

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

##### **1. Bakteri**

Ada berbagai macam mikroorganisme yang penting dalam bidang kedokteran diantaranya yaitu bakteri, rickettsia dan chlamydia, virus, jamur dan protozoa. Berdasarkan dari struktur selnya, mikroorganisme dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu eukariotik dan prokariotik. Mikroorganisme eukariotik adalah yang mempunyai struktur sel seperti hewan dan tumbuhan, contohnya adalah jamur dan protozoa. Mikroorganisme yang termasuk kedalam prokariotik adalah bakteri, rickettsia dan chlamydia yang merupakan sel mikroorganisme yang struktur selnya sederhana (Soedarto,2015).

##### **a. Bentuk Bakteri**

Berbagai macam bentuk dan ukuran bakteri mulai dari yang berbentuk sferis sangat kecil, silindris, batang spiral, batang berflagel hingga rantai yang berfilamen dapat ditemukan di hampir semua bagian bumi ini (Soedarto,2015).

Berikut ini adalah macam-macam bentuk bakteri:

##### **1) Bakteri berbentuk bulat (bola)**

Bakteri dengan bentuk bulat disebut juga kokus (coccus) dapat dibagi menjadi 5 yaitu sebagai berikut:

- a) Monokokus, merupakan bakteri berbentuk bola tunggal, misalnya adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit kencing nanah yaitu *Neisseria gonorrhoeae*.
- b) Diplokokus, merupakan bakteri berbentuk bola yang bergandengan dua-dua misalnya adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit pneumonia yaitu *Streptococcus pneumoniae*.
- c) Sarkina, merupakan bakteri berbentuk bola yang tersusun empat-empat sehingga menyerupai kubus.
- d) Streptokokus, merupakan bakteri berbentuk bola yang tersusun memanjang seperti rantai misalnya adalah bakteri *Streptococcus pyogenes*.
- e) Stafilokokus, merupakan bakteri berbentuk bola yang berkoloni membentuk gerombolan sehingga menyerupai buah anggur misalnya adalah bakteri *Streptococcus aureus*.

(Irianto,2014)

## 2) Bakteri berbentuk batang

Bakteri dengan bentuk batang dengan nama lainnya adalah basilus dapat dibedakan menjadi 3 macam yaitu:

- a) Basil Tunggal, merupakan bakteri yang hanya terdiri dari satu batang saja, misalnya adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit tifus yaitu *Salmonella typhi*.

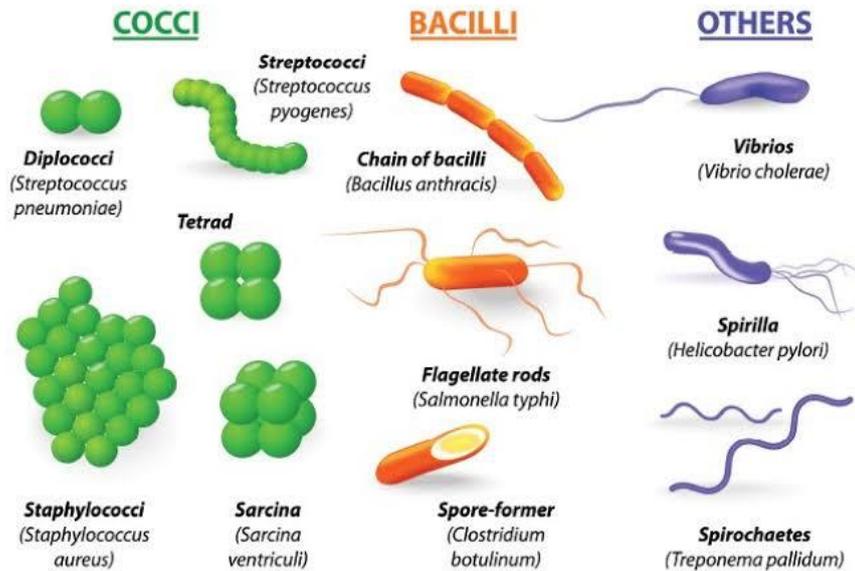
- b) Diplobasil, merupakan bakteri yang berbentuk batang dan bergandengan dua-dua.
- c) Streptobasil, merupakan bakteri berbentuk batang yang tersusun bergandengan memanjang menyerupai rantai, misalnya adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit antraks yaitu *Bacillus anthracis* (Irianto,2014).

### 3) Bakteri berbentuk melilit

Bakteri berbentuk melilit dapat disebut juga spiral atau spirillum yang dapat dibagi menjadi 3 macam yaitu:

- a) Spiral, merupakan bakteri yang berbentuk menyerupai spiral, misalnya adalah bakteri *Helicobacter pylori*.
- b) Vibrio, merupakan bakteri yang berbentuk koma, misalnya adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit kolera yaitu *Vibrio cholerae*.
- c) Spirochaeta, merupakan bakteri yang berbentuk spiral tetapi mempunyai kelenturan yang pada saat bergerak dapat memanjangkan dan mengerutkan tubuhnya, misalnya adalah bakteri *Treponema pallidum* penyebab penyakit sifilis.  
(Irianto,2014).

Berikut adalah gambar bentuk morfologi bakteri:



Gambar 1. Bentuk Morfologi Bakteri  
(sumber : <https://www.RuangBiologi.co.id/>)

#### b. Syarat Pertumbuhan Bakteri

Kebutuhan bakteri pada umumnya adalah sumber energi yang digunakan untuk pertumbuhan dan sebagai sumber tenaga bagi bakteri. Makanan merupakan substrat yang digunakan untuk metabolisme. Beberapa kebutuhan nutrisi bakteri adalah sebagai berikut:

##### 1) Karbon

Karbon merupakan nutrisi paling penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri dan sebagai atom pusat untuk semua struktur dan fungsi seluler. Terdapat dua jenis mikroba yang bergantung pada karbon, yaitu:

a) Autotrof

Organisme ini dapat tumbuh pada media yang hanya mengandung senyawa anorganik. Organisme ini menggunakan karbon anorganik dalam bentuk karbon dioksida.

b) Heterotrof

Organisme ini dapat tumbuh pada media yang mengandung senyawa organik, terutama glukosa (Cappuccino dan Sherman, 2014).

2) Nitrogen

Unsur nitrogen harus ada di dalam bentuk reduksi sebagai kombinasi organik misalnya nitrogen sebagai asam amino (R-NH<sub>2</sub>). Beberapa genus dari bakteri mengalami proses *fiksasi nitrogen biologis* yaitu secara enzimatik suatu bakteri dapat mereduksi nitrogen yang berada di udara yang digunakan dalam sintesis senyawa organik di dalam sel. Apabila suatu bakteri tidak mempunyai enzim untuk mereduksi nitrogen, maka bakteri harus mendapatkan unsur ini dalam bentuk sudah direduksi misalnya N sebagai garam ammonium atau sebagai senyawa organik yang mengandung N seperti asam-asam amino (Irianto,2014).

3) Unsur non-logam

Unsur sulfur harus ada di dalam bentuk reduksi sebagai kombinasi organik misalkan sulfur sebagai senyawa sulfhidril (R-SH) . Apabila suatu bakteri tidak mempunyai enzim untuk

mereduksi sulfur, maka bakteri harus mendapatkan unsur ini dalam bentuk sudah direduksi misalnya S sebagai  $\text{H}_2\text{S}$  atau senyawa organik yang mengandung S seperti senyawa-senyawa merkapto. Selain sulfur ada senyawa non logam lain yaitu fosfor yang diperoleh dari senyawa fosfat (Irianto,2014).

#### 4) Unsur logam

Ion logam yang hanya dibutuhkan dalam konsentrasi sedikit oleh bakteri diantaranya adalah  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  dan  $\text{Fe}^{+3}$  yang juga dapat diperoleh dari garam-garam anorganik. Ion-ion tersebut dibutuhkan bakteri untuk proses aktivitas seluler agar dapat berjalan secara efisien. Osmoregulasi, pengaturan aktivitas enzim dan transport elektron selama oksidasi hayati adalah yang dimaksud aktivitas seluler tersebut (Cappuccino dan Sherman, 2014).

#### 5) Vitamin

Vitamin yang hanya diperlukan dalam jumlah sedikit memiliki peran penting untuk aktivitas sel dan untuk pertumbuhan seluler. Vitamin yang merupakan sumber koenzim yang digunakan untuk pembentukan sistem enzim aktif (Cappuccino dan Sherman, 2014).

#### 6) Air

Air yang berada di dalam media dapat membantu sel-sel agar nutrien-nutrien dengan bobot molekul rendah dapat melintasi membran sel (Cappuccino dan Sherman, 2014).

#### 7) Energi

Energi memiliki peran penting dalam aktivitas metabolik kehidupan sel, yang meliputi transport aktif, biosintesis dan biodegradasi makromolekul. Energi yang konstan sangat dibutuhkan agar aktivitas tersebut tetap dapat berlangsung. Terdapat 2 tipe bioenergetik yaitu:

- a) Fototrof, merupakan sumber energi bagi mikroorganisme tipe ini yang berasal dari energi radiasi.
- b) Kemotrof, merupakan sumber energi bagi mikroorganisme tipe ini yang berasal dari oksidasi senyawa kimia (Cappuccino dan Sherman, 2014).

#### c. Kondisi Fisik yang Diperlukan untuk Pertumbuhan Bakteri

Di dunia ini terdapat berbagai jenis bakteri yang mempunyai bentuk, ukuran dan struktur yang bermacam-macam serta dapat hidup dalam berbagai jenis lingkungan sehingga bermacam-macam jenis bakteri tersebut juga mempunyai fisiologi yang berbeda-beda pula meskipun secara garis besar untuk mekanisme biokimianya sama. Setiap organisme yang hidup pasti memerlukan nutrisi dan kondisi-

kondisi tertentu untuk tumbuh dan berkembang. Kebutuhan untuk pertumbuhan dan perkembangan bakteri diantaranya adalah:

1) Kebutuhan Metabolisme

Di dalam hidupnya, bakteri selalu melakukan perkembangan biakan untuk menghasilkan bakteri-bakteri yang baru. Untuk bereproduksi, bakteri memerlukan energi, bahan baku dan kondisi lingkungan yang mendukung serta enzim-enzim yang dibentuk pada saat-saat tertentu saja atau pada semua kondisi yang memang membutuhkan enzim untuk proses penyusunan genotip maupun genetik (Soedarto,2015).

2) Sumber Energi

Berdasarkan sumber energi yang digunakan oleh mikroorganisme untuk tumbuh kembangnya dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu:

- a) Phototroph, yaitu sumber energi yang berasal dari sinar matahari.
- b) Chemotroph, yaitu sumber energi yang berasal dari oksidasi komponen kimiawi.
- c) Chemo-organotroph, yaitu sumber energi yang berasal dari komponen organik yang berasal dari hospes (Soedarto,2015).

3) Oksigen

Suatu organisme dalam hidupnya untuk pertumbuhan dan perkembangannya ada yang memerlukan oksigen maupun tidak

tergantung dari jenisnya. Menurut kebutuhan oksigennya, organisme dapat dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu:

- a) Aerob, yaitu tersedianya oksigen sangat diperlukan untuk dapat hidup.
  - b) Aerob obligat, yaitu hanya dapat hidup jika tersedia oksigen bebas.
  - c) Aerob fakultatif, yaitu suatu organisme akan hidup dan tumbuh lebih baik apabila tersedianya oksigen, namun walaupun oksigen tidak tersedia, organisme tersebut juga tetap bisa hidup.
  - d) Anaerob obligat, yaitu suatu organisme yang tidak dapat hidup apabila ada oksigen bebas
  - e) Mikroaerofilik, yaitu suatu organisme yang dalam kondisi rendah oksigen dapat hidup lebih baik (Soedarto,2015).
- 4) Karbon dioksida

Suatu mikroorganisme dalam pertumbuhannya ada yang memerlukan karbon dioksida dalam kadar rendah maupun tinggi tergantung jenis organismenya yang berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhannya.

5) Temperatur

Berdasarkan temperatur yang menjadi habitat mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang, organisme dapat dikelompokkan menjadi 3 berdasarkan sifatnya yaitu:

- a) *Psychrophile (cold loving bacteria)*, yaitu pada suhu rendah atau bahkan di bawah 0°C, organisme dengan sifat ini bisa hidup dengan baik.
- b) *Thermophile (moderate temperature loving bacteria)*, yaitu organisme yang tahan dan dapat hidup dalam lingkungan dengan suhu yang tinggi yaitu pada suhu 40°C atau bahkan lebih.
- c) *Mesophile (heat loving bacteria)*, yaitu jenis organisme yang pertumbuhan optimalnya berada pada suhu yang tidak terlalu panas dan tidak terlalu dingin kisaran suhu 20°C-40°C. Sebagian besar patogen yang menyerang tubuh manusia adalah organisme yang bersifat mesophile ini karena suhu tubuh manusia masuk dalam kisaran suhu optimal organisme dapat tumbuh yaitu sekitar 37°C (Soedarto,2015).

#### 6) Konsentrasi Ion Hidrogen

Medium buatan yang digunakan untuk tumbuh suatu mikroorganisme harus selalu dijaga pH nya, yaitu bisa dengan cara menggunakan larutan penyangga. Pertumbuhan bakteri pada pH optimal antara 6,5 dan 7,5. Namun, beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat asam atau sangat alkali.

#### 7) Tekanan Osmose

Tekanan osmose sangat diperlukan untuk mempertahankan bakteri agar tetap hidup. Apabila pada saat bakteri berada dalam

larutan yang konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi yang ada dalam sel bakteri maka cairan akan keluar dari sel bakteri melalui membran sitoplasma yang disebut plasmolisis (Tim Mikrobiologi Universitas Brawijaya, 2003).

#### 8) Kadar air

Bakteri merupakan makhluk yang suka akan keadaan basah, bahkan dapat hidup didalam air, namun didalam air yang tertutup mereka tidak dapat hidup subur, hal ini disebabkan karena kurangnya udara. Tanah yang basah baik untuk kehidupan bakteri. Banyak bakteri yang mati, jika terkena udara kering (Dwijoseputro,2010).

#### d. Pertumbuhan Bakteri

Pada bakteri, pertumbuhan dapat diartikan sebagai pertambahan volume dan ukuran sel serta sebagai pertambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Transisi dari satu fase ke fase lainnya dapat ditunjukkan dari perubahan kemiringan pada kurva. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan dua dari populasi. Kebanyakan suatu bakteri bermultiplikasi aseksual dengan pembelahan biner melintang yang menghasilkan dua sel yang sama,

dua menjadi empat, empat menjadi delapan dan seterusnya. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama :

1) Fase lag (fase pertumbuhan diperlambat)

Fase adaptasi ini merupakan periode dari bakteri yang ditanam pada suatu media perbenihan yang sesuai atau waktu yang diperlukan untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru.

2) Fase log (fase eksponensial atau fase pertumbuhan cepat)

Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan dan perkembangan bakteri berlangsung begitu cepat dan maksimum. Bakteri pada fase ini sangat baik apabila akan dijadikan inokulum. Komposisi sel bakteri dan bahan metabolitnya relatif konstan untuk jangka waktu tertentu. Hal ini tergantung dari sifat-sifat alamiah bakteri dan lingkungannya.

3) Fase Konstan (fase statis)

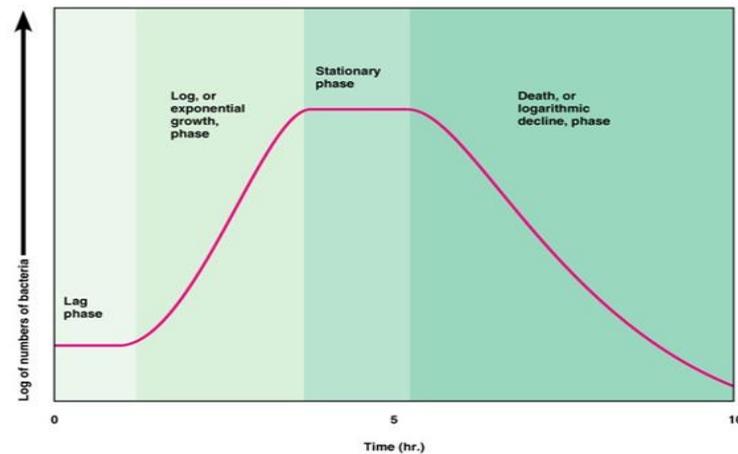
Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan bakteri menurun dan perkembangbiakan bakteri yang mulai menyusut. Kemudian akan terjadi jumlah bakteri yang berbiak bisa sama dengan jumlah bakteri yang mati sehingga pada grafik tergambar garis yang hampir horizontal.

4) Fase Penurunan (fase kematian)

Pada fase ini, merupakan fase dimana terjadi peningkatan kematian sel bakteri sehingga terjadi penurunan populasi bakteri.

Jumlah bakteri sangat sedikit dan bagi bakteri yang masih hidup dengan menggunakan bahan yang dikeluarkan oleh sel bakteri yang telah mati (Irianto,2014).

Berikut adalah kurva pertumbuhan bakteri:



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri  
(Sumber : Pearson Education Inc.2004)

## 2. Bakteri *Staphylococcus aureus*

### a. Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat dalam uraian di bawah ini:

Domain : Bacteria

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Staphylococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus aureus* (Soedarto,2015)

b. Morfologi dan Sifat

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri berbentuk kokus atau bulat berdiameter sekitar 1 $\mu$ m yang apabila dilihat secara mikroskopik koloni bergerombol menyerupai anggur dan apabila dilakukan pewarnaan gram, bakteri ini bersifat gram positif. Bakteri ini tidak aktif bergerak, tidak membentuk spora, tahan terhadap kekeringan, dapat hidup pada lingkungan dengan kadar garam tinggi (*halofilik*), positif terhadap uji katalase dan tahan terhadap panas hingga mencapai 50°C. Uji katalase positif dapat digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus sp.* dengan *Streptococcus sp.* Bakteri *S.aureus* mempunyai pigmen *staphyloxanthin* yang berfungsi sebagai faktor virulensi, sehingga koloni bakteri berwarna kuning (Soedarto, 2015).

Pada tes koagulase *S.aureus* yang merupakan salah satu faktor virulensi bakteri menunjukkan hasil positif. Bakteri ini menggunakan faktor koagulase darah untuk melindungi diri terhadap fagositosis dan respon imun hospes dengan cara menggumpalkan fibrinogen yang berada dalam plasma. Selain itu, untuk dapat merusak sel hospes bakteri ini juga menghasikan eksotoksin sitolitik, leukosidin dan exfoliatin (Soedarto, 2015).

*Staphylococcus aureus* selain hidup tersebar di alam, ada pula yang hidup pada manusia sebagai flora normal yang hidup di aksila, daerah membran mukosa, kulit serta saluran hidung bagian anterior

yang dapat ditemukan pada sekitar 30% dari orang dewasa. Staphylococci yang hidup di kulit ada yang dapat menghasilkan antibiotika yang aktif terhadap flora kulit. Disamping menjadi flora normal pada manusia, *S.aureus* juga dapat bersifat patogen yang dapat menyebabkan infeksi supuratif, keracunan makanan dan sindrom syok toksik (Soedarto,2015).

c. Pertumbuhan dan Pemiakan

Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan suasana aerobik atau mikroaerofilik dapat tumbuh dengan baik pada media bakteriologi. Bakteri ini dapat tumbuh dengan cepat pada suhu 37<sup>0</sup>C, namun untuk pembentukan pigmen yang baik adalah pada suhu kamar sekitar 20<sup>0</sup>C - 35<sup>0</sup>C (Brooks dkk., 2005). Kondisi pH yang optimal untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah 7,4 (Tim Mikrobiologi Universitas Brawijaya, 2003). Pada media padat, koloni *S.aureus* berbentuk bulat, halus, mengkilap dan berwarna abu-abu hingga kuning emas. Pada perbenihan cair bakteri *S.aureus* tidak membentuk pigmen, namun menyebabkan kekeruhan yang merata (Brooks dkk., 2005).

*Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada media-media yang digunakan di laboratorium bakteriologi. Media-media tersebut adalah:

1) *Nutrient Agar Plate* (NAP)

Pada media ini yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pembentukan pigmen, *Staphylococcus aureus* akan membentuk pigmen berwarna kuning keemasan.

2) *Blood Agar Plate* (BAP)

Media BAP merupakan media rutin yang digunakan sebagai media pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Koloni yang tumbuh pada media ini akan tampak lebih besar dan pada galur ganas akan terlihat zona hemolisis yang jernih di sekitar koloni bakteri (Tim Mikrobiologi Universitas Brawijaya, 2003).

Asam amino dan vitamin-vitamin, seperti threonin, asam nikotinat dan biotin yang terkandung dalam media begitu diperlukan untuk membiakkan *Staphylococcus aureus*. Diperlukan media yang mengandung NaCl dengan konsentrasi tinggi (7.5%) atau media yang mengandung polimiksin (*Polymixin Staphylococcus medium*) untuk dapat melakukan isolasi primer *S.aureus* dari infeksi campuran yang berasal dari tinja atau luka (Tim Mikrobiologi Universitas Brawijaya, 2003).

d. Patogenitas

*Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia dan melalui invasi jaringan. Infeksi dapat ditularkan melalui tangan yang menyentuh tempat koloni patogen itu berada lalu bakteri tersebut dapat masuk ke dalam

tubuh bisa dengan melalui luka pada kulit, lokasi pembedahan atau tempat yang lain dengan sistem kekebalan yang lemah (Soedarto,2015).

Bakteri *S.aureus* dapat menyerang seluruh bagian tubuh dengan bentuk klinis yang tidak sama tergantung dari bagian tubuh mana yang terinfeksi. Macam dari bentuk klinis tersebut adalah sebagai berikut:

- 1) Infeksi pada kulit yaitu furunkel, karbunkel, impetigo, scalded skin syndrome dan lain-lain.
- 2) Infeksi pada kuku yaitu paronikhia.
- 3) Infeksi pada tulang yaitu osteomielitis.
- 4) Infeksi pada sistem pernapasan yaitu tonsilitis, bronkhitis dan pneumonitis.
- 5) Infeksi pada otak yaitu meningitis dan ensefalomielitis.
- 6) Infeksi pada traktus urogenitalis yaitu sistitis dan pielitis.
- 7) *Toxic shock syndrome* yaitu suatu keadaan yang ditandai dengan panas secara mendadak, diare, syok, diffuse maculo erythematous rash, hiperemi pada konjungtiva, orofarings dan membran mukus vagina terutama bagi wanita yang sedang mengalami menstruasi dan ada kaitannya dengan penggunaan tampon.
- 8) Keracunan makanan dapat terjadi karena menelan makanan yang sudah terkontaminasi oleh enterotoksin *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan dari uraian bentuk-bentuk klinis tersebut, ada beberapa infeksi akibat bakteri *S.aureus* yang sering menimbulkan kematian, diantaranya adalah Septisemia, Endokarditis, Ensefalitis dan *Toxic shock syndrome* (Tim Mikrobiologi Universitas Brawijaya,2003).

### 3. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Bakteri

Beberapa teknik pengawetan dan penyimpanan mikroba sudah banyak dilakukan dan dikembangkan. Namun untuk memilih suatu metode yang akan digunakan untuk penyimpanan bakteri yang tepat perlu memperhatikan beberapa faktor penting diantaranya yaitu jumlah kultur, nilai ekonomis kultur, frekuensi penggunaan kultur, fasilitas yang dimiliki yang meliputi sumber daya manusia dan peralatan yang ada serta biaya. Dari beberapa faktor tersebut, hal yang paling penting adalah untuk menjaga agar mikroorganisme yang diawetkan dan disimpan tidak mati, tidak terkontaminasi, tidak mengalami perubahan populasi dan tidak mengalami perubahan genetik (Novelina,2005).

Perlunya pemeliharaan yang baik bagi kultur murni agar dapat digunakan setiap waktu dibutuhkan. Banyak cara yang dilakukan untuk pemeliharaan kultur murni yang saat ini terus dikembangkan. Pemeliharaan dapat dilakukan dengan cara meremajakan dalam jangka waktu tertentu atau sub kultur. Namun pada metode tersebut masih terdapat kelemahan yaitu dalam waktu singkat harus dipindahkan secara periodik ke medium baru sehingga dapat menyita waktu dan tenaga.

Metode penyimpanan yang lain adalah penyimpanan kering beku (*freeze drying*) atau dengan metode penyimpanan dengan suhu ultra dingin (Rahman,2011).

Berikut adalah beberapa teknik pemeliharaan kultur murni bakteri :

a. Peremajaan Berkala

Teknik peremajaan berkala merupakan teknik pemeliharaan kultur murni tertua yang digunakan untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium yang dilakukan dengan cara memperbarui biakan mikroba dari biakan lama ke medium baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali. Teknik ini tidak dianjurkan untuk penyimpanan dalam jangka panjang karena memiliki berbagai kendala diantaranya kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, peluang terjadinya kontaminasi, dan terjadi kekeliruan dalam pemberian label (Sharman dkk,2009).

b. Penyimpanan Dalam Akuades Steril

Hanya beberapa bakteri yang dapat disimpan dengan baik menggunakan teknik ini, contohnya adalah *Pseudomonas Agrobacterium*, dan *Curtobacterium*. Bakteri yang berbentuk batang dan bereaksi gram positif adalah bakteri yang dapat disimpan menggunakan teknik ini yang dilakukan penyimpanan dalam akuades steril pada suhu ruang. Pada kondisi penyimpanan tersebut, bakteri masih berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga stabilitas genetiknya untuk jangka panjang tidak bisa dijamin. Penyimpanan

dengan teknik ini juga memiliki risiko terjadi kontaminasi. Oleh karena itu, teknik ini lebih dianjurkan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang (Sumarsih,2014).

c. Penyimpanan Dalam Minyak Mineral

Teknik penyimpanan dalam minyak mineral merupakan salah satu teknik yang paling sederhana untuk memelihara bakteri, khamir dan jamur. Cara penyimpanannya adalah disimpan dalam tabung agar miring dan ditutup dengan minyak mineral atau paraffin cair setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Dasar teknik penyimpanan ini yaitu mempertahankan viabilitas mikroba dengan mencegah pengeringan medium, sehingga waktu peremajaan dapat diperpanjang sampai beberapa tahun. Kelemahan pada teknik ini adalah kurang praktis untuk ditransportasi dan adanya minyak mineral menyebabkan peremajaan menjadi kotor (Sumarsih,2014).

d. Penyimpanan Dalam Tanah Steril

Teknik penyimpanan dalam tanah steril bermanfaat bagi fungi, *Streptomyces spp.*, dan bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus spp.* dan *Clostridium spp.* *Rhizobium spp.* Keuntungan dari teknik ini yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan dapat mempertahankan stabilitas genetik mikroba (Sumarsih,2014).

e. Penyimpanan Dengan Teknik Kering Beku (Liofilisasi)

Proses pengeringan beku merupakan kombinasi dari dua teknik penyimpanan jangka panjang yang paling baik, yaitu pembekuan dan pengeringan. Garis besar tahapan proses ini meliputi pembuangan uap air dengan cara sublimasi vakum dari status beku. Pada teknik pengeringan beku ini produk dibekukan kemudian kandungan air yang berupa es akan diuapkan dengan cara sublimasi dengan menggunakan energi dalam bentuk panas dan pada tekanan yang rendah. Teknik pengeringan beku merupakan yang terbaik untuk dapat mencegah terjadinya perubahan kimia dan meminimumkan kehilangan nutrisi selama proses pengeringan berlangsung. Kultur kering beku mempunyai penampakan jernih, padat dan memiliki viabilitas sel yang baik. Pengeringan beku dapat mempertahankan bentuk kaku dari bahan yang dikeringkan sehingga dapat menghasilkan produk kering yang berpori dan tidak berkerut. Produk kultur yang mengalami proses pengeringan beku memiliki beberapa keuntungan. Keuntungan produk kering beku antara lain: kering, stabil, menempati volume yang kecil sehingga dapat menekan biaya penyimpanan dan pengiriman (Machmud,2001).

Dalam metode pengeringan beku ini terdapat tiga tahapan yaitu pembekuan, pengeringan primer dan pengeringan sekunder. Pada tahapan yang pertama yaitu pembekuan, hal penting yang dilakukan adalah mendinginkan material di bawah titik eutektiknya

yaitu suhu terendah pada saat fase padat dan cair bahan dapat berdampingan. Dalam hal ini, memastikan bahwa sangat cenderung terjadi sublimasi daripada berubah menjadi fase cair. Fase pembekuan merupakan yang paling penting dalam proses pengeringan beku ini karena suatu produk dapat diperlakukan supaya menghasilkan hasil akhir yang baik (Shukla,2011).

Tahapan selanjutnya adalah tahap pengeringan primer yang dilakukan dengan cara tekanan diturunkan (beberapa milibar) dan diberikan panas yang cukup untuk sublimasi. Pada fase pengeringan primer, pengendalian tekanan dilakukan melalui vacuum parsial dan sekitar 95% air disublimasikan, sehingga kemungkinan pada fase ini terjadi secara lambat. Peran kondensor yang sudah diatur suhunya biasanya dibawah 50°C dalam fase ini adalah untuk mencegah uap air mencapai pompa vacuum sehingga dapat menurunkan kinerja pompa. Molekul air yang tidak tercairkan selanjutnya akan dihilangkan dengan fase pengeringan sekunder. Pada proses *freeze drying* dalam fase ini diatur oleh isotherm adsorpsi bahan. Suhu pada pengeringan sekunder dinaikkan lebih tinggi daripada pengeringan primer, bahkan ada suhu yang diatas 0°C. Selain suhu, tekanan dalam fase ini diturunkan karena untuk mendorong desorpsi yang biasanya dalam mikrobar atau fraksi pascal. Hasil akhirnya adalah kandungan air akan mencapai hanya sebesar 1% sampai 4% saja (Shukla,2011).

Hal yang perlu diperhatikan adalah lioprotektan (*lyoprotectant*) yang akan digunakan untuk pembuatan suspensi sel supaya kerusakan sel hidup pada tahapan pembekuan dan pengeringan dapat dicegah. Lioprotektan merupakan zat kimia nonelektrolit yang memiliki peran dalam mengurangi pengaruh mematikan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es selama pembekuan sehingga dapat mempertahankan viabilitas sel. Berdasarkan sifat fisikokimia dan daya permeabilitas membran, maka lioprotektan dibagi menjadi dua kelompok, yang pertama yaitu lioprotektan intraseluler merupakan lioprotektan yang memiliki bobot molekul kecil dan bersifat permeabel sehingga dapat keluar masuk membran (contoh: gliserol, etilen glikol, dan propanadiol). Kedua yaitu lioprotektan ekstraseluler merupakan lioprotektan yang memiliki bobot molekul besar dan bersifat nonpermeatif sehingga tidak dapat keluar masuk membran (contoh: protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, dan susu) (Vishwanath & Shannon 2000).

Lioprotektan yang paling banyak digunakan adalah gliserol karena dapat berdifusi ke dalam sel lebih cepat, mampu mengubah kristal es yang berukuran besar dan tajam, dan melenturkan membran sel sehingga tidak mudah rapuh. Selain itu, gliserol dapat menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit sehingga menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya merusaknya suatu bahan. Di dalam membran plasma,

lioprotektan ini akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengatasi ketidakstabilan membran serta berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein sehingga menyebabkan partikel-partikel intramembran terkumpul (Vishwanath & Shannon 2000).

#### 4. Perhitungan Jumlah Bakteri

Pertumbuhan bakteri dapat diukur dengan melakukan pengenceran biakan atau medium. Pengukuran jumlah sel bakteri merupakan pengukuran jumlah sel per unit volume biakan yang dapat dilakukan secara langsung maupun tidak langsung.

##### a) Cara Langsung (*Total Direct Count*)

Cara langsung yaitu dengan menghitung jumlah total dari sel bakteri, baik yang hidup maupun yang mati.

##### b) Cara Tidak Langsung (*Indirect Viable Count*)

Inokulasi dan inkubasi adalah hal yang perlu dilakukan terlebih dulu untuk perhitungan mikrobial dengan cara tidak langsung yaitu dengan menghitung jumlah sel yang hidup saja. Beberapa teknik dapat dilakukan untuk melakukan perhitungan mikrobial secara tidak langsung, diantaranya yaitu seperti menggunakan sentrifuge, menghitung berat kering, menghitung aktivitas metabolisme, kekeruhan, pengenceran, perhitungan jumlah koloni (*plate count*) dan *most probable number* (MPN Method) (Retnaningrum, 2017).

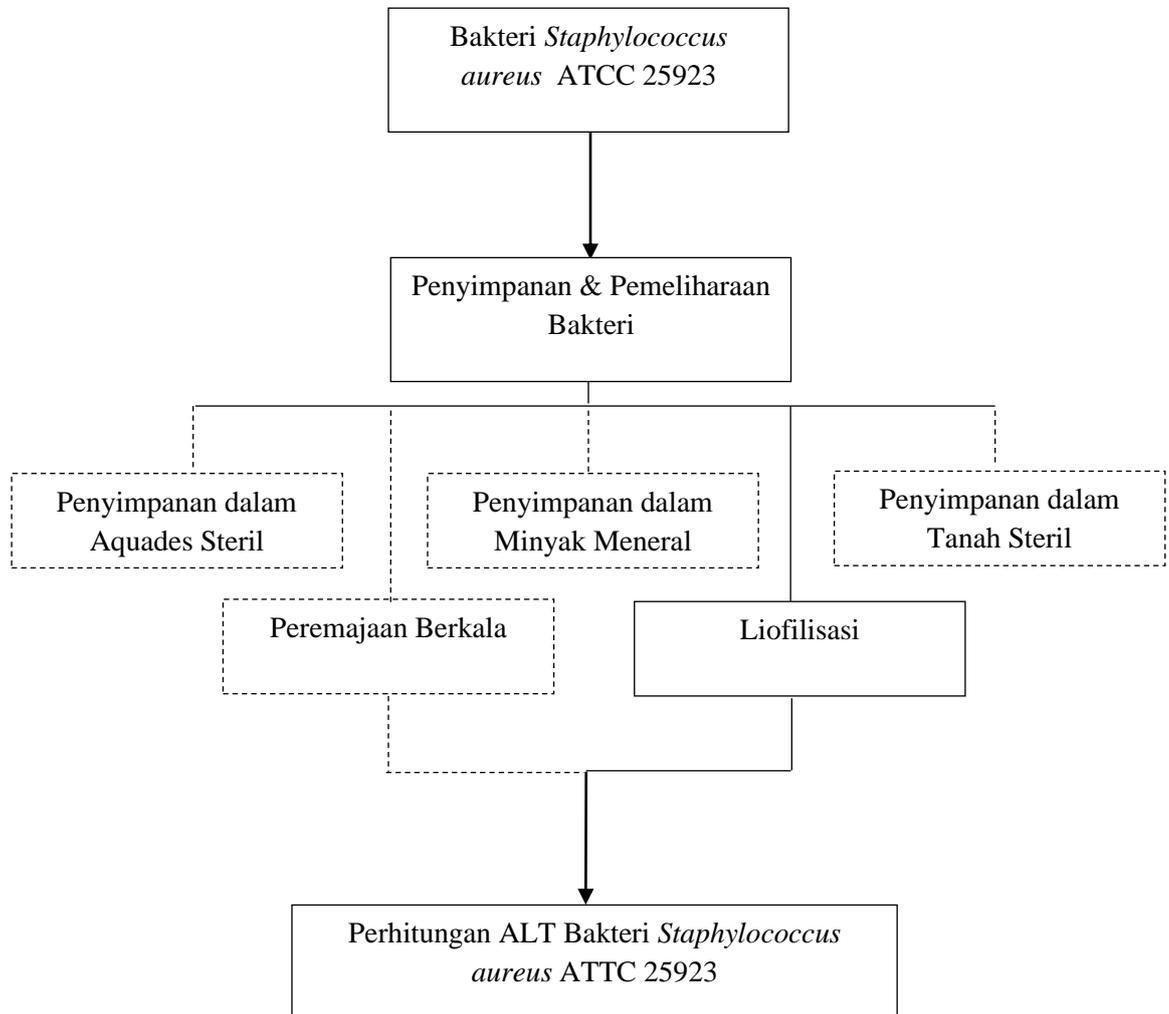
Cara yang paling umum digunakan untuk perhitungan jumlah mikrobial adalah dengan berdasarkan jumlah koloni (*plate count*). Prinsip dari metode ini adalah dengan melakukan sebuah seri pengenceran lalu masing-masing dari pengenceran tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah diberi media agar dengan menggunakan cara dan macam tergantung pada mikrobial apa yang akan dilakukan perhitungan. Setelah diinkubasi dan koloni tumbuh, kemudian dilakukan perhitungan dari cawan petri pada masing-masing pengenceran. Hasil dari perhitungan tersebut dapat diketahui jumlah bakteri per mililiter atau gram bahan.

Adapun syarat-syarat yang digunakan untuk menentukan standar perhitungan koloni metode *plate count* yaitu sebagai berikut:

- 1) Pada setiap cawan petri terdapat 30-300 koloni. Apabila tidak memenuhi syarat maka jumlah bakteri dipilih yang mendekati 300.
- 2) Tidak ditemukan koloni *spreader* yaitu koloni yang lebih besar dan menutupi dari setengah cawan petri.
- 3) Perbandingan jumlah koloni bakteri antara pengenceran sebelumnya secara berturut turut, apabila hasilnya sama atau lebih kecil dari 2 maka hasil dirata-rata, namun apabila lebih dari 2, yang digunakan adalah jumlah koloni bakteri pada pengenceran sebelumnya.
- 4) Apabila dengan ulangan hasilnya telah memenuhi syarat, maka dirata-rata.

Dalam menghitung koloni bakteri biasanya dapat dengan bantuan *colony counter* yang biasanya telah dilengkapi dengan *electronic regester* (Retnaningrum, 2017).

## B. Kerangka Teori



Keterangan : ----- = Tidak dilakukan  
 ————— = Dilakukan

### **C. Pertanyaan Penelitian**

1. Berapa Angka Lempeng Total (ALT) bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada sebelum dilakukan liofilisasi yang disimpan selama 30 hari pada suhu 4°C?
2. Berapa Angka Lempeng Total (ALT) bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada sesudah dilakukan liofilisasi yang disimpan selama 30 hari pada suhu 4°C?