

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Bakteri *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah bakteri saprofit dan bakteri tanah yang memberikan kontribusi pada siklus nutrisi karena kemampuannya untuk menghasilkan berbagai enzim. Bakteri ini telah digunakan di industri untuk menghasilkan protease, amilase, antibiotik dan bahan kimia. *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan penyakit pada manusia, seperti meningitis, *endocarditis*, *endophalmitis*, konjungtivitis dan gastroenteritis akut (Brooks, dkk., 2005).

a. Klasifikasi

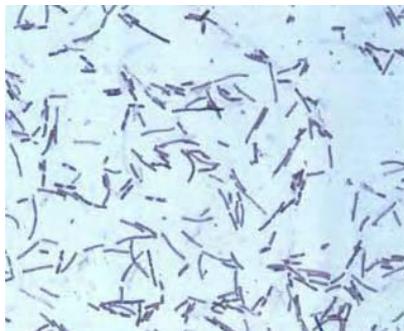
Berikut adalah klasifikasi *Bacillus subtilis* (Madigan, 2005):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

b. Morfologi dan Karakteristik

Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan bakteri Gram positif berbentuk streptobasil atau batang berantai, dapat membentuk endospora yang berbentuk oval di bagian sentral, tidak motil dan mempunyai flagela. Koloni bakteri pada media agar berbentuk bulat sedang, tepi tidak teratur, permukaan tidak mengkilat dan berwarna kecoklatan. *Bacillus subtilis* mempunyai panjang 2-3 μm dan lebar 0,7-0,8 μm . *Bacillus subtilis* dapat hidup pada kondisi dengan atau tanpa adanya oksigen sehingga disebut sebagai mikroorganisme anaerobik fakultatif (Brooks, dkk., 2005; Williams, 1985).

Berikut adalah gambar morfologi bakteri *Bacillus subtilis* secara mikroskopis.



Gambar 1. Morfologi Bakteri *Bacillus subtilis*

Sumber: Madya, 2013.

c. Kondisi Fisik untuk Pertumbuhan Bakteri

Berbagai faktor sangat menentukan apakah suatu kelompok mikroba yang terdapat dalam suatu lingkungan dapat tumbuh subur, tetap dorman atau mati. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yaitu:

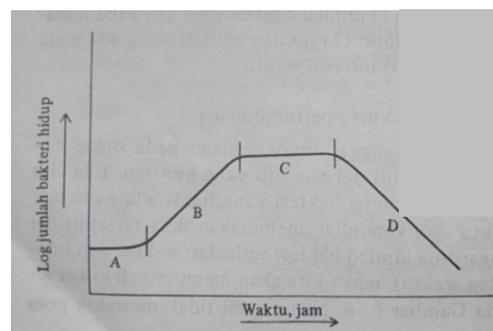
- 1) Nutrisi atau sumber zat makanan bagi bakteri diperoleh dari senyawa karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, unsur logam, vitamin dan air untuk fungsi-fungsi metabolik dan pertumbuhannya.
- 2) Suhu merupakan faktor lingkungan yang sangat penting yang dapat mempengaruhi aktivitas organisme. Suhu dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, mempengaruhi jumlah total pertumbuhan, mengubah proses-proses metabolik tertentu serta morfologi (bentuk luar) sel. Berdasarkan suhu dari tempat hidupnya, bakteri dapat dibagi dalam beberapa golongan yaitu psikrofil (*cold loving bacteria*) yaitu pada suhu 0-20°C, mesofil (*moderate temperature loving bacteria*) pada suhu 25-40°C dengan suhu optimal 37°C, serta termofil (*heat loving bacteria*), yaitu bakteri yang tumbuh pada suhu antara 50-60°C. *Bacillus subtilis* termasuk bakteri golongan mesofil dengan suhu pertumbuhan optimum yaitu 30-37°C (Hadimani dan Kulkarni, 2017).
- 3) Rentang pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yaitu pada pH 7-8 (Hadimani dan Kulkarni, 2017).
- 4) *Bacillus subtilis* bersifat anaerob fakultatif, yaitu akan hidup dan tumbuh lebih baik apabila tersedia oksigen, namun juga tetap bisa hidup walaupun oksigen tidak tersedia (Soedarto, 2015).
- 5) Tekanan osmotik sangat diperlukan untuk mempertahankan bakteri agar tetap hidup. Medium yang paling cocok untuk kehidupan bakteri ialah medium yang isotonik terhadap isi sel bakteri.

Apabila bakteri berada dalam larutan yang konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi yang ada di dalam sel bakteri, maka kemungkinan yang akan terjadi yaitu keluarnya cairan dari sel bakteri melalui membran sitoplasma yang disebut plasmolisis. (Dwijoseputro, 2018).

d. Pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan bakteri merupakan penambahan secara teratur pada semua komponen di dalam sel bakteri. Ukuran sel ditentukan dari kecepatan pertumbuhan. Semakin cepat pertumbuhan maka semakin cepat ukuran sel bertambah. Sedangkan umur sel bakteri dapat ditentukan setelah selesai pembelahan sel dan untuk umur kultur bakteri dapat ditentukan dari lama atau waktu inkubasi (Hamdayati, 2011).

Kurva pertumbuhan bakteri pada media dapat dipisahkan menjadi empat fase utama:



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Sumber: Pelczar dan Chan, 1986.

1) Fase lag (A)

Fase lag merupakan fase adaptasi, yaitu fase penyesuaian mikroorganisme pada suatu lingkungan yang baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel, yang ada hanyalah peningkatan ukuran sel. Lama fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal mikroorganisme yang diambil dari kulturnya.

2) Fase logaritma (B)

Fase logaritma merupakan fase dimana terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase logaritma ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Hal yang dapat menghambat laju pertumbuhan adalah bila satu atau lebih nutrisi dalam kultur habis, sehingga hasil metabolisme yang bersifat racun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

3) Fase stasioner (C)

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya sehingga jumlah keseluruhan bakteri akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena kematian diimbangi oleh pembentukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan dengan nutrisi yang dilepaskan oleh sel-sel yang mati karena lisis. Hal ini disebabkan

oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel.

4) Fase kematian (D)

Fase kematian merupakan fase dimana laju kematian melampaui laju pertumbuhan sehingga terjadi penurunan populasi bakteri (Pelczar dan Chan, 2013).

2. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Bakteri

Penyimpanan dan pemeliharaan bakteri bertujuan untuk menjaga agar biakan bakteri tetap hidup, ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah, mereduksi atau mengurangi laju metabolisme dengan tetap mempertahankan viabilitasnya dan memperoleh biakan dengan pertahanan hidup (*survival*) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri yang minimum (Setiaji, 2015).

Teknik yang digunakan dalam penyimpanan dan pemeliharaan bakteri bergantung pada sifat bakteri dan tujuan dari penyimpanan dan pemeliharaan bakteri. Sifat bakteri dapat dilihat melalui ciri-ciri morfologi, fisiologi, biokimia dan kemampuan bakteri bertahan hidup baik dalam lingkungan alaminya maupun di lingkungan buatan.

Tujuan penyimpanan atau koleksi meliputi penyimpanan jangka pendek dan penyimpanan jangka panjang. Penyimpanan jangka pendek merupakan penyimpanan yang dilakukan untuk keperluan rutin penelitian yang disesuaikan dengan kegiatan atau program tertentu. Penyimpanan jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi

sehingga apabila suatu saat diperlukan dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia. Oleh karena itu, daya hidup bakteri harus dipertahankan (Machmud, 2001).

Beberapa teknik penyimpanan dan pemeliharaan sebagai berikut:

a. Peremajaan Berkala

Peremajaan berkala yaitu dengan memindahkan atau memperbarui biakan bakteri dari media lama ke media baru secara berkala dengan rentang waktu yang singkat. Teknik ini merupakan cara paling tradisional yang digunakan untuk penyimpanan dan pemeliharaan isolat bakteri di laboratorium. Peremajaan berkala tidak dianjurkan untuk penyimpanan dan pemeliharaan jangka panjang karena kemungkinan terjadinya kontaminasi sehingga harus dilakukan identifikasi untuk memperoleh kultur standar bakteri yang murni.

b. Penyimpanan dalam Akuades Steril

Penyimpanan dalam akuades steril hanya dapat digunakan untuk beberapa bakteri, terutama bakteri Gram negatif dan berbentuk batang, misalnya anggota genus *Pseudomonas*. Bakteri yang disimpan dengan teknik ini masih berpeluang tumbuh dengan lambat sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang. Selain itu, teknik ini masih kurang efektif karena bakteri yang disimpan berpeluang terkontaminasi, tetapi masih bisa digunakan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang.

c. Penyimpanan dalam Minyak Mineral

Teknik penyimpanan dalam minyak mineral dilakukan dengan cara menyimpan biakan bakteri dalam tabung dan menutupnya dengan minyak mineral atau parafin cair. Bakteri ditumbuhkan pada tabung berisi medium agar miring atau medium cair (*broth*) yang sesuai, lalu permukaan biakan ditutup dengan minyak mineral steril setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Teknik ini memiliki kelemahan yaitu kurang praktis untuk ditransportasi dan keberadaan minyak mineral menyebabkan peremajaan menjadi kotor.

d. Penyimpanan dalam Tanah Steril

Teknik penyimpanan dalam tanah steril terutama diaplikasikan untuk bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus* sp. dan *Clostridium* sp. Beberapa keuntungan teknik ini yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan dapat mempertahankan stabilitas genetik mikroba (Machmud,2001).

e. Penyimpanan dengan Teknik Kering Beku (Liofilisasi)

Penyimpanan dengan teknik kering beku atau disebut dengan liofilisasi (*lyophilization*) merupakan teknik penyimpanan dan pemeliharaan bakteri yang menggunakan kombinasi antara dua teknik penyimpanan jangka panjang yang paling baik yaitu pembekuan dan pengeringan. Teknik ini terkenal dan banyak digunakan untuk penyimpanan bakteri jangka panjang. Keunggulan produk hasil liofilisasi atau liofilisat antara lain adalah dapat

mempertahankan stabilitas produk, dapat mempertahankan stabilitas struktur bahan sehingga dapat meningkatkan daya rehidrasi, daya hidup dan rekonstitusi sel-sel hidup tetap tinggi. Prinsip dari liofilisasi yaitu membekukan sampel dan mengurangi kandungan airnya dengan cara sublimasi, yaitu penguapan langsung mengubah bentuk es menjadi gas atau uap (Pujihastuti, 2009; Sugiawan, 2000).

Proses liofilisasi untuk mengawetkan kultur jangka panjang dilakukan dengan menggunakan bahan pelindung atau lioprotektan. Lioprotektan berfungsi untuk menstabilkan protein, mencegah kerusakan akibat pembekuan, dan melindungi dari kekeringan yang berlebihan. Pemilihan lioprotektan tergantung pada mikroba yang akan disimpan dan penambahannya dilakukan sebelum proses liofilisasi untuk meminimalisir kerusakan sel bakteri. Senyawa lioprotektan harus dapat memelihara mikroba dalam kondisi hidup dan memberi peluang untuk dapat ditumbuhkan kembali dengan baik dalam kondisi kering. Beberapa macam lioprotektan meliputi, skim milk, sukrose, trehalose, Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, dan gliserol. (Pujihastuti, 2009; Puspawati, dkk., 2010)

3. Angka Lempeng Total (ALT)

Angka Lempeng Total (ALT) merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba pada suatu sampel. Uji ALT menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang

dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni (CFU) per ml (BPOM, 2008). Pada pengujian ALT menggunakan media *Plate Count Agar* (PCA) sebagai media padatnya.

Koloni yang tumbuh pada media tidak selalu berasal dari 1 sel mikroba, karena beberapa mikroba ada yang cenderung mengelompok atau berantai. Pada metode ALT setiap sel mikroba yang hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi 1 koloni setelah diinkubasi dalam media biakan dengan lingkungan yang sesuai. Istilah *Coloni Forming Unit* (CFU) digunakan untuk menghitung jumlah mikroba yang hidup dan menghasilkan 1 koloni. Jumlah bakteri hidup yang terhitung (*viable count*) menggambarkan sel bakteri yang hidup. Lempeng agar yang paling baik digunakan dalam perhitungan yaitu lempeng yang mengandung 30 – 300 koloni (BPOM RI, 2006).

Beberapa metode perhitungan ALT sebagai berikut:

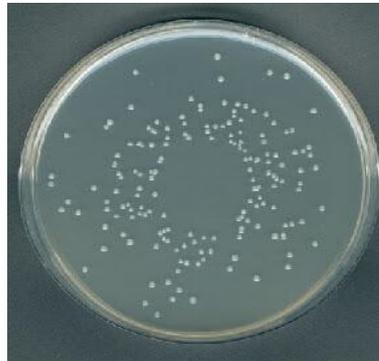
- a. *Pour plate*, merupakan metode untuk menumbuhkan bakteri di dalam media agar dengan cara mencampurkan media agar yang masih cair dengan suspensi bakteri sehingga sel-sel tersebut tersebar merata. Suspensi bakteri perlu dilakukan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri.
- b. *Spread plate*, merupakan metode untuk menumbuhkan bakteri dengan cara menuangkan suspensi bakteri ke media agar yang telah memadat lalu disebar atau digores secara merata. Sama halnya dengan metode *pour plate*, pada metode ini juga dilakukan

pengenceran suspensi bakteri sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri.

Beberapa syarat untuk menentukan standar perhitungan koloni menggunakan metode ALT, sebagai berikut:

- a. Pelaporan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka satuan dan desimal. Lakukan pembulatan ke atas apabila angka ≥ 5 dan pembulatan ke bawah apabila angka < 5
- b. Dihitung jumlah koloni tiap cawan petri dengan syarat jumlah koloni diantara 30-300 koloni
- c. Jika pada semua pengenceran didapatkan < 30 koloni per cawan petri, maka jumlah koloni yang dihitung yaitu pada pengenceran terendah. Jumlah sebenarnya tetap ditulis.
- d. Jika pada semua pengenceran didapatkan > 300 koloni per cawan petri, maka jumlah koloni yang dihitung yaitu pada pengenceran tertinggi. Jumlah sebenarnya tetap ditulis.
- e. Jika jumlah koloni dari masing-masing tingkat pengenceran hasilnya diantara 30-300 koloni, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah adalah ≤ 2 , maka hitung rata-ratanya untuk pelaporan.
- f. Jika jumlah koloni dari masing-masing tingkat pengenceran hasilnya diantara 30-300 koloni, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah adalah ≥ 2 , maka ambil nilai terkecil untuk pelaporan.
- g. Jika ada koloni yang menutup lebih besar daripada setengah luas cawan petri, koloni tersebut dikenal sebagai *spreader*.

- h. Jika dengan ulangan telah memenuhi syarat, hasilnya dirata-rata (Retnaningrum, dkk., 2017).



Gambar 3. Angka Lempeng Total pada Media *Plate Count Agar*
Sumber : Teknologi Laboratorium Medik, 2016

4. Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis untuk melihat karakteristiknya. Bakteri ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (NA) miring atau medium NA pada cawan petri untuk melihat bentuk morfologinya.

a. Pengamatan Makroskopis

Pengamatan secara makroskopis pada media pertumbuhan meliputi warna atau pigmentasi, bentuk koloni, tepian koloni, permukaan (elevasi), konsistensi dan opalesensi. Warna atau pigmentasi koloni bakteri terdiri dari putih, karotenoid (warna merah, oranye dan kuning), antosianin (merah dan biru), melanin (warna coklat, hitam, oranye dan merah). Bentuk koloni bakteri terdiri dari *circular* (bulat), *irregular* (tidak beraturan) dan *rhizoid* (menyebar seperti akar). Tepi bakteri yaitu *entire* (rata), *lobate* (berlekuk), *undulate* (bergelombang), *serrate*

(bergerigi), dan *filamentous* (benang). Bentuk elevasi terdiri dari *flat* (rata), *raised* (timbul), *convex* (cembung) dan *unbonate* (cembung di bagian tengah lebih menonjol). Konsistensi koloni terdiri dari berlendir, seperti mentega (*butyrous*) kering, atau seperti tepung (*dry*). Opalesensi atau kekeruhan terdiri dari keruh dan jernih (Lay, 1994).

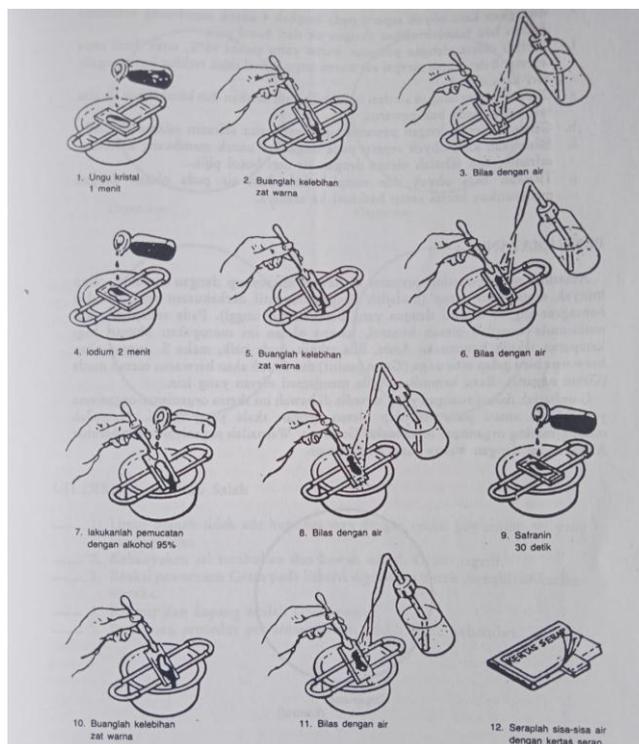
b. Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk melihat bentuk sel serta sifat bakteri. Pengamatan mikroskopis dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram, pewarnaan spora dan uji biokimia.

1) Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan salah satu teknik identifikasi yang sangat penting dalam menentukan jenis bakteri. Pewarnaan Gram membedakan bakteri menjadi dua golongan utama berdasarkan kemampuannya dalam menyerap cat warna yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif yaitu bakteri yang memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan tebal yang tersusun kompak dengan permeabilitas yang kecil sehingga kompleks iodin-kristal violet yang terbentuk tidak bisa lepas, mempertahankan cat warna kristal violet dan tampak berwarna ungu tua. Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang terdiri atas lipopolisakarida dan lapisan peptidoglikan yang tipis tersusun tidak kompak dengan permeabilitas besar sehingga kompleks iodin-kristal violet mudah lepas dan kemudian menyerap warna merah dari cat warna safranin sebagai cat warna pembanding. *Bacillus subtilis*

dengan pewarnaan Gram dapat diamati sel bakteri berbentuk batang dan berantai berwarna ungu tua yang merupakan ciri bakteri Gram positif.



Gambar 4. Prosedur Pewarnaan Gram

Sumber: Hadioetomo, 1985.

2) Pewarnaan Spora

Spora bakteri adalah fase perubahan bentuk bakteri untuk melindungi diri dari faktor luar yang tidak menguntungkan. Spora lazim disebut endospora karena dibentuk di dalam sel. Endospora dapat berbentuk bulat, lonjong atau silindris, terletak sentral, subterminal atau terminal, serta ada yang garis tengahnya lebih besar dari garis tengah sel bakteri sehingga menyebabkan pembengkakan sel bakteri (Dwidjoseputro, 2001)

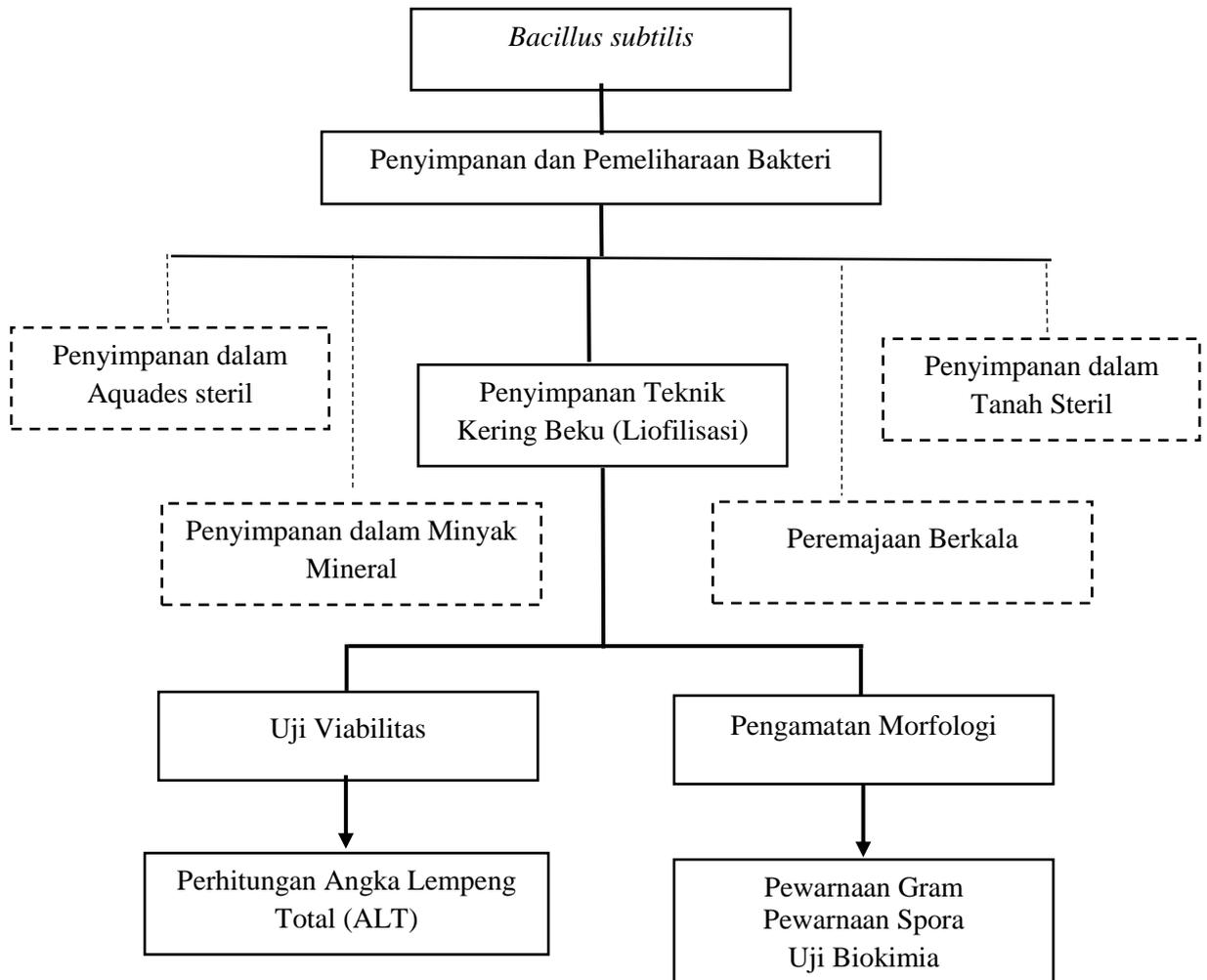
Pewarnaan spora dapat dilakukan dengan metode Schaeffer Fulton menggunakan cat warna *malachite green*, alkohol dan safranin. Spora bakteri mempunyai dinding yang tebal sehingga diperlukan pemanasan agar pori-pori membesar dan cat warna karbol fuksin dapat masuk, dengan pencucian menyebabkan cat warna *malachite green* tidak dapat dilepas walaupun menggunakan peluntur, sedangkan pada badan bakteri warna dari *malachite green* dilepaskan dan kemudian mengikat warna merah dari safranin, sehingga hasil perwarnaan dapat diamati bakteri dengan spora berwarna merah dan badan bakteri berwarna biru (Pelczar, 1986). *Bacillus subtilis* dapat membentuk endospora sehingga dengan pewarnaan spora akan dapat diamati bakteri dengan endospora berwarna hijau dan badan bakteri berwarna merah.

3) Uji Biokimia

Uji biokimia bakteri dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Media yang digunakan dalam uji biokimia adalah media gula-gula (glukosa, laktosa, manitol, maltose, sukrosa), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), Sulfida Indol Motil (SIM) dan *Simmons Citrat* (SC) (Lay, 1994). Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasikan karbohidrat, kemampuan bergerak atau motilitas, pembentukan indol, produksi H₂S, serta kemampuan bakteri menggunakan Natrium sitrat sebagai sumber

karbon. *Bacillus subtilis* dengan uji biokimia menunjukkan hasil uji yaitu memfermentasi glukosa, manitol, maltosa dan sukrosa namun tidak memfermentasi laktosa, tidak membentuk indol, tidak memproduksi H₂S, motilitas positif atau negatif serta tidak menggunakan Natrium sitrat sebagai sumber karbon (Brooks, dkk., 2005).

B. Kerangka Teori



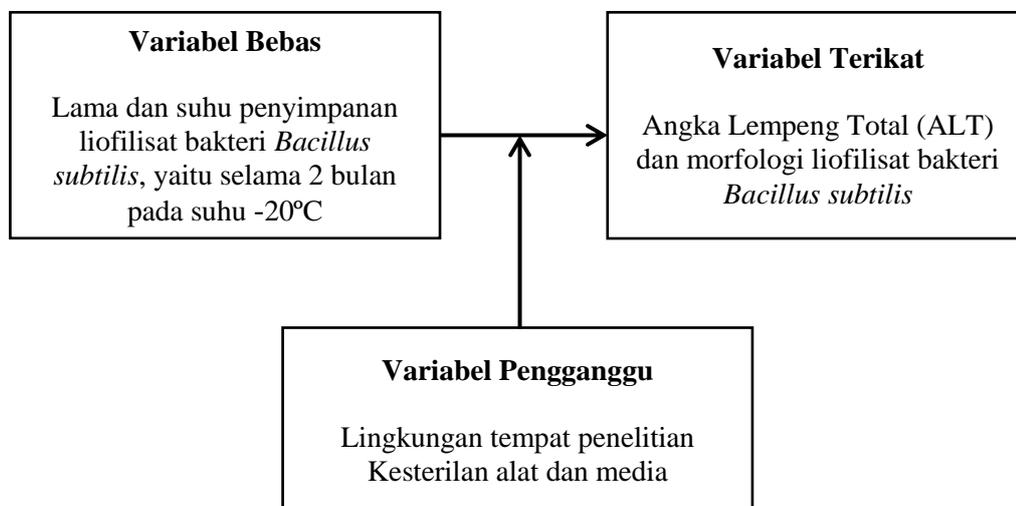
Gambar 5. Kerangka Teori

Keterangan :

----- : Tidak dilakukan

———— : Dilakukan

C. Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep

D. Pertanyaan Penelitian

Bagaimana viabilitas liofilisat bakteri *Bacillus subtilis* sebelum dan setelah disimpan selama 2 bulan pada suhu -20°C? Apakah teknik liofilisasi dengan penyimpanan selama dua bulan pada suhu -20°C mampu mempertahankan morfologi bakteri yang diliofilisasi?