

**PEMELIHARAAN KULTUR MURNI *Escherichia coli*
METODE PAPER FILTER**

(Skripsi)

Oleh

Ryan Farkhan Prastowo



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

PURE CULTURE MAINTENANCE *Escherichia Coli* PAPER FILTER METHOD

By

RYAN FARKHAN PRASTOWO

The purpose of this research was to determine the viability of pure cultures stored by the dry paper filter method using coffee paper wrappers and plastic seals at room temperature and cold temperature (5°C). The research was carried out using paper filter storage method using three factors, wrapper filter paper and plastic seal wrapping material, storage temperature of room temperature and cold temperature (5°C), storage time of 14 days, 28 days, 42 days, 56 days. Storage of pure *Escherichia coli* culture using a paper filter storage method with plastic seal packaging at room temperature can maintain viability with a viability value of 92,5% at 8 weeks storage time, storage of pure *Escherichia coli* culture using the paper filter method with seal plastic packaging material on cold temperature 5°C can maintain viability with a viability value of 94,3%. Storage of pure *Escherichia coli* culture using paper filter storage method with coffee paper wrapping material at room temperature can maintain viability with a viability value of 91,4% at 8 weeks storage time, storage of pure *Escherichia coli* culture using the paper filter method with coffee paper wrapping material on cold temperature 5°C can maintain viability with a viability of 93,2%. Storage using the paper filter method

using plastic seal wrapping material can maintain the highest viability of *Escherichia coli* with a viability value of 94,3% and a microbial total of $5,6 \times 10^{10}$ at 8 weeks storage time.

Keywords : *Escherichia coli*, viability, paper filter, coffee paper, plastic seal

ABSTRAK

PEMELIHARAAN KULTUR MURNI *Eschericia Coli* METODE PAPER FILTER

Oleh

RYAN FARKHAN PRASTOWO

Tujuan penelitian ini yaitu Mengetahui viabilitas atau daya hidup kultur murni yang disimpan dengan metode dry paper filter menggunakan pembungkus kertas kopi dan plastik seal pada suhu ruang dan suhu dingin (5°C). Penelitian dilakukan dengan metode penyimpanan paper filter dengan menggunakan tiga faktor yaitu bahan pembungkus kertas saring dan plastik seal, suhu penyimpanan suhu ruang dan suhu dingin 5°C, lama penyimpanan 14 hari, 28 hari, 42 hari, 56 hari. Penyimpanan kultur murni *Eschericia coli* menggunakan metode penyimpanan paper filter dengan bahan pembungkus plastik seal pada suhu ruang dapat mempertahankan viabilitas dengan nilai viabilitas sebesar 92,5% pada lama penyimpanan 8 minggu, penyimpanan kultur murni *Eschericia coli* menggunakan metode paper filter dengan bahan pembungkus plastik seal pada suhu dingin (5°C) dapat mempertahankan viabilitas dengan nilai viabilitas sebesar 94,3%. Penyimpanan kultur murni *Eschericia coli* menggunakan metode penyimpanan paper filter dengan bahan pembungkus kertas kopi pada suhu ruang dapat

mempertahankan viabilitas dengan nilai viabilitas sebesar 91,4% pada lama penyimpanan 8 minggu, penyimpanan kultur murni *Eschericia coli* menggunakan metode paper filter dengan bahan pembungkus kertas kopi pada suhu dingin (5°C) dapat mempertahankan viabilitas dengan nilai viabilitas sebesar 93,2%. Penyimpanan menggunakan metode paper filter menggunakan bahan pembungkus plastik seal dapat mempertahankan viabilitas *Eschericia coli* tertinggi dengan nilai viabilitas 94,3% dan total mikroba sebesar $5,6 \times 10^{10}$ pada lama penyimpanan 8 minggu.

Keywords : *Eschericia coli*, viabilitas, Paper Filter, Kertas Kopi, Plastik Seal

**PEMELIHARAAN KULTUR MURNI *Eschericia coli* METODE
PAPER FILTER**

Oleh

RYAN FARKHAN PRASTOWO

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

Pada

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

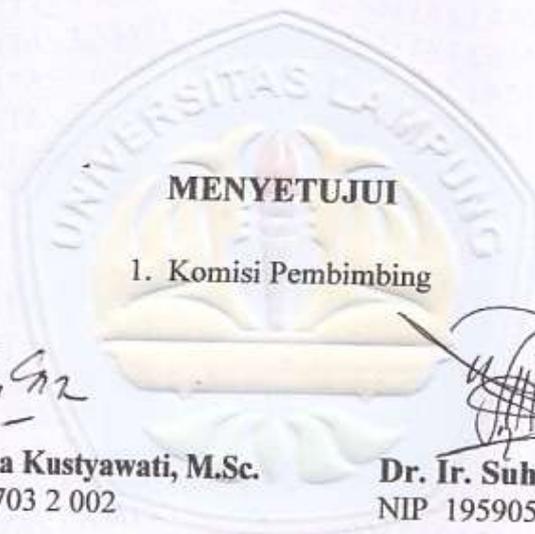
Judul Skripsi : **PEMELIHARAAN KULTUR MURNI *Eschericia coli***
METODE PAPER FILTER

Nama Mahasiswa : **Ryan Farkhan Prastowo**

No. Pokok Mahasiswa : 1314051043

Program Studi : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Pertanian



Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc.
NIP 19621129 198703 2 002

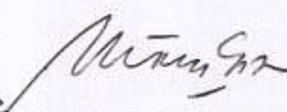
Dr. Ir. Suharyono, A.S., M.S.
NIP 19590530 198603 1 004

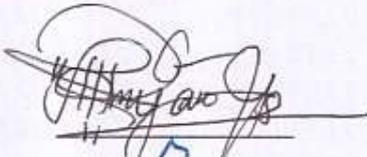
2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

Ir. Susilawati, M.Si.
NIP 19610806 198702 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc.** 

Sekretaris : **Dr. Ir. Suharyono, A.S., M.S.** 

Penguji
Bukan Pembimbing : **Ir. Samsul Rizal, M.Si.** 



2. Dekan Fakultas Pertanian

Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP. 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **08 Agustus 2019**

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ryan Farkhan Prastowo

NPM : 1314051043

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri yang berdasarkan pada pengetahuan dan penelitian yang telah saya lakukan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukan hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 8 Agustus 2019
Pembuat pernyataan



Ryan Farkhan Prastowo
NPM 1314051043

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 08 Januari 1995. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Ghozali,S.E. dan Ibu Irianti,S.pd.,M.pd.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Sekolah Dasar Swasta Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama Swasta Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2010, dan Sekolah Menengah Atas Swasta Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2013. Pada tahun 2013, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur undangan atau Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik di Sri Mulyo Kecamatan Anak Ratu Aji Kabupaten Lampung Tengah Provinsi Lampung dengan tema Pemberdayaan Kampung Berbasis Informasi dan Teknologi” pada bulan Januari – Februari 2016. Penulis Melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT. Bimandiri Agro Sedaya Lembang dan menyelesaikan laporan PU yang berjudul “Mempelajari Pengolahan Pasca Panen dan Penggudangan Sayuran Basah di PT. Bimandiri Agro Sedaya pada bulan Agustus 2016.

SANWACANA

Alhamdulillah rabbi'l'alamiin, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas nikmat dan ridha-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini yang berjudul “Pemeliharaan Kultur Murni *Eschericia Coli* Metode Paper Filter Menggunakan Pembungkus Kertas Kopi dan Plastik Seal”. Penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ibu Susilawati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan untuk kelancaran proses penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc., selaku pembimbing satu skripsi atas bimbingan, arahan, saran, dan motivasi yang diberikan dalam proses penelitian dan penyelesaian skripsi penulis.
4. Bapak Dr. Ir. Suharyono, A.S., M.S., selaku pembimbing dua atas bimbingan, arahan, saran, dan motivasi yang diberikan dalam proses penelitian dan penyelesaian skripsi penulis.
5. Bapak Ir. Samsul Rizal, M.Si., selaku pembahas atas saran, evaluasi, dan motivasi terhadap karya penulis.

6. Seluruh dosen pengajar atas ilmu yang diberikan selama perkuliahan serta teknisi Laboratorium Jurusan Teknologi Hasil Pertanian atas bantuan selama penelitian.
7. Kedua orang tua dan kakak tercinta yang telah memberikan doa, semangat, motivasi, dan yang selalu menyertai penulis untuk menyelesaikan skripsi.
8. Sahabat-sahabatku (Nur Ega, Dicky, Cholik, Fani, Bima, Rio) serta teman-teman terbaikku angkatan 2013 atas pengalaman yang diberikan, semangat, dukungan, canda tawa, serta kebersamaannya selama ini.
9. Sahabat-sahabat SMA (Fadia, Aldo kodel, Febri, Ilham, Panji, Arwi, Niko) atas semangat, dukungan, canda tawa, serta kebersamaannya selama ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dan amal perbuatan semua pihak diatas. Semoga sripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca. Aamiin.

Bandar Lampung, 8 Agustus 2019
Penulis

Ryan Farkhan Prastowo

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Kerangka Pemikiran	3
1.4. Hipotesis	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Pemeliharaan Kultur Murni	6
2.2. Teknik Pemeliharaan Kultur Murni	6
2.2.1. Peremajaan Berkala	6
2.2.2. Penyimpanan dalam Akuades Steril	7
2.2.3. Penyimpanan dalam Minyak Mineral	8
2.2.4. Penyimpanan dalam Tanah Steril	9
2.2.5. Penyimpanan dengan Manik Manik Porselen	10
2.2.6. Penyimpanan Menggunakan Lempengan Gelatin	12
2.2.7. Penyimpanan Menggunakan Potongan Kertas Filter	13
2.3. Mutasi Makhluk Hidup	14
2.3.1. Pengertian Mutasi	14
2.3.2. Faktor Penyebab Terjadinya Mutasi.....	15

2.4. Media Pertumbuhan Mikroba	16
2.5. <i>Eschericia coli</i>	17

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2. Alat dan Bahan	20
3.3. Metode Penelitian	21
3.4. Pelaksanaan Penelitian	22
3.4.1. Peremajaan Biakan <i>Eschericia coli</i> Menggunakan metode widya (2016).....	22
3.4.2. Penyiapan Suspensi Biakan yang Akan Diinokulasikan pada Paper Fiter	24
3.4.3. Inokulasi Biakan Murni ke Paper Filter Steril ukuran 1x 1 cm	24
3.4.4. Perlakuan Penyimpanan dan Perhitungan Jumlah Koloni Kultur Murni dari Media Paper Fiter.....	25
3.5. Perhitungan Total Bakteri Menggunakan Metode TPC (<i>Total Plate Count</i>)	25

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Total Koloni <i>Eschericia coli</i> Sebelum Disimpan	29
4.2. Hasil Total Bakteri <i>Eschericia coli</i> Selama Penyimpanan	30
4.3. Jumlah Rata-rata Total Bakteri	31
4.4. Daya Hidup (Viabilitas) Bakteri <i>E. coli</i>	35

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kombinasi perlakuan antara pembungkus dan suhu penyimpanan	21
2. Kombinasi jenis pembungkus dan suhu penyimpanan terhadap lama penyimpanan.....	21
3. Total Mikroba Sebelum dan Setelah Dikeringkan dengan desikator selama 24 jam	29
4. Total mikroba <i>E. Coli</i> penyimpanan teknik paper filter menggunakan plastik seal dan kertas kopi selama 2 ,4 ,6 , dan 8 minggu	30
5. Jumlah total <i>E. coli</i> CFU/cm ² selama penyimpanan teknik paper filter menggunakan pengemas plastik seal dan kertas kopi.....	32
6. Jumlah total <i>E. coli</i> CFU/cm ² selama penyimpanan teknik paper filter menggunakan pengemas plastik seal pada suhu dingin.....	32
7. Jumlah total <i>E. coli</i> CFU/cm ² selama penyimpanan teknik paper filter menggunakan pengemas kertas kopi pada suhu ruang	33
8. Jumlah total <i>E. coli</i> CFU/cm ² selama penyimpanan teknik paper filter menggunakan pengemas kertas kopi pada suhu ruang.....	34
9. Persentase daya hidup (viabilitas) <i>E. coli</i> yang disimpan dengan teknik paper filter menggunakan plastik seal dan kertas kopi selama penyimpanan.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram alir peremajaan <i>Eschericia coli</i> termodifikasi (Sumber: Widya, 2016)	23
2. Diagram alir penyiapan suspensi biakan.....	24
3. Diagram alir inokulasi biakan murni dalam paper filter	25
4. Diagram alir perlakuan penyimpanan <i>Eschericia coli</i> menggunakan paper filter	27
5. Diagram Alir Penghitungan jumlah koloni (Waluyo,2010).....	28

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kultur murni merupakan suatu biakan mikroorganisme yang terdiri dari sel-sel satu species atau satu galur. Kultur murni diperoleh dari isolasi mikroorganisme tertentu sehingga hanya diperoleh satu spesies pada suatu biakan. Kultur murni nantinya dibiakkan untuk digunakan dalam suatu proses. Kultur murni yang telah diperoleh dari isolasi harus disimpan untuk digunakan sewaktu-waktu. Kultur murni perlu dipelihara agar kultur murni selalu siap saat akan digunakan. Pemeliharaan kultur murni untuk jangka pendek dapat dilakukan dengan memindahkan kultur murni yang sudah lama ke media baru. Teknik tersebut memerlukan waktu, biaya, dan tenaga yang banyak.

Pemeliharaan kultur murni merupakan usaha dalam menjaga dan memelihara kultur murni agar dapat disimpan dalam waktu lama. Teknik pemeliharaan kultur murni pada dasarnya dengan mengurangi laju metabolisme sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidup) dan memelihara dengan baik. Pemeliharaan kultur murni dengan baik dapat diperoleh kehidupan mikroorganisme yang tinggi dan perubahan ciri-ciri yang minimum. Pemeliharaan kultur murni berfungsi untuk menjaga kualitas dan kuantitas untuk penyediaan kultur murni sewaktu-waktu dibutuhkan. Proses pemeliharaan kultur

murni adalah dengan menghambat laju pertumbuhan dan perkembangan sehingga jumlah sel-sel mikroorganisme tetap (Sanfa, 2011).

Pemeliharaan kultur murni terdiri dari pemeliharaan untuk jangka pendek, menengah, dan jangka panjang. Pemeliharaan kultur murni jangka pendek atau menengah di antaranya adalah penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porselin, lempengan gelatin, dan P_2O_5 dalam keadaan vakum. Teknik pemeliharaan kultur murni yang telah dilakukan untuk jangka waktu panjang yaitu metode liofilisasi atau kering beku dan kriopresvasi (Clark, 2013). Namun tidak semua laboratorium memiliki peralatan teknik tersebut. Salah satu teknik yang belum dikembangkan adalah penyimpanan kering menggunakan teknik paper filter.

Metode paper filter ternyata sangat efektif untuk pemeliharaan *Marasmiellus inoderma*, *Ganoderma sp.* dan kultur *Fusarium oxysporum*. Penyimpanan pada suhu $-19^{\circ}C$, 75% dari isolate *M. Inoderma* masih layak digunakan setelah dua tahun penyimpanan, 81% dari isolat *Ganoderma sp.* setelah lima bulan dan 100% isolat *F oxysporum* setelah empat tahun. Semua kultur yang disimpan bebas dari kontaminan. Proses peremajaan harus diinkubasi dalam kondisi pertumbuhan optimal agar kultur dapat berkembang dengan baik. Dibandingkan dengan metode pengeringan beku liofilisasi, metode pemeliharaan ini jauh lebih sederhana, lebih murah dan hanya membutuhkan sistem vakum murah yang terdiri desikator dan stasiun tekanan vakum, dan kulkas rumah tangga atau domestik freezer. Untuk pemeliharaan kultur skala kecil di laboratorium, metode

paper filter ini juga lebih murah daripada menggunakan nitrogen cair. (Fong *et al*, 2010).

Metode paper filter dapat digunakan untuk penyimpanan yeast. Paper filter yang digunakan adalah paper filter jenis Whatman no. 4 yang sebelumnya di potong dengan ukuran sesuai dengan yang diinginkan pengguna dan disterilkan. Proses sterilisasi dilakukan dengan cara menumpuk kertas saring dengan alumunium foil lalu di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Inokulasi dilakukan dengan cara mencelupkan paper filter yang telah disterilisasi ke dalam suspensi ragi dengan media susu skim 5% selama 1 menit. Paper filter yang telah diinokulasi dikeringkan dalam desikator selama 2-3 minggu pada suhu 4°C yang kemudian dikemas dalam wadah kedap udara dan disimpan pada suhu 4°C. Penyimpanan menggunakan metode ini dapat disimpan selama 2-3 tahun, pada saat dibutuhkan paper filter dapat ditumbuhkan pada media segar. (Kulkarni dan Chitte 2015).

1.2. Tujuan

Mengetahui viabilitas atau daya hidup kultur murni yang disimpan dengan metode paper filter menggunakan pembungkus kertas kopi dan plastik seal pada suhu ruang dan suhu dingin (5°C).

1.3. Kerangka Pemikiran

Penyimpanan dan pemeliharaan mikroba dapat dilakukan pada kertas saring (paper filter). Paper filter dapat menjaga kelembaban sehingga mikroba dapat

mempertahankan stabilitas genetik. Penyimpanan pada kertas saring memiliki prinsip mempertahankan daya tumbuh mikroba dan mengurangi kemampuan tumbuh dengan menghilangkan air dan nutrisi. Mikroba akan tertahan pada kertas saring kering dan steril. Mikroba akan mengalami fase dorman ketika disimpan pada suhu ruang atau suhu dingin (Sanfa, 2011).

Mikroorganisme dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan kemampuan tumbuh optimum terhadap suhu yaitu termofil, mesofil, psikrofil (obligat), dan psikrofil (fakultatif). Masing-masing kelompok bakteri memiliki suhu minimum, optimum, dan maksimum. Bakteri *E. Coli*, *Citrobacter*, dan *Propionibacterium* merupakan bakteri mesofil yang memiliki suhu optimum 30-40°C. Kelompok bakteri termofil dan mesofil tidak dapat tumbuh baik dibawah suhu optimum sehingga pada suhu lebih rendah (suhu minimum) pertumbuhan mikroba akan terhambat. Penyimpanan pada suhu dingin tidak membunuh mikroba itu sendiri namun menghambat pertumbuhan sehingga dapat memperpanjang umur simpan mikroba (Sopandi dan Wardah, 2014). Diduga penyimpanan mikroba pada paper filter suhu dingin dapat bertahan lebih lama dari penyimpanan suhu ruang.

1.4. Hipotesis

1. Kultur murni yang disimpan menggunakan metode paper filter dengan pembungkus plastik seal lebih baik dari kultur murni yang disimpan menggunakan metode paper filter dengan pembungkus kertas kopi.
2. Kultur murni yang disimpan menggunakan metode paper filter pada suhu dingin (5°C) dengan pembungkus plastik seal dan kertas kopi lebih baik

dari kultur murni yang disimpan menggunakan metode paper filter pada suhu ruang dengan pembungkus plastik seal dan kertas kopi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pemeliharaan Kultur Murni

Kultur murni harus dalam kondisi baik dan dapat digunakan setiap saat sehingga perlu dipelihara dengan baik. Pemeliharaan kultur murni dilakukan dengan berbagai cara untuk menjaga kualitasnya. Salah satu cara memperoleh kondisi kultur murni. Pemeliharaan dapat dilakukan secara sub kultur yaitu meremajakan dalam jangka waktu tertentu. Namun pemeliharaan secara sub kultur memiliki kelemahan, yaitu menyita waktu dan tenaga karena dalam waktu singkat harus dipindahkan secara periodik ke medium baru. Metode penyimpanan lain adalah penyimpanan secara kering beku (freeze drying) atau dengan metode penyimpanan pada suhu ultra dingin. Suhu yang digunakanyaitu -196°C di dalam nitrogen cair (kriopreservasi) (Rahman, 2011). Berbagai cara terus dikembangkan dalam usaha untuk memelihara kultur.

2.2. Teknik Pemeliharaan Kultur Murni

2.2.1. Peremajaan Berkala

Teknik peremajaan berkala adalah teknik pemeliharaan kuktur murni tertua yang digunakan oleh penelti untuk memelihara koleksi isolate mikroba di laboratorium. Peremajaan berkala tidak dianjurkan untuk penyimpanan jangka panjang. Teknik

ini memiliki berbagai kendala diantaranya kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, peluang terjadinya kontaminasi, dan terjadi kekeliruan dalam pemberian label. Peremajaan berkala dilakukan dengan cara memindahkan atau memperbaiki biakan mikroba dari biakan lama ke medium baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali (Sharman et al. 2009).

2.2.2. Penyimpanan Dalam Akuades Steril

Tidak semua bakteri dapat disimpan dengan baik menggunakan teknik ini, *Pseudomonas Agrobacterium*, dan *Curtobacterium* merupakan salah satu jenis mikroba yang dapat disimpan menggunakan teknik ini. Bakteri yang dapat disimpan menggunakan teknik akuades steril adalah bakteri yang berbentuk batang dan bereaksi gram positif, penyimpanan dilakukan dalam akuades steril pada suhu ruang. Pada kondisi penyimpanan dalam akuades steril bakteri yang disimpan masih berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang. Penyimpanan dengan teknik ini juga memungkinkan terjadinya kontaminasi. Oleh karena itu, teknik ini lebih dianjurkan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang (Faradiana. 2016).

Tahap penyimpanan mikroba dalam akuades steril adalah sebagai berikut:

1. Akuades steril disiapkan dalam botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml, 5-10 ml/botol .
2. Mikroba yang akan disimpan ditumbuhkan dalam bentuk biakan murni pada medium agar miring yang sesuai.
3. Biakan bakteri berumur 24-48 jam disimpan dengan beberapa cara seperti:

- a. menambahkan 3-5 ml akuades steril ke dalam biakan miring, mengocok tabung hingga diperoleh suspensi pekat bakteri (10^8 - 10^9 sel/ml), dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril.
 - b. memindahkan satu ose biakan miring bakteri ke dalam tabung reaksi berisi 3-5 ml akuades steril, tabung dikocok hingga suspensi merata, dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril.
 - c. memindahkan satu ose biakan miring bakteri langsung ke dalam tiap botol yang berisi air steril dan mengocok hingga merata.
4. Botol ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau suhu 10 - 15° C.
 5. Uji viabilitas mikroba dan pemeliharaan stok isolat dilakukan secara rutin.
 6. Penumbuhan kembali biakan dilakukan dengan mengambil botol dari tempat penyimpanan, mengocok, dan mengambil satu ose suspensi dan menumbuhkan pada medium cair atau langsung pada medium agar yang sesuai.

2.2.3. Penyimpanan Dalam Minyak Mineral

Penyimpanan dalam minyak mineral merupakan salah satu teknik penyimpanan yang paling sederhana untuk memelihara bakteri, khamir dan jamur. Penyimpanan dalam minyak mineral dilakukan dengan cara menyimpan dalam tabung agar miring dan menutup dengan minyak mineral atau paraffin cair. Dasar teknik penyimpanan ini adalah mempertahankan viabilitas mikroba dengan mencegah pengeringan medium, sehingga waktu peremajaan dapat diperpanjang hingga beberapa tahun. Daya tahan mikroba lebih baik apabila disimpan pada suhu kulkas (4° C). Mikroba yang akan dipelihara ditumbuhkan pada tabung berisi medium agar miring atau medium cair (broth) yang sesuai, kemudian permukaan

biakan ditutup minyak mineral steril setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Teknik ini memiliki kelemahan yaitu kurang praktis untuk ditransportasi dan keberadaan minyak mineral mengakibatkan peremajaan menjadi kotor (Sumarsih. 2011).

2.2.4. Penyimpanan dalam Tanah Steril

Teknik penyimpanan dalam tanah steril berguna untuk fungi, *Streptomyces spp.*, dan bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus spp.* dan *Clostridium spp.* *Rhizobium spp.* Teknik ini memiliki beberapa keuntungan, yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan stabilitas genetik mikroba dapat dipertahankan (Sumarsih. 2011). Cara penyimpanan dalam tanah steril adalah sebagai berikut:

1. Diambil tanah yang agak liat, dikering anginkan dan diayak untuk memisahkan partikel tanah yang agak besar dan membuang sisa-sisa tanaman.
2. Tanah yang sudah kering dan diayak dimasukkan ke dalam tabung atau botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml hingga 1 cm dari permukaan tutup.
3. Tabung atau botol yang berisi tanah diberi akuades steril hingga kebasahan 50% kapasitas lapang, kemudian diautoklaf pada suhu 121° C tiga kali berturut-turut selama tiga hari masing masing selama satu jam.
4. Bila mana diperlukan, sterilitas tanah diuji dengan menumbuhkan contoh tanah pada medium agar.
5. Selanjutnya, botol dioven kering pada suhu 105° C selama satu jam dan setelah dingin disimpan di dalam desikator hingga digunakan.
6. Suspensi mikroba yang akan disimpan (sel, spora atau konidia, miselia) dibuat dalam larutan steril pepton 2% dalam akuades.

7. Suspensi mikroba (0,1 ml) diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tiap botol yang telah disiapkan.
8. Botol dikembalikan ke desikator untuk disimpan di dalamnya atau setelah kering diambil dan disimpan di ruangan.
9. Mikroba yang disimpan diuji viabilitasnya setiap tahun dengan menumbuhkan pada medium agar.
10. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik sebagian contoh tanah dari botol penyimpanan, memindahkan ke medium cair diikuti dengan menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai atau langsung dengan menumbuhkan contoh tanah pada medium agar.

2.2.5. Penyimpanan dengan Manik Manik Porselen

Cara sederhana lain untuk pemeliharaan berbagai jenis mikroba adalah mengeringkan suspensi sel pada manik-manik porselin (*porcelain beads*) atau gelas (*glass beads*) menggunakan gel silika sebagai pengering (Norris. 2009). Selapis gel silika diletakkan di alas botol dengan tutup berdrat, kemudian di atasnya ditutup dengan lapisan kapas atau slag wool dan di atasnya diletakkan manik-manik porselin atau kaca yang diimpregnasi dan telah dicelupkan dalam suspensi mikroba yang akan disimpan. Kelembaban yang ada pada manikmanik diserap oleh gel silika yang ada di bawahnya. Kelebihan gel silika juga berfungsi menjaga kekeringan udara di dalam botol. Prosedur penyimpanan dan pemeliharaan dengan manik-manik porselin adalah sebagai berikut:

1. Gel silika (berwarna biru bila kering dan ungu bila lembab) sebanyak 3-4 g dimasukkan ke dalam botol tutup berdrat ukuran 25 ml.

2. Di atas gel silika dilapisi kapas atau slag wool setebal 1 cm agar tidak bergerak tetapi tetap berpori.
3. Di atas lapisan kapas diletakkan 20-50 manik-manik porselin atau gelas yang diimpregnasi (No. 2).
4. Botol dibuka tutupnya dan disterilkan dengan oven kering suhu 160°C selama 1-2 jam. Tutup botol karena berlapis karet disterilkan dengan autoklaf, suhu 121°C selama 15 menit, kemudian di oven kering dengan suhu 100°C selama 1 jam, dan setelah dingin ditutupkan ke botolnya secara aseptik.
5. Mikroba yang akan disimpan dibiakkan 24-48 jam dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml medium cair yang sesuai.
6. Manik-manik porselin dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi biakan mikroba dan kelebihan suspensi bakteri dibuang.
7. Manik-manik yang basah oleh suspensi bakteri dikembalikan ke dalam botol dan ditutup rapat. Sebagian gel silika di dalam botol akan berubah warna menjadi merah jambu, sedangkan sisanya tetap berwarna biru. Apabila seluruh gel silika berubah warna menjadi merah jambu, hendaknya botol tidak digunakan.
8. Botol yang berisi mikroba disimpan pada suhu ruang atau di kulkas.
9. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
10. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu manikmanik botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair atau dengan menggosokkan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu optimal.

Menurut Leben dan Sleesman (2012) penyimpanan dengan manik manik porselin dapat diganti dengan butiran gel silika.

2.2.6. Penyimpanan Menggunakan Lempengan Gelatin

Teknik penyimpanan sederhana lainnya adalah teknik penyimpanan menggunakan lempengan gelatin. Mula-mula teknik ini dilaporkan oleh Stamp pada tahun 1947 (Klement, 2011) untuk penyimpanan jangka panjang bakteri. Tetapi saat ini sangat sedikit data tentang keefektifan penyimpanan dan daya tahan hidup bakteri dalam penyimpanan, sehingga teknik ini perlu diuji lebih lanjut. Tahapan teknik penyimpanan dengan lempengan gelatin adalah sebagai berikut:

1. Sepuluh mililiter lilin (paraffin wax) disterilkan dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Sebagai pengganti lilin dapat juga digunakan kertas lilin (Lapage *et al.*, 2011) atau cairan silicon yang ditempatkan pada alas cawan petri.
2. Biakan bakteri umur 24-48 jam disediakan dan dibuat suspensi pekat bakteri (10^8 - 10^9 sel/ml) dalam medium gelatin nutrien 10% yang mengandung 0,25% asam askorbat.
3. Suspensi bakteri dalam medium gelatin nutrien diteteskan secara aseptik menggunakan pipet Pasteur steril pada permukaan lilin atau kertas lilin di dalam cawan petri. Setiap petri dapat ditetesi beberapa tetes suspensi.
4. Cawan petri yang telah diberi tetesan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam desikator vakum yang berisi P_2O_5 dan dievakuasi hingga tetesan menjadi kering dan berupa lempengan gelatin.

5. Lempengan gelatin diambil secara aseptik menggunakan pinset dan dipindahkan ke dalam botol steril dengan tutup berdrat 5-10 lempengan/botol. Botol-botol yang berisi lempengan gelatin disimpan dalam wadah yang berisi P_2O_5 pada suhu $4^{\circ}C$.
6. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
7. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu lempengan gelatin dari botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair, kemudian menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai, serta menginkubasikan pada suhu optimal untuk pertumbuhan mikroba.

2.2.7. Penyimpanan Menggunakan Kertas Filter

Teknik penyimpanan ini merupakan teknik yang efektif dan sederhana untuk penyimpanan bakteri. Tahapan teknik penyimpanan bakteri menggunakan potongan kertas filter menurut Kulkarni and chitte (2015) adalah sebagai berikut:

1. Mikroba yang akan disimpan dibiakkan pada medium yang sesuai.
2. Paper filter yang digunakan jenis whatman no 3 yang di potong dengan diameter 3mm
3. Paper filter di sterilisasi dengan cara dimasukkan kedalam botol dengan lalu di autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 20 menit.
4. Paper filter yang telah disterilisasi di rendam kedalam media berisi mikroba selama 2-3 jam

5. Paper filter yang telah berisi mikroba dikeringkan menggunakan oven pada suhu 55°C selama 24-48 jam.
7. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu kertas filter dari botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair, menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai, serta menginkubasikan pada suhu optimal untuk pertumbuhan mikroba.

2.3. Mutasi Makhluk Hidup

2.3.1. Pengertian Mutasi

Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada materi genetic sehingga menyebabkan perubahan ekspresi. Perubahan dapat terjadi pada tingkat pasangan basa, tingkat satu ruas DNA, bahkan pada tingkat kromosom (Fahrudin, 2011). Mutasi dapat terjadi pada setiap bagian tanaman, namun lebih banyak terjadi pada bagian yang sedang aktif mengadakan pembelahan sel. Jika mutasi terjadi pada sel somatik, maka perubahan hanya pada bagian itu dan tidak diwariskan. Mutasi yang terjadi pada sel generatif akan diwariskan pada generasi berikutnya. Organisme baru hasil mutasi disebut mutan. (Dewi, 2017).

Mutasi atau perubahan materi genetik dapat dideteksi dengan melihat perubahan pada tingkat struktur gen atau perubahan pada tingkat ekspresinya. Untuk melihat perubahan tersebut dapat dilakukan dengan membandingkan antara mutan dan tipe liarnya. Perubahan dapat terlihat pada tingkat morfologi yang terlihat oleh mata telanjang, atau pada tingkat lain yang

tidak nampak oleh mata. Secara garis besar penampilan mutan dapat dilihat dari liarnya dengan tiga cara; perbedaan morfologi, perbedaan tingkat kimia, dan perbedaan tingkat adaptasi terhadap lingkungan tumbuh. Hasil mutasi yang paling mudah dilihat ialah bila terjadi perubahan morfologi seperti bentuk, ukuran atau warna (Dewi, 2017).

Mutasi dapat terjadi pada tingkat gen maupun kromosom. Jika perubahan hanya mengenai satu gen yaitu pada ruas yang diapit oleh sepasang promotor dan terminator, maka disebut mutasi tingkat gen. Jika perubahan mengenai lebih dari satu gen maka dinamakan mutasi tingkat kromosom. Mutasi titik merupakan mutasi yang terjadi pada tingkat gen. Mutasi titik adalah perubahan sekuen nukleotida pada gen yang menghasilkan perubahan asam amino dan protein produk mutan atau sebagai perubahan satu bentuk alel ke bentuk alel lainnya dimana perubahan tersebut terjadi dalam satu lokus kromosom. (Fahrudin, 2011).

2.3.2. Faktor Penyebab Terjadinya Mutasi

Makhluk hidup akan selalu berusaha untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang selalu berubah-ubah karena alam tidak selalu konstan. Mutasi terjadi karena adanya perubahan lingkungan yang luar biasa. Sesungguhnya mutasi itu dimaksudkan untuk menghadapi perubahan alam yang sewaktu-waktu akan timbul. Kalau perubahan itu sudah terjadi, maka sifat yang bermutasi tersebut kemungkinan akan lebih mudah beradaptasi daripada sifat yang asli.

Bagi makhluk yang tidak dapat menyesuaikan diri, maka mereka secara perlahan akan menyusut selanjutnya akan punah. Untuk bertahan hidup dan menjaga kelestarian spesies itu di alam, maka makhluk hidup harus selalu mengikuti perubahan sesuai dengan sifat alam sekelilingnya yang selalu mengalami perubahan. Perubahan ini dinamakan dengan evolusi yang sumbernya adalah mutasi. Sedangkan pelaksanaannya disebut dengan seleksi alam. (Dewi, 2017).

Penyebab mutasi disebut dengan mutagen (agen mutasi). Kebanyakan mutagen adalah bahan fisika, kimia atau biologi yang memiliki daya tembus yang kuat sehingga dapat mencapai bahan genetik dalam inti sel. Contohnya: zat radioaktif, zat kimia yang keras dan virus. Namun, ada juga mutagen yang tidak begitu jelas. (Dewi, 2017).

2.4. Media Pertumbuhan Mikroba

Susunan kimia dan senyawa yang terkandung didalam sel mikroba relatif tetap. Berdasarkan analisis kimia diketahui bahwa penyusun utama sel adalah unsur kimia C, H, O, N, dan P, yang jumlahnya + 95 % dari berat kering sel. Sedangkan sisanya tersusun dari unsur-unsur lain. Bagian utama penyusun senyawa mikroba adalah air yaitu 80-90%. Bagian lain sebesar 10-20% yaitu sitoplasma, dinding sel, lipida, polisakarida, polifosfat, dan senyawa lain (Lescot, 2009). Setiap mikroba memiliki sifat fisiologis dan kandungan yang berbeda-beda.

Mikroba mempunyai sifat fisiologi tertentu, sehingga memerlukan nutrisi tertentu. Untuk pertumbuhan. Nutrisi pertumbuhan mikroba disajikan dalam bentuk media. Media mengandung nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan untuk

bahan pembangun sel, untuk sintesa protoplasma dan bagian-bagian sel lain mikroba. Setiap unsur nutrisi mempunyai peran tersendiri dalam fisiologi sel. Unsur tersebut diberikan ke dalam medium sebagai kation garam anorganik yang jumlahnya berbeda-beda tergantung keperluannya. Media sebagai bahan makanan dibagi menjadi tujuh golongan yaitu air, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron, sumber mineral, faktor tumbuh, dan sumber nitrogen (Ratna, 2010).

2.4. *Eschericia coli*

Eschericia coli merupakan bakteri batang tidak berspora, motil berbentuk flagel peritrik, berdiameter $\pm 1,1 - 1,5 \mu\text{m} \times 0,2 - 0,6 \mu\text{m}$. *E.coli* merupakan bakteri gram negatif. *E. coli* dapat bertahan hidup dimedia sederhana dan menghasilkan gas serta asam dari glukosa dan memfermentasi laktosa. Bakteri *E. Coli* memiliki pergerakan motil, tidak motil, dan peritrikus. Bakteri *E. Coli* dapat bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif (Elfidasari et al. 2011).

Klasifikasi bakteri *Eschericia coli*.

Kingdom : Bacteria
 Divisi : Proteobacteria
 Classis : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : *Escherichia*
 Species : *Eschericia coli*

Menurut Ikmala (2008), bakteri *E. coli* merupakan satu jenis spesies utama bakteri gram negatif fakultatif anaerobik. *E. coli* mempunyai alat gerak berupa flagel dan tersusun dari sub unit protein yang disebut flagelin. Bakteri *E. Coli* memiliki ukuran diameter 12-18 nm dan dengan panjang 12 nm bersifat kaku dan berdiameter lebih kecil. *E. coli* tersusun dari protein dan memiliki pili yang berfungsi sebagai jalan pemindahan DNA saat konjugasi. *E. Coli* memiliki kapsul atau lapisan lendir yang merupakan polisakarida tebal dan air yang melapisi permukaan luar sel.

Bakteri *E. coli* merupakan salah satu bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya kontaminasi *feces* dan kondisi sanitasi yang tidak baik terhadap air, makanan, dan minuman. *E. coli* menjadi patogen jika jumlah bakteri dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. *E. Coli* menghasilkan enterotoksin yang dapat menyebabkan terjadinya beberapa infeksi yang berasosiasi dengan enteropatogenik kemudian menghasilkan enterotoksin pada selapit. Manifestasi klinik infeksi oleh *E. coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Ismail, 2012).

Bakteri *E. Coli* yang berada di dalam usus besar manusia berfungsi untuk menekan pertumbuhan bakteri jahat, dia juga membantu dalam proses pencernaan termasuk pembusukan sisa-sisa makanan dalam usus besar. Fungsi utama yang lain dari *E. Coli* adalah membantu memproduksi vitamin K melalui proses pembusukan sisa makan. Vitamin K berfungsi untuk pembekuan darah misalkan saat terjadi

perdarahan seperti pada luka/mimisan vitamin K bisa membantu menghentikannya. (Nyoman, 2010).

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan November 2018 sampai Februari 2019.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kultur murni *Eschericia coli* yang diperoleh dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), kertas saring merek whatman no 1, aquades, alkohol 70%, alumunium foil, plastik seal , kertas kopi dan kapas.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, jarum ose, batang pengaduk, beaker glass, rak tabung reaksi, inkubator, kulkas, sentrifuge, tabung sentrifuge, timbangan, mikropipet, pipet tip, jangka vortex, timbangan analitik, colony counter, desikator dan autoklaf.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan tiga faktor dan empat kali ulangan. Faktor pertama adalah jenis pembungkus (P), terdiri atas 2 taraf yaitu plastik seal (P1), kertas kopi (P2). Faktor kedua adalah suhu penyimpanan (S), terdiri atas 2 taraf yaitu suhu ruang (S1), Suhu dingin 5°C. Faktor ketiga adalah waktu penyimpanan (T), terdiri dari 4 taraf yaitu 2 minggu (T1), 4 minggu (T2), 6 minggu (T3), dan 8 minggu (T4). Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan antara pembungkus dan suhu penyimpanan

P \ S	S	S1	S2
	P1	P1S1	P1S2
P2	P2S1	P2S2	

Tabel 2. Kombinasi jenis pembungkus dan suhu penyimpanan terhadap lama penyimpanan

PS \ T	T	T1	T2	T3	T4
	P1S1	P1S1T1	P1S1T2	P1S1T3	P1S1T4
P1S2	P1S2T1	P1S2T2	P1S2T3	P1S2T4	
P2S1	P2S1T1	P2S1T2	P2S1T3	P2S1T4	
P2S2	P2S2T1	P2S2T2	P2S2T3	P2S2T4	

Parameter yang diamati yaitu viabilitas atau daya hidup kultur murni setelah dilakukan penyimpanan. Dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali sebagai pembandingan untuk tiap perlakuan. Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya

dengan uji Barlett dan dilakukan juga uji kemenambahan data dengan uji Tuckey. Data tersebut kemudian dianalisis dengan sidik ragam untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh antar perlakuan. Data dianalisis secara Deskriptif untuk mendeskripsikan hasil yang diperoleh.

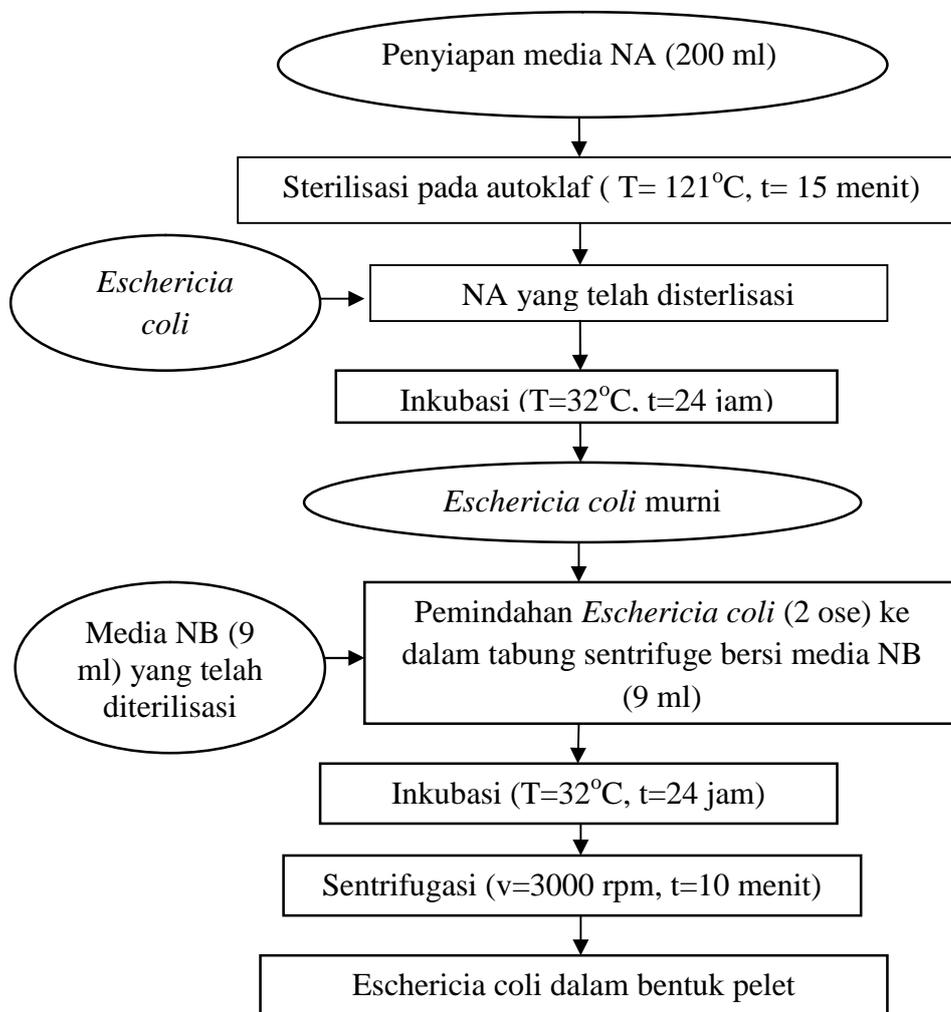
3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Peremajaan Biakan *Eschericia coli* Menggunakan Metode Widya (2016)

Langkah awal pelaksanaan penelitian adalah sterilisasi alat. Pembuatan media NA dilakukan dengan menimbang Media NA sebanyak 5,6 gram, lalu dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi akuades 200 mL, kemudian panaskan pada hotplate pada suhu 150°C selama \pm 15 menit. Setelah itu masukkan ke dalam tabung erlenmeyer 250 ml dan tutup dengan kapas penyumbat, kemudian sterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, tuang media kedalam cawan petri (\pm 20ml) dan didinginkan.

Inokulasi biakan murni *Eschericia coli* yang telah tersedia dalam cawan petri, dilakukan secara aseptis didekat pembakar bunsen, inokulasi biakan dari media menggunakan jarum ose yang sudah dibakar sampai pijar. Pemiakan kedalam media Nutrien Agar (NA) dilakukan menggunakan metode cawan gores .sehingga akan diperoleh *Eschericia coli* pada media Nutrient Agar (NA) baru. Selanjutnya cawan petri berisi media Nutrient Agar (NA) yang telah digores dengan *Eschericia coli* diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Koloni-koloni *Eschericia coli* yang tumbuh dipindahkan sebanyak 2 ose ke dalam tabung

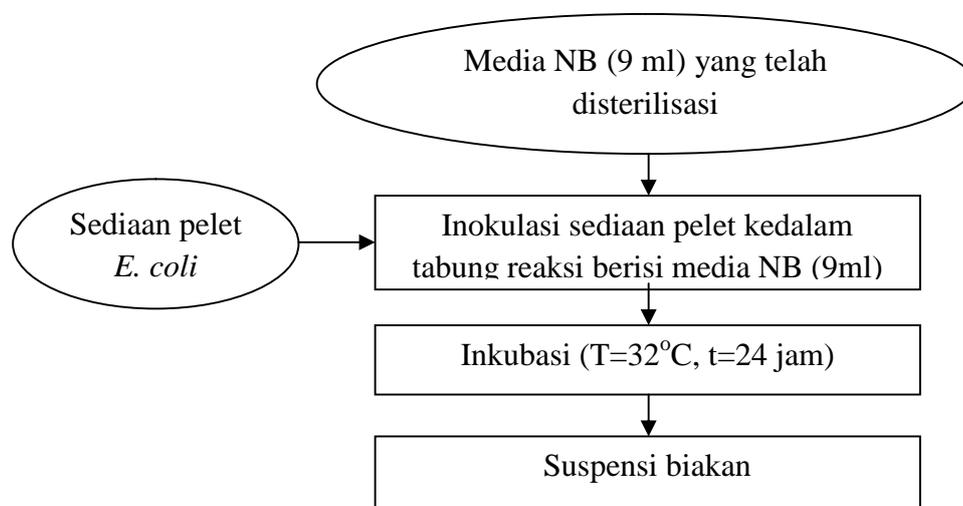
sentrifuge yang berisi media Nutrien Broth (NB) sebanyak 9 mL agar dapat disentrifugasi, kemudian dihomogenisasi menggunakan vortex dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Biakan *Eschericia coli* yang berada pada tabung sentrifuge selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan pelet dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Biakan *Eschericia coli* yang telah berbentuk pelet selanjutnya diinokulasikan ke media Nutrient Broth (NB) sebelul siap digunakan untuk inokulasi ke paper filter. Tahapan-tahapan persiapan inokulum *Eschericia coli* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir peremajaan *Eschericia coli* termodifikasi (Sumber: Widya, 2016)

3.4.2. Penyiapan Suspensi Biakan yang Akan Diinokulasikan pada Paper Filter

Biakan dalam sediaan pelet yang berada pada tabung sentrifuge, selanjutnya diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisi media Nutrient Broth (NB) menggunakan mikropipet secara aseptis. Kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Tahapan-tahapan penyiapan suspensi biakan dapat dilihat pada Gambar 2.

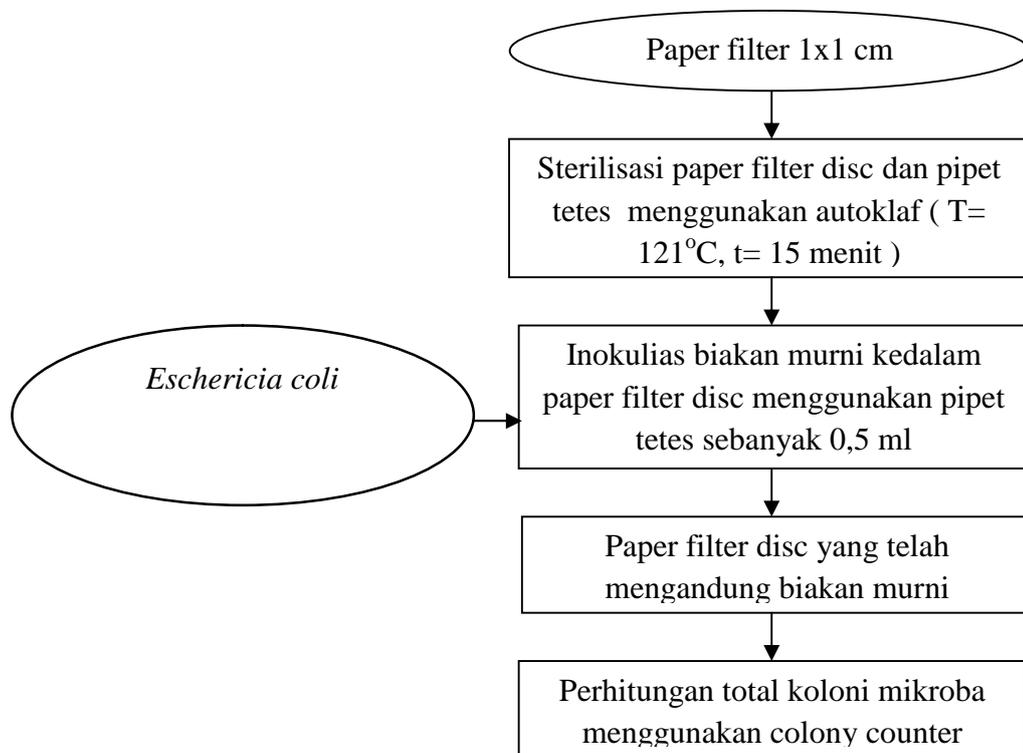


Gambar 2. Diagram alir penyiapan suspensi biakan

3.4.3. Inokulasi Biakan Murni ke Paper Filter Steril ukuran 1 x 1 cm

Sebelum dilakukan inokulasi biakan murni ke dalam paper filter disc, paper filter disc yang memiliki ukuran 125 mm diperkecil menjadi persegi dengan ukuran 1cm x 1cm dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Suspensi biakan yang diperoleh dari Gambar 2 selanjutnya diinokulasikan kedalam paper filter disc secara aseptis sebanyak 0,5 ml menggunakan pipet tetes yang sudah disterilisasi. Paper filter disc yang telah mengandung biakan murni dihitung total mikrobya menggunakan TPC (Total Plate Count) untuk

mengetahui jumlah total biakan murni sebelum dilakukan penyimpanan, dengan cara memasukkan lembaran paper filter yang sudah diinokulasikan kedalam tabung reaksi berisi media Nutrient Broth (NB) dan selanjutnya divortex hingga keruh. Kultur murni yang telah di vortex diambil sebanyak 0,1 ml dicampur dengan 0,9 ml larutan garam fisiologis. Selanjutnya dilakukan penanaman kultur murni dengan menggunakan metode pour plate ke media Nutrient Agar (NA) untuk dapat dihitung menggunakan colony counter. Proses inokulasi biakan murni dalam paper filter disc dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram alir inokulasi biakan murni dalam paper filter

3.4.4. Perlakuan Penyimpanan dan Perhitungan Jumlah Koloni Kultur Murni dari Media Paper Filter

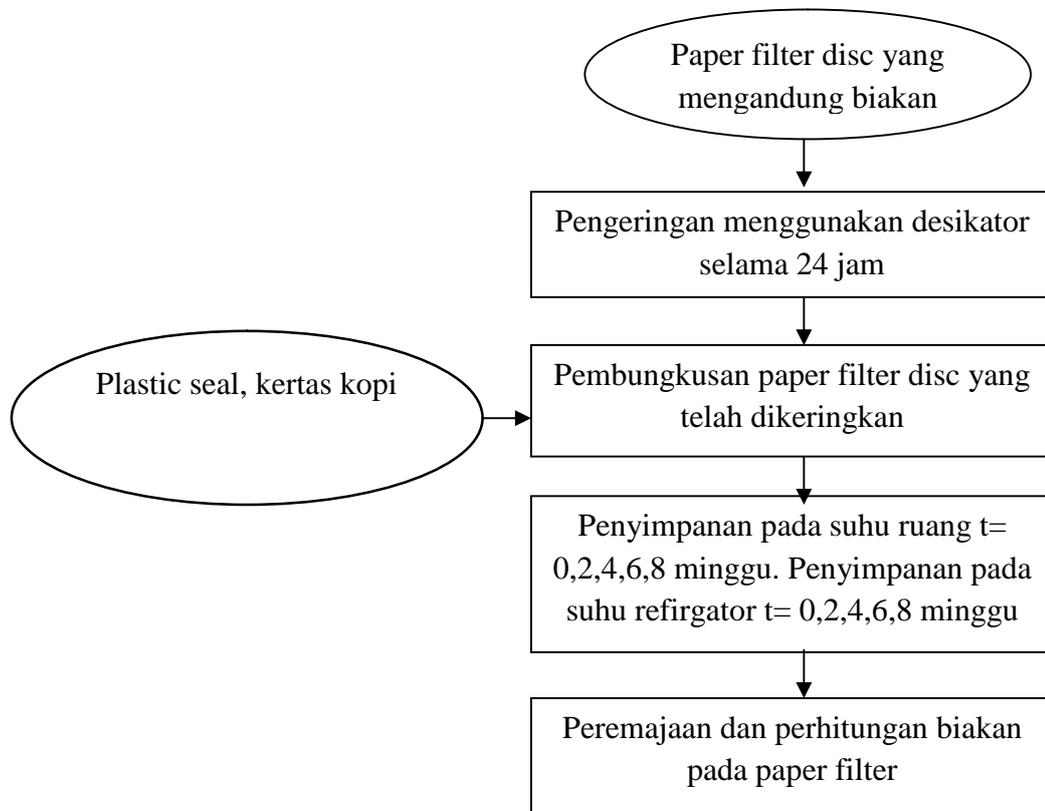
Paper filter disc yang telah mengandung biakan murni disimpan dalam petri disc dan disimpan dalam desikator selama 24 jam. Setelah paper filter disc yang

berada di desikator kering, selanjutnya kertas saring dibungkus menggunakan plastic seal, kertas kopi, dan petri disc. Penyimpanan paper filter disc yang mengandung biakan dilakukan selama 0 minggu, 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu, dan 8 minggu penyimpanan pada suhu ruang dan suhu refrigerator. Selanjutnya dilakukan peremajaan kultur murni dari media paper filter dengan cara mengambil lembaran paper filter untuk dipindahkan ke media Nutrient Broth (NB). Lembaran paper filter yang berisi kultur murni dimasukkan kedalam media Nutrient Broth (NB) dan divortex agar kultur murni yang ada pada lembaran paper filter menjadi homogen dengan Nutrient Broth (NB). Selanjutnya dilakukan perhitungan TPC (Total Plate Count) kultur murni yang telah di vortex menggunakan metode pour plate ke media Nutrient Agar (NA). Selanjutnya dilakukan perhitungan viabilitas mikroba dengan rumus :

$$\text{Viabilitas (cfu/cm}^2\text{)} = \frac{M}{M_0} \times 100\%$$

Ket : M = koloni mikroba pada waktu penyimpanan 0, 2, 4, 6, 8 minggu
M₀ = koloni mikroba pada waktu penyimpanan 0 minggu

Proses perlakuan penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 4.

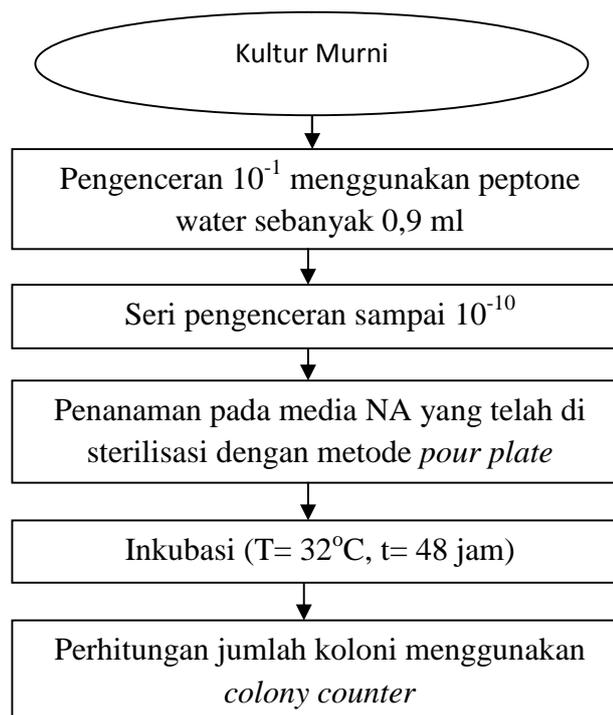


Gambar 4. Diagram alir perlakuan penyimpanan *Escherichia coli* menggunakan paper filter

3.4.5. Perhitungan Total Bakteri Menggunakan Metode TPC (*Total Plate Count*)

Metode perhitungan yang digunakan pada penelitian ini adalah metode TPC (*Total Plate Count*), penggunaan metode TPC dilakukan untuk menghitung jumlah total koloni bakteri dalam satu sampel dengan menggunakan teknik pengenceran dan cawan yang dihitung mengandung 30-300 koloni bakteri (Waluyo, 2010). Metode ini menggunakan cara tuang/penuangan (*pour plate*). Pada penelitian ini TPC tidak mengidentifikasi jenis bakteri, namun hanya menghitung jumlah total koloni bakteri saja. Kelebihan dari teknik ini adalah mikroba yang tumbuh dapat

tersebar secara merata pada media agar. Pengenceran yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan larutan pengencer garam fisiologis sebanyak 0,9 ml dan 0,1 ml biakan untuk seri pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan sampai seri 10^{-10} dengan cara mengambil 0,1 ml larutan dari seri pengenceran sebelumnya ke dalam 0,9 ml larutan garam fisiologis pada seri pengenceran baru. Seri pengenceran yang telah mencapai 10^{-10} ditanamkan ke media NA secara tuang (*pour plate*) dan diratakan. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 32°C selama 48 jam. Perhitungan jumlah koloni mikroba yang telah tumbuh dilakukan menggunakan *colony counter*. Diagram alir perhitungan TPC (*Total Plate Count*) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram Alir Penghitungan jumlah koloni (Waluyo,2010).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai pemeliharaan kultur murni *Eschericia coli* menggunakan metode paper filter, maka dapat disimpulkan :

1. Penyimpanan kultur murni metode paper filter menggunakan pembungkus plastik seal lebih baik dari penyimpanan kultur murni metode paper filter menggunakan pembungkus kertas kopi, dengan total mikroba pada penyimpanan plastik seal suhu ruang minggu ke 8 sebesar $3,5 \times 10^{10}$ cfu/cm², dan penyimpanan kertas kopi suhu ruang minggu ke 8 sebesar $2,7 \times 10^{10}$ cfu/cm².
2. Penyimpanan kultur murni metode paper filter menggunakan pembungkus plastik seal dan kertas kopi pada suhu dingin (5°C) lebih baik dari penyimpanan kultur murni metode paper filter menggunakan pembungkus plastik seal pada suhu ruang, dengan total mikroba pada penyimpanan plastik seal suhu dingin minggu ke 8 sebesar $5,6 \times 10^{10}$ cfu/cm² , dan penyimpanan plastik seal suhu ruang minggu ke 8 sebesar $3,5 \times 10^{10}$ cfu/cm².

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dan dapat dijadikan sebagai bahan masukan, Perlu dilakukan perbandingan antara metode penyimpanan paper filter dengan metode penyimpanan dalam cawan.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark, W.A. 2013. Selected bibliography of literature on preservation of microorganisms, blood, tissues, and vaccines with emphasis on freezing and freeze-drying. US Department of Health Education and Welfare, Center for Disease Control, Atlanta. p. 187-201.
- Dewi, A.W. 2017. Mutasi Genetik. Buku Ajar Fakultas Peternakan. Universitas Udayana. Denpasar. p. 6-7.
- Elfidasari, D., Sarasawati, A.M., Nufadianti, G., dan Samiah, R. 2011. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas Al Azhar Indonesia dengan Restoran Fast Food di Daerah Senayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut. Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi. p. 118-23
- Faradiana. R. 2016. Pemanfaatan Sumber Karbohidrat yang Berbeda (Umbi kimpul dan Umbi Suweg) Sebagai Substitusi Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) Untuk Pertumbuhan Jamur. Skripsi. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Fahrudin. 2011. Peningkatan Kapasitas Bakteri Melalui Induksi Mutasi-UV. Jurnal Alam dan Lingkungan. Vol.2 (3) Maret 2011. p. 60-68
- Fong, Y.K., Anuar, S., Lim, H.P., and Anderson, F.R. 2010. A Modified Paper Filter Technique For Long-term Preservation of Some Fungal Culture. Journal Mycologist. Volume 14 Part 3 August 200. p. 127-130.
- Ikmalia. 2008. Analisa profil protein isolate *Escherichia coli* S1 hasil iradiasi sinar gamma. Fakultas sains teknologi universitas islam negeri syarif hidayatullah. Jakarta. p. 171-174
- Ismail, D. 2012. Uji Bakteri *Escherichia coli* Pada Minuman Susu Kedelai Bermerek dan Tanpa merek di kota surakarta. Naskah publikasi, Fakultas Kedokteran. Universitas Muhammadiyah Surakarta. p. 200-205
- Klement, Z. 2011. Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest. p. 30-31

- Kulkarni, G.A., and Chitte, R.R. 2015. Preservation of Thermophilic Bacterial Spores Using Paper Filter Disc Technique. *Journal Bioprocess Biotech* 2015. Vol 5 Part 4. p. 1-3.
- Lapage, S.P., Shelton, J.E, and Mitchell, T.G. 2011. Media for the maintenance and preservation of bacteria. In Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Eds.). *Methods in Microbiology* 3A. p. 130-133.
- Lescot, S. 2009. *Microbiology Advance*. McGraw-Hill. New York. p. 120-132
- Leben, C. and Slesman, J. P. 2012. Preservation of plant pathogen bacteria on silica gel. *Plant Disease*. p. 327-331
- Norris, D.O. 2009. Porcelain bead method for storing Rhizobium. *Empire Journal of Experimental Agriculture*. p. 255-258.
- Nyoman, P. 2010. Kompos. Pusat Penelitian Antar Universitas Ilmu Hayati LPPM-ITB. Dept Biologi. *Jurnal Biologi*. p. 155-159
- Rahman, A, and Islam, M. 2011. Antibacterial Activities of Actinomycetes Isoaltes Collected From Soils of Rajshahi. *Biotechnology Research Internatonal*. p. 264-267
- Ratna, S. 2010. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur dasar Laboratorium*. PT Gramedia, Jakarta. p. 101-111
- Sanfa. 2011. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit Universitas Muhammadiyah. Malang. p. 98-102
- Sharman, D., Kaur, T., Chadda, B. S., and Manhas, R. 2009. Identification of vibrocidal compound from medical plant, *W.J Microbiology*. p. 19-25
- Sumarsih. 2014. *Mikrobiologi Umum*. UI Press. Jakarta. p. 92-95
- Sopandi, T. dan Wardah. 2014. *Mikrobiologi Pangan*. Penerbit Rajawali. Yogyakarta. p. 51-67
- Waluyo, L. 2010. *Teknik Dasar Metode Mikrobiologi*. UMM Press. Malang. p. 69-70
- Widya, P. 2016. Aplikasi Mikroorganisme untuk Bioremediasi Oil Spill Sistem Dua Tahap. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Lipi Press. Vol 28. p. 29-37

Wulan, A. 2009. Kemampuan Air Rebusan Daun Salam (*Eugenia Polyantha W*) Dalam Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri *Escherichia coli*. Majalah Farmasi Indonesia. p. 113