan sumber energi dan sumber donor elektron

Jasad	Sumber Energi	Sumber Donor Elektron	Contoh
Fotolitotrof	Cahaya	Zat anorganik	Tumbuhan tingkat tinggi, alga
Fotoorganotrof	Cahaya	Zat organik	Bakteri belerang fotosintetik
Khemolitotrof	Oksidasi zat anorganik	Zat anorganik	Bakteri besi, bakteri hidrogen, bakteri nitrifikasi
Khemoorganotrof	Oksidasi zat organik	Zat organik	Jasad heterotrof

- g. Berdasarkan akan kebutuhan oksigen
- Jasad dapat digolongkan dalam jasad aerob, anaerob, mikroaerob, anaerob fakultatif, dan kapnofil.

✚ Jasad aerob adalah organisme yang menggunakan oksigen bebas (O₂) sebagai akseptor hidrogen terakhir selama respirasi.

✚ Jasad anaerob, yang biasa disebut sebagai anaerob obligat atau bakteri anaerob 100%, adalah organisme yang tidak dapat menggunakan oksigen bebas sebagai akseptor hidrogen akhir selama respirasi. Mikroaerofil

adalah organisme yang membutuhkan sangat sedikit oksigen.

✚ Jasad aerob fakultatif adalah organisme yang dapat hidup dalam kondisi anaerobik dan aerobik. Organisme ini juga toleran terhadap bakteri anaerob.

✚ Jasad kapnofil adalah organisme yang membutuhkan kadar oksigen rendah dan kadar karbon dioksida tinggi. (Dwidjoseputro. 2003)

C. Interaksi antara mikroba dalam penggunaan nutrisi

Menurut Kusnadi (2008), jika dua atau lebih mikroorganisme yang berbeda ditumbuhkan bersama dalam satu media, aktivitas metabolismenya dibandingkan dengan jumlah aktivitas metabolisme masing-masing mikroorganisme dalam media yang sama tetapi ditumbuhkan secara terpisah akan bervariasi dalam kualitas dan kuantitas. Fenomena ini merupakan hasil dari interaksi metabolik atau interaksi dalam penggunaan nutrisi, yang dikenal sebagai co-direction atau sinergi, di samping interaksi mikroba lain yang dikenal sebagai "cross-feeding".

✚ Sintropik atau sinergistik

Syntropic atau Syntropic adalah fenomena interaksi metabolisme atau interaksi dalam penggunaan nutrisi, termasuk simbiosis simbiosis, misalnya yaitu:

- Metanogen yang merupakan bakteri anaerob obligat tidak dapat menggunakan glukosa sebagai substrat, tetapi bakteri ini akan cepat tumbuh dengan adanya

bakteri anaerobik atau fakultatif anaerob lain yang dapat memfermentasi glukosa.

- Kultur mikroba campuran yang terdiri dari satu atau lebih spesies. Faktor pertumbuhan umumnya tidak diperlukan untuk pengembangan budaya. Mikroorganisme dapat mensintesis bahan selulernya dari bahan organik sederhana atau dari media yang mengeluarkan sejumlah kecil vitamin atau asam amino esensial (esensial) untuk mikroorganisme lain. Adanya fakta ini akan menimbulkan koloni satelit yang dapat dilihat pada media padat. Koloni satelit ini hanya dapat tumbuh jika kotoran mikroorganisme lain merupakan faktor pertumbuhan penting bagi mikroorganisme tersebut.

Cross feeding

Cross feeding adalah bentuk simbiosis mutualisme sederhana. Dalam cross-feeding, pertumbuhan satu mikroba tergantung pada pertumbuhan yang lain karena kedua mikroba saling membutuhkan faktor pertumbuhan esensial, yang diekskresikan oleh masing-masing.

D. Pengertian dan Fungsi Media Pertumbuhan Mikroba

Pertumbuhan dan reproduksi mikroorganisme (bakteri) membutuhkan substrat yang disebut media kultur. Berkat media yang sesuai, pertumbuhan mikroorganisme akan maksimal, subur dan cepat. Media kultur (larutan biologis) dapat dibuat dari senyawa tertentu.

Media tumbuh adalah media yang terdiri dari nutrisi atau campuran nutrisi pada dan di mana mikroorganisme tumbuh. Selain itu, media juga dapat digunakan untuk isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroorganisme. Hal ini berkaitan erat dengan hipotesis Koch. Untuk menentukan bahwa mikroorganisme adalah penyebab penyakit, pertama-tama perlu untuk mendapatkan mikroorganisme dalam keadaan murni untuk mempelajari sifat-sifatnya. Untuk itu diperlukan media kultur sebagai tempat pertumbuhan dan isolasi mikroorganisme. (Lud Waluyo, 2004).

E. Persyaratan media Pertumbuhan Mikroba

Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme dalam bentuk padat, semi padat dan cair. Jika persyaratan tersebut terpenuhi, maka mikroorganisme dalam media dapat tumbuh, antara lain:

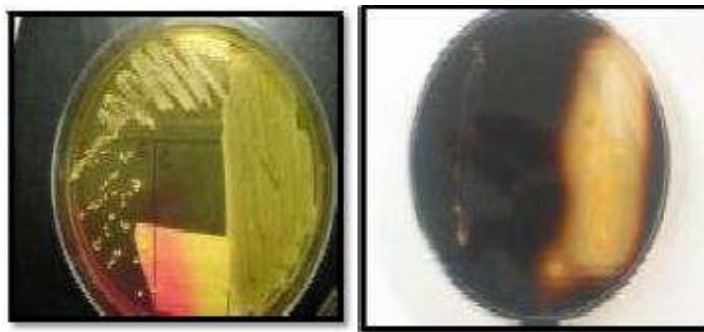
- ✚ Media harus memenuhi semua nutrisi yang tersedia untuk mikroorganisme
- ✚ Media harus memiliki tekanan osmotik, pH dan tegangan permukaan yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba
- ✚ Medium tidak mengandung zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme
- ✚ Media harus steril sebelum digunakan agar mikroorganisme dapat tumbuh dengan baik. (Lud Waluyo, 2004).

F. Klasifikasi media pertumbuhan mikroba

Menurut Pelczar, Michael (1988), medium dibagi menjadi tiga bagian berdasarkan konsistensi atau densitasnya, yaitu:

- a. Media padat

Media diperoleh dengan menambahkan agar-agar sebagai pematat. Medium agar dibagi menjadi medium miring dan medium dalam. Selain agar, media padat juga dapat dibuat dengan menggunakan bahan organik alami dan anorganik. Medium padat sering digunakan untuk mengamati kenampakan atau morfologi koloni dan sebagai media isolasi mikroorganisme tertentu. Contoh : Penggunaan Nutrient Agar (NA) dalam cawan Petri untuk memisahkan media dengan metode streak plate (Gambar A), selain media padat digunakan media Strach Agar (SA) untuk menguji aktivitas amilolitik mikroorganisme . Daerah bening di sekitar koloni menunjukkan hasil positif setelah penambahan iodium tetes demi tetes (Gambar B).



(A)

(B)

Gambar 1. (a) Metode pemisahan coretan menggunakan Nutrient Agar (NA) dalam cawan petri (b) Uji aktivitas amilolitik mikroba menggunakan media Strach Agar (SA). Daerah bening di sekitar koloni menunjukkan hasil positif setelah pemberian iodium (Sumber: Anna, 2012)

b. Media setengah padat (*semi solid medium*)

Medium ini dibuat dari bahan yang sama dengan medium padat, tetapi berbeda dalam komposisi compactor. Media ini biasanya digunakan untuk mengamati pergerakan mikroskopis bakteri dan kapasitas fermentasinya. Media ini dipanaskan ketika cair dan padat ketika dingin. Medium dapat dibuat tegak atau miring sesuai dengan kebutuhannya.

Contoh: bullying

c. Media cair

Media cair merupakan media berbentuk cair yang digunakan untuk berbagai tujuan, seperti menumbuhkan sejumlah besar mikroorganisme, memeriksa fermentasi, dan berbagai pengujian. Misalnya: Media Nutrient Both (NB) dalam tabung reaksi (Gambar 2) untuk mikroba bloom, uji fermentasi dan berbagai uji lainnya.



Gambar 2. Media Nutrient Both (NB) dalam tabung reaksi (Sumber: Anna, 2012)



Gambar 3. Media Nutrient Both dalam erlenmeyer yang digunakan untuk perbanyak mikroba (Sumber: Anna, 2012)

Sedangkan menurut komposisinya, medium dibagi menjadi:

a. Media sintetik atau media siap makan adalah media yang dibuat dari bahan yang ditentukan secara kimia. Contoh media sintetik yaitu :

1. Nutrien Agar (NA) adalah media umum untuk menguji air dan produk susu. Dalam kasus heterotrof, NA juga digunakan untuk pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme non-selektif. Media ini merupakan media sederhana yang terbuat dari ekstrak daging sapi, pepton dan agar-agar. NA adalah salah satu media yang umum digunakan dalam prosedur bakteriologis, seperti pengujian umum air, limbah, makanan, untuk membawa kultur, untuk pertumbuhan sampel dalam pengujian bakteri, dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni.
2. Potato Dextrose Agar (PDA) digunakan untuk mengkultur atau mengidentifikasi ragi dan kapang. Ini juga dapat digunakan untuk menghitung ragi dan jamur dalam sampel atau makanan. PDA mengandung sumber karbohidrat yang cukup, termasuk 20% ekstrak kentang dan 2% dekstrosa, sehingga mendukung pertumbuhan jamur dan ragi, tetapi bukan bakteri.



(a) (b)

Gambar 3. Hasil Percobaan pada Tanah Kebun Teh yang dicampurkan dengan PDA (b) dan NA (a)

- b. Media non sintetik atau media alami adalah media yang terbuat dari bahan alami seperti daging, kentang, dll. Komposisi senyawa tidak pasti karena media dibuat sendiri. Contoh media alami seperti: agar daging, agar kentang, agar touge, agar wortel.



Gambar 4. Hasil dari percobaan pada media wortel dengan sebelumnya di sterilisasi dengan autoklaf.

Menurut tujuan atau fungsinya, medium dibagi menjadi:

- a. Media selektif elektif, yaitu media yang dibuat dengan menambahkan bahan kimia tertentu yang selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme lain. Misalnya, aplikasi kimia kristal violet konsentrasi tertentu dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif tanpa

mempengaruhi pertumbuhan bakteri gram negatif. Contoh lain adalah endo agar yang menyebabkan E.coli berwarna merah sedangkan koloni Salmonella tidak berwarna (Lud, 2004).

- b. Media differensial, yaitu media yang mengandung bahan kimia yang mampu membedakan berbagai mikroorganisme. Media dilengkapi dengan reagen atau bahan kimia tertentu yang menyebabkan mikroorganisme membentuk, tumbuh atau berubah untuk membedakan jenisnya. Contohnya adalah Blood Agar Plate, yang dapat membedakan antara bakteri hemolitik dan non-hemolitik (Lud, 2004).
- c. Media eksklusif yaitu media yang hanya memungkinkan satu jenis mikroorganisme untuk tumbuh sedangkan mikroorganisme lainnya dihambat atau dibunuh. Contohnya adalah air pepton alkali, yang membunuh bakteri selain Vibrio. Hal ini karena pH medium sangat tinggi. (Sumarsih, 2003)
- d. Media diperkaya (enriched medium) adalah media yang ditambahkan zat tertentu untuk menumbuhkan mikroorganisme heterotrofik tertentu. Ditambahkan serum, darah, ekstrak tumbuhan dan zat lainnya (Luther, 2004).
- e. Media khusus adalah media yang menentukan jenis pertumbuhan mikroorganisme dan kemampuannya untuk melakukan perubahan kimia tertentu (Luther, 2004).
- f. Media persemaian (nutrient medium) adalah media yang kaya akan unsur hara dengan bahan yang disusun sedemikian

rupa sehingga hanya membuahi satu jenis mikroorganisme yang dicari. Misalnya media Kaufman tentang *Salmonella typhi* (Sumarsih, 2003).

- g. Media universal adalah media yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi. Media ini dapat menumbuhkan sebagian besar mikroorganisme. Contohnya adalah media kaldu nutrisi (Sumarsih, 2003).

III. **TEKNIK PENGAMATAN MIKROBA**

A. Isolasi Mikroba

Isolasi mikroba adalah proses mengambil bakteri dari lingkungan asalnya misalnya tanah, air, limbah dan lain-lain untuk dikembangkan atau ditumbuhkan pada medium buatan meliputi NA (Nutrien Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) atau medium lainnya sehingga didapatkan biakan yang murni. Mikroba yang dibiakkan dari satu tempat ke tempat lainnya harus menggunakan prosedur steril atau aseptik. Aseptik memiliki arti bebas dari kontaminasi spesies lain atau mikrobialain. Teknik aseptik merupakan hal terpenting apabila berkaitan dengan isolasi mikroba.

Teknik aseptik juga merupakan kegiatan dalam melindungi laboran dari kontaminasi bakteri (Singleton dan Sainsbury, 2006). Kondisi aseptis dalam isolasi dalam laboratorium mikrobiologi sangat diperlukan dengan tujuan agar mikroba yang terisolasi/didapatkan adalah mikroba yang benar-benar berasal dari habitat asalnya, bukan mikroba dari peralatan atau bahan lain yang digunakan selama prosesnya. Untuk itu peralatan atau bahan yang akan digunakan dalam proses isolasi sangat penting untuk dilakukan tahap sterilisasi terlebih dahulu.

Kegiatan dalam mengisolasi bakteri yang fungsi untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan aslinya sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni dilakukan dengan beberapa cara diantaranya yaitu cara goresan (streak plate), cara taburan atau

tuang (pour plate), cara sebar (spread plate), cara pengenceran (dilution method), serta mikromanipulator (the micromanipulator method).

1) **Sterilisasi**

Sterilisasi adalah proses membunuh mikroorganisme yang mungkin ada pada suatu benda. Sterilisasi merupakan persyaratan mutlak untuk keberhasilan pekerjaan di laboratorium mikrobiologi. Proses sterilisasi membutuhkan berbagai teknik untuk sterilisasi yang sempurna. Sterilisasi didefinisikan sebagai proses membebaskan alat dari segala bentuk kehidupan. Tujuan sterilisasi adalah untuk membebaskan alat atau bahan dari berbagai bentuk kehidupan, terutama mikroorganisme. Dalam praktik mikrobiologi, alat dan media steril sangat penting. Adanya pertumbuhan mikroba menunjukkan bahwa bakteri masih tumbuh dan proses sterilisasi belum sempurna. Sterilisasi akan berlangsung sepenuhnya sebelum spora bakteri, bentuk kehidupan mikroba yang paling tahan, dihancurkan (Lud Waluyo, 2004).

Macam-macam dan Teknik Sterilisasi

Secara umum, ada tiga teknik sterilisasi yang umum digunakan. Pemilihan teknik sterilisasi didasarkan pada sifat peralatan dan bahan yang akan disterilkan. Ketiga teknik tersebut adalah:

a) Sterilisasi Mekanik/Filtrasi

Mensterilkan (filter) secara mekanis pada suhu kamar menggunakan filter berpori yang sangat kecil (0,22 mikron atau 0,45 mikron) untuk menjaga mikroorganisme tetap pada filter.

Sterilisasi ini cocok untuk bahan yang sensitif terhadap panas seperti enzim dan larutan antibiotik.

b) Sterilisasi Fisik

Sterilisasi fisik dapat dilakukan dengan panas atau radiasi. Sterilisasi fisik radiasi dapat dilakukan dengan menggunakan sinar UV. Ada empat jenis sterilisasi panas:

- ✓ Pemijaran Api, membakar alat pada api secara langsung, contoh alat : jarum inokulum, pinset, batang L, dll.
- ✓ Panas kering, yaitu penggunaan udara panas untuk sterilisasi. Sterilisasi kering ditandai dengan penggunaan oven suhu tinggi (170-180°C) dalam waktu lama (1-3 jam). Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca, seperti kerucut, tabung reaksi, dll. Bungkus, pasang, atau letakkan peralatan/bahan dalam wadah kedap udara sebelum dimasukkan ke dalam oven untuk mencegah kontaminasi saat dikeluarkan dari oven.
- ✓ Uap Panas. Konsepnya mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih cocok untuk metode ini, agar tidak terjadi dehidrasi.
- ✓ Uap panas bertekanan (autoclave). Alat yang digunakan adalah autoklaf. Alat ini bekerja dengan menggunakan uap panas pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atmosfer. Sterilisasi uap tergantung pada:
 - Alat/bahan harus dapat ditembus uap panas secara merata tanpa mengalami kerusakan
 - Kondisi steril harus bebas udara (vacum)

- Suhu yang terukur harus mencapai 121°C selama 15 menit.



Gambar Autoklaf Merk All American, Model 25X-240 Electric Steam Pressure.

Bahan/alat yang tidak dapat disterilisasi dengan uap panas adalah serum, vitamin, antibiotik dan enzim, pelarut organik (seperti phenol), buffer yang mengandung deterjen (seperti SDS). Erlenmeyer hanya dapat mengisi media hingga volume totalnya. Langkah-langkah menggunakan autoclave:

- Pelajari tentang komponen autoclave dan fungsinya masing-masing
- Tuang air suling ke dalam autoklaf hingga batas yang disarankan
- Masukkan alat/bahan yang akan disterilkan, disusun sedemikian rupa sehingga uap air dapat meresap secara merata ke dalam alat/bahan yang akan disterilkan.
- Matikan autoklaf dan hidupkan perangkat. Perhatikan langkah-langkah pemanasan dan tekanan di dalam autoklaf. Tunggu hingga perangkat mencapai suhu 121°C selama 15

menit. Ketika proses sterilisasi selesai, autoclave akan secara otomatis membunyikan alarm.

- Hindari membuka tutup autoklaf setelah proses sterilisasi selesai dan menunggu tekanan dan suhu turunan-bagian autoclave dan fungsinya masing-masing
- Tuangkan air suling kedalam autoclave hingga batas yang dianjurkan
- Masukkan alat/bahan yang akan disterilkan, ditata sedemikian rupa sehingga uap air secara merata dapat menembus alat/bahan yang akan disterilkan tersebut.
- Tutup autoclave dan hidupkan alat. Perhatikan tahap kenaikan suhu dan tekanan pada autoclave. Tunggu hingga alat mencapai suhu 121°C selama 15 menit. Autoclave akan otomatis membunyikan alarm, jika proses sterilisasi sudah selesai.
- Hindari membuka tutup autoclave begitu proses sterilisasi selesai, tunggu sampai tekanan dan suhunya turun

c) Sterilisasi kimiawi.

Sterilisasi ini digunakan untuk alat/bahan yang tidak tahan panas atau kondisi aseptik (desinfeksi bangku dan tangan). Bahan kimia yang dapat digunakan adalah alkohol, asam p-asetoasetat, formaldehida, dll.

Selain proses sterilisasi, proses sterilisasi juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, namun untuk jenis aplikasi yang berbeda. Penjelasan tentang desinfeksi ini adalah sebagai berikut.

2) Pengertian Desinfeksi

Desinfeksi adalah penghancuran, penghambatan atau penghilangan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit atau masalah lain seperti pembusukan. Hal ini biasanya dicapai melalui penggunaan bahan kimia. Desinfektan adalah bahan kimia yang digunakan untuk mencegah infeksi atau kontaminasi oleh mikroorganisme seperti bakteri dan virus, dan untuk membunuh atau mengurangi jumlah mikroorganisme atau bakteri lain.

- Hasil dari proses desinfeksi dipengaruhi oleh beberapa faktor: Beban organik (bioburden) pada objek
 - Jenis dan tingkat kontaminasi mikroba
 - Pembersihan atau dekontaminasi objek sebelumnya
 - Konsentrasi desinfektan
 - Struktur fisik benda
 - Suhu dan pH proses desinfeksi
- Desinfeksi terbagi menjadi tiga tingkat:

- a) Desinfeksi tingkat tinggi (DTT) adalah proses yang membunuh semua makhluk hidup, tetapi spora bakteri hanya terbunuh sebagian. Dapat direbus selama 20 menit atau dijenuhkan dengan desinfektan dalam jumlah besar selama 30 menit, misalnya dengan glutaraldehid atau H₂O₂
- b) Desinfeksi sedang (DTS), yang membunuh bakteri, terutama jamur, kecuali spora bakteri
- c) Desinfeksi tingkat rendah (DTR) yang membunuh sebagian besar bakteri, beberapa virus, dan beberapa jamur. Namun, itu tidak dapat membunuh mikroorganisme yang resistan

terhadap obat seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan spora bakteri.

Desinfektan dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai cara, antara lain yaitu dengan cara pembersihan, sinar matahari, pendinginan, dan pemanasan.

a) Pembersihan

Membersihkan benda atau permukaan mengurangi jumlah mikroorganisme dan dengan demikian kemungkinan infeksi, seperti mencuci tangan dengan sabun dan air sebelum operasi. Cuci tangan dengan sabun, lalu basahi dengan alkohol 70%. Gunakan betadine untuk membersihkan luka, terutama yang kotor. Cuci kulit atau jaringan tubuh yang akan dioperasi dengan larutan yodium 3%, dilanjutkan dengan alkohol.

b) Sinar matahari

Sinar ultraviolet di bawah sinar matahari adalah germisida. Ini membunuh bakteri vegetatif dan pembentuk spora, meskipun butuh waktu lebih lama untuk membunuh bentuk spora. Sinar ultraviolet juga digunakan untuk desinfeksi air, sterilisasi ruang operasi, ruang industri farmasi, dll. Meskipun sinar ultraviolet memiliki daya mematikan yang kuat terhadap mikroorganisme, daya tembusnya kecil dan hanya dapat membunuh mikroorganisme di permukaan.

c) Pendinginan

Suhu rendah menyebabkan mikroorganisme berhenti tumbuh dan berkembang biak. Metode ini digunakan untuk mengawetkan makanan yang mudah rusak. Pada suhu -20°C ,

mikroorganisme tidak dapat menguraikan makanan, sehingga tidak terjadi pembusukan. Patogen mati pada 0°C, seperti *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*.

d) Pemanasan

Umumnya bakteri bentuk vegetatif akan mati dalam waktu 5-10 menit pada suhu 65°C. Meskipun bentuk spora membutuhkan waktu lebih lama. Panas membunuh bakteri karena mengkoagulasi (menggumpalkan) protoplasmanya (protein). Jika lebih banyak air, protoplasma akan lebih cepat mengembun, sehingga sterilisasi dengan uap panas lebih cepat daripada sterilisasi dengan udara kering panas. Spora *Clostridium botulinum* terbentuk dalam uap air panas pada suhu 120°C dan mati dalam waktu 10 menit, sedangkan pada udara kering yang panas pada suhu 120°C, mereka mati dalam waktu 120 menit.

e) Pengeringan

Pengeringan membuat larutan di sekitar mikroorganisme hipertonik, memungkinkan air keluar dari sel mikroba, menyebabkan mikroorganisme mati. Misalnya, dalam pembuatan ikan asin dan bandeng, penambahan garam dan bumbu dapat memperparah gangguan osmotik. Karena pengeringan ini mengakibatkan terhentinya pembunuhan dan perkembangbiakan mikroba.

f) Menggunakan zat kimia

Bahan kimia yang dapat digunakan dalam desinfektan seperti alkohol, yodium, sediaan klorin, pewarna, sabun dan deterjen sintetis, aerosol, dll.

3) Preparasi sampel

Sebelum melakukan isolasi mikroba, langkah pertama yang harus dilakukan adalah preparasi sampel. Preparasi sampel ini bertujuan untuk melepaskan atau melarutkan mikroba dari substratnya ke air sehingga lebih mudah untuk dilakukan langkah selanjutnya. Adapun beberapa macam preparasi sampel yang dapat dilakukan yaitu :

1. Pencucian.

Preparasi sampel ini dilakukan dengan cara melarutkan sel-sel mikroba yang menempel di permukaan suatu substrat luas namun relatif kecil seperti contoh : daun, bunga, batang. Pencucian dapat dilakukan dengan merendam alcohol 70% selama 1 menit, selanjutnya direndam dengan natrium hipoklorit (NaOCl) 5% selama 5 menit kemudian direndam alcohol 70% selama 1 menit dan dibilas aquades steril untuk selanjutnya diinokulasikan ke media isolasi (Pulungan & Tumangger, 2018).

2. Pengulasan (Swab).

Preparasi sampel ini dilakukan dengan tujuan memindahkan mikroba pada permukaan benda yang luas menggunakan *cotton bud* steril. Sebagai contoh adalah pengambilan sampel dengan mengusapkan kapas steril di atas tempat berukuran 10

x 10 cm secara horizontal, vertikal dan miring selama 30 detik di satu titik (Delfira et al., 2020).

3. Penghancuran (Maserasi)

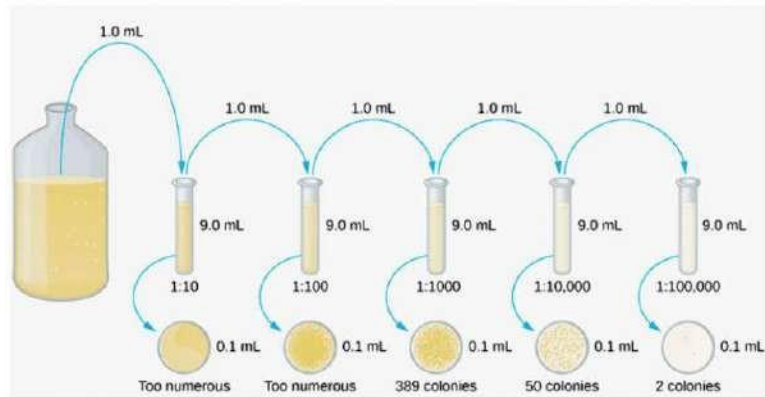
Maserasi dilakukan dengan cara menumbuk sampel padat untuk melepaskan mikroba dari sampel tersebut. Hasil dari maserasi selanjutnya diinokulasi ke media yang telah disiapkan dan ditunggu 2 hingga 7 hari untuk diamati mikroba yang tumbuh.

4) Pengenceran bertingkat

Untuk memperkecil atau mengurangi jumlah dari mikroba dilakukan pengenceran bertingkat atau berseri. Banyaknya tingkat pengenceran bergantung pada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Perbandingan yang digunakan adalah 1:9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya terdapat $1/10$ sel mikroba dari pengenceran sebelumnya. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

- a) Sampel yang mengandung mikroba dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama (10^{-1}) secara aseptis. Kemudian sampel dilarutkan atau dihomogenkan dengan menggunakan vortex.
- b) Mengambil 1 ml dari tabung (10^{-1}) menggunakan pipet volume untuk dipindahkan ke tang reaksi kedua (10^{-2}). Sampel selanjutnya dihomogenkan kembali menggunakan vortex.
- c) Pengenceran dilakukan berulang hingga tabung reaksi terakhir dengan cara yang sama. Perlu diingat bahwa setiap

mengencerkan dari tabung satu ke tabung yang lain blue tip pada pipet volume harus selalu diganti.



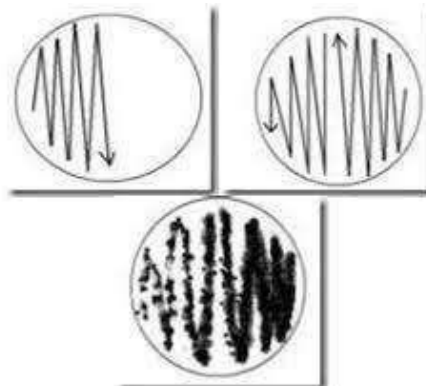
Teknik pengenceran bertingkat pada penanaman media

Sumber : Microbe Notes

Isolasi mikroba dapat digunakan untuk mengetahui kemampuannya pada berbagai bidang, seperti pertanian, kesehatan, pangan, dan lain-lain.

5) Penanaman sampel mikroba

a) Metode Streak



Gambar. Teknik penanaman dengan goresan (Streak)

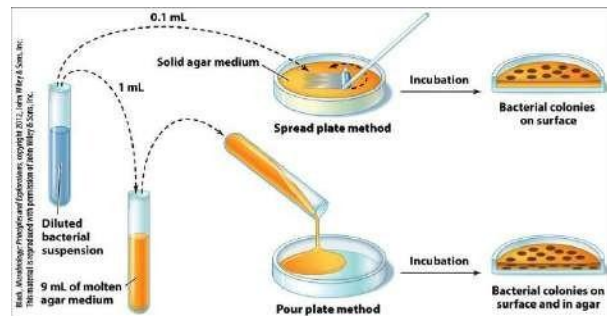
Sumber : <https://generasibiologi.com/2016/11/metode-teknik-cara-isolasi-mikroba.html>

Teknik penanaman dengan goresan (streak) memiliki tujuan untuk meremajakan kultur ke dalam media baru. Mikroba yang diisolasi menggunakan teknik ini biasanya merupakan mikroba yang sudah diidentifikasi atau diisolasi sebelumnya.

b) Metode Spread plate

Spread plate merupakan teknik menanam dengan menyebarkan suspensi mikroba pada permukaan media sehingga diperoleh kultur murni. Adapun prosedur dalam teknik ini adalah sebagai berikut :

- a) Teteskan 1 ml suspensi sel kedalam cawan petri kosong yang telah steril secara aseptis
- b) Tuangkan media agar yang hangat (suhu 45 – 50°C) ke cawan yang telah berisi suspensi bakteri tersebut dan tutup
- c) Homogenkan campuran media dan suspensi dengan cara goyangkan atau putar cawan petri secara perlahan membentuk angka delapan (8) di atas meja yang rata dalam kondisi aseptis
- d) Setelah agar memadat cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada
- e) suhu kamar ataupun inkubator selama 24 jam. Amati pertumbuhannya (Universiitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, 2020).



Sumber: <http://farmasi.unida.gontor.ac.id/wp-content/uploads/2019/03/isolasi-bakteri-dengan-metode-cawan-gores.jpg>

c) Metode Pour Plate

Pada teknik ini digunakan media agar yang belum memadat ($>45^{\circ}\text{C}$) untuk dituangkan bersama sampel ke dalam cawan petri dan dihomogenkan sebelum dibiarkan memadat. Tujuan menghomogenkan sampel dan media adalah untuk menyebarkan sampel yang berisi mikroba pada permukaan dan di dalam media sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan media yang kaya O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Berikut merupakan prosedur kerja yang dilakukan dalam teknik ini :

- a) Siapkan alat yang dibutuhkan, yaitu cawan steril, tabung reaksi dan media padat yang masih cair ($>45^{\circ}\text{C}$)
- b) Semprotkan 1 ml sampel ke dalam cawan kosong . Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan membentuk angka 8 sebanyak delapan kali untuk menghomogenkan sampel dan media, kemudian diinkubasi.

- c) Sampel yang digunakan sebanyak 0,1 ml untuk spread plate dan 1 ml untuk pour plate karena spread plate digunakan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan pour plate diberikan lebih banyak dari pada spread plate karena media yang luas di dalam agar dan di permukaan.



Gambar. Metode pour plate

Sumber: <https://generasibiologi.com/2016/11/metode-teknik-cara-isolasi-mikroba.html>

d) Karakterisasi Makroskopis

a. Bakteri

Beberapa sifat bakteri yang digunakan untuk identifikasi ini mencakup morfologi koloni (ukuran, bentuk, warna) (Mahmudah et al., 2016).

1) Bentuk

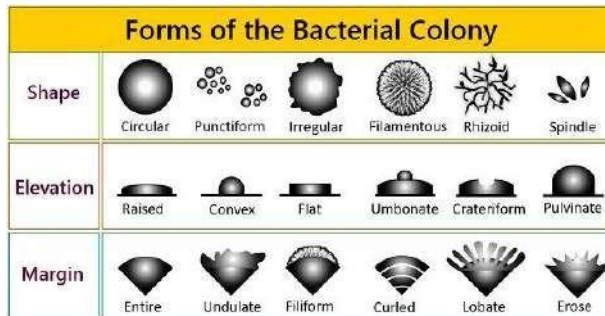
- a) Circular: tepian teratur
- b) Irregular: tepian berlekuk
- c) Rizoid: pertumbuhan menyebar seperti akar

2)

- a) Flat
- b) Raised
- c) Convex
- d) Pulvinate
- e) Umbonate

3) Tepian/margin

- a) Entire
- b) Undulate
- c) Lobate
- d) Erode
- e) Flamentous
- f) Curled



Sumber: <https://biologyreader.com/wp-content/uploads/2022/04/forms-of-the-bacterial-colony.jpg>

b. Fungi

Pengamatan secara makroskopis dilakukan terhadap warna dan diameter pertumbuhan koloni kapang pada petridis (Sine & Soetarto, 2018). Adapun pengamatan lain yaitu mencakup:

- 1) Bentuk
- 2) Diameter
- 3) Warna
- 4) Tekstur

Jamur kapang, yeast dan cendawan memiliki karakterisasi yang beebeda-beda, diantaranya yaitu:

- 1. Karakterisasi Kapang