



JURUSAN
TEKNIK LINGKUNGAN

TUGAS AKHIR

Analisis Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Konsentrasi *Gellan Gum* sebagai Alternatif Agar untuk Penyimpanan Jangka Panjang

Nabila Utami

21513169

Dosen Pembimbing I:

Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr., Ph.D.

Dosen Pembimbing II:

Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T.

Program Studi Teknik Lingkungan Program Sarjana

Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan

Universitas Islam Indonesia

2025



DEPARTMENT
ENVIRONMENTAL ENGINEERING

BACHELOR THESIS

Analysis of Bacterial Growth at Various Concentrations of *Gellan Gum* as an Agar Alternative for Long-Term Storage

Nabila Utami

21513169

Supervisor I:

Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr., Ph.D.

Supervisor II:

Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T.

Environmental Engineering Bachelor Program

Faculty of Civil Engineering and Planning

Universitas Islam Indonesia

2025

LEMBAR PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

Analisis Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Konsentrasi *Gellan Gum*
sebagai Alternatif Agar untuk Penyimpanan Jangka Panjang

Tugas akhir ini disusun dan diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Teknik (S.T.) pada Program Studi Teknik Lingkungan Program Sarjana Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia.

Nabila Utami
21513169

Tugas akhir ini telah diuji pada tanggal 22 September 2025 dan disetujui oleh:



Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr., Ph.D.

(Pembimbing 1)



— 23-09-2025

Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T.

(Pembimbing 2)



Dewi Wulandari, S.Hut., M.Agr., Ph.D.

(Penguji)

Mengesahkan
Ketua Prodi Teknik Lingkungan Program Sarjana
23/9-25

Any Juliani, S.T., M.Sc. (Res. Eng.), Ph.D.

PERNYATAAN

Saya, penyusun tugas akhir ini, menyatakan bahwa:

1. Karya tulis ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik apapun, baik di Universitas Islam Indonesia, maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini merupakan gagasan, rumusan, dan studi saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan dosen pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama penulis dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Perangkat lunak atau program komputer yang digunakan dalam tugas akhir ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya. Bukan tanggung jawab Universitas Islam Indonesia.
5. Tidak ada penggunaan kecerdasan buatan (*artificial intelligence*, AI) dalam penyusunan karya tugas akhir ini kecuali:
 - a. untuk membantu dalam kadar yang wajar (seperti membantu mengoreksi, mencari ide, dan mencari referensi), dan
 - b. tercantum dan dijelaskan perihal penggunaannya secara eksplisit di dalam karya tugas akhir ini.Implikasi dari penggunaan AI tersebut menjadi tanggung jawab saya sepenuhnya.
6. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademik dengan pencabutan gelar yang sudah diperoleh serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Yogyakarta, 28 Juli 2025

Yang membuat pernyataan,


C3A74ANX044569882
Nabila Utami
21513169

PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji dan syukur penulis haturkan kepada dzat Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya, serta sholawat beserta salam selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawakan kebenaran dan menjadi teladan bagi umat manusia. Berkat izin-Nya, penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Analisis Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Konsentrasi *Gellan gum* sebagai Alternatif Agar untuk Penyimpanan Jangka Panjang”.

Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat dalam Program Studi Teknik Lingkungan serta bertujuan untuk memberikan kontribusi dalam pengembangan ide, guna mencari solusi atas berbagai permasalahan di bidang Teknik Lingkungan. Penulisan penelitian ini juga merupakan bagian dari syarat akademik untuk meraih gelar Sarjana (S1) Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia. Selama proses penyusunan, penulis mendapatkan banyak sekali dukungan, motivasi, bimbingan, dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, yang telah melimpahkan rahmat, kekuatan, kesehatan, kesabaran, kelancaran, dan ilmu, serta membimbing setiap langkah dalam menyelesaikan penelitian ini.
2. Kedua orang tua tercinta, Bapak Wawan Setiawan dan Ibu Siti Junasih, atas kasih sayang, do'a, nasihat, kesabaran, dan kerja kerasnya yang menjadi alasan utama ditiap langkah dan doa penulis.
3. Kakak-kakak dan adikku tersayang, Teh Wulan, Kaka Untung, A Dea, Teh Sinta, A Yogie, Teh Ncha, dan Oham yang selalu menemani, menyemangati, menghibur, serta memberikan motivasi dalam suka maupun duka kepada penulis.

4. Ibu Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing I yang selalu membimbing, memberikan arahan, ilmu, waktu, dan semangat, serta kritik dan saran, terhadap penulis dengan penuh kesabaran sejak penulisan proposal tugas akhir hingga tugas akhir ini selesai.
5. Ibu Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T. selaku Dosen Pembimbing II yang selalu membimbing, memberikan arahan, ilmu, dan motivasi, serta kritik dan saran, terhadap penulis dengan penuh kesabaran dalam penyusunan tugas akhir ini.
6. Ibu Dewi Wulandari, S.Hut., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Penguji yang memberikan masukan guna membangun penulis serta saran-saran yang sangat bermanfaat untuk terselesaikannya tugas akhir ini.
7. Mbak Rina Isnikarita, S.Si. selaku laboran yang telah banyak membantu dan membimbing penulis saat melakukan penelitian.
8. Seluruh dosen dan laboran Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia yang selama ini telah memberikan ilmu maupun fasilitas yang sangat bermanfaat untuk penulis selama proses menempuh Pendidikan di Program Studi Teknik Lingkungan Universitas Islam Indonesia.
9. Teman-teman terdekat penulis Tika, Amel, Kiki, Najla yang selama ini senantiasa menemani, menghibur, dan mendukung, serta memeberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
10. Teman-teman seperjuangan Program Studi Teknik Lingkungan Angkatan 2021 yang telah memberikan bantuan dan semangat selama masa perkuliahan.
11. Pihak-pihak lain yang telah membantu penulis selama perkuliahan di Teknik Lingkungan Universitas Islam Indonesia.
12. Terakhir, penulis persembahkan tulisan ini kepada diri sendiri yang tak henti berjuang, yang tetap tegar, tak pernah menyerah, dan tetap

melangkah ditengah keraguan. Teruslah menjadi pembelajar yang rendah hati, karena ilmu ini adalah titipan dan tugas kita adalah menjaganya, menyebarkannya, serta menjadikannya berkah bagi sesama dan semesta. Semoga setiap baris dalam karya ini bernilai ibadah, tugas kita hanyalah berusaha, Allah SWT yang menentukan hasil.

Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan dan kontribusi selama proses penyusunan laporan ini. Penulis menyadari bahwa karya Tugas Akhir ini masih memiliki berbagai kekurangan, baik dari segi isi maupun penyajiannya. Oleh karena itu, segala bentuk kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan dan peningkatan wawasan penulis di masa mendatang. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat yang luas, serta menjadi referensi yang berguna bagi penulis dan semua pihak yang membutuhkan.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Sleman, 28 Juli 2025

Nabila Utami

Analisis Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Konsentrasi *Gellan gum* sebagai Alternatif Agar untuk Penyimpanan Jangka Panjang

Mahasiswa : Nabila Utami
NIM : 21513169
Program Studi : Teknik Lingkungan - Program Sarjana
Pembimbing 1 : Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr.,
Ph.D.
Pembimbing 2 : Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T.

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi teknik penyimpanan isolat bakteri dalam media *gellan gum* dengan variasi konsentrasi 2,5% dan 3%. Viabilitas koloni bakteri dievaluasi dengan metode *Total Plate Count* (TPC), serta pengamatan morfologi sel diamati melalui teknik pewarnaan gram. Sampel bakteri yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia, yang memiliki potensi dalam aplikasi bioremediasi dan bioteknologi. Kultur bakteri diinokulasikan ke dalam media semi padat DNB (*Dilute Nutrient Broth*) ditambah *gellan gum* dengan konsentrasi 2,5% dan 3%. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan pertumbuhan koloni bakteri yang signifikan antara kedua konsentrasi. Pada konsentrasi 2,5%, jumlah koloni yang terhitung dalam sampel isolat lebih rendah dibandingkan pada konsentrasi 3%. Selain itu, dilakukan pengamatan morfologi sel dengan pengecatan gram. Teknik ini menunjukkan bahwa bakteri yang diuji ada yang termasuk gram positif. Pengamatan morfologi makroskopis meliputi bentuk sel, tepi, dan elevasi bakteri yang diteliti, sehingga memberikan informasi tambahan mengenai karakteristik bakteri tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media DNB ditambah *gellan gum* dengan konsentrasi 3% lebih efektif dalam mendukung pertumbuhan koloni bakteri. Hasil penelitian ini dapat dijadikan alternatif penyimpanan bakteri dalam jangka panjang dengan mempertahankan viabilitas dan morfologi selnya, sehingga berpotensi untuk mendukung aplikasi bioremediasi dan bioteknologi dimasa mendatang.

Kata kunci: Bioteknologi; *Gellan gum*; Isolasi Bakteri; Viabilitas

Analysis of Bacterial Growth at Various Concentrations of Gellan gum as an Agar Alternative for Long-Term Storage

Student : Nabila Utami
Student Number : 21513169
Study Program : Environmental Engineering – Bachelor Program
Supervisor 1 : Annisa Nur Lathifah, S.Si., M.Biotech., M.Agr., Ph.D.
Supervisor 2 : Diah Ayu Prawitasari, S.T., M.T.

Abstract

This study aimed to explore the technique of storing bacterial isolats in gellan gum media with varying concentrations of 2.5% and 3%. Bacterial colony viability was evaluated using the Total Plate Count (TPC) method, and cell morphology was observed using the Gram staining technique. The bacterial samples used were from the Environmental Engineering Laboratory collection, Islamic University of Indonesia, which has potential in bioremediation and biotechnology applications. Bacterial cultures were inoculated into semi-solid DNB (Dilute Nutrient Broth) media supplemented with gellan gum at concentrations of 2.5% and 3%. The results showed a significant difference in bacterial colony growth between the two concentrations. At a concentration of 2.5%, the number of colonies counted in the isolat sample was lower than at a concentration of 3%. In addition, cell morphology was observed using Gram staining. This technique indicated that the tested bacteria were gram-positive. Macroscopic morphological observations included cell shape, edges, and elevation of the bacteria studied, thus providing additional information regarding the characteristics of the bacteria. The results showed that DNB media supplemented with gellan gum at a concentration of 3% was more effective in supporting bacterial colony growth. The results of this study can be used as an alternative for long-term bacterial storage by maintaining cell viability and morphology, thus having the potential to support bioremediation and biotechnology applications in the future.

Key words: Biotechnology; Gellan gum; Bacterial Isolation; Viability

DAFTAR ISI

PRAKATA	i
Abstrak	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	11
1.1 Latar Belakang	11
1.2 Perumusan Masalah	13
1.3 Tujuan Penelitian	13
1.4 Manfaat Penelitian	14
1.5 Ruang Lingkup	14
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	15
2.1 Isolasi Bakteri	15
2.2 Teknik penyimpanan	18
2.3 Media <i>Gellan gum</i>	21
2.4 Proses Isolasi Bakteri	29
2.5 Penelitian Terdahulu	31
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian	35
3.2 Alat dan Bahan	35
3.3 Tahapan Penelitian	36
3.4 Pembuatan Media	38
3.5 Isolasi Bakteri	40
3.6 Identifikasi Morfologi Sel Bakteri dengan Pewarnaan Gram	43
3.7 Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri	44
3.8 Analisis Data	46
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1 Isolasi Bakteri	47

4.2 Identifikasi Koloni Bakteri dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	55
4.3 Analisis Viabilitas pada Konsentrasi <i>Gellan gum</i> yang Optimal	58
4.5 Identifikasi Morfologi Bakteri	63
BAB V PENUTUP	71
5.1 Kesimpulan	71
5.2 Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	79
RIWAYAT HIDUP	1

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Ciri-ciri Polisakarida Mikroorganisme	23
Tabel 2. 2 Sifat fisik, kimia, dan mikroba dari <i>gellan gum</i>	26
Tabel 2. 3 Teknik Isolasi Mikroorganisme	30
Tabel 2. 4 Tinjauan Hasil Penelitian Sebelumnya	31
 Tabel 3.1 Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian	 35
 Tabel 4. 1 Nama dan Kode Sampel Bakteri.....	 48
Tabel 4. 2 Identifikasi Sampel Bakteri Error! Bookmark not defined.	
Tabel 4. 3 Hasil TPC Hari ke-12 Pengenceran 10^{-5}	55
Tabel 4. 4 Hasil TPC Hari ke-28 Pengenceran 10^{-7}	56
Tabel 4. 5 Data Koloni Bakteri di Tiap Konsentrasi GG.....	57
Tabel 4. 6 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG dari TPC hari ke-12	59
Tabel 4. 7 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG dari TPC hari ke-28	59
Tabel 4. 8 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Fase Pertumbuhan Bakteri	17
Gambar 2. 2 Struktur Kimia <i>Gellan gum</i>	25
Gambar 2. 3 Biosintesis <i>Gellan gum</i>	28
 Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian	37
Gambar 3. 2 Diagram Pembuatan Media	38
Gambar 3. 3 Prosedur pewarnaan gram bakteri	44
Gambar 3. 4 Prosedur pengujian <i>Total Plate Count</i> (TPC)	46
 Gambar 4. 1 Kulturasasi Bakteri di Waterbath Shaker	51
Gambar 4. 2 Inokulasi Agar Miring	52
Gambar 4. 3 Inokulasi Bakteri di Media DNB+ <i>Gellan gum</i>	53
Gambar 4. 4 Hasil Uji Statistik Konsentrasi GG 2,5%	58
Gambar 4. 5 Hasil Uji Statistik Konsentrasi GG 3%	58
Gambar 4. 6 Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri pada Media <i>Gellan gum</i> 2,5%	60
Gambar 4. 7 Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri pada Media <i>Gellan gum</i> 3%	61
Gambar 4. 10 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri BR-1	66
Gambar 4. 11 Literatur <i>Arthrobacter</i> sp, Ivan Glaucio (2019)	66
Gambar 4. 12 Pengamatan Sel Bakteri BR-12	67
Gambar 4. 13 Literatur <i>Mesorhizobium loti</i>	67
Gambar 4. 14 Pengamatan Sel Bakteri BR-36	67
Gambar 4. 15 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri BRU-12	68
Gambar 4. 16 Literatur <i>Bradyrhizobium</i> sp,	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Persiapan dan Sterilisasi Alat	79
Lampiran 2 Pembuatan Media	80
Lampiran 3 Inokulasi Bakteri	80
Lampiran 4 Pengujian Total Plate Count.....	81
Lampiran 5 Hasil TPC Hari ke-12	83
Lampiran 6 Hasil Pengamatan Pengecatan Gram.....	88
Lampiran 7 Media yang Dipakai Selama Penelitian.....	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyimpanan atau preservasi mikroba diperlukan untuk aplikasi bioremediasi, terutama ketika memiliki perbedaan waktu dan tempat antara proses produksi mikroba dan penggunaannya (She & Butler, 2023). Penyimpanan ini terbagi menjadi dua kategori yang berdasarkan pada jangka waktu penyimpanan (Prakash dkk, 2020). Penyimpanan jangka pendek dilakukan untuk keperluan penelitian laboratorium secara rutin, sementara penyimpanan jangka panjang digunakan untuk koleksi dan konservasi stok mikroba dengan tujuan ketika suatu saat diperlukan dapat ditumbuhkan kembali serta memiliki kinerja yang tetap optimal (Morgan dkk, 2006).

Prinsip utama dalam penyimpanan mikroba yaitu menghambat atau mengurangi laju metabolisme sel sehingga energi sel tetap terjaga selama masa simpan. Hal tersebut dapat mengaktifkan kembali mikroba dalam kondisi viabel dan memiliki kemampuan pertumbuhan yang baik. Viabilitas bakteri merupakan kunci utama kemampuan suatu isolat untuk tumbuh kembali (McDaniel & aali, 1968). Oleh karena itu, penyimpanan mikroba dimaksudkan untuk memperpanjang umur mikroba dengan viabilitas yang tetap terjaga dan dipelihara dengan baik. Maka, metode penyimpanan ini dilakukan agar dapat memperpanjang umur simpan mikroba tanpa mengubah karakteristik genetiknya, dan tetap efisien dari segi biaya dan tenaga pemeliharaan (Leung dkk, 2009).

Salah satu pendekatan yang digunakan dalam penyimpanan bakteri adalah enkapsulasi. Dimana, enkapsulasi bertujuan untuk melindungi sel bakteri dalam kondisi lingkungan yang tidak stabil selama produksi dan penyimpanan. Beberapa bahan yang umum digunakan sebagai enkapsulan meliputi, alginat, karagenan, xanthan gum, dan *gellan gum* (Aali & Al-Sahlany, 2024). *Gellan gum* merupakan polisakarida alami yang diproduksi melalui fermentasi bakteri *Sphingomonas elodea*. Bahan ini biasa digunakan sebagai bahan pembentuk gel dalam berbagai produk pangan yang memiliki struktur molekul unik yang dapat membentuk zat

seperti gel saat dicampur dengan air (Zohri dkk, 2022). *Gellan gum* mampu memperlambat pelepasan nutrisi dan melindungi enzim atau protein lain yang penting bagi viabilitas bakteri (Munarin dkk, 2012).

Dalam aplikasi penyimpanan mikroba, variasi konsentrasi dari *gellan gum* berperan penting untuk menentukan keberhasilan media penyimpanan. Evaluasi terhadap sifat fisik *gellan gum* terdiri dari pengamatan organoleptis, penentuan pH, viskositas, daya sebar, daya lekat dan daya proteksi (Mac dkk, 2017). Konsentrasi substrat (gelling agent) yang berlebih dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah memungkinkan stabilitas dan viabilitas mikroba tidak cukup tahan dalam jangka panjang. Oleh karena itu, eksplorasi variasi konsentrasi terhadap media *gellan gum* diperlukan untuk menemukan formulasi konsentrasi optimal yang mendukung pertumbuhan bakteri dan produksi bakteri selama penyimpanan (Aali & Al-Sahlany, 2024).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *gellan gum* dapat meningkatkan kemampuan pertumbuhan mikroorganisme tertentu yang sulit dikulturkan pada media agar konvensional. Studi yang dilakukan oleh Mac dkk (2017), berhasil meningkatkan jumlah bakteri laut hingga 40 kali lipat yang dikultur dengan media *gellan gum* sebagai agen pembentuk gel pengganti media agar, dan dipengaruhi juga oleh kondisi pertumbuhan yang spesifik dan jenis media yang digunakan. Dalam penelitian ini, kultur maksimum yang dicapai yaitu 6,6 % dari total sel langsung, yang secara signifikan meningkat dalam jumlah dan keragaman bakteri yang berhasil dikulturkan. Dengan menggunakan metode laboratorium standar, bakteri laut yang biasanya hanya tumbuh 1% dapat menunjukkan peningkatan substansial dalam kelangsungan hidupnya dengan penggunaan *gellan gum*. Penelitian ini menegaskan bahwa penggunaan gel alternatif seperti *gellan gum* dapat secara efektif mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu yang tidak berkembang dengan baik pada media agar tradisional (Mac dkk., 2017)

Kemudian, keberhasilan kultur bakteri yang meningkat dan isolasi bakteri baru telah dilakukan oleh Janssen dkk (2002), yang menunjukkan bahwa media pertumbuhan *gellan gum* sebagai agen pembentuk gel alternatif lebih efektif dibandingkan media agar konvensional untuk meningkatkan jumlah bakteri yang dapat dikulturkan dari tanah. Penelitian mereka mencatat peningkatan jumlah

koloni mencapai 7,5% dari total sel yang terdeteksi secara mikroskopis dibandingkan dengan media agar yang hanya menghasilkan 5,2%. Selain itu, penggunaan teknik homogenisasi dengan sonikasi dalam penelitian ini mampu meningkatkan viabilitas hingga 14,1%, yang menandakan bahwa pentingnya kondisi fisik dan media pertumbuhan dalam keberhasilan isolasi bakteri. Penelitian ini juga mencatat tentang kemampuan *gellan gum* dalam mengurangi faktor toksisitas yang sering ditemukan pada agar, sehingga memungkinkan isolasi bakteri dari kelompok yang sebelumnya dianggap sulit dikulturkan, seperti Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, dan Verrucomicrobia (Janssen dkk., 2002)

Berdasarkan studi – studi tersebut, eksplorasi mengenai variasi konsentrasi *gellan gum* sebagai media penyimpanan mikroba sangat penting untuk meningkatkan viabilitas bakteri dalam mikrobiologi dan bioremediasi. Dengan menemukan konsentrasi *gellan gum* yang optimal, diharapkan teknik ini dapat menjadi solusi yang efektif dan efisien dalam penyimpanan bakteri jangka panjang tanpa kehilangan viabilitas dan kemampuan pertumbuhannya.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dan masalah yang diteliti dapat dirumuskan sebagai berikut:

- 1) Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi *gellan gum* terhadap viabilitas dan pertumbuhan koloni bakteri selama penyimpanan
- 2) Berapa konsentrasi *gellan gum* optimal yang menghasilkan pertumbuhan koloni tertinggi setelah penyimpanan dilihat berdasarkan metode Total Plate Count (TPC).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Menganalisis pengaruh perbedaan konsentrasi *gellan gum* terhadap pertumbuhan dan jumlah koloni bakteri yang viabel setelah periode penyimpanan menggunakan metode Total Plate Count (TPC)

- 2) Mengidentifikasi perubahan morfologi sel bakteri setelah penyimpanan dalam media *gellan gum* dengan variasi konsentrasi melalui pengecatan gram.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini untuk memperpanjang masa simpan kultur isolat bakteri dengan konsentrasi *gellan gum* yang paling optimal, sehingga kualitas bakteri selama penyimpanan dapat dipertahankan termasuk karakteristik morfologi dan fisiologisnya.

1.5 Ruang Lingkup

Berikut ruang lingkup penelitian ini, yaitu :

- 1) Jenis isolat bakteri yang digunakan berasal dari koleksi laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia
- 2) Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media *Diluted Nutrient Broth* (DNB) ditambahkan media *gellan gum* dengan variasi konsentrasi 2,5% dan 3%
- 3) Parameter yang diamati meliputi, pertumbuhan koloni, jumlah populasi bakteri dengan metode TPC, dan karakterisasi sel bakteri dengan pengecatan gram.
- 4) Penelitian dilakukan skala laboratorium

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Isolasi Bakteri

Mikroorganisme merupakan populasi campuran dari berbagai jenis, baik pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan ataupun tumbuhan. Isolasi bakteri diperlukan untuk mengetahui jenis, kultural, morfologi, fisiologi, dan karakteristiknya (Singleton & Sainsbury, 2006). Teknik isolasi biasa disertai dengan pemurnian. Isolasi bakteri merupakan suatu proses mengambil bakteri dari medium atau dari habitat aslinya lalu ditumbuhkan dalam medium buatan sehingga dapat diperoleh biakan yang murni (Cappucino & Welsh, 2017).

Prinsip isolasi mikroba yaitu memisahkan satu jenis mikroba dari mikroba lain yang berasal dari campuran macam-macam mikroba. Proses tersebut dapat dilakukan dengan menumbuhkannya dalam media padat, sel-sel mikroba akan membentuk koloni sel yang tetap pada tempatnya (Madigan dkk, 2018). Metode yang biasa digunakan untuk memperoleh biakan murni dari suatu biakan campuran yaitu metode cawan gores dan cawan tuang. Metode tersebut didasarkan pada prinsip pengenceran untuk memperoleh spesies individu, dengan tujuan bahwa ketika suatu koloni dapat terpisah dari satu jenis sel dapat diidentifikasi (Afrianto, 2004).

Proses identifikasi bakteri dapat dilakukan secara konvensional berdasarkan karakter fenotip bakteri, contohnya pewarnaan gram, morfologi koloni, dan aktivitas enzim yang bersifat dinamis berubah seiring dengan evolusi. Kesalahan dapat terjadi ketika karakteristik fenotip bakteri yang tidak biasa hadir ataupun kurangnya pengalaman dalam menginterpretasikan karakter fenotip tersebut (Willey dkk, 2020). Maka, metode identifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA muncul sebagai solusi. Menurut Petti (2007), pendekatan metode ini mengurangi subjektivitas interpretasi dan menghilangkan kebutuhan untuk pengujian awal (pretest) dalam mengklasifikasi mikroorganisme, sehingga pemeriksaan langsung dan pemilihan database lebih efisien (Sabbathini dkk, 2017)

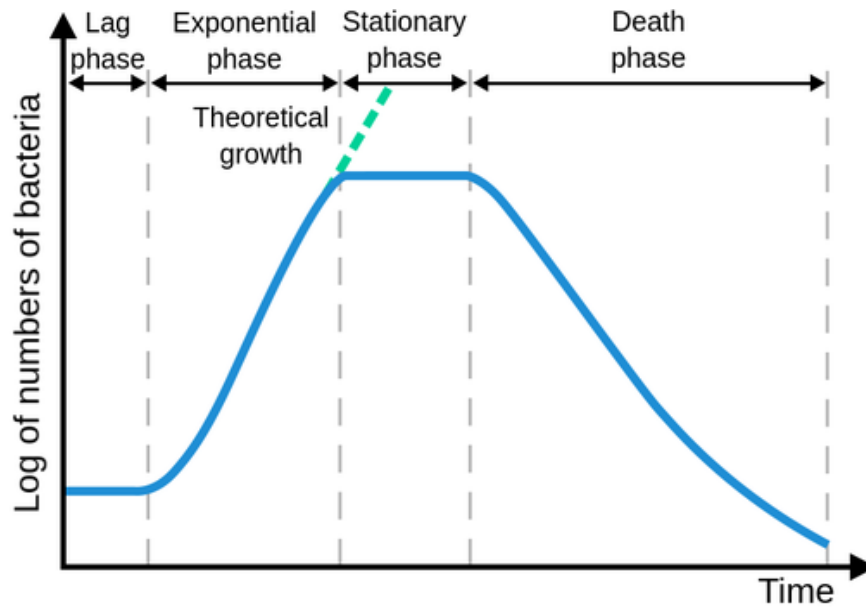
Gen 16S rRNA merupakan gen yang digunakan untuk menentukan filogenetik

dan taksonomi dari bakteri secara molekuler. Penggunaannya menjadi umum untuk mengidentifikasi bakteri biokimia tak dikenal di laboratorium klinis dan/atau menyediakan identifikasi untuk strain yang langka (Janda & Abbott, 2007). Penggunaan gen 16S rRNA dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) memungkinkan untuk mengidentifikasi bakteri amilolitik dengan cepat dan spesifik. PCR adalah metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro* (Yuwono, 2006).

2.1.1 Proses Pertumbuhan Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme prokariotik yang sangat kecil dan mudah ditemukan di setiap lingkungan, baik di tanah, air, tubuh manusia, bahkan dalam kondisi ekstrem seperti suhu tinggi dan salinitas tinggi (Madigan dkk, 2018). Proses pertumbuhan bakteri sangat kompleks dan melibatkan serangkaian tahapan yang mempengaruhi reproduksi dan ekspansi koloni. Pertumbuhan yaitu proses meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Pada bakteri, pertumbuhan secara aseksual dan disebut dengan pembelahan biner, yang berlangsung dengan interval yang teratur dengan penambahan atau kelipatan secara eksponensial (Willey dkk, 2020).

Fase pertumbuhan bakteri merupakan fase pembelahan sel bakteri. Prosesnya digambarkan dengan kurva pertumbuhan bakteri. Kurva ini menunjukkan berbagai tahap pertumbuhan bakteri, yaitu tahap lag, tahap log, tahap stasioner, dan kematian (Bertrand, 2019). Dinamika pertumbuhan mikroba dapat dilihat melalui kurva berikut yang menggambarkan hubungan antara biomassa dan periode waktu pengukuran.



Gambar 2. 1 Fase Pertumbuhan Bakteri
Sumber: Labster Theory pages

1. Fase lag (fase adaptasi)

Fase ini merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan baru sebelum memulai pembelahan, durasinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan kondisi fisiologis bakteri, seperti komposisi media, pH, suhu (Bertrand, 2019). Setelah beradaptasi, bakteri memasuki fase logaritma (eksponensial) dimana terjadi pembelahan sel yang cepat hingga mencapai populasi maksimum yang disertai perubahan komposisi kimia serta peningkatan ukuran dan substansi intraseluler sel (Ughy dkk, 2023).

2. Fase log (fase eksponensial)

Fase logaritmik atau eksponensial ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang sangat pesat, dimana setiap sel membelah menjadi dua secara berulang. Tingkat pertumbuhannya dipengaruhi oleh faktor genetik bakteri serta kondisi lingkungan seperti ketersediaan nutrisi, suhu, pH, dan aerasi (Pletnev dkk, 2015). Fase ini terus berlanjut hingga laju pertumbuhan dan kematian sel menjadi seimbang. Selama fase log, bakteri membelah secara teratur dan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan.

3. Fase stasioner

Fase stasioner ditandai dengan jumlah bakteri relatif konstan karena laju pertumbuhan seimbang dengan laju kematian. Keseimbangan ini disebabkan oleh nutrisi yang menipis, akumulasi limbah toksik, dan kondisi lingkungan yang tidak lagi mendukung pertumbuhan. Dalam kondisi ini, bakteri dapat menghasilkan endospora atau struktur resisten lainnya untuk bertahan hidup. Fase stasioner ditandai dengan aktivitas metabolisme yang berkelanjutan, termasuk produksi metabolit sekunder seperti antibiotik (Ughey dkk, 2023).

4. Fase kematian

Fase ini merupakan tahap akhir pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan penurunan populasi. Hal ini terjadi akibat kondisi lingkungan yang memburuk, seperti kekurangan nutrisi atau penumpukan limbah toksik, yang menyebabkan laju kematian sel melebihi laju pembelahan (Li & Liu, 2024).

2.2 Teknik penyimpanan

Menurut para ilmuwan dalam memelihara bakteri perlu memiliki metode pembuatan dan penyimpanan koleksi (preparasi) yang sesuai, sehingga genetiknya tetap stabil dan tidak berubah. Metode yang dipilih sangat tergantung pada sifat mikroba dan tujuan dari preparasi (Puchkov, 2023). Sifat mikroba diklasifikasikan dalam ciri morfologinya yang beragam, ciri fisiologi dan biokimianya, serta kemampuan untuk bertahan hidup dalam lingkungan alami maupun buatan (Senaratne & Jayaweera, 2024).

Tujuan dari koleksi dan preparasi meliputi tujuan jangka panjang dan jangka pendek. Preparasi jangka panjang dilakukan untuk koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba dalam keadaan tersedia ketika dibutuhkan kembali, sedangkan preparasi jangka pendek dilakukan untuk keperluan rutin kegiatan penelitian tertentu (Vero dkk, 2019). Keberhasilan dalam membuat koleksi plasma nutfah mikroba dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu, penguasaan teknologi, fasilitas preparasi yang memadai, dan ketersediaan tenaga yang terampil, teliti, dan konsisten (Iqbal, 2023).

Tujuan utama preservasi bakteri adalah untuk mereduksi atau memperlambat

laju metabolisme untuk mempertahankan viabilitas (kemampuan hidupnya) (Vero dkk, 2019). Selain itu, preservasi ini bertujuan untuk memelihara kultur bakteri sebaik mungkin agar tetap memiliki kemampuan tumbuh kembali (recovery) dan tingkat kelangsungan hidup (survival rate) yang tinggi, dengan perubahan karakteristik yang minim. Oleh karena itu, menentukan teknik penyimpanan yang tepat memerlukan penelitian yang lebih rumit dengan jangka waktu yang lama sehingga diperlukan pemantauan yang cermat dan investasi dana yang cukup besar. Penyimpanan jangka pendek membutuhkan waktu dan tenaga yang banyak untuk memindahkan bakteri ke media baru secara berkala (Morgan dkk, 2006). Hal ini berbeda dengan penyimpanan jangka panjang, bakteri biasa disimpan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porselin, lempengan gelatin, dan P_2O_5 dalam keadaan vakum. Teknik tersebut membutuhkan peralatan yang sederhana dan mudah diperoleh. (Skerman, 1973 dikutip dari Machmud, 2001).

Menurut Clark (1976), metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan yaitu metode liofilisasi atau kering beku (liophylization atau *freeze drying*) dan kriopreservasi (cryopreservation atau cryogenic preservation). Tahapan pembuatan koleksi dan preservasi plasma nutfah mikroba, meliputi koleksi contoh mikroba isolasi (pemurnian), karakterisasi isolat, preservasi, pemeliharaan dan pembuatan bank data.

1. Penyimpanan dalam aquades steril

Beberapa jenis bakteri seperti bakteri bentuk batang dan yang bereaksi gram negatif (*Pseudomonas*) dapat disimpan lama dalam aquades steril pada suhu ruang atau suhu 10-15 °C (Lacobellis & DeVay, 1986). Contoh bakteri yang tidak bisa disimpan dalam teknik ini yaitu genus *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, dan *Curtobacterium*, yang memungkinkan terjadinya kontaminasi karena dapat tumbuh dengan lambat. Oleh karena itu, teknik ini dianjurkan untuk alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang (McGinnis dkk., 1974).

2. Penyimpanan dalam minyak mineral

Dasar penyimpanan ini untuk mempertahankan viabilitas mikroba

dengan mencegah pengeringan medium, sehingga waktu peremajaan dapat diperpanjang sampai beberapa tahun. Daya tahan mikroba akan lebih baik apabila disimpan pada suhu 4°C (Senaratne & Jayaweera, 2024). Biakan yang dapat disimpan dengan teknik ini yaitu biakan bakteri, khamir, dan jamur dengan menyimpannya dalam tabung agar miring dan ditutup dengan minyak mineral atau parafin cair 10-20 mm. Teknik ini kurang praktis untuk di transportasi, serta keberadaan minyak mineral yang dapat mengakibatkan peremajaan menjadi kotor.

3. Penyimpanan dalam tanah steril

Teknik ini dapat menyimpan bakteri dan jamur pada tanah kering dan disimpan pada suhu ruang untuk jangka waktu yang lama >20 tahun. Fungi *Streptomyces* spp., dan bakteri yang membentuk spora *Bacillus* spp. dan *Clostridium* spp. *Rhizobium* spp. Juga dapat bertahan hidup dengan baik (Vincent, 1970)

4. Penyimpanan dengan manik-manik porselain

Penyimpanan ini dapat memelihara bakteri dengan teknik cara mengeringkan suspensi sel pada manik-manik porselin (*porcelain beads*) atau gelas (*glass beads*) menggunakan sel silika sebagai pengeringnya (Norris, 1963). Dasar botol dengan tutup berdrat dilapisi dengan gel silika, kemudian lapisinya kapas atau slag wool dan ditutupi dengan manik-manik porselen atau kaca yang diimpregnasi dan telah dicelupkan kedalam suspensi mikroba. Gel silika berfungsi menyerap kelembaban dari manik-manik, sehingga kondisi kering dalam botol tetap terjaga (Leben, 1982)

5. Penyimpanan menggunakan lempengan gelatin

Teknik ini ditemukan oleh Stamp tahun 1947, yang efektif dan sederhana untuk penyimpanan bakteri jangka panjang. Namun, sedikitnya data terkait keefektifan tersebut perlu dilakukan pengujian lebih lanjut.

6. Penyimpanan In Vacuo dalam gas fosfopentaoksida (P₂O₅)

Penyimpanan teknik ini sering disebut teknik Sordelli, karena ditemukan oleh Sordelli. Biakan mikroba dalam serum kuda disimpan dalam tabung gelas kecil atau ampul kemudian ditempatkan di dalam

tabung yang lebih besar berisi sedikit fosfopentaoksida (P_2O_5) pada suhu ruang atau kulkas. Teknik ini dapat digunakan untuk penyimpanan jangka panjang bakteri, khamir, dan jamur yang dapat bertahan selama 5-28 tahun, tergantung pada strain mikroba yang disimpan (Soriano, 1970).

7. Penyimpanan dengan teknik kering beku (liofilisasi)

Penyimpanan dengan teknik ini paling populer untuk penyimpanan jangka panjang mikroba dan cocok untuk berbagai jenis mikroorganisme termasuk virus (Lelliott, 1960), bakteri (Sly, 1983), khamir, jamur berspora dan jamur tidak berspora, bahkan algae dan protozoa (Clark, 1976). Teknik kering beku menjadi teknik yang paling rumit karena memerlukan keterampilan teknik dan modal dasar tinggi untuk memberi alat pengering beku (freeze dryer). Pada saat pembekuan (pre-freezing), suspensi sel mikroba dibekukan dengan menambah campuran pendingin seperti es kering (dry ice) dalam etanol atau bisa dengan pembekuan sentrifugal (pendinginan dan penguapan pada kondisi vakum) (Machmud, 2001).

8. Penyimpanan dengan teknik pengeringan cairan

Strain bakteri yang peka terhadap proses kering beku disimpan dengan cara pengeringan suspensi (liquid drying) mikroba yang dikembangkan oleh Annear pada tahun 1954-1962 (Sky, 1983) yang berhasil untuk menyimpan bakteri, khamir, jamur, dan virus. Teknik ini kemudian dimodifikasi oleh Banno dan Sakane pada tahun 1979.

2.3 Media *Gellan gum*

Gellan gum (GG) merupakan eksopolisakarida yang disekresikan di luar sel bakteri yang diproduksi oleh spesies dari genus *Sphingomonas*, dan larut dalam air (Aali & Al-Sahlany, 2024). Tahun 1978, mantan divisi Kelco dari Merck & Inc. Company, Rahway, NJ, Amerika Serikat menemukan bakteri penghasil gellan dan kemudian diisolasi. Bakteri tersebut ditemukan dalam jaringan bunga lili (tanaman *Elodea*) dari kolam alami di Pennsylvania, yang awalnya dikenal sebagai agen pembentuk gel pengganti agar dalam media kultur padat untuk mendukung pertumbuhan berbagai mikroorganisme karena kemampuannya terhadap suhu

tinggi hingga 120 °C (Das dkk, 2015). Komposisi GG mencakup tiga unit dasar, yaitu : α -L-rhamnose, β -D-glucose, dan β -D-glucuronate, dengan rasio 1:2:1 (Aali & Al-Sahlany, 2024).

GG mempunyai transparansi, kekuatan tarik tinggi, dan rasa yang enak, serta memiliki stabilitas tinggi terhadap suhu dan ketahanan terhadap enzim asam (Aali & Al-Sahlany, 2024). Berat molekul GG mencapai 500 Kda, dan dapat membentuk larutan kental ketika dilarutkan dalam larutan berair namun tidak larut dalam etanol. Senyawa ini tetap stabil pada rentang pH 2-10. GG banyak dimanfaatkan dalam industri makanan karena kemampuannya sebagai pengental, pengikat, penstabil, pengemulsi, dan pembentuk gel (Huang dkk, 2020).

Gellan gum berasal dari berbagai spesies bakteri *Sphingomonas*, seperti *S. Pseudosanguinis* dan *S. Yabuuchiae*, dengan memanfaatkan residu lemak seperti gliserol sebagai media nutrisinya. Huang dkk (2020), melakukan penelitian terkait pemanfaatan limbah jagung untuk menghasilkan GG dari bakteri *S. paucimobilis*. Hasilnya mencapai 14 g/L dalam media produksi, dengan memanfaatkan dadih keju sebagai media, dan fermentasi yang dilakukan untuk menghasilkan GG dari bakteri *S. azotifigens* menghasilkan gum dengan berat molekul 890 KDa (Wang dkk, 2020).

GG yang digunakan dalam industri makanan sering digunakan dalam produksi jus, manisan, bubuk minuman, jeli, selai, marmalade, mentega sayur (margarin), dan yoghurt (Bagheri dkk, 2014). Pada tahun 1990, zat ini mendapat persetujuan tanpa syarat untuk digunakan dalam makanan karena bukti sitotoksitasnya dan diberi simbol E418 dan dapat digunakan dalam konsentrasi 0,1 – 1,0 % (Aali & Al-Sahlany, 2024)

Agar digunakan sebagai agen pembentuk gel dalam media padat untuk menumbuhkan koloni yang merupakan campuran polisakarida yang diproses dari dinding sel rumput laut (algae merah). Pada tahun 2015, terjadi fluktuasi dan kekurangan pasokan agar di alam liar karena alga yang dipanen terus menerus. Dalam media kultur, mikroba sudah mendapat sumber nutrisi yang banyak (ekstrak ragi) dan suplemen (asam amino dan antibiotik). Kemudian Mc Guffey dkk (2018), melakukan penelitian untuk membudidayakan bakteri penghasil *gellan gum* sebagai alternatif pengganti agar. *Gellan gum* digunakan sebagai bahan pematat dalam

industri makanan dan dijual sebagai produk yang dapat dimurnikan secara kimia (misalnya *gelrite*) untuk dipakai sebagai media pertumbuhan mikroba. Pemurnian *gellan gum* melibatkan pembudidayaan dari bakteri *S. Paucimobilis*, dengan presipitasi untuk memisahkan polisakarida dari sel, dan fase pengeringan di akhir.

2.3.1 Polisakarida Mikroba

Polisakarida yang umumnya terletak di vesikel sel yang merupakan komponen integral sitoplasma. Strukturnya merupakan kapsul tertutup yang menghubungkan permukaan sel ke tubuh dan terdiri dari zat lengket (Ahmad dkk, 2015). Gula-gula ini, seperti gom xanthan dan *gellan gum*, yang berperan penting dalam produksi pangan dan sebagai bahan tambahan pangan yang diizinkan. Beberapa mikroorganisme ini dapat menghasilkan jumlah yang signifikan melebihi 40 g/L, yang cocok untuk aplikasi dalam industri makanan dan farmasi (Ravella dkk, 2010).

Produk sampingan industri seperti residu hidrokarbon dan gliserol dapat berfungsi sebagai sumber karbon untuk memproduksi gula-gula ini dari mikroorganisme (Chilakamarry dkk, 2021). Polisakarida ini diproduksi oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan alga yang berfungsi sebagai sumber energi, penyimpanan karbon, dan bahan pembangun dinding sel. Polisakarida lain seperti glikogen dan kitin, ditemukan di dalam sel yang membantu pembentukan dan perlindungan dinding sel, sementara yang lain disekresikan di luar sel untuk melekat pada permukaan, dan beberapa membentuk kapsul di sekitar sel untuk perlindungan dan adhesi (Freitas dkk, 2021). Selain itu, polisakarida mikroba terdiri dari unit-unit monosakarida dan mungkin mencakup komponen non-karbohidrat seperti fosfat, piruvat, suksinat, dan asam asetat (Mahmoud dkk, 2021). Jenis tersebut dikategorikan menjadi homopolisakarida, yang terdiri dari satu unit basa seperti glukosa dalam selulosa, dan heteropolisakarida, yang memiliki berbagai unit gula dan komponen non-karbohidrat seperti gom xanthan, asam hialuronat, dan *gellan gum* (Mouro dkk, 2024).

Ciri- ciri polisakarida mikroorganisme:

Tabel 2. 1 Ciri-ciri Polisakarida Mikroorganisme

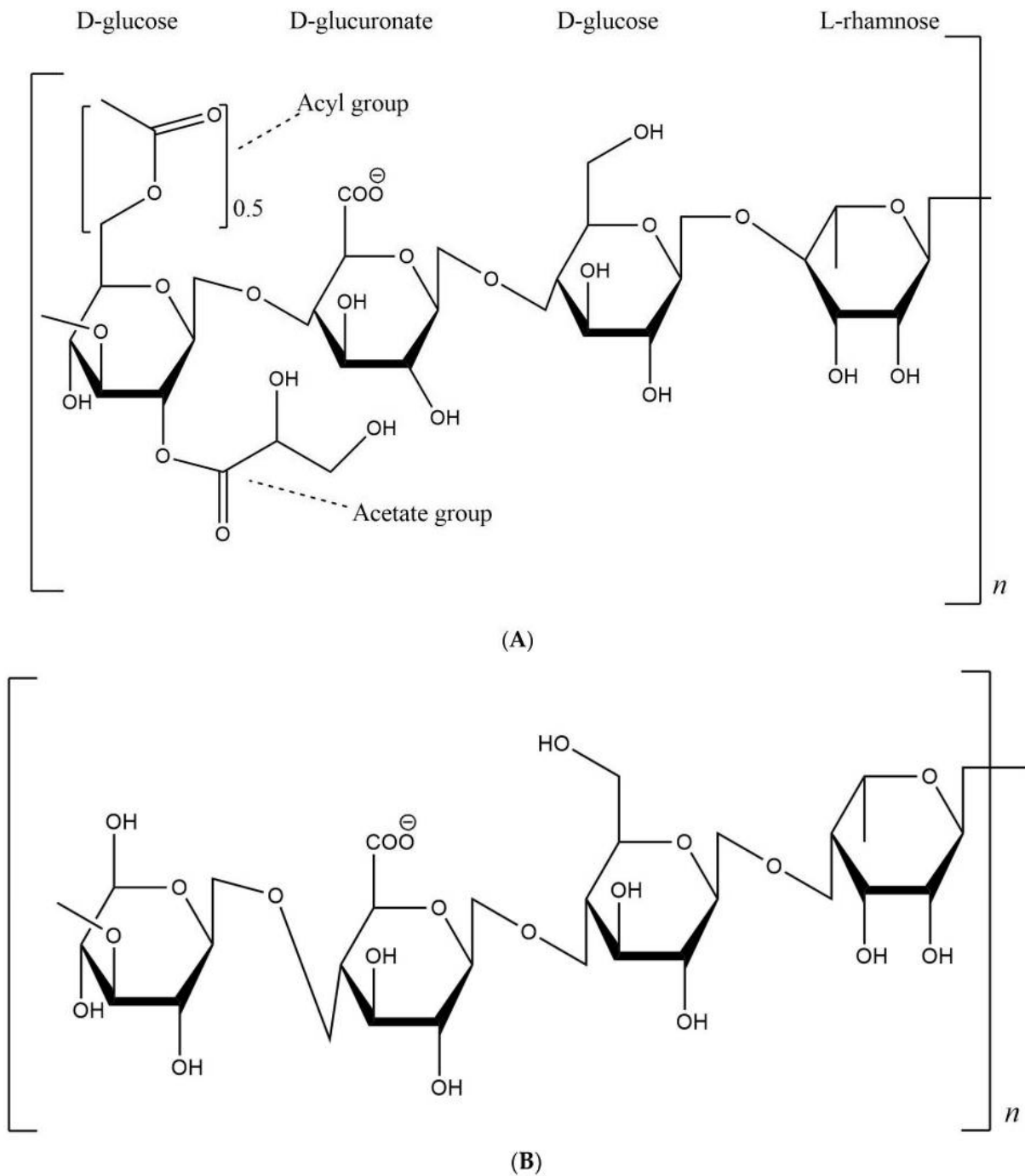
Sumber	Diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, ragi, dan jamur. Contohnya : gom xanthan (bakteri), dekstran (bakteri), dan pullulan (jamur).
--------	--

Struktur	Seringkali menunjukkan komposisi yang lebih rumit dan bervariasi. Struktur bercabang pada gom xanthan dan struktur linier pada dekstran.
Fungsi	Untuk perlindungan, perlekatan, atau penyimpanan energi. Aplikasi dalam industri sebagai pengental, penstabil, dan agen pembentuk gel di sektor makanan dan farmasi.
Metode produksi	Diproduksi melalui teknik fermentasi dengan mikroorganisme di lingkungan yang terkendali.
Kelarutan	Gom xanthan menunjukkan kelarutan dalam air dan menghasilkan larutan kental.
Sifat-sifat pembentuk gel	<i>Gellan gum</i> menunjukkan sifat pembentuk gel dan dapat menghasilkan gel yang kuat dan fleksibel.
Aplikasi	Umumnya dimanfaatkan dalam sektor makanan, farmasi, dan kosmetik karena sifat pengentalan, penstabil, dan pembentuk gelnya.

Sumber: *National Library of Medicine*, 2024

2.3.2 Komposisi *Gellan gum*

GG merupakan heteropolisakarida linear yang mengandung muatan negatif, yang dikenal sebagai polyanion, yang tersusun atas empat unit dasar (tetrasakarida): 2 molekul β -D-glucose, 1 molekul β -D-glucuronate, dan 1 molekul α -L-rhamnose (Morris dk., 2012). Komposisi polimer GG mencakup glukosa 60%, dengan rhamnosa dan asam glukoronat masing-masing sebesar 20% (Bajaj dkk, 2006). GG yang diproduksi dibagi menjadi dua macam: tipe alami, dengan kandungan asilnya yang tinggi (GG high-acyl); dan asil rendah, dimana gugus asil dihilangkan (GG low acyl). Perbedaannya dilihat dari keberadaan dua gugus asil, gliserida dan asetat. Selama proses pemurnian GG alami, gugus asil dapat dihilangkan dengan larutan basa panas, yang kemudian mempengaruhi sifat reologinya.



Gambar 2. 2 Struktur Kimia *Gellan gum*

(A) *Natural high-acyl gellan*

(B) *Low-acyl gellan*

Sumber: *National Library of Medicine*, 2024

GG mengandung gugus karboksilat ($-\text{COO}^-$) dari asam glukuronat, yang sensitive terhadap keberadaan ion multivalent (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+). Gugus hidroksil ($-\text{OH}$) memungkinkan ikatan hydrogen dengan molekul air dan biomolekul lain, yang

memberikan kombinasi sifat hidrofilik tinggi. Sifat ini mampu mengikat air dan mempertahankan kelembapan dalam matriks gel. GG memiliki sifat yang resistensi enzimatis, tidak mudah terdegradasi oleh sebagian besar enzim mikroba yang sering menyerang agar sehingga lebih tahan lama sebagai media simpan.

Penelitian oleh Ferris dkk, menunjukkan bahwa dengan memanfaatkan difraksi sinar-X, GG memiliki struktur heliks ganda paralel tiga sisi. Ikatan hidrogen menciptakan struktur heliks ganda dengan menghubungkan gugus hidrometil dalam unit glukosil dengan gugus karboksilat sepanjang rantai untuk membentuk polimer. Komposisi ini dipengaruhi oleh konsentrasi polimer yang ditambahkan kedalam larutan, suhu, dan keberadaan senyawa bermuatan positif (Millane dkk, 1988). Hal tersebut menghasilkan GG sebagai gel bening, kuat, namun masih elastis.

GG menghasilkan gel yang lebih transparan dibanding agar akan memudahkan pengamatan koloni bakteri kecil atau pigmen yang dihasilkan (Janssen dkk., 2002). Kekuatan mekanis GG dalam konsentrasi rendah (0,1-0,3%), menghasilkan gel yang sama kuat dengan agar 1,5-2,0%. Hal tersebut menjadikan GG lebih ekonomis dan memungkinkan difusi nutrient dan oksigen lebih baik karena struktur pori yang lebih longgar (Ghosh dkk., 2021).

Giavasis dkk, menemukan bahwa GG tetap stabil bahkan pada suhu tinggi. Pada suhu 90 °C dapat menciptakan gel yang kuat berbeda dengan gom xanthan, yang mengalami *weight loss* 74% dalam kondisi yang sama. GG memiliki titik leleh 100 °C atau lebih tinggi dan bervariasi sesuai dengan keberadaan elemen bermuatan positif. Zia dkk, menekankan sifat-sifat utama GG terutama kemampuan kristalisasi, ketahanan terhadap gaya geser, fleksibilitas, biodegradabilitas, dan stabilitas termal dan asamnya. Disamping itu, GG lebih tahan terhadap sineresis (pelepasan air dari gel) dibanding agar, sehingga viabilitas bakteri lebih terjaga selama penyimpanan jangka panjang.

Sifat fisik, kimia, dan mikroba dari *gellan gum* yang dihasilkan :

Tabel 2. 2 Sifat fisik, kimia, dan mikroba dari *gellan gum*

Tes	Sifat	Nilai
Physicochemical	Berat molekul	500 KDa
	Wujud	Bubuk putih kekuningan

	Fungsional	Pengental dan penstabil
	Kelarutan	Larut dalam air, membentuk larutan kental, tidak larut dalam etanol, dan pelarut organik lainnya
	Weight loss	> 15% di suhu 105 °C selama 2,5 jam
	Lead	> 2 mg/kg
	Nitrogen	> 3%
Mikrobia	Total bakteri	> 1 x 10 ⁴ CFU/g
	E - coli	Tidak ada pertumbuhan
	Salmonella	Tidak ada pertumbuhan
	Ragi dan jamur	> 5 x 10 ² CFU/g

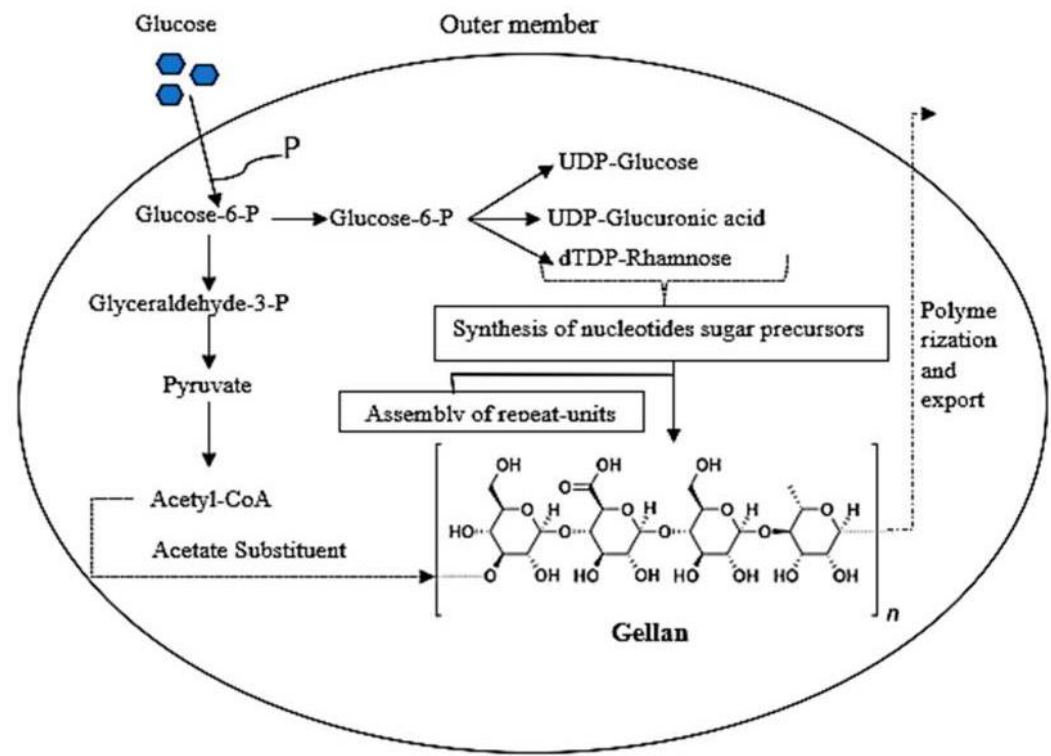
Sumber: *National Library of Medicine*, 2024

Agar konvensional mengandung senyawa organik kompleks (misal: fenolik, asam humat) yang bersifat toksik bagi bakteri tertentu yang dapat menyebabkan jumlah bakteri yang bisa tumbuh terbatas (Tamaki dkk., 2005). GG yang lebih murni secara kimiawi tidak menghasilkan senyawa toksik yang menghambat pertumbuhan mikroba. Janssen dkk (2002), menunjukkan bahwa media GG mampu meningkatkan jumlah bakteri tanah yang dapat dikultur hingga 7,5% dari total sel (dibanding agar 5,2%). Mac dkk (2017), menyebutkan bahwa isolasi bakteri laut meningkat hingga 40x lipat dengan GG dibanding agar konvensional.

Struktur hidrofilik GG menjaga kadar air dan kelembapan mikro-lingkungan dapat mengurangi stres osmotik pada sel bakteri. Stabilitas gel dan resitensinya terhadap degradasi membuat GG cocok untuk preservasi biakan mikroba, dengan viabilitas lebih baik dibanding agar setelah periode penyimpanan panjang. GG juga dapat digunakan pada variasi konsentrasi untuk menyesuaikan difusi nutrisi dan stabilitas mekanik gel yang penting untuk menentukan kondisi optimal penyimpanan tiap spesies bakteri.

2.3.4 Biosintesis *Gellan gum*

Bakteri penghasil GG mengonsumsi glukosa melalui jalur metabolisme Embden-Meyerhof atau jalur pentosa-fosfat tanda adanya enzim fosfofruktokinase sebagai langkah awal dalam proses katabolisme glukosa dalam jalur ini.



Gambar 2. 3 Biosintesis *Gellan gum*
Sumber: *National Library of Medicine*, 2024

Pembuatan GG dimulai dengan mengubah glukosa menjadi glukosa-6-fosfat yang kemudian pembentukan unit uridin-difosfat dan timin-difosfat bersama dengan basa uridin-difosfat yang terfosforilasi. Proses tersebut berperan penting dalam pembentukan unit glukosa dan asam glukuronat, sementara timin-difosfat berperan memproduksi gula rhamnosa. Ketiga gula tersebut dihubungkan untuk membentuk unit kuartener, yang kemudian dipolimerisasi untuk membuat GG (Aali & Al-Sahlany, 2024).

2.3.5 Kelebihan dan Kekurangan *Gellan gum* dibandingkan Polisakarida Lainnya

GG merupakan hidrokoloid serbaguna dibanding dengan polisakarida lain seperti agar, karagenan, dan gom xanthan. Umumnya, GG memberikan manfaat dalam membentuk gel pada konsentrasi rendah dan bersifat termoreversibel, yang

memungkinkan pengembangan tekstur yang khas (Aali & Al-Sahlany, 2024). Ketahanannya terhadap sineresis, menjamin stabilitas gelnya dalam jangka panjang. Selain itu, kejernihannya sangat baik dan kemampuan membentuk lapisan tipis (film forming). Namun, penggunaan GG memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk aplikasi tertentu dibandingkan agen pembentuk gel lainnya, serta sensitivitas terhadap ion tertentu dapat mempengaruhi tekstur gel (Gomes dkk, 2023).

No.	Media	Kelebihan	Kekurangan
1.	Agar	<ul style="list-style-type: none"> - Media standar, mudah diperoleh dan murah [1] - Sudah umum digunakan untuk kultur mikroba 	<ul style="list-style-type: none"> - Mengandung senyawa toksik bagi beberapa bakteri - Kurang stabil pada suhu tinggi - Tidak semua mikroba bisa tumbuh
2.	Alginat	<ul style="list-style-type: none"> - Baik untuk enkapsulasi [3] - Bersifat biokompatibel dan biodegradabel 	<ul style="list-style-type: none"> - Kekuatan gel rendah, cepat rusak - Kurang stabil untuk penyimpanan jangka panjang
3.	Karagenan	<ul style="list-style-type: none"> - Mampu membentuk gel kuat [4] - Murah dan mudah didapatkan 	<ul style="list-style-type: none"> - Sensitif terhadap ion (K^+, Ca^{2+}) sehingga tekstur gel tidak konsisten - Rentan sineresis
4.	<i>Gellan gum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Transparan, stabil secara termal hingga $120^{\circ}C$ [2][5] - Tidak toksik [2] - Membentuk gel kuat pada konsentrasi rendah [2][5] - Mendukung pertumbuhan bakteri sulit dikultur [1][2] - Stabil di pH yang cukup luas (2-10) [5] 	<ul style="list-style-type: none"> - Harga relatif lebih mahal [2] - Beberapa aplikasi butuh konsentrasi lebih tinggi dibanding agar [2]

[1] Janssen, P. H., dkk. (2002).

[2] Mac, N., et al. (2017).

[3] Ghosh, S., Kaushik, S., & Chauhan, R. S. (2021).

[4] Morin, A. (1998).

[5] Sanderson, G. R. (1990).

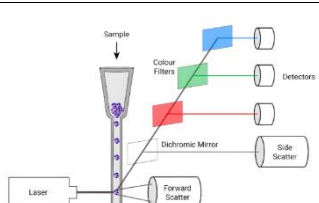
2.4 Proses Isolasi Bakteri

Prinsip teknik isolasi melibatkan pemisahan mikroorganisme tertentu dari campuran mikroba, dengan tujuan untuk memperoleh kultur bakteri murni. Proses

isolasi dimulai dengan menginokulasikan bahan uji yang mengandung bakteri pada media kultur yang telah disiapkan. Bakteri diambil dengan menggunakan kawat inokulasi (jarum ose) dengan ujung berbentuk loop, kemudian diinokulasikan ke permukaan media kultur dengan teknik sebagai berikut (McCance & Harrigan, 2014) :

Tabel 2. 3 Teknik Isolasi Mikroorganisme

Teknik Isolasi Mikroorganisme	Gambar	Keterangan
Pengenceran seri		Pengenceran bertingkat dari suatu sampel mikroba untuk mendapatkan kultur murni
Metode geser (<i>streak plate</i>)		Penanaman mikroba secara bertahap pada media padat untuk membentuk koloni individual
<i>Spread plate</i>		Menyebarkan sampel cair pada permukaan media
<i>Drop plate</i>		Menempatkan tetesan kecil dari sampel pada media
<i>Membrane filtration</i>		Memfiltrasi cairan melalui membran, lalu menempatkan membran pada media

Teknik Isolasi Mikroorganisme	Gambar	Keterangan
Alat khusus		Menggunakan peralatan seperti <i>cytometer flow</i>

Sumber : Sanders, 2012

2.5 Penelitian Terdahulu

Berikut merupakan penelitian-penelitian terkait pengaplikasian GG dalam bidang mikrobiologi

Tabel 2. 4 Tinjauan Hasil Penelitian Sebelumnya

No.	Judul Penelitian	Nama Peneliti, Tahun	Hasil Penelitian
1.	<i>A semy-fluid gellan gum medium improves nematode toxicity testing</i>	Brinke, M., dkk, 2011	Studi ini menguji media alternatif untuk nematoda menggunakan GG sebagai agen pembentuk gel pengganti agar (CNGG). Konsistensi CNGG yang semi cair mendukung distribusi 3 dimensi nematoda dan bakteri makanan, dan memungkinkan adanya pergerakan bebas. CNGG sangat berguna untuk menguji zat hidrofobik karena meningkatkan sorpsi zat tersebut ke bakteri makanan dan meminimalkan kontak dengan permukaan wadah uji. CNGG memberikan keuntungan untuk studi jangka panjang dan pengujian zat yang kurang larut atau tidak larut, seperti nanopartikel.

No.	Judul Penelitian	Nama Peneliti, Tahun	Hasil Penelitian
2.	<i>A novel agarolytic β-galaktosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers</i>	Lee, C. H., dkk, 2014	Penelitian terkait alga merah laut yang merupakan biomassa terbarukan untuk produksi bahan kimia dan biofuel, memiliki kandungan agarosa yang terdiri dari D-galaktosa dan 3,6-anhidro-L-galaktosa (AHG). Kemudian, ditemukan β -galaktosidase baru di bakteri laut <i>Vibrio</i> sp. Strain EJY3 (VejABG) yang dapat menghidrolisis <i>agarooligosakarida</i> (AOS) menjadi galaktosa. Hal tersebut sama dengan komposisi pada GG, dan digunakan sebagai pengganti agar dalam bidang kultivasi mikroorganisme, dan GG dipasarkan dengan nama <i>Gelrite</i> .
3.	<i>Change of network structure in agarose gels by aging during storage studied by NMR and electrophoresis</i>	Descallar, F, B. A., & Matsukawa, S. 2020	Pada pengujian ini menjelaskan terkait perubahan struktur jaringan dalam gel agarosa selama penyimpanan diukur dengan koefisien difusi (D) polimer probe. GG sebagai media gel berpori dalam elektroferesis digunakan untuk memisahkan komponen DNA berdasarkan ukuran dan muatannya.
4.	<i>An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer</i>	Prajapati, V. D., dkk, 2013	Penelitian ini memanfaatkan <i>granular gel</i> berbasis <i>gellan gum</i> sebagai media suspensi untuk <i>biofabrication</i> , khususnya dalam rekayasa konstruksi jaringan 3D

No.	Judul Penelitian	Nama Peneliti, Tahun	Hasil Penelitian
			yang menyerupai jaringan hidup untuk aplikasi pengobatan regeneratif. <i>Granular gel</i> ini dihasilkan dari pengaplikasian <i>shear</i> selama proses gelasi dan menunjukkan sifat viskoplastis pada berbagai suhu. Gel ini memiliki <i>yield stress</i> sangat rendah (hingga 0,4 Pa), memungkinkan pencetakan cepat (hingga 60 mm/s), dan menunjukkan potensi untuk kultur sel selama lebih dari 7 hari.

Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan potensi *gellan gum* (GG) sebagai media gel yang inovatif dan multifungsi dalam berbagai aplikasi mikrobiologi dan bioteknologi, mulai dari media kultur mikroorganisme, media uji toksisitas nematoda, media elektroferesis DNA, hingga penggunaan dalam bio fabrikasi dan rekayasa jaringan tiga dimensi. Akan tetapi, sebagian besar penelitian ini lebih berfokus pada pengembangan media sebagai alternatif agar atau aplikasi pada skala dan konteks tertentu, seperti stabilitas struktur gel, aplikasi bio fabrikasi, atau karakterisasi kimia enzim yang menghidrolisis bahan polisakarida terkait GG. Selain itu, penelitian mengenai peran GG dalam mendukung viabilitas bakteri selama penyimpanan jangka panjang dan bagaimana variasi konsentrasi GG secara kuantitatif mempengaruhi pertumbuhan dan keberlangsungan populasi bakteri masih sangat terbatas.

Oleh karena itu, penelitian ini mengisi gap tersebut dengan mengkaji secara sistematis pengaruh variasi konsentrasi *gellan gum* terhadap pertumbuhan dan viabilitas koloni bakteri yang disimpan dalam media semi-padat berbasis GG. Kebaruan penelitian ini terletak pada pendekatan evaluasi viabilitas bakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) pasca penyimpanan, yang

memberikan gambaran kuantitatif dan praktis untuk aplikasi penyimpanan kultur mikroba. Hal ini memberikan kontribusi penting dalam pengembangan media penyimpanan baru yang efisien dan dapat diandalkan, terutama dalam konteks pelestarian isolat bakteri yang berguna untuk bioremediasi dan aplikasi mikrobiologi lainnya, yang belum banyak dieksplorasi dalam literatur sebelumnya.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium mulai dari tahap persiapan media, kultur bakteri, isolasi bakteri, karakterisasi morfologi bakteri, hingga pengambilan data. Sampel isolat bakteri yang akan diuji merupakan koleksi Laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia. Kegiatan penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2025 sampai bulan Juli 2025 di Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk mendukung kealancaran saat penelitian berlangsung diantaranya, sebagai berikut:

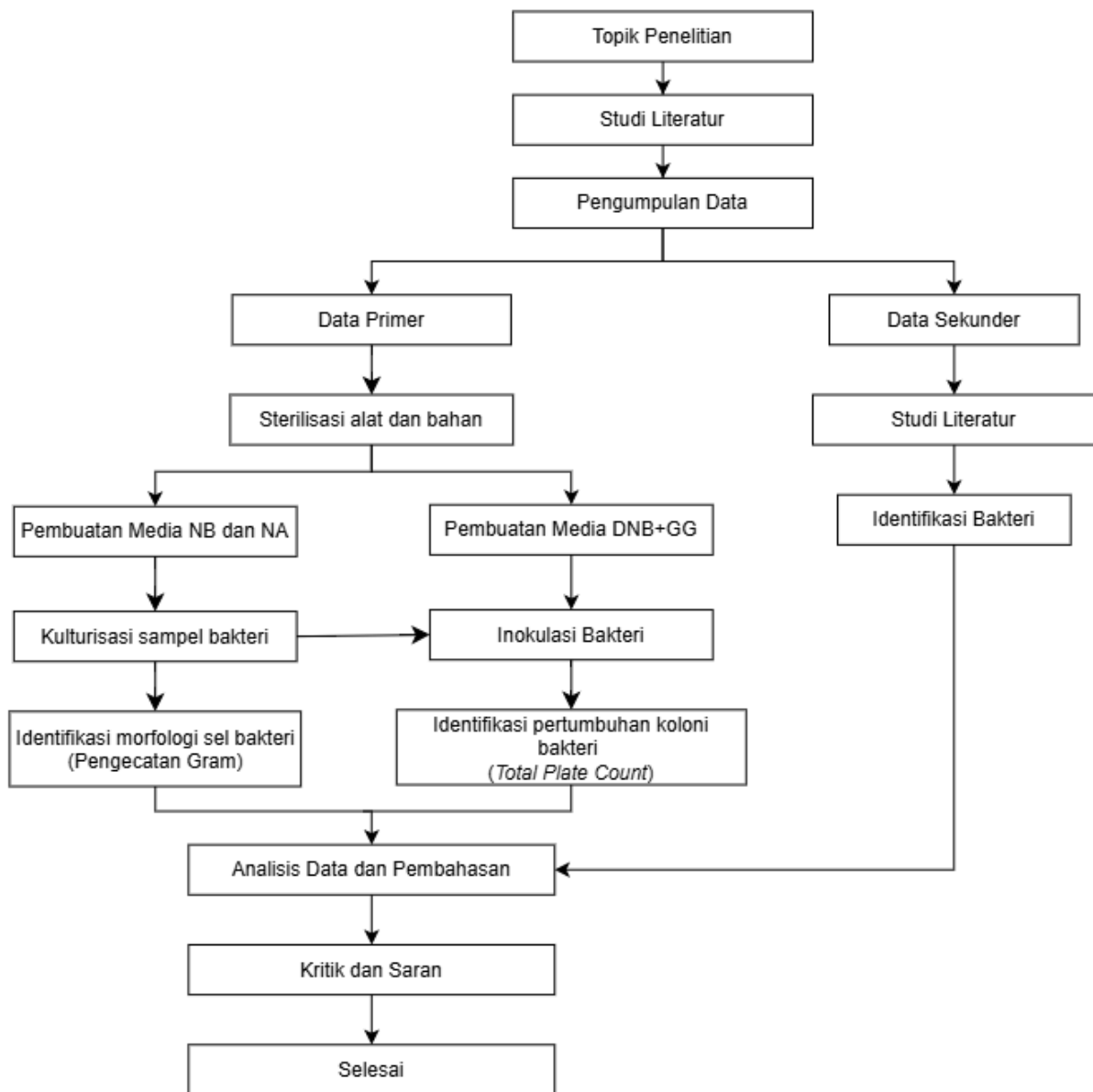
Tabel 3.1 Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Alat	Nama Bahan
1	Cawan Petri (Anumbra)	Sampel Isolat Bakteri
2	Erlenmeyer (Pyrex)	<i>Gellan gum</i> (Himedia)
3	Gelas Beaker (Pyrex)	<i>Nurient Broth</i> (NB) (Merck)
4	Gelas Ukur (Ashahi)	<i>Nutrient Agar</i> (NA) (Merck)
5	Pipet Ukur (Ashahi)	<i>Plate Count Agar</i> (PCA) (Merck)
6	Jarum Ose	Aquades Steril
7	Mikropipet	Spirtus
8	Bunsen	Alkohol 70%
9	<i>Cryovial</i>	Alkohol 96%
10	Tabung reaksi (Pyrex)	Kristal Violet
11	Spatula	<i>Iodine</i>
12	Batang Pengaduk	Safranin
13	Kaca Arloji	Kertas Sampul
14	Karet Penghisap (<i>bulb</i>)	Alumunium Foil
15	Kaca Preparat	Kapas Steril
16	<i>Magnetic Stirrer</i>	Kertas Label
17	<i>Hot Plate</i>	Tisu
18	Autoklaf	Karet
19	Inkubator	

No.	Nama Alat	Nama Bahan
20	<i>Laminar air Flow Cabinet</i>	
21	Lemari Pendingin	
22	Timbangan Digital	
24	<i>Vortex Mixer</i>	
25	<i>Colony Counter</i>	

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dimulai dari studi literatur sampai dengan pembahasan penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar diagram alir berikut ini:

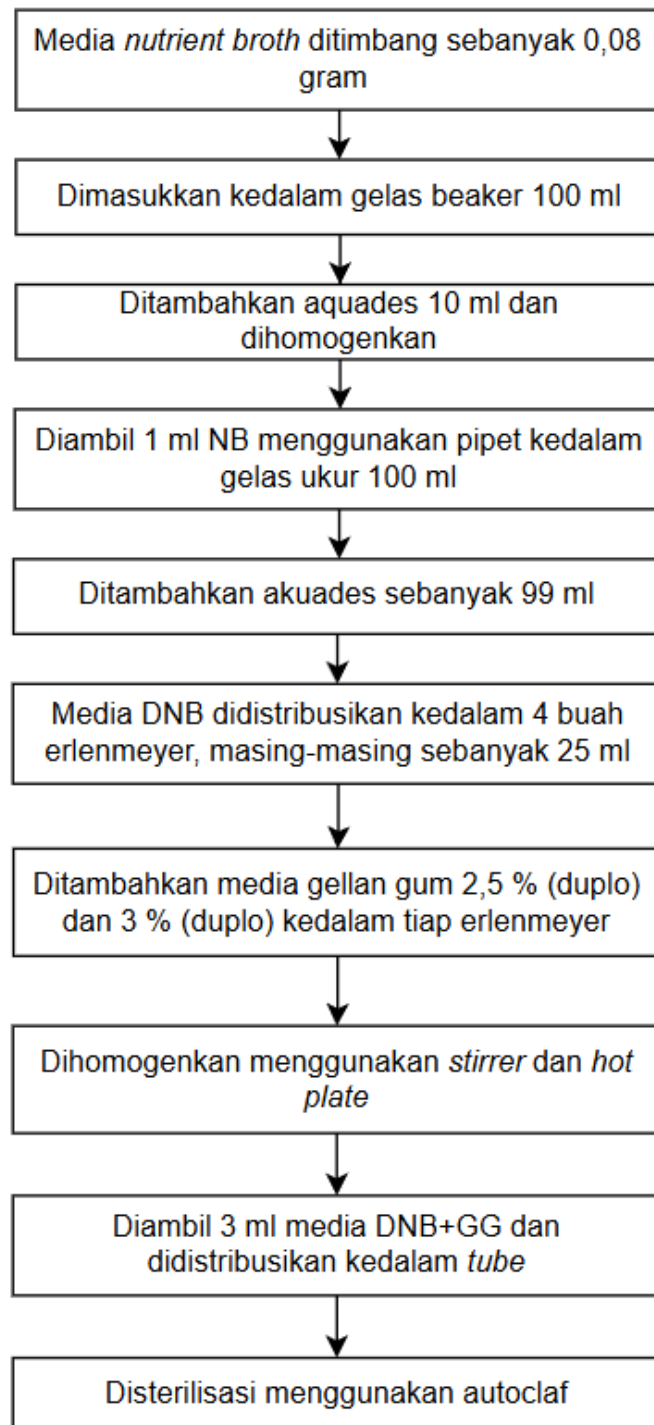


Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

Tiap pengujian menggunakan kontrol negatif dengan media yang digunakan tanpa inokulasi isolat bakteri. Tujuannya untuk mendeteksi kontaminan/sinyal (*false positive*), jika ada pertumbuhan berarti ada kontaminasi pada media/proses dan data perlakuan tidak boleh ditafsirkan sebelum masalah sterilitas diselesaikan (Arghyros, 2020).

3.4 Pembuatan Media

Pada penelitian ini, media yang digunakan yaitu Nutrient Agar (NA) dan *Dilute Nutrient Broth* (DNB) + 2,5 dan 3 % *Gellan gum*. Berikut merupakan diagram alir pembuatan media DNB.



Gambar 3. 2 Diagram Pembuatan Media

Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB) sebagai langkah awal dalam memperkaya pertumbuhan sampel bakteri dari media semi-padat. Dimulai dengan menambahkan 0,8 gram media bubuk NB kedalam 100 ml aquades, dan dihomogenkan di *hot plate* menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan NB kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan dibalut menggunakan kapas serta kertas sampul sebagai penutupnya. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf, ditunggu sampai suhu ruang dan disimpan di lemari pendingin selama 24 jam sebelum digunakan untuk melihat adanya kontaminasi atau tidak.

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) dimulai dengan menyiapkan 2 gram media bubuk NA dan ditambahkan aquades sebanyak 100 ml, lalu dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dan *hot plate*. Larutan NA kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan dibalut menggunakan kapas serta kertas sampul sebagai penutupnya. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf, dan didinginkan serta diletakan secara miring untuk media agar miring. Media agar dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam sebelum digunakan untuk melihat adanya kontaminasi atau tidak.

Pembuatan media DNB 100x pengenceran dimulai dengan menambahkan 1 ml stok *Nutrient Broth* kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 99 ml. DNB dibagi menjadi empat bagian dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 50 ml, dan ditambahkan masing-masing 2,5% dan 3% gram *gellan gum* per ml. Kemudian, erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Media DNB + *gellan gum* yang sudah larut dan homogen didistribusikan ke dalam *tube/cryovial* masing-masing 3 ml. Setelah semuanya selesai, media disterilisasi menggunakan autoklaf (Usman & Osuji, 2007).

Secara umum, konsentrasi GG yang digunakan untuk memadatkan media berkisar 0,2-0,4% (2-4 g/L), setara dengan konsentrasi 1,5% agar, sering dipilih karena mampu menghasilkan gel transparan dan stabil pada kondisi standar (PhytoTech, 2023). Namun, pada media dengan kandungan ion rendah atau untuk kebutuhan penyimpanan jangka panjang, konsentrasi GG perlu ditingkatkan hingga 0,6–1,0% (6–10 g/L), disertai penambahan kation divalen seperti Mg^{2+} atau Ca^{2+}

agar terbentuk gel yang lebih kokoh dan tahan lama (Mac et al., 2017). Penelitian oleh Takano & Aoyagi (2021) menunjukkan bahwa kekuatan gel GG sangat bergantung pada konsentrasi gum, komposisi medium, serta pH, sehingga pemilihan konsentrasi harus menyesuaikan kebutuhan kultur, baik untuk isolasi cepat maupun penyimpanan jangka panjang. Konsentrasi GG yang tepat ditentukan dari fungsi media yang diinginkan; konsentrasi rendah untuk aplikasi diferensiasi atau difusi, konsentrasi sedang untuk kultur rutin, dan konsentrasi tinggi untuk penyimpanan isolat jangka panjang agar viabilitas dan stabilitas bakteri tetap terjaga.

Perhitungan Konsentrasi *Gellan Gum*

Diketahui : Dalam media DNB 25 ml maka kebutuhan media GG, sebagai berikut :

- Konsentrasi GG 2,5%

$$\frac{x}{25 \text{ ml}} = \frac{2,5}{100 \text{ ml}}$$

$$x = 0,025 \times 25$$

$$x = 0,625 \text{ gram GG per ml}$$

- Konsentrasi GG 3%

$$\frac{x}{25 \text{ ml}} = \frac{3}{100 \text{ ml}}$$

$$x = 0,03 \times 25$$

$$x = 0,750 \text{ gram GG per ml}$$

3.5 Isolasi Bakteri

3.5.1 Asal Muasal Bakteri

Bakteri yang diteliti berasal hasil isolasi endapan vulkanik Gunung Merapi setelah letusan di tahun 2010, sampel diambil pada tahun 2013 yang sedang mengalami pelapukan. Letusan gunung merapi pada tahun 2010 telah menyebabkan kerusakan vegetasi lokal, hilangnya kondisi tanah asli, dan perubahan struktur komunitas mikroba di sekitarnya (Prakasa, 2024).

Menurut Dedi dkk (2012 dikutip dari Prakasa, 2024), menyebutkan bahwa tanah yang terbentuk dari lahar Gunung Merapi memiliki sifat fisik diantaranya, tanah yang sangat porus dan kandungan air yang sangat rendah (sekitar 1-3% volume). Kusuma dan Yanti (2021) menyatakan bahwa kandungan air dalam tanah

mempengaruhi keasaman pH tanah. Semakin besar kadar air maka semakin asam tingkat pH tanah.

Pengambilan bakteri dari lokasi deposit vulkanik memiliki berbagai kelebihan dan manfaat yang penting untuk penelitian dan konservasi lingkungan (Prakasa, 2024).

- Membantu memahami peran komunitas mikroba tanah dalam proses biogeokimia serta perkembangan tanah di lingkungan ekstrim seperti pasca-erupsi vulkanik.
- Bentuk konservasi lingkungan dengan memelihara keragaman genetik spesies mikroorganisme sekaligus merawat siklus serta fungsi ekosistem di sekitar Gunung Merapi.
- Langkah awal untuk mengungkap peran mikroorganisme dalam proses pelapukan batuan di kawasan tersebut.
- Komunitas mikroba yang ada dapat memberikan respons lebih cepat terhadap perubahan lingkungan dibandingkan komunitas tumbuhan, sehingga mereka dapat mempengaruhi proses ekosistem seperti siklus karbon dan nitrogen, serta menjadi indikator awal dalam arah pemulihan ekosistem.
- Komunitas bakteri di deposit vulkanik menunjukkan keragaman spesies yang adaptif, di mana terdapat dominasi filum, kelas, dan ordo tertentu seperti Pseudomonadota dan Betaproteobacteria. Ditemukan juga spesies khusus seperti *Dyella koreensis* dan *Vicinamibacter silvetris* yang menunjukkan kemampuan adaptasi terhadap kondisi lingkungan berbeda, misalnya *Vicinamibacter silvetris* yang dapat tumbuh pada suhu dan pH tertentu

3.5.2 Proses Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri merupakan proses untuk memisahkan suatu bakteri dari habitatnya dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan (Jutono, 1980). Menurut Stolp dan Starr (1981), beberapa teknik mikroba yang biasa digunakan adalah *spread plate* (agar tabur ulas), *pour plate* (agar tuang), *streak* (goresan), goresan sinambung, goresan T, dan goresan kuadran. Untuk menghasilkan koloni tunggal dari suspensi yang masih pekat, dilakukan teknik isolasi dengan metode gores dalam media agar miring.

Langkah awal kulturisasi bakteri dimulai dengan menginokulasi satu *loop* ose isolat bakteri ke dalam 5 mL media Nutrient Broth (NB), kemudian diinkubasi

selama 18–24 jam pada suhu 30°C di *waterbath shaker*, agar populasi bakteri bertambah dalam media cair tersebut. Indikasi pertumbuhan bakteri pada NB bisa dilihat dari media yang menjadi keruh, menandakan bakteri bermultiplikasi secara signifikan (Septiani, 2019).

Selanjutnya, sampel dari NB dipindahkan ke media Nutrient Agar (NA) miring menggunakan metode gores (*streak plate*) secara aseptis dengan tujuan memperoleh koloni tunggal sehingga dapat diamati secara morfologis berdasarkan bentuk, warna, tepi, dan elevasi koloni setelah inkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C (Wahyuni dkk, 2024). Koloni tunggal ini memudahkan seleksi isolat untuk tahap berikutnya dan memastikan kemurnian isolat bakteri.

Koloni tunggal yang telah diidentifikasi kemudian diinokulasikan ke media *Dilute Nutrient Broth* (DNB) yang dicampur dengan *gellan gum* (2,5% dan 3%). Media ini disiapkan dengan mencampurkan DNB dan bubuk *gellan gum*, dipanaskan hingga larut sempurna, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah didinginkan, koloni dari NA ditanamkan ke DNB-*gellan gum* dan diinkubasi di suhu 30°C sebagai media semi-padat untuk menjaga viabilitas bakteri dalam jangka panjang. Suhu ini dipilih sebagai suhu optimum bakteri mesofilik antara 20°C – 40°C (Jay, 1992), yaitu diambil dari kisaran kecil antara suhu maksimum dan minimum sehingga mendukung kecepatan pertumbuhan dan metabolisme bakteri.

Pengaruh suhu dan lama inkubasi bagi isolat bakteri memberikan dampak terhadap aktivitas selulase (struktur protein sel). Hal ini terjadi karena pada fase log, bakteri berada dalam kondisi pertumbuhan aktif, menghasilkan metabolit primer seperti enzim. Pada suhu inkubasi yang digunakan, struktur sel bakteri masih mampu mempertahankan kestabilan enzimnya. Namun, apabila suhu terlalu tinggi, enzim dapat mengalami denaturasi termal yang berpengaruh secara signifikan [ada perubahan struktur protein seluler dan menurunkan aktivitas enzim (Kurniawati dkk., 2021)].

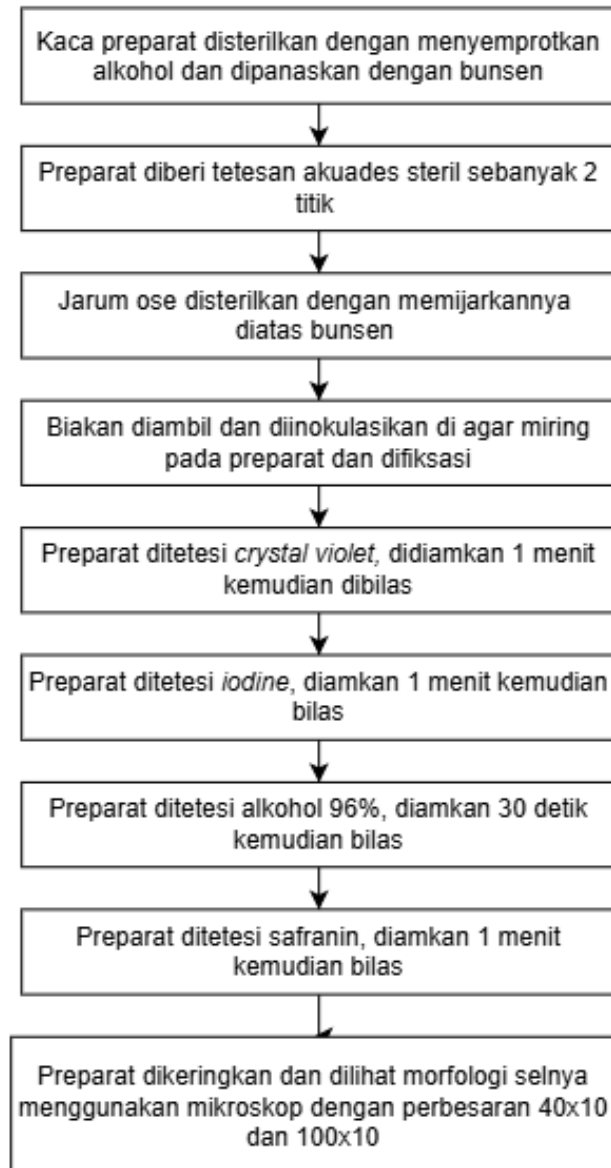
Kesimpulannya, pada inkubasi yang optimal (fase log), sel bakteri masih dalam keadaan aktif membelah, membran sel dan sistem enzimatik tetap utuh. Ketika waktu inkubasi terlalu lama, sel mulai memasuki fase stasioner/kematian, sehingga struktur sel dapat rusak (lisis) dan menyebabkan penurunan produksi enzim.

3.6 Identifikasi Morfologi Sel Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Tujuan dari pewarnaan gram ini untuk mengidentifikasi mikroba menjadi kelompok gram positif dan gram negatif. Pengecatan gram tersebut mikroba yang termasuk dalam kelompok gram positif memiliki range warna dari biru ungu sampai kehitaman, sementara untuk mikroba kelompok gram negatif akan tampak berwarna merah (Lay, 1994)

Isolat bakteri diambil secara aseptik menggunakan jarum ose dan diletakkan diatas tetes aquades. Sampel dikeringkan dengan melewatkannya 3-4 kali diatas api bunsen. Setelah kering, isolat diwarnai dengan crystal violet selama 1 menit, dibilas dengan air, dan dikeringkan. Kemudian, ditambahkan iodine selama 1 menit, dibilas, dan dikeringkan. Selanjutnya, alkohol 96% (*gram decolorizer*) ditetaskan selama 30 detik, diikuti pembilasan air dan pengeringan. Proses serupa diulangi

dengan safranin selama 1 menit, lalu dikeringkan. Terakhir, isolat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Yusmaniar & Khairun, 2017)



Gambar 3. 3 Prosedur pewarnaan gram bakteri

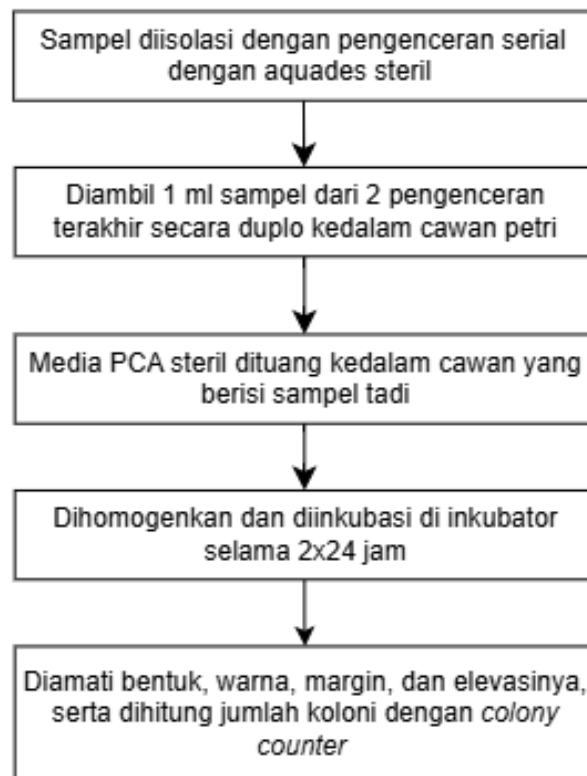
3.7 Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan pertumbuhan koloni bakteri dilakukan setelah sampel diinkubasi selama 7 hari pada media DNB + *gellan gum*. Koloni dihitung dengan menggunakan alat *colony counter* serta untuk memperjelas identifikasi bentuk, warna, serta elevasi, dan margin dari koloni bakteri. Tahap ini dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

Untuk menguji efektivitas media penyimpanan, dilakukan uji *Total Plate Count* (TPC). Prosedurnya dimulai sebagai berikut:

1. Dilakukan pengenceran serial terhadap sampel dari media *gellan gum*, mulai dari 10^{-1} hingga 10^{-6} dengan tiap langkah pengenceran menggunakan 1 mL sampel dalam 9 mL aquades steril.
2. Sampel dari pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} masing-masing 1 mL dimasukkan ke cawan petri steril secara duplo, lalu dituangi media *Plate Count Agar* (PCA) steril yang telah didinginkan hingga $\pm 45^{\circ}\text{C}$, dihomogenkan perlahan, dan diinkubasi 24–48 jam pada 30°C .
3. Setelah inkubasi, jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung, dan hasilnya dinyatakan dalam CFU/mL untuk menilai keberhasilan kulturisasi serta efektivitas *gellan gum* sebagai media penyimpanan isolat bakteri.

Setiap tahapan yang dilakukan merupakan prosedur standar dalam kulturisasi dan penyimpanan isolat bakteri, baik untuk perbanyakan, isolasi koloni murni, maupun pengujian viabilitas selama penyimpanan jangka panjang (Mikdarullah & Nugraha, 2017).



Gambar 3. 4 Prosedur pengujian *Total Plate Count* (TPC)

3.8 Analisis Data

3.8.1 Perhitungan Pertumbuhan Koloni Bakteri

Analisis data densitas bakteri dari isolasi bakteri yang ditumbuhkan dengan menggunakan media *Dilute Nutrient Broth* (DNB) dan perhitungan koloni bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC), kemudian hasil perhitungan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{TPC} = \frac{(\text{jumlah koloni}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume sampel}}$$

Satuan TPC = CFU/ml

Jumlah koloni yang dimasukkan rumus adalah jumlah koloni yang *representative* (jumlah koloni yang berjumlah antara 30-300 koloni) (Fatayati dkk, 2023).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri

Identifikasi ini meliputi nama sampel, kultivasi sampel, pengujian morfologi bakteri, karakterisasi sampel, serta pertumbuhan koloni bakteri menggunakan metode TPC.

4.1.1 Identifikasi Isolat Bakteri

Sampel isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari koleksi Laboratorium Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia. Sampel kemudian dikultivasi di media *Nutrient Broth* (NB). Proses ini bertujuan untuk memperbanyak sel bakteri dari sampel awal dalam medium yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri di laboratorium. Salah satu media yang umum digunakan untuk kultur cair bakteri adalah *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung nutrisi dasar yang mendukung pertumbuhan berbagai jenis bakteri (Lestari, 2020). Bakteri yang hidup akan menunjukkan perubahan media menjadi keruh (*turbiditas*), yang menunjukkan populasi bakteri sudah bertambah secara signifikan selama inkubasi di *waterbath shaker* (Madigan dkk., 2019).

Sampel bakteri yang tumbuh selanjutnya diinokulasi ke media agar miring, yaitu medium padat yang bertujuan untuk isolasi bakteri secara kuantitatif dan kualitatif dengan teknik *streak* agar mendapatkan koloni tunggal yang murni (Jufri, 2020). Sebagian besar prosedur isolasi bakteri akan merekomendasikan inokulasi sampel/hasil kultur bakteri dari NB ke media NA miring, kemudian diinkubasi untuk memudahkan indentifikasi berdasarkan karakteristik makroskopis dan mikroskopisnya (Harrigan & McCance, 1966).

Sampel yang berhasil tumbuh dari media NB dan kemudian dipindahkan ke media NA yaitu sebanyak 4 sampel, diantaranya:

Tabel 4. 1 Nama dan Kode Sampel Bakteri

Kode Bakteri	Nama Bakteri
BR-1	<i>Arthrobacter aurescens</i>
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>
BR-36	<i>Massilia abidiflava</i>
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Arthrobacter aurescens adalah bakteri gram positif berbentuk batang atau kokus yang dikenal sangat tahan terhadap kondisi lingkungan ekstrem dan memiliki keragaman metabolik tinggi (Roy & Kumar, 2020). Bakteri ini umumnya ditemukan di tanah, terutama pada lahan yang terpapar pestisida seperti herbisida triazin. Salah satu *strain* paling dikenal, TC1, mampu mendegradasi berbagai senyawa triazin seperti atrazin hingga konsentrasi 3.000 mg/L, bahkan menggunakan senyawa-senyawa tersebut sebagai sumber karbon dan nitrogen (Strong dkk., 2002). Kemampuannya ini menjadikan *arthrobacter aurescens* sangat efektif dalam bioremediasi tanah pertanian yang tercemar pestisida. Keunikan bakteri ini adalah adanya gen dehalogenase yang memungkinkannya memanfaatkan dan mendekomposisi senyawa kimia yang sulit terurai. Selain itu, terdapat potensi interaksi metabolik dengan mikroba tanah lain yang dapat meningkatkan efisiensi degradasi polutan (Ofaim dkk., 2020).

Mesorhizobium loti merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, aerob, dan motil yang hidup bebas di tanah maupun berasosiasi dengan akar tanaman *leguminosa*, khususnya genus *Lotus*. Dalam proses simbiosis, *M. loti* membentuk bintil akar dan berperan penting dalam fiksasi nitrogen, sehingga mengubah nitrogen atmosfer menjadi ammonium yang bermanfaat bagi tanaman dan meningkatkan kesuburan tanah (Larsen, 2010). Dengan kemampuan ini, penggunaan pupuk kimia dapat dikurangi secara signifikan, sehingga berkontribusi terhadap pertanian berkelanjutan dan penurunan penggunaan energi fosil. Selain fiksasi nitrogen, strain tertentu dari *M. loti* seperti TONO memiliki gen pengkode enzim dehalogenase yang memungkinkan bakteri ini untuk menurunkan polutan organik terhalogenasi di lingkungan, memperluas peranannya dalam bioremediasi limbah pertanian maupun industri (Zakary dkk., 2021). *M. loti* juga penting sebagai

organisme model dalam studi transfer gen horizontal dan evolusi simbiosis tanaman; bakteri ini diketahui tidak patogen bagi manusia, hewan, maupun tanaman.

Massilia albidiflava adalah bakteri gram negatif berbentuk batang dan berwarna putih kekuningan dalam koloni. Ia ditemukan melimpah di berbagai ekosistem, terutama di substrat lahan basah buatan (*constructed wetlands*), tanah rhizosfer, air, bahkan udara. Bakteri ini dikenal sangat adaptif terhadap perubahan musim serta lingkungan abiotik ekstrim seperti kekeringan dan tingginya logam berat (Xu dkk., 2023). Konsentrasi dan distribusinya dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban, (SO₂, NO₂, PM10), dan polutan lainnya. *M. albidiflava* berkontribusi dalam dinamika komunitas mikroba tanah, mendukung proses fitoremediasi, mendetoksifikasi lingkungan tercemar, serta menekan pertumbuhan patogen tanaman di zona akar dengan berkompetisi secara efektif (Amirhosseini dkk., 2025). Kelebihan lain *Massilia*, termasuk *M. albidiflava*, adalah kemampuannya bertahan di habitat ekstrem seperti gurun dan tanah beku serta kemampuannya mendegradasi polutan kompleks (Xu dkk., 2023).

Bradyrhizobium japonicum merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang sangat terkenal sebagai simbiosis tanaman kedelai dan leguminosa lain. Bakteri ini membentuk bintil akar (nodul) di sistem akar tanaman inang dan berfungsi sebagai fiksator nitrogen, mensuplai nitrogen untuk tanaman dan berperan vital dalam meningkatkan kesuburan serta produktivitas tanah secara alami tanpa perlu tambahan pupuk sintetis. *Bradyrhizobium japonicum* dapat hidup bebas di tanah dan bersaing dengan mikroba tanah lain dalam memanfaatkan sumber karbon, serta mampu tumbuh di lingkungan dengan substrat yang beragam meski tanpa akar inang (Viteri & Schmidt, 1987). Selain menyediakan nitrogen, bakteri ini mensekresikan enzim degradasi polisakarida untuk penetrasi akar tanaman tanpa bersifat patogen; justru menjaga hubungan simbiosis mutualistik yang tidak merugikan tumbuhan. Studi ekologi menunjukkan bahwa populasi *B. japonicum* bersaing efektif di tanah dan dapat tumbuh cepat dalam keberagaman substrat karbon sederhana yang tersedia di lingkungan (Viteri & Schmidt, 1987).

Bakteri-bakteri tersebut memiliki peranan penting dan signifikan, selain hanya untuk meningkatkan produktivitas pertanian dan memperbaiki kualitas tanah, tetapi juga memiliki potensi besar dalam proses bioremediasi, detoksifikasi, serta

rehabilitasi lingkungan yang terkontaminasi oleh polutan organik maupun anorganik. Keempat mikroorganisme tersebut menggambarkan keberagaman strateginya dalam beradaptasi terhadap lingkungan dan memanfaatkan peluang ekologis, termasuk membangun hubungan simbiosis mutualisme dengan berbagai tanaman, serta menjaga keseimbangan ekosistem tanah guna mendukung pertanian yang berkelanjutan.

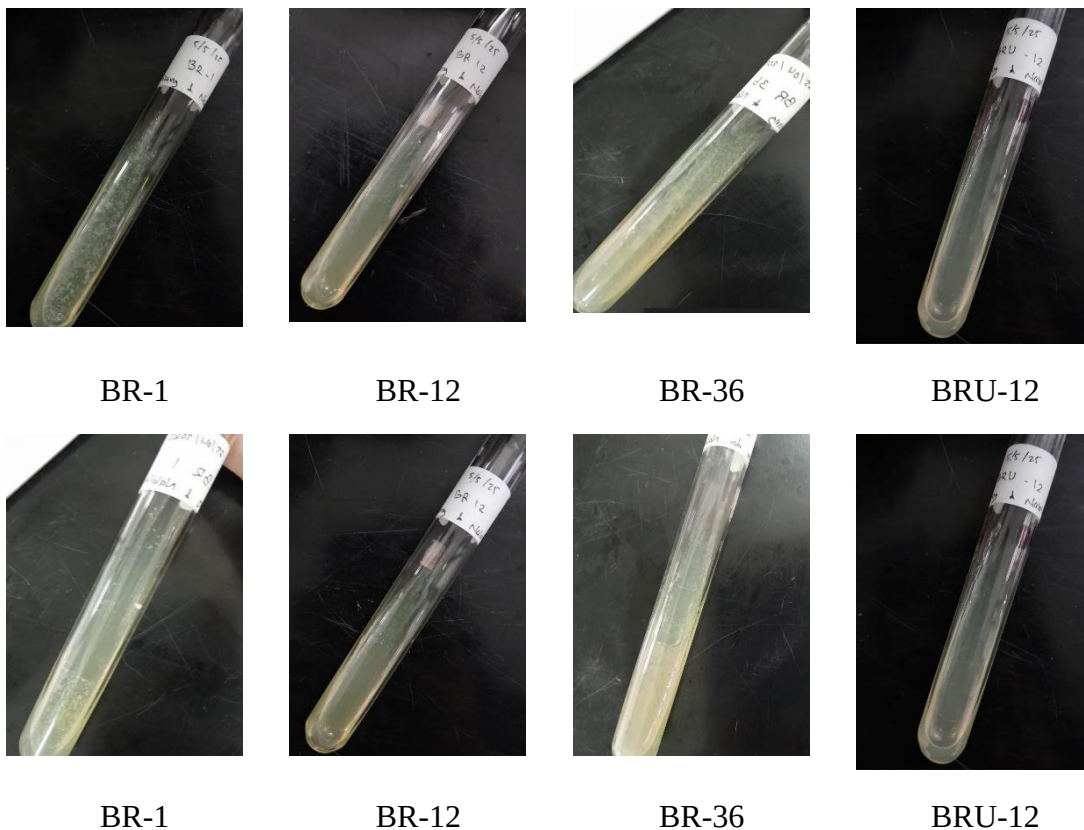
4.1.2 Inokulasi Bakteri

Sampel bakteri yang sudah disiapkan kemudian di inokulasi ke media NB dengan tujuan untuk memperbanyak biakan bakteri. Media NB disiapkan dengan melarutkan bubuk *Nutrient Broth* sebanyak 0.8 gram dalam air suling atau aquades, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit untuk menjaga kondisi steril saat inokulasi. Selanjutnya, inokulasi dilakukan dengan memasukkan satu *loop* ose bakteri ke dalam 5 mL media NB dalam tabung reaksi steril, kemudian diinkubasi menggunakan *waterbath shaker* pada suhu sekitar 30°C dengan kecepatan putar 100 rpm selama 18–24 jam. Inkubasi dengan agitasi ini memberikan aerasi dan distribusi nutrisi yang optimal sehingga mendukung pertumbuhan bakteri secara maksimal sehingga media menjadi keruh sebagai tanda pertumbuhan (Septiani, 2019). Bakteri mulai tumbuh pada hari ke-14 di dalam media NB yang diinkubasi di *waterbath shaker*.



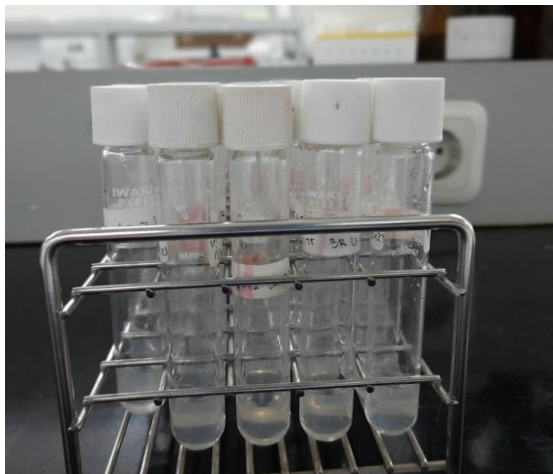
Gambar 4. 1 Kulturasasi Bakteri di Waterbath Shaker
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Bakteri yang tumbuh di media NB akan menunjukkan indikasi kekeruhan pada media NB, kemudian kultur diinokulasikan ke media *Nutrient Agar* (NA) dalam bentuk agar miring. Proses inokulasi di agar miring dilakukan dengan metode teknik gores (*streak plate*) untuk memperoleh koloni tunggal. Media agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 2x24 jam di incubator. Tujuan inkubasi ini yaitu untuk mendapatkan kemurnian bakteri melalui isolasi koloni tunggal. Setelah koloni tersebut tumbuh dalam agar miring, selanjutnya dapat diamati dan diidentifikasi morfologinya melalui pengecatan gram. Tujuannya, untuk membedakan apakah bakteri tersebut termasuk gram positif atau gram negatif, serta diamati morfologi selnya (rod/batang, kokus/bulat, atau bentuk lainnya) (Pratiwi, 2012).

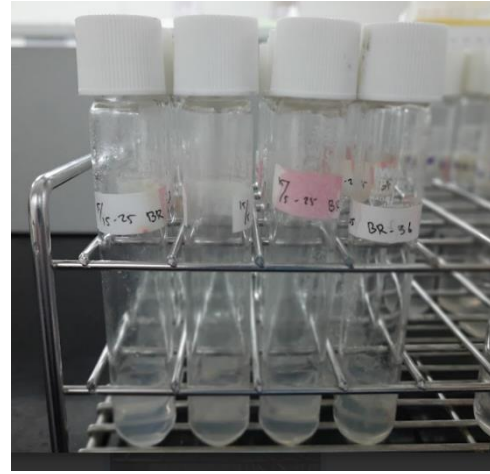


Gambar 4. 2 Inokulasi Agar Miring
Sumber: Dokumentasi Pribadi

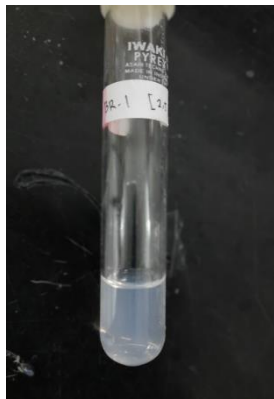
Selanjutnya, untuk mempertahankan viabilitas dan kestabilan bakteri dalam jangka waktu lama, koloni murni yang diperoleh dari medium agar miring dipindahkan ke media semi-padat berupa *Dilute Nutrient Broth* (DNB) yang dicampur dengan *gellan gum* pada konsentrasi tertentu (misalnya 2,5%–3%). Media ini disiapkan dengan mencampurkan DNB dan bubuk *gellan gum*, kemudian dipanaskan hingga homogen dan disterilkan oleh autoklaf. Setelah media dingin, inokulasi koloni bakteri dilakukan ke media tersebut. Media DNB-*gellan gum* ini bersifat semi-padat, yang mendukung penyimpanan bakteri dalam kondisi stabil dan mempertahankan viabilitasnya untuk jangka waktu yang lebih lama dibandingkan media cair biasa (Septiani, 2019).



DNB + 2,5% GG



DNB + 3% GG



BR-1 2,5%



BR-12 2,5%



BR-36 2,5%



BRU-12 2,5%



BR-1 3%



BR-12 3%



BR-36 3%



BRU-12 3%

Gambar 4. 3 Inokulasi Bakteri di Media DNB+Gellan gum
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Pemilihan konsentrasi GG berdampak pada viabilitas sel karena peningkatan konsentrasi membuat struktur gel menjadi lebih rapat. Kepadatan gel ini

memperlambat penetrasi nutrisi dan oksigen, yang meskipun menurunkan kecepatan pertumbuhan bakteri, justru meningkatkan daya tahan sel selama penyimpanan jangka panjang dengan menjadikan metabolisme sel lebih efisien (Nair dkk., 2019). Dalam penelitian dengan jenis bakteri dan suhu inkubasi yang sama, penggunaan konsentrasi GG yang berbeda (0,5% dan 1,5%) tidak menghasilkan pertumbuhan bakteri. Hal ini terjadi karena penambahan GG bersifat nonlinier dan meningkatkan kekakuan serta kepadatan media hingga mencapai titik jenuh dan mengeras, sehingga menghambat difusi nutrisi serta oksigen dan menyebabkan penumpukan produk limbah metabolik yang menghambat pertumbuhan, membuat bakteri hanya tumbuh pada permukaan gel.

Konsentrasi nutrisi yang sangat rendah dalam DNB memudahkan adaptasi bakteri tanah yang bersifat oligotrofik (Kurm, 2019). Berbeda dengan media standar yang kaya nutrisi yang justru dapat menghambat pertumbuhannya, DNB meniru kondisi lingkungan alami bakteri sehingga bisa mendukung pertumbuhan dalam media baru. *Gellan gum* menyediakan permukaan fisik yang memungkinkan bakteri tanah menempel dan membentuk mikrokoloni, sebagaimana mereka hidup di alam (Das dkk, 2015). Bakteri oligotrof memiliki sistem transport membran dengan afinitas (respons sensitif) tinggi terhadap nutrisi, yang memungkinkan mereka menangkap molekul nutrisi yang sangat rendah kadarnya dalam DNB dan memanfaatkan nutrisi dari sel-sel yang mati dan melisis yang mengeluarkan protein, DNA, dan komponen lain. Bakteri yang bertahan juga dapat mengeluarkan enzim eksogen (exoenzim) untuk mengurai materi organik dari sel mati dan menyerapnya sebagai sumber nutrisi.

Dalam penelitian kultur lingkungan, mengganti agar dengan *gellan gum* meningkatkan fraksi sel yang dapat tumbuh karena GG lebih murni dan tidak toksik serta mampu mendukung pertumbuhan spesies yang sulit tumbuh di agar. Contohnya, formulasi DNB+GG menghasilkan 7,5% sel yang tumbuh berdasarkan perhitungan mikroskopis, lebih tinggi dibandingkan 5,2% pada media agar, dan bahkan meningkat hingga 14,1% pada sampel tanah yang dihomogenisasi dengan prasonikasi. Hasil ini menunjukkan bahwa DNB+GG efektif untuk menumbuhkan dan mengisolasi bakteri tanah yang sulit dikultur dalam kultur murni (Janssen dkk., 2002).

4.2 Identifikasi Koloni Bakteri dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Metode *Total Plate Count* (TPC) digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu sampel secara langsung melalui pembentukan koloni pada media padat. Dalam metode tuang (*pour plate*), sampel hasil pengenceran serial sebanyak 1 ml diambil kedalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan media *Plate Count Agar* (PCA) cair yang sudah disterilisasi di autoklaf dan didinginkan hingga suhu 47-50°C sebanyak 15-20 ml. Campuran kemudian, digoyangkan perlahan hingga sampel menyebar sebelum media memadat (Dwidjoseputro, 2005). Cawan diinkubasi pada suhu 30°C selama kurang lebih 2x24 jam untuk memungkinkan pertumbuhan koloni mikroba.

Media PCA merupakan media padat yang mengandung sumber nitrogen (*casein enzymiz hydrolysate*), *yeast extract*, *dextrose*, dan agar, yang mampu mendukung pertumbuhan bakteri. Proses sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Wati, 2018). Pertumbuhan dan jumlah koloni yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh abiotic, antara lain: suhu, kelembaban, cahaya, dan pH, serta ketersediaan nutrisi dalam media (Haastuti, 2008). Faktor-faktor tersebut dapat menentukan keberhasilan jumlah koloni yang tumbuh dikarenakan ukurannya yang sangat mikroskopis, pertumbuhan mikroba sangat bergantung pada keadaan sekelilingnya (Pelczar dan Chan, 2006).

Hasil perhitungan koloni pada media PCA dalam CFU/ml, dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4. 2 Hasil TPC Hari ke-12

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan gum</i>	<i>Total Plate Count</i> (CFU/ml)
BR-1	<i>Arthrobacter aurescens</i>	2,5%	2,0x10 ⁶
		3%	1,2x10 ⁷
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%	3,0x10 ⁷
		3%	3,2x10 ⁷
BR-36	<i>Massilia abidiflava</i>	2,5%	2,9x10 ⁷
		3%	1,7x10 ⁷
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%	5,9x10 ⁶
		3%	1,9x10 ⁷

Sumber: Data Hasil Penelitian Pribadi

Tabel 4. 3 Hasil TPC Hari ke-28

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi Gellan gum	Total Plate Count (CFU/ml)
BR-1	<i>Arthrobacter aureus</i>	2,5%	$1,0 \times 10^7$
		3%	$3,8 \times 10^7$
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%	$3,0 \times 10^7$
		3%	$5,0 \times 10^7$
BR-36	<i>Massilia abidiflava</i>	2,5%	$7,0 \times 10^7$
		3%	$3,0 \times 10^7$
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%	$4,5 \times 10^7$
		3%	$3,0 \times 10^7$

Sumber: Data Hasil Penelitian Pribadi

Uji Statistik

Teknik pengumpulan data dengan teknik yang tepat akan memastikan bahwa hasil analisis bersifat reliabel dan representatif terhadap fenomena yang sedang diteliti (Isnaini dkk., 2025). Dalam analisis statistik, salah satu tahapan yang sering diabaikan adalah pengujian asumsi yang mendasari model statistik yang digunakan (Subhakkiyasa, 2024).

Data penelitian sering kali tidak sepenuhnya normal karena adanya ketidaksimetrisan, kemencengan (skewness), atau nilai ekstrim (outlier) yang menyebabkan penyimpangan distribusi (Nasrum, 2018). Untuk itu, uji normalitas dilakukan guna memastikan apakah data sesuai dengan distribusi normal sebelum dianalisis lebih lanjut. Uji ini penting dilakukan sebagai dasar pengujian analisis statistik. Selain itu, uji normalitas penting dilakukan untuk memvalidasi apakah data yang telah dikumpulkan sesuai dengan asumsi distribusi normal yang diperlukan oleh berbagai metode analisis statistik (Isnaini dkk., 2025).

Hasil uji normalitas menentukan pemilihan metode analisis, jika data terdistribusi normal maka selanjutnya digunakan uji paramterik seperti uji T-Test, ANOVA, atau regresi linear. Tetapi, apabila data menyimpang dari normalitas, maka analisis yang tepat adalah dengan uji non-parametrik, seperti Uji Mann-Whitney U Test, Uji Kruskal-Wallis, atau Uji Spearman's rho (Isnaini dkk., 2025). Dengan demikian, uji normalitas tidak hanya berperan sebagai prosedur teknik, tetapi juga untuk memastikan pemilihan metode analisis yang tepat sehingga hasil penelitian dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

Uji Mann Whitney U

Uji ini merupakan uji statistik non-paramterik yang digunakan untuk membandingkan dua kelompok yang tidak berhubungan untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan diantara kedua sampel tersebut, terutama ketika data tidak terdistribusi normal. Uji ini merupakan alternatif non-parametrik dari uji T-sampel independent dan menguji apakah sampel tersebut berasal dari populasi dengan median yang sama (McClenaghan, 2024). Skala data yang digunakan dalam uji Mann Withney yaitu data ordinal, bisa saja menggunakan data interval/rasio, dengan syarat asumsi normalitas data tidak terpenuhi (data tidak terdistribusi secara normal) (Sahid, 2018). Pengujian Mann Whitney U meliputi dua teknik berbeda, yaitu ketika jumlah sampel kecil (n_1 atau $n_2 < 20$), dan ketika jumlah sampel besar (n_1 atau $n_2 > 20$) (Yanti, 2007).

Kriteria pengujian uji Mann Whitney

- Nilai Asymp. Sig. (2-tailed) $< 0,10$ berkesimpulan ada perbedaan secara signifikan dan "Hipotesis Ditolak"
- Nilai Asymp. Sig. (2-tailed) $> 0,10$ berkesimpulan tidak ada perbedaan secara signifikan dan "Hipotesis Diterima"

Data yang dipakai merupakan hasil analisis total koloni bakteri (CFU/ml) pada pengujian TPC secara duplo di dua konsentrasi *Gellan gum*, sebagai berikut:

Tabel 4. 4 Data Koloni Bakteri di Tiap Konsentrasi GG

Koloni Bakteri (CFU/ml)			
Hari ke-12		Hari ke-28	
Konsentrasi GG 2,5%	Konsentrasi GG 3%	Konsentrasi GG 2,5%	Konsentrasi GG 3%
6	7	7	7
6	5	5	7
7	8	7	8
7	8	6	7
8	7	8	7
7	7	7	6
7	7	7	7
6	7	6	5
7	8	7	8
6	8	6	8
8	8	8	8
7	7	6	8
8	8	9	8

8	8	6	8
7	8	8	9
6	7	6	8

Berdasarkan hasil Uji Mann-Whitney U (Gambar 4.4 dan 4.5), nilai signifikansi (p-value) yang diperoleh pada hari ke-12 adalah 0,077 dan pada hari ke-28 adalah 0,062. Karena kedua nilai ini lebih kecil dari tingkat signifikansi (α) 0,1 yang ditetapkan, maka H_0 ditolak. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik dalam jumlah total koloni bakteri antara media dengan konsentrasi gellan gum 2,5% dan 3% pada taraf kepercayaan 90%.

Penetapan $\alpha = 0,1$ dipilih secara khusus mengingat karakteristik penelitian dengan ukuran sampel yang terbatas dan variasi data yang tinggi. Tingkat signifikansi ini memungkinkan pendeteksian perbedaan yang bermakna dengan tetap mempertimbangkan risiko kesalahan Tipe I (false positive) yang dapat diterima dalam studi eksploratif..

Penolakan H_0 , mengonfirmasi bahwa konsentrasi *gellan gum* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan total koloni bakteri. Perbedaan ini mengindikasikan bahwa respons fisiologis bakteri terhadap kepadatan matriks gel berbeda secara nyata antara kedua konsentrasi yang diuji. Temuan ini memperkuat dugaan bahwa kerapatan media berperan penting dalam mengatur ketersediaan nutrisi, difusi oksigen, dan ruang gerak sel, yang pada akhirnya memengaruhi dinamika populasi bakteri.

Test Statistics ^a	
	Koloni Bakteri
Mann-Whitney U	84.500
Wilcoxon W	220.500
Z	-1.767
Asymp. Sig. (2-tailed)	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.102 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi
b. Not corrected for ties.

Gambar 4. 4 Hasil Uji Statistik Hari ke-12

Test Statistics ^a	
	Koloni Bakteri
Mann-Whitney U	80.500
Wilcoxon W	216.500
Z	-1.868
Asymp. Sig. (2-tailed)	.062
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.073 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi
b. Not corrected for ties.

Gambar 4. 5 Hasil Uji Statistik Hari ke-28

4.3 Analisis Viabilitas pada Konsentrasi *Gellan gum* yang Optimal

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa konsentrasi optimal *gellan gum* dalam

penyimpanan jangka panjang berbeda antar strain bakteri. Untuk bakteri BR-1, BR-12, dan BRU-12 pada konsentrasi 3% menunjukkan viabilitas bakteri yang lebih tinggi, sementara untuk BR-36 justru menunjukkan viabilitas terbaiknya pada konsentrasi 2,5%. Konsentrasi yang digunakan merujuk pada parameter keberhasilan yang diukur, terkait sifat fisik media (kekerasan, stabilitas, kejelasan), jumlah koloni yang tumbuh pada konsentrasi optimal akan menunjukkan jumlah koloni tertinggi. Berikut merupakan perbandingan konsentrasi DNB+GG terhadap viabilitas bakteri:

Tabel 4. 5 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG dari TPC hari ke-12

Kode Bakteri	Konsentrasi DNB+GG 2,5%	Konsentrasi DNB+GG 3%
BR-1	2×10^6	1×10^7
Br-12	3×10^7	3×10^7
BR-36	3×10^7	2×10^7
BRU-12	6×10^6	2×10^7

Tabel 4. 6 Perbandingan Konsentrasi DNB+GG dari TPC hari ke-28

Kode Bakteri	Konsentrasi DNB+GG 2,5%	Konsentrasi DNB+GG 3%
BR-1	1×10^7	4×10^7
Br-12	3×10^7	5×10^7
BR-36	7×10^7	3×10^7
BRU-12	5×10^7	3×10^7

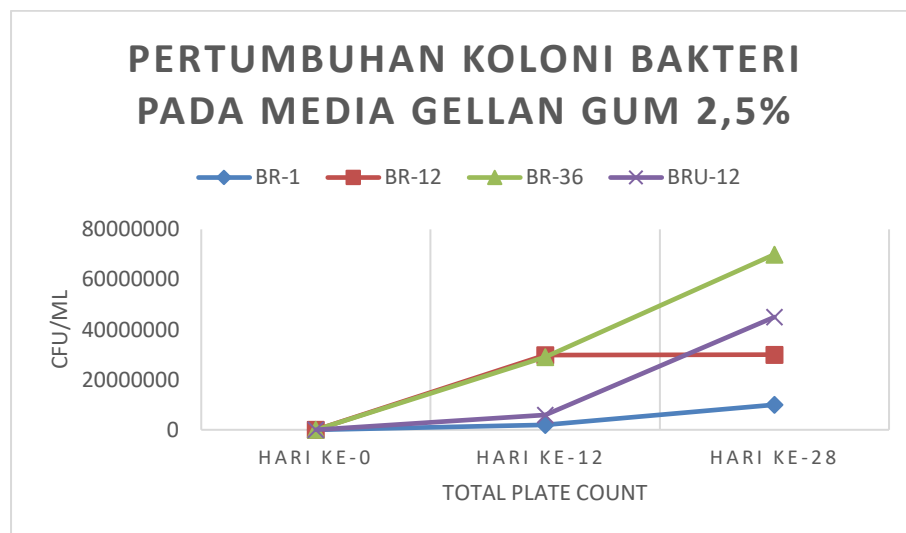
Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi *gellan gum* berpengaruh terhadap kemampuan media dalam mempertahankan viabilitas bakteri selama penyimpanan. Pada konsentrasi rendah (0,5%), tekstur gel yang terbentuk relatif lunak dan kurang stabil, sehingga meskipun nutrisi mudah diakses, kondisi ini tidak cukup melindungi sel dari tekanan lingkungan, yang berdampak pada menurunnya tingkat viabilitas setelah periode simpan tertentu. Konsentrasi menengah (1,5%) menghasilkan media dengan kestabilan mekanik yang lebih baik dan masih mampu mendukung pertumbuhan bakteri. Pada level ini, bakteri dapat tumbuh relatif optimal karena keseimbangan antara difusi nutrisi dan perlindungan sel lebih terjaga.

Sementara itu, pada konsentrasi lebih tinggi (2,5–3%), media menunjukkan

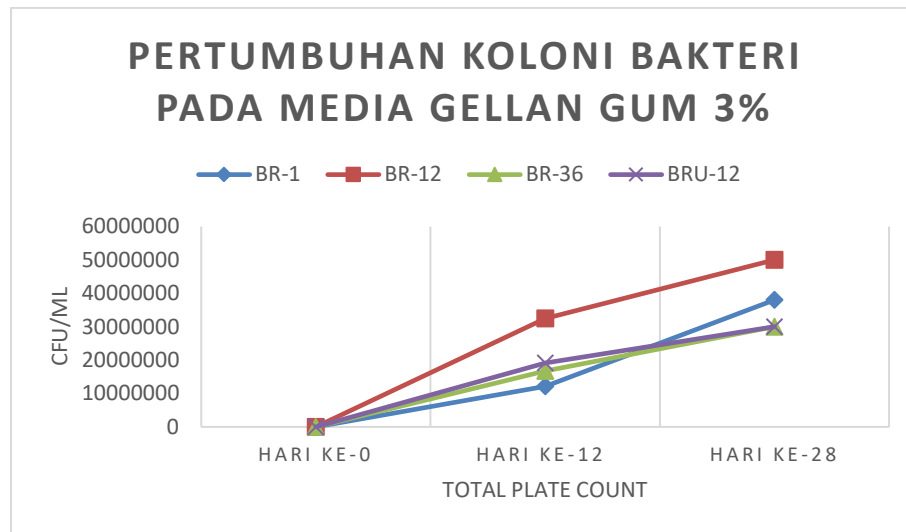
kestabilan fisik yang jauh lebih baik, sehingga mampu menjaga integritas sel dan melindungi bakteri dari fluktuasi lingkungan selama penyimpanan jangka panjang. Namun, peningkatan kepadatan gel dapat sedikit membatasi difusi nutrisi, sehingga tidak semua isolat menunjukkan respons yang sama. Beberapa isolat, seperti *Pseudomonas* spp., tetap menunjukkan viabilitas yang tinggi pada konsentrasi 2,5–3%, sedangkan isolat lain lebih optimal pada konsentrasi menengah. Hal ini menunjukkan bahwa kebutuhan lingkungan fisik untuk mempertahankan viabilitas bersifat spesifik terhadap jenis bakteri yang diuji.

Secara keseluruhan, data mendukung bahwa konsentrasi menengah hingga tinggi (1,5–3%) lebih efektif dibandingkan konsentrasi rendah (0,5%) untuk mempertahankan viabilitas bakteri. Dengan demikian, pemilihan konsentrasi optimal sangat penting dan perlu disesuaikan dengan karakteristik isolat bakteri yang digunakan. Temuan ini sejalan dengan penelitian Janssen et al. (2002) yang melaporkan efektivitas *gellan gum* dalam meningkatkan isolasi bakteri dari tanah, serta Mac et al. (2017) yang menunjukkan peningkatan jumlah bakteri terkultur hingga 40 kali lipat ketika *gellan gum* digunakan sebagai media pengganti agar.

Kenaikan viabilitas bakteri dapat dilihat pada grafik pertumbuhan dibawah ini:



Gambar 4. 6 Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri pada Media *Gellan gum* 2,5%



Gambar 4. 7 Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri pada Media *Gellan gum* 3%

Secara statistik, konsentrasi media 3% DNB+Gellan gum menghasilkan pertumbuhan optimal untuk tiga isolat bakteri pada hari ke-28. Isolat BR-1 mencapai 4×10^7 CFU/ml, BR-12 mencapai 5×10^7 CFU/ml, dan BRU-12 mencapai 3×10^7 CFU/ml. Namun, isolat BR-36 justru menunjukkan pertumbuhan tertinggi, yaitu 7×10^7 CFU/ml, pada konsentrasi media yang lebih rendah, 2.5%.

Analisis Pertumbuhan per Isolat

- Isolat BR-1 (*A. aurescens*): Pola pertumbuhan dari hari ke-0 hingga ke-12 menunjukkan fase adaptasi, diikuti oleh fase eksponensial yang signifikan pada konsentrasi 3%. Pencapaian 4×10^7 CFU/ml pada hari ke-28 mengindikasikan bahwa bakteri masih berada dalam fase eksponensial lambat atau awal fase stasioner, yang sesuai dengan karakteristik pertumbuhan yang konsisten dan tidak agresif dari spesies ini.
- Isolat BR-12 (*M. loti*): Isolat ini menunjukkan respons pertumbuhan yang cepat sejak awal (hari ke-0 hingga ke-12) pada kedua konsentrasi media, yang merupakan ciri khas bakteri simbiotik yang responsif terhadap lingkungan organik. Pada hari ke-28, pertumbuhan di media 2.5% telah memasuki fase stasioner (3×10^7 CFU/ml), sementara media 3% justru memperpanjang fase eksponensialnya, menghasilkan jumlah koloni yang lebih tinggi (5×10^7 CFU/ml).

- Isolat BR-36 (*M. abidiflava*): Isolat ini menunjukkan pola unik dengan pertumbuhan tertinggi pada konsentrasi 2.5%. Lonjakan pertumbuhan terjadi pada awal fase eksponensial (hari ke-12), dan pada hari ke-28, jumlah koloni di media 2.5% terus meningkat signifikan menjadi 7×10^7 CFU/ml, menandakan fase eksponensial yang berlanjut. Sebaliknya, pada media 3%, isolat ini lebih cepat memasuki fase stasioner (3×10^7 CFU/ml), menunjukkan bahwa konsentrasi 2.5% merupakan kondisi optimal bagi pertumbuhannya.
- Isolat BRU-12: Pertumbuhan isolat ini lebih lambat dan dinamis. Meskipun merespons lebih baik pada media 3% di fase eksponensial awal, pada hari ke-28 pertumbuhan di media 2.5% justru lebih tinggi (5×10^7 CFU/ml vs 3×10^7 CFU/ml). Hal ini mengindikasikan bahwa kekentalan media yang lebih tinggi mungkin mulai menghambat difusi nutrisi atau oksigen pada fase lanjutan.

Berdasarkan data yang diperoleh, pengamatan pertumbuhan bakteri hingga hari ke-28 telah memadai untuk menjawab tujuan penelitian. Dalam kurun waktu tersebut, ketiga fase pertumbuhan kritis—yaitu fase adaptasi (lag), fase eksponensial (yang tampak jelas pada hari ke-12), dan fase stasioner (yang mulai teramati pada hari ke-28)—telah terekam dengan baik. Data pada hari ke-28 telah secara jelas menunjukkan konsentrasi media optimal bagi setiap isolat, yaitu 3% untuk BR-1 dan BR-12, serta 2,5% untuk BR-36, sekaligus mengidentifikasi nilai pertumbuhan maksimum yang dicapai (Brinke et al., 2011; Prajapati et al., 2013). Pertimbangan efisiensi sumber daya juga menjadi alasan yang logis, mengingat masa inkubasi 28 hari sudah tergolong lama dalam standar mikrobiologi.

Tidak ada yang menunjukkan fase kematian hingga akhir pengamatan diduga kuat berkaitan dengan sifat media gellan gum yang semi-padat. Media ini memberikan stabilitas fisik dan menjaga kelembaban, sehingga menciptakan lingkungan mikro yang mendukung viabilitas sel dalam jangka panjang (Brinke et al., 2011). Untuk isolat BR-1 (*A. aurescens*), struktur gel yang lebih kokoh pada konsentrasi 3% mungkin memberikan perlindungan optimal. Sebaliknya, pertumbuhan BR-36 (*M. abidiflava*) yang justru optimal pada konsentrasi 2,5% mengindikasikan bahwa kerapatan matriks gel yang lebih rendah lebih sesuai untuk

metabolisme atau difusi nutrisi yang dibutuhkan oleh spesies ini (Lee et al., 2020). Hal ini konsisten dengan temuan Prajapati et al. (2013) yang melaporkan bahwa pengaruh konsentrasi gellan gum terhadap viabilitas sel bersifat spesifik terhadap jenis mikroorganisme, di mana terdapat titik optimal yang menyeimbangkan antara perlindungan dan kemudahan akses nutrisi. Penelitian Prajapati dkk (2013), menunjukkan bahwa variasi konsentrasi *gellan gum* memengaruhi sifat mekanis gel dan viabilitas sel (semakin padat, maka semakin baik stabilitas, hingga titik yang bagus. Hal ini konsisten dengan hasil bahwa konsentrasi optimal bisa berbeda antar spesies karena karakteristik sel masing-masing.

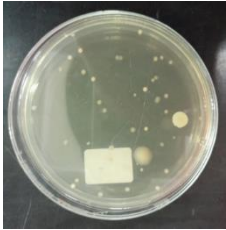
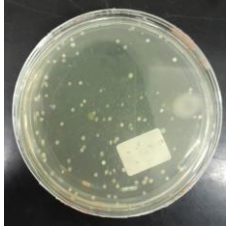
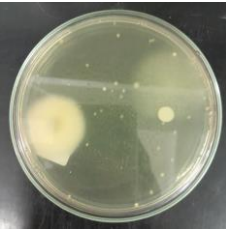
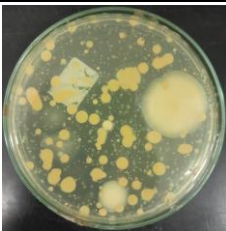
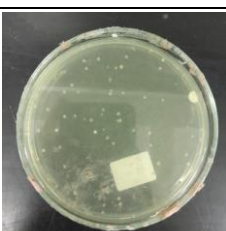
Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun konsentrasi *gellan gum* 3% lebih efektif untuk sebagian besar bakteri, dan bakteri BR-36 menunjukkan respons yang berbeda, yang memerlukan penelitian lebih lanjut untuk memahami mekanisme terkait viabilitas dan karakteristik morfologisnya. Penelitian lebih lanjut juga diperlukan untuk mengeksplorasi faktor-faktor yang mempengaruhi hasil pewarnaan gram pada bakteri-bakteri tersebut, agar dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai karakteristik dan perilaku bakteri dalam media penyimpanan.

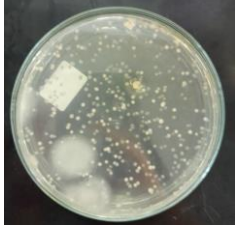
4.5 Identifikasi Morfologi Bakteri

4.5.1 Pengamatan Makroskopis Sel Bakteri dari Media PCA

Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopis pada media PCA, koloni bakteri yang tumbuh menunjukkan morfologi sel yang meliputi, bentuk, tepi, dan permukaan koloninya. Pengamatan ini mengindikasikan bahwa isolat bakteri yang diamati memiliki karakter morfologi yang seragam sesuai dengan spesies nya. Berikut merupakan hasil pengamatan keempat isolat bakteri yang diteliti pada penelitian ini:

Tabel 4. 7 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

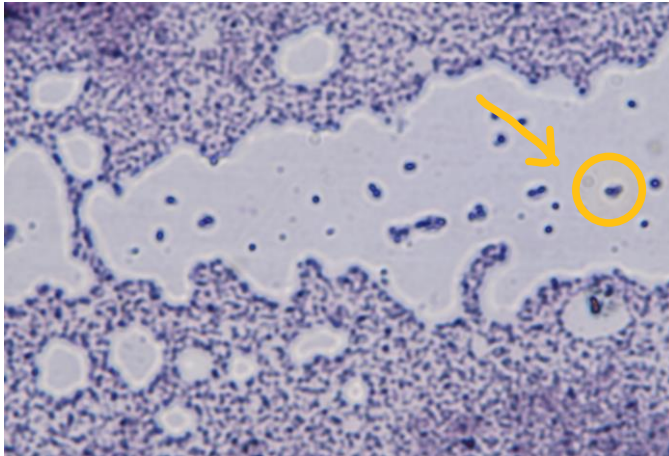
Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan gum</i>	Gambar	Morfologi Koloni Bakteri			
			Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
<i>Arthrobacter aureescens</i>	2,5%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
	3%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	2,5%		kuning	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
	3%		kuning	<i>irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>
<i>Massilia abidiflava</i>	2,5%		kuning	<i>irregular</i>	<i>lobate</i>	<i>flat</i>
	3%		kuning	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>flat</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2,5%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>convex</i>

Nama Bakteri	Konsentrasi <i>Gellan gum</i>	Gambar	Morfologi Koloni Bakteri			
			Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
	3%		putih	<i>circular</i>	<i>entire</i>	<i>convex</i>

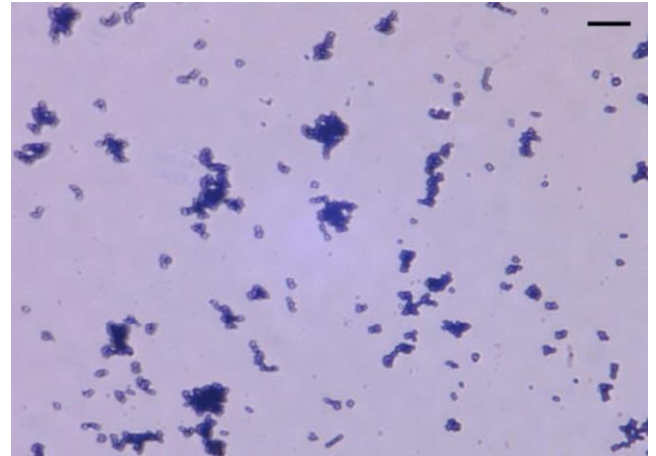
4.5.2 Pengamatan Mikroskopis Sel Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram merupakan salah satu metode proses untuk mengetahui sel bakteri tersebut termasuk kedalam golongan gram negatif atau gram positif secara mikroskopis. Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 4.8), karakteristik sampel isolat BR-1 secara mikroskopis termasuk kedalam jenis bakteri gram positif. Bakteri gram positif berjenis bulat ini sering ditemukan pada genus seperti *Micrococcus* atau *Staphylococcus*, yang memiliki dinding sel tebal dan mempertahankan warna ungu dari pewarnaan kristal violet pada proses pewarnaan gram (Prescott dkk, 2005)

Menurut Mages dkk, *Arthrobacter aurescens* termasuk dalam bakteri gram positif berbentuk batang dengan morfologi yang khas berupa batang pendek hingga oval yang bisa berubah bentuk menjadi kokus pada fase tertentu dalam siklus hidupnya (misalnya saat kondisi lingkungan kurang menguntungkan), sehingga memperlihatkan bentuk pleomorfik (variasi bentuk) yang dapat mencakup bentuk kokus maupun batang (Mages dkk., 2008). Secara makroskopis, koloni *Arthrobacter* pada media padat biasanya berwarna putih atau krem dengan permukaan yang datar (flat), berbentuk bundar (circular) dengan tepi yang halus (entire) (Fadilah dkk., 2022).



Gambar 4. 8 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri BR-1

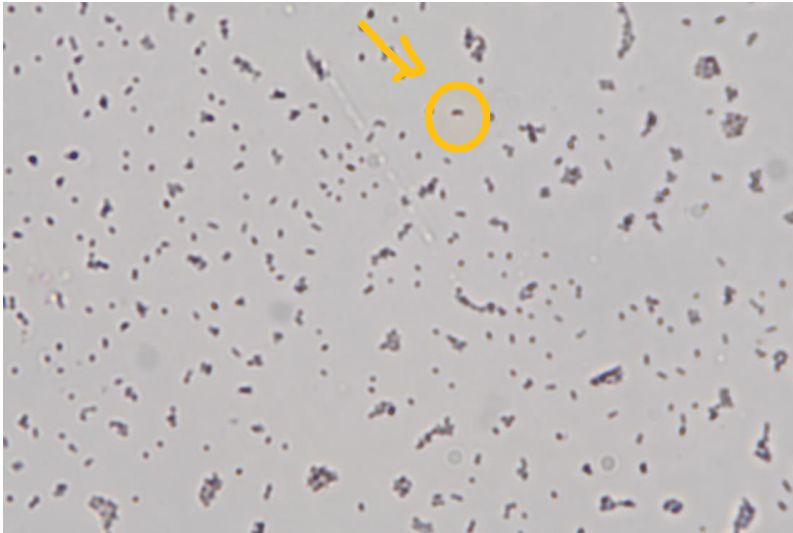


Gambar 4. 9 Literatur *Arthrobacter* sp, Ivan Glaucio (2019)

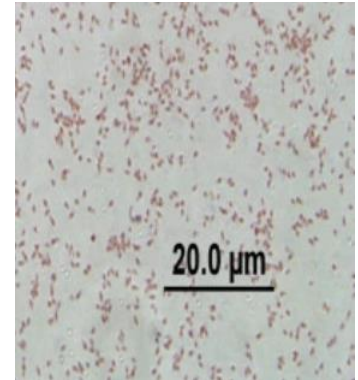
Sementara itu, pengamatan isolat bakteri BR-1 yang menunjukkan koloni berwarna putih, berbentuk *circular* dengan tepi *entire* dan elevasi *flat*, serta bersifat gram positif dengan bentuk sel coccus, secara umum sesuai dengan kemungkinan morfologi fase coccus dari *Arthrobacter aurescens*. Namun, *Arthrobacter* sendiri lebih dikenal sebagai bakteri batang, meskipun memang bentuk kokus (coccus) juga dilaporkan bisa berlangsung secara sementara pada beberapa fase pertumbuhan atau kondisi lingkungannya (Mages dkk., 2008).

Arthrobacter berkembang dari genus bakteri tanah yang memiliki ciri khas utama siklus pertumbuhannya yaitu batang yang tidak beraturan pada kultur muda dan digantikan oleh bentuk-bentuk kokus pada kultur yang lebih tua, sehingga ketika dipindahkan ke media baru kaya akan nutrisi dapat menghasilkan kembali genus batang tak beraturan, dan siklus tersebut selalu berulang (Jones & Keddie, 2017). Oleh karena itu, hasil pengamatan isolat BR-1 tidak bertentangan tetapi lebih menegaskan karakter pleomorfik *Arthrobacter aurescens* yang berbentuk kokus gram positif yang terlihat pada pengamatan mikroskopik. Perbedaan bentuk sel yang bulat (coccus) pada isolat BR-1 kemungkinan merupakan bagian dari siklus hidup alami atau respons adaptif bakteri tersebut di media kultur.

Hasil pengamatan morfologi sel bakteri BR-12 pada Gambar 4.10 menunjukkan bakteri tersebut masuk kedalam jenis bakteri gram positif dengan bentuk basil/batang memanjang.



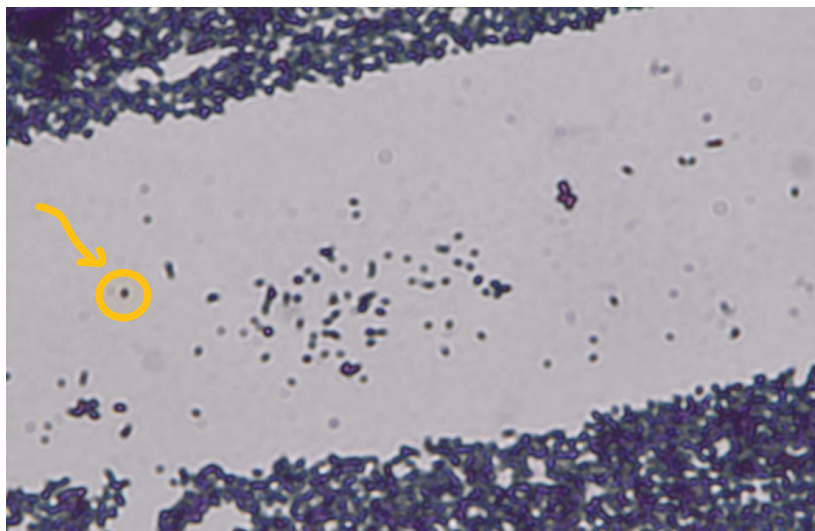
Gambar 4. 10 Pengamatan Sel Bakteri BR-12



Gambar 4. 11 Literatur
Mesorhizobium loti
Reeve dkk (2014)

Secara teori morfologi sel mesorizhobium loti merupakan gram negatif dengan dinding sel tipis dengan lapisan lipopolisakarida. Selnya berbentuk batang (*rod-shape*) dan umumnya lurus, berukuran sekitar $0,5-0,9 \mu\text{m} \times 1,2-3,0 \mu\text{m}$, berflagela peritrik yang menyebar diseluruh permukaan sel. Umumnya tumbuh relatif lambat dibandingkan bakteri non-simbion, serta tidak membentuk spora (Strain Identifier, 2002).

Identifikasi hasil pengamatan mikroskopis untuk bakteri BR-36 menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk bakteri gram positif dengan morfologi sel yang berbentuk basil agak memanjang.

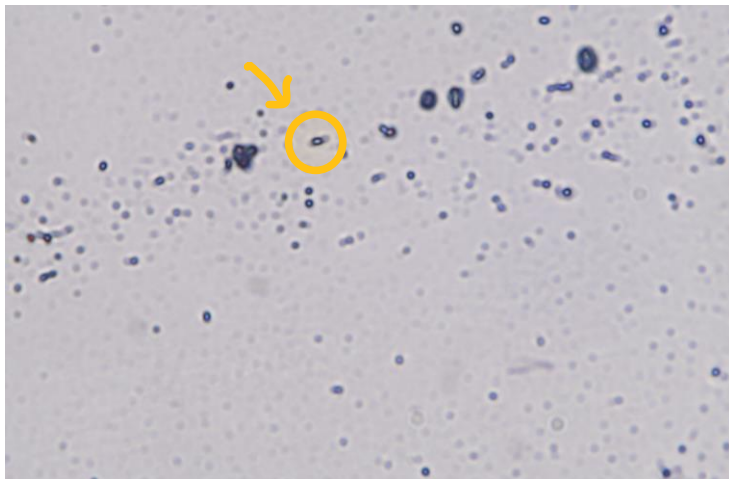


Gambar 4. 12 Pengamatan Sel Bakteri BR-36

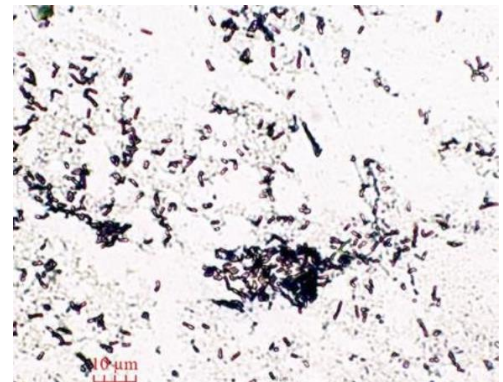
Morfologi *Massilia abidiflava* termasuk kedalam strain gram negatif dengan bentuk sel batang (*rod shape*), tidak membentuk spora, bermotil dengan flagela

peritrik. Ukuran sel nya diantara 1,8–2 μm x 3–3,5 μm , berkoloni secara melingkar, cembung (convex), bertekstur kering dan buram (*opaque*), menunjukkan potensi bioaktif melauai produksi massiliamide (agen potent antibiosintesis tyrosinase) (Zhang dkk, 2006).

Hasil pengamatan morfologi sel bakteri BRU-12 dapat dilihat pada Gambar 4.13, yang menunjukkan bakteri tersebut masuk kedalam jenis bakteri gram positif dengan bentuk sel basil dan agak memanjang.



Gambar 4. 13 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri BRU-12



Gambar 4. 14 Literatur
Bradyrhizobium sp,
Sumber: Jiraporn (2021)

Bradyrhizobium termasuk kedalam kelompok *slow growing rhizobia* dibanding rhizobium biasa, dengan waktu generasi bisa lebih dari 8-10 jam. *Bradyrhizobium japonicum* termasuk gram negatif dengan bentuk batang (*rod-shape*), agak melengkung, berukuran sekitar 0.5–0.9 μm x 1.2–3.0 μm . mempunyai motil dengan flagella polar/subpolar, dan tidak membentuk spora (Strain identifier, 1999).

Berdasarkan beberapa penelitian mikrobiologi, *Arthobacter* dan beberapa genus serupa memiliki dinding sel yang relatif tebal dengan kandungan peptidoglikan tinggi (Stackebrandt & Schumann, 2014), yang menjelaskan hasil gram positif pada BR-1. Namun hal lain terjadi pada BR-12, BR-36, dan BRU-12 yang seharusnya gram negatif berdasarkan klasifikasi taksonominya (Bergey's, 2019). Hal ini bisa terjadi karena beberapa faktor:

1. Perubahan fisiologisnya, mengenai proses adaptasi bakteri terhadap media penyimpanan. dapat megubah komposisi lipid membran (Epstein, 2009)

2. Variasi intraspecies, strain bakteri yang sama dari koleksi berbeda mungkin menunjukkan karakter dinding sel bervariasi (Vandamme dkk, 1996)

Adaptasi laboratorium yang lama atau pergantian generasi isolat bisa menyebabkan perubahan dinding sel (penebalan peptidoglikan).

Berdasarkan beberapa literatur yang ada, fase pertumbuhan bakteri bisa dipengaruhi juga oleh respons lingkungan baru sehingga ketika lingkungan baru tersebut tidak mendukung untuk metabolismenya, bakteri dapat stress yang mempengaruhi pertumbuhan selnya.

Dalam penelitian Wee dkk (2023), pada fase pertumbuhan dan stress lingkungan pada *Staphylococcus aureus*, bakteri yang diberi *pre-stressor* (kelaparan, garam, pH rendah, kompetisi mikroba) mengalami perubahan fenotipik yang berdampak pada resistensi antibiotik. Stress ringan selama 12 jam tidak menghentikan pertumbuhan, namun cukup untuk membuat *S. aureus* beradaptasi, masuk ke fase adaptasi stress. Respons stress ini mengubah viabilitas sel saat memasuki fase eksponensial setelah pemberian antibiotik. Misalnya, *pre-stressor* menyebabkan peningkatan resistensi terhadap vancomycin. Studi ini tidak eksplisit membagi fase lag-log-stasioner, tapi menunjukkan bahwa paparan stress sebelum fase pertumbuhan aktif dapat "mempersiapkan" bakteri untuk bertahan terhadap tekanan berikutnya.

Menurut Rofle dkk (2012), fase lag bukan fase pasif, tetapi fase aktif di mana terjadi transkripsi besar-besaran (>2.600 gen) dalam 40 menit pertama setelah inokulasi. Dalam 4 menit pertama, bakteri *Salmonella Typhimurium* sudah mulai memproduksi enzim dan protein metabolik, termasuk pengambilan besi dan pembentukan kluster Fe-S. Sel membesar tetapi belum membelah—menunjukkan aktivitas metabolik tinggi untuk persiapan menuju fase eksponensial. Terjadi akumulasi logam seperti Fe, Ca, dan Mn, serta sensitivitas sementara terhadap stress oksidatif—menandakan kerentanan selama masa transisi ini.

Andersson (2016) dalam PNAS Commentary, bakteri mampu menunjukkan "memori fenotipik" jangka pendek terhadap stress, melalui ekspresi protein yang bertahan melampaui satu generasi sel. Contohnya, *E. coli* menunjukkan lag time lebih pendek saat berpindah ke medium yang mengandung laktosa setelah sebelumnya terekspos glukosa. Studi menunjukkan bahwa ekspos awal terhadap

stres ringan dapat meningkatkan kelangsungan hidup saat stres berulang, namun efek ini bersifat sementara dan tidak diwariskan secara genetik. Respon ini disebut strategi manajemen stres, bukan memori sejati, karena hanya berdampak dalam rentang waktu terbatas.

Dapat disimpulkan bahwa fase lag merupakan fase awal kritis dimana bakteri beradaptasi terhadap lingkungan baru sebelum memasuki fase eksponensial. Paparan stress ringan pada fase awal (pra-lag atau selama lag) dapat mengubah perilaku dan viabilitas sel di fase-fase berikutnya. Respon-respon ini menunjukkan adanya bentuk “memori fisiologi” yang tidak bisa bersifat genetik tapi bisa menentukan kecepatan pertumbuhan, ketahanan terhadap antibiotik, dan kelangsungan hidup.

Dalam kondisi tertentu, stres lingkungan memungkinkan dapat menyebabkan modifikasi struktural pada dinding sel bakteri gram-negatif yang dapat mengganggu dan mengubah interpretasi hasil pewarnaan gram, tetapi tidak mengubah secara permanen klasifikasi gram-nya secara genetik. Contohnya, *e-coli* dan *salmonella* pada saat stress bisa menyebabkan penebalan lapisan peptidoglikan, atau penurunan permeabilitas membran luar, sebagai bentuk perlindungan dari lingkungan. Hal tersebut bisa membuat kristal violet tertahan lebih lama, sehingga saat pewarnaan gram, hasilnya tampak seperti gram-positif.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Perbedaan konsentrasi *gellan gum* mempengaruhi viabilitas bakteri setelah penyimpanan. Konsentrasi *Dilute Nutrient Broth* + *Gellan gum* 3% menunjukkan kemampuan terbaik untuk mempertahankan koloni bakteri yang viabel, terutama untuk isolat BR-1 (*Arthrobacter aurescens*), BR-12 (*Mesorhizobium loti*), dan BRU-12 (*Bradyrhizobium japonicum*), sebagaimana ditunjukkan oleh metode *Total Plate Count* (TPC). Namun, untuk isolat BR-36 (*Massilia abidiflava*), konsentrasi *Dilute Nutrient Broth* + *Gellan gum* 2,5% justru menghasilkan viabilitas yang lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan fisik yang dibutuhkan untuk mempertahankan viabilitas bakteri bersifat spesifik terhadap jenis mikroorganisme yang digunakan.
2. Pewarnaan gram menunjukkan bahwa semua isolat bakteri termasuk jenis bakteri basil gram positif yang khas setelah penyimpanan. Hasil ini konsisten dengan karakteristik *Arthrobacter aurescens* tetapi tidak konsisten dengan literatur mengenai *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, dan *Massilia abidiflava*, yang secara taksonominya bersifat gram negatif. Hal ini menunjukkan kemungkinan adanya perubahan morfologi dinding sel bakteri selama penyimpanan, atau kemungkinan kontaminasi silang atau degradasi identitas fenotopik selama kultur penyimpanan.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang telah dikemukakan, maka penulis memberikan saran sebagai berikut:

1. Disarankan agar pemilihan konsentrasi *gellan gum* sebagai media penyimpanan mempertimbangkan karakteristik spesifik bakteri yang digunakan. Untuk tujuan konservasi jangka panjang, konsentrasi 3% direkomendasikan sebagai konsentrasi awal, dengan evaluasi lebih lanjut untuk setiap spesies bakteri, dikarenakan respons terhadap kerapatan media dapat bervariasi.
2. Optimalisasi prosedur pewarnaan gram diperlukan, termasuk penggunaan kontrol positif dan negatif untuk memastikan hasil yang akurat. Pewarnaan berulang dengan waktu dekolorisasi yang lebih terkontrol dan penggunaan kultur bakteri yang segar dapat meningkatkan validitas interpretasi morfologi sel.
3. Temuan ini dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai dasar pengembangan teknik penyimpanan bakteri yang ramah lingkungan, murah, dan efisien, terutama untuk aplikasi bioteknologi lingkungan seperti biofertilizer atau agen bioremediasi. Oleh karena itu, penggunaan *gellan gum* dapat menjadi solusi alternatif bagi media penyimpanan konvensional yang lebih mahal dan kurang ramah lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdl Aali, R. A. K., & Al-Sahlany, S. T. G. (2024). *Gellan gum* as a Unique Microbial Polysaccharide: Its Characteristics, Synthesis, and Current Application Trends. *Gels (Basel, Switzerland)*, 10(3), 183. <https://doi.org/10.3390/gels10030183>
- Bertrand R. L. (2019). Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *Journal of bacteriology*, 201(7), e00697-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Bioeng A. J. B., (2023). Preservation of Viable Microorganisms in the Laboratory: An Overview of Basics, Methods and Practical Recommendations for Beginners. *Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 10(1), 1119.
- Brinke, M., Heininger, P., & Traunspurger, W. (2011). A semi-fluid *gellan gum* medium improves nematode toxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 1824–1831. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.007>
- Chilakamarry, C. R., Sakinah, A. M. M., Zularisam, A. W., & Pandey, A. (2021). Glycerol waste to value added products and its potential applications. *Systems microbiology and biomanufacturing*, 1(4), 378–396. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00036-w>
- Chang, I., Im, J., & Cho, G. C. (2016). Geotechnical engineering behaviors of *gellan gum* biopolymer treated sand. *Canadian Geotechnical Journal*. 1-38. <https://mc06.manuscriptcentral.com/cgj-pubs>
- Clark, W. A. (1976). Selected Bibliography of Literature on Preservation of Microorganisms, Blood, Tissues, and Vaccines with Emphasis on Freezing and Freeze-Drying (1968–1976).
- Costa, E. D., dkk. (2019). Fruit pastes with organic honey texturized with *gellan gum*: bioaccessibility of antioxidant activity and sensory analysis fruit pastes with gellan and organic honey. *Food Science and Technology*, 39(3). <https://doi.org/10.1590/fst.05518>
- Cuello, R. G., Fernandez, J. H., & Toro, R. O. (2025). Optimization of the Viability of Microencapsulated *Lactobacillus reuteri* in Gellan Gum-Based Composites Using a Box–Behnken Design. *J. Compos. Sci.* 2025, 9(8), 419; <https://doi.org/10.3390/jcs9080419>
- Das, N., dkk. (2015). Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Microbiotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00698>

- Descallar, F. B. A., & Matsukawa, S. (2020). Change of network structure in agarose gels by aging during storage studied by NMR and electrophoresis. *Carbohydrate Polymers*, 245, 116497. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116497>
- Deutch, C.E., Bui, A.P. & Ho, T. Growth of *Paenarthrobacter aurescens* strain TC1 on atrazine and isopropylamine during osmotic stress. *Ann Microbiol* 68, 569–577 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1364-9>
- De Vero, L., Boniotti, M. B., Budroni, M., Buzzini, P., Cassanelli, S., Comunian, R., Gullo, M., Logrieco, A. F., Mannazzu, I., Musumeci, R., Perugini, I., Perrone, G., Pulvirenti, A., Romano, P., Turchetti, B., & Varese, G. C. (2019). Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections. *Microorganisms*, 7(12), 685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Fatayati, I., dkk. (2023). Gambaran Cemaran Mikroba Terhadap Masa Simpan dan Kebersihan Penyimpanan Telur Ayam Ras. *Sentri: Jurnal Riset Ilmiah*, 2(5), 1674–1683.
- Ghosh, S., Kaushik, S., & Chauhan, R. S. (2021). Recent advances in microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and applications. *Biotechnology Advances*, 47, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107695>
- Gibson, W., Sanderson, G.R. (1997). *Gellan gum*. In: Imeson, A.P. (eds) *Thickening and Gelling Agents for Food*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2197-6_6
- Gomes. S., dkk (2023). Progress and opportunities in *Gellan gum*-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications. *Carbohydrate Polymers*, 311, 120782. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120782>
- Haastuti, U. S. (2008). *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Hattori, R., & Hattori, T. (1980). Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 26(1), 1–14. <https://doi.org/10.2323/jgam.26.1>
- Iacobellis, N. S., & Devay, J. E. (1986). Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water. *Applied and environmental microbiology*, 52(2), 388–389. <https://doi.org/10.1128/aem.52.2.388-389.1986>
- Ida, N. C., dkk. (2022). Metode Penyimpanan Mikroba *Saccharomyces cerevisiae* dengan Menggunakan Teknik Cryogenic Freezing di Laboratorium Biosain. *Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium*, 1(2), 67–72.
- Iqbal, M. (2023). Preservation of Bacteria and its Methods. *Microbial Notes*.

- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., & Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2391–2396. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2391-2396.2002>
- Jiayuan Liang, Yupeng Nie, Xuebing Ren, Ruiguo Li, Zhiqiang Xiong, Lianzhong Ai, and Yanjun Tian. (2025). *Gellan gum* Biosynthesis in Microorganisms: Current Status and Future Directions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2025 73 (22), 13195-13211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c02818>
- Khan. R., dkk. (2022). Bacterial polysaccharides—A big source for prebiotics and therapeutics. *Food Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1031935>
- Kurm, V., van der Putten, W. H., & Hol, W. H. G. (2019). Cultivation-success of rare soil bacteria is not influenced by incubation time and growth medium. *PloS one*, 14(1), e0210073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210073>
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lee, C. H., Kim, H. T., Yun, E. J., Lee, A. R., Kim, S. R., Kim, J. H., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2014). A novel agarolytic β -galactosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5965–5973. <https://doi.org/10.1128/AEM.01577-14>
- Lorenzo, G., dkk. (2013). Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl *gellan gum*. *Food hydrocolloids*, 30. 672-680. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.014>
- Mac, N., et al. (2017). Evaluation of *gellan gum* as an alternative gelling agent for bacterial culture media. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.00>
- Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1), 24–32.
- Mahmoud, Y. A., El-Naggar, M. E., Abdel-Megeed, A., & El-Newehy, M. (2021). Recent Advancements in Microbial Polysaccharides: Synthesis and Applications. *Polymers*, 13(23), 4136. <https://doi.org/10.3390/polym13234136>
- McCormack, A., Porcza, L. M., Leslie, N. R., & Melchels, F. P. W. (2024). *Gellan gum*-based granular gels as suspension media for biofabrication. *PloS One*, 19(11), e0312726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312726>
- Morgan, C. A., Herman. N., White. P. A., & Vesey. G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

- Mouro, C., Gomes, A. P., & Gouveia, I. C. (2024). Microbial Exopolysaccharides: Structure, Diversity, Applications, and Future Frontiers in Sustainable Functional Materials. *Polysaccharides*, 5(3), 241-287. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides5030018>
- Nijenhuis, K. (1997). *Gellan gum*. In: Thermoreversible Networks. Advances in Polymer Science, vol 130. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0008712>
- Noda, S., dkk (2008). Molecular structures of *gellan gum* imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. *Gellan gum* with various acyl contents in the presence and absence of potassium. Food Hydrocolloids. 22. 1148-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.007>
- Oliveira, J. T., dkk. (2010). *Gellan gum* Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering Applications: In Vitro Studies and Preliminary In Vivo Evaluation. Tissue Engineering: Part A, (16)1, 343-354. DOI: 10.1089=ten.tea.2009.0117
- Omoto, T., Uno, Y., Asai, I. (1999). The latest technologies for the application of *gellan gum*. In: Nishinari, K. (eds) Physical Chemistry and Industrial Application of *Gellan gum*. Progress in Colloid and Polymer Science, vol 114. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-48349-7_18
- Park, G., Jin, W.-Y., Jang, S.-J., Kook, J.-K., Choi, J.A., Park, G.C., Lee, M.-J., Park, S.-N., Li, X.M., Cho, S.-S., Jang, C.H., Kang, S.-H. and Moon, D.-S. (2015), Evaluation of four methods of assigning species and genus to medically important bacteria using 16S rRNA gene sequence analysis. Microbiol Immunol, 59: 285-298. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12254>
- Pelczar, MJ dan ECS. Chan,. (2006). Dasar-Dasar Mikrobiologi jilid II. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia UI - Press
- Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., & Dontsova, O. (2015). Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase. Acta naturae, 7(4), 22–33.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Zala, B. S., & Khutliwala, T. A. (2013). An insight into the emerging exopolysaccharide *gellan gum* as a novel polymer. Carbohydrate Polymers, 93(2), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.030>
- Putri, A. S. (2022). Keragaman Bakteri yang Berpotensi dalam Mendegradasi Mikroplastik di TPA Piyungan, Bantul, DIY. Environmental Engineering.
- Rygaard, A. M., Schmidt Thøgersen, M., Nielsen, K. F., Gram, L., & Bentzon-Tilia, M. (2017). Effects of gelling agent and extracellular signaling molecules on the culturability of marine bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 83(9).
- Sabbathini, dkk. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus Sphingomonas dari Daun Padi (Oryza sativa) di Area Persawahan Cibinong. Jurnal Biologi, 6(1), 59–64.

- Sanderson, G.R. (1990). *Gellan gum*. In: Harris, P. (eds) Food Gels. Elsevier Applied Food Science Series. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0755-3_6
- Senaratne, W. M. T. N., & Jayaweera, J. A. A. S. (2024). Comparison of microbial preservation methods: a narrative review. *Germs*, 14(4), 375–386. <https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447>
- Silvaa, N. A., dkk. (2012). The effects of peptide modified *gellan gum* and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate. *Biomaterials*, 33, 6345–6354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.050>
- Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y., & Harris, J. J., (2007). An Initial Evaluation of *Gellan gum* as a Material for Tissue Engineering Applications. *Journal Of Biomaterials Applications*, Vol. 22, 241-254. DOI: 10.1177/0885328207076522
- Ughy, B., Nagyapati, S., Lajko, D. B., Letoha, T., Prohaszka, A., Deeb, D., Der, A., Pettko-Szandtner, A., & Szilak, L. (2023). Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations. *Cells*, 12(10), 1430. <https://doi.org/10.3390/cells12101430>
- Upendra C. Galgatte, Amruta B. Kumbhar & Pravin D. Chaudhari (2014) Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation, *Drug Delivery*, 21:1, 62-73, DOI: <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.849778>
- Takahashi, R., Akutu, M., Kubota, K., Nakamura, K. (1999). Characterization of *gellan gum* in aqueous NaCl solution. In: Nishinari, K. (eds) *Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan gum*. Progress in Colloid and Polymer Science, vol 114. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-48349-7_1
- Wang, C., Gong, Y., Lin, Y., Shen, J., & Wang, D. A. (2008). A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1226–1234. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.03.008>
- Wati, R. Y. (2018). Pengaruh Pemanasan Media Plate Count Agar (PCA) Berulang Terhadap Uji Total Plate Count (TPC) di Laboratorium Mikrobiologi Teknologi Hasil Pertanian Unand. *Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Universitas Andalas Limau Manis Padang*. 1(2), 2621-0878
- Wu, T., Cheng, J., Zhang, J., Zhao, H., Sui, W., Zhu, Q., Jin, Y., & Zhang, M. (2022). Hypoglycemic Activity of Self-Assembled *Gellan gum*-Soybean Isolat Composite Hydrogel-Embedded Active Substance-Saponin. *Foods*, 11(22), 3729. <https://doi.org/10.3390/foods11223729>
- Yunisha, A. N. (2022). Potensi Bakteri dari Aliran Sungai Progo Yogyakarta sebagai Agen Bioremediasi Mikroplastik. *Environmental Engineering*.
- Zhang, Y. Q., Li, W. J., Zhang, K. Y., Tian, X. P., Jiang, Y., Xu, L. H., Jiang, c. L., & Lai, R. (2006). *Massilia dura* sp. nov., *Massilia albidiflava* sp. nov., *Massilia plicata* sp. nov. and *Massilia lutea* sp. nov., isolated from soils in China. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 459–463.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64083-0>

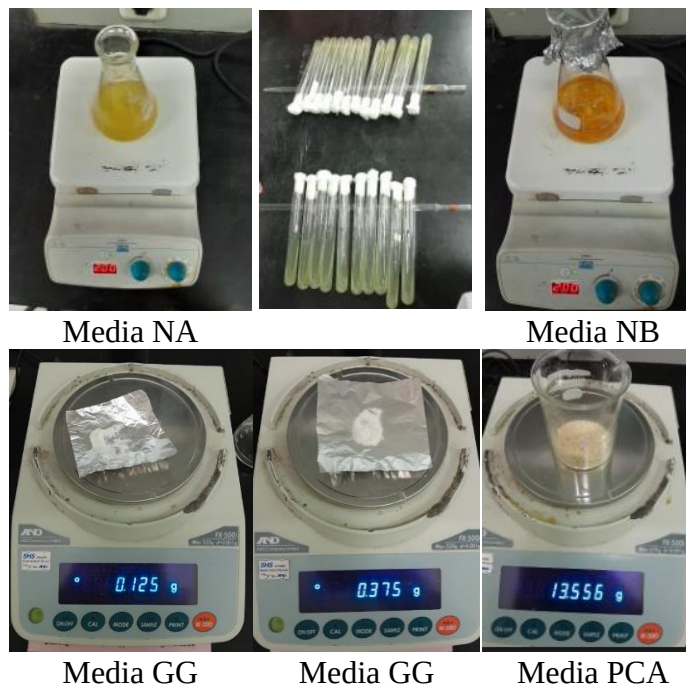
LAMPIRAN

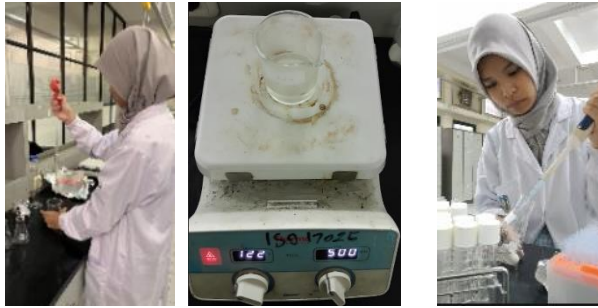
Lampiran 1 : Persiapan dan Sterilisasi Alat



Lampiran 1 Persiapan dan Sterilisasi Alat

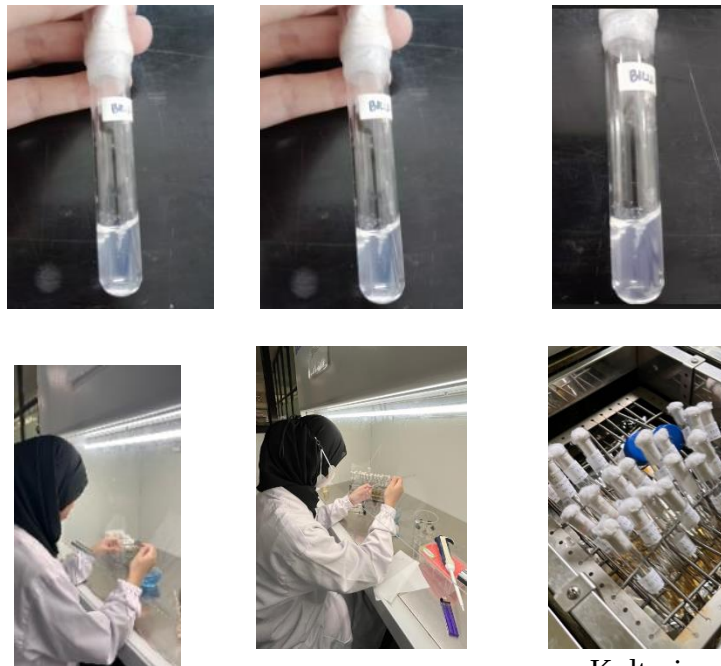
Lampiran 2 : Pembuatan Media





Lampiran 2 Pembuatan Media

Lampiran 3 : Inokulasi Bakteri



Kulturasasi di
waterbath shaker



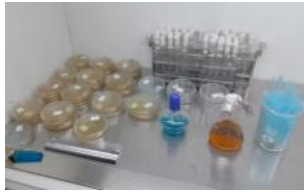
Inokulasi ke Media GG

Lampiran 3 Inokulasi Bakteri

Lampiran 4 *Total Plate Count* (TPC)

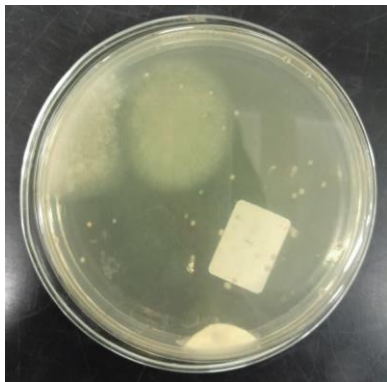
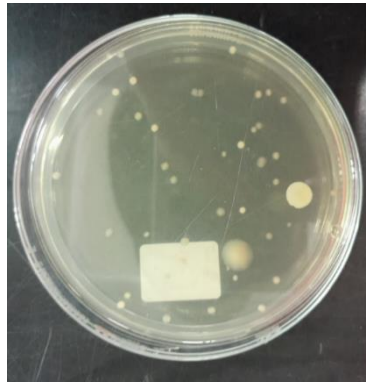
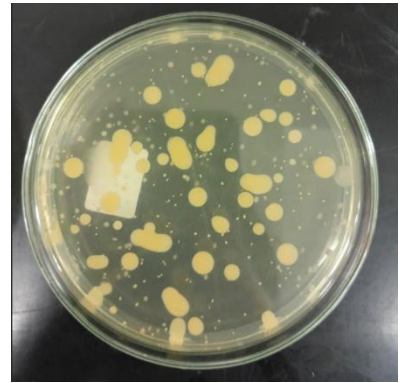
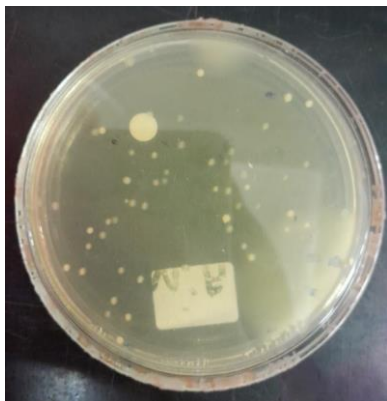
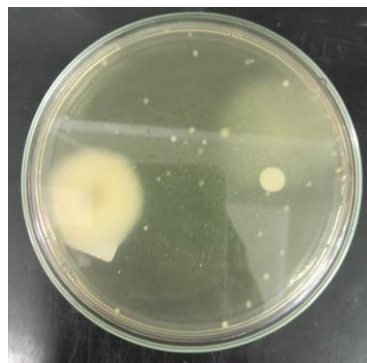
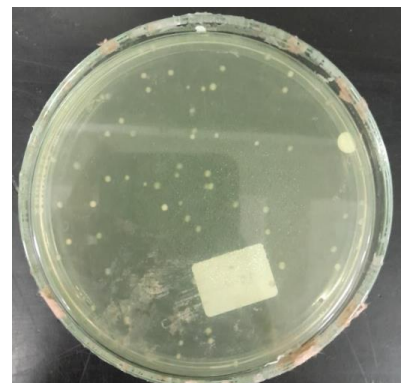
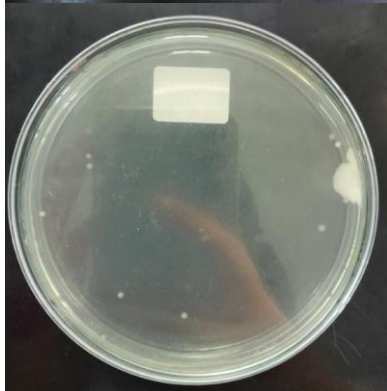
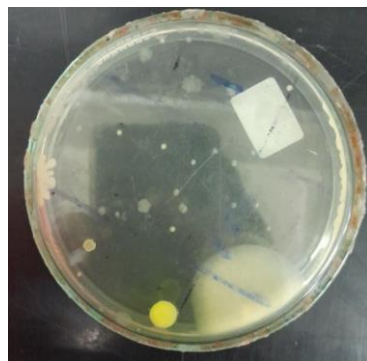
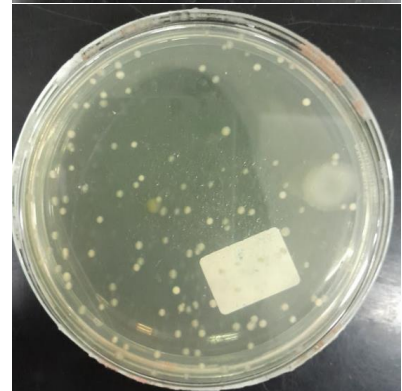
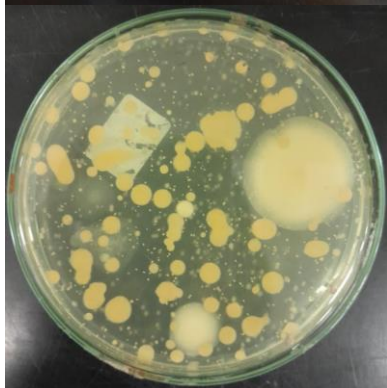
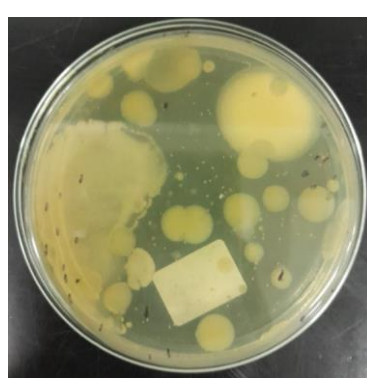


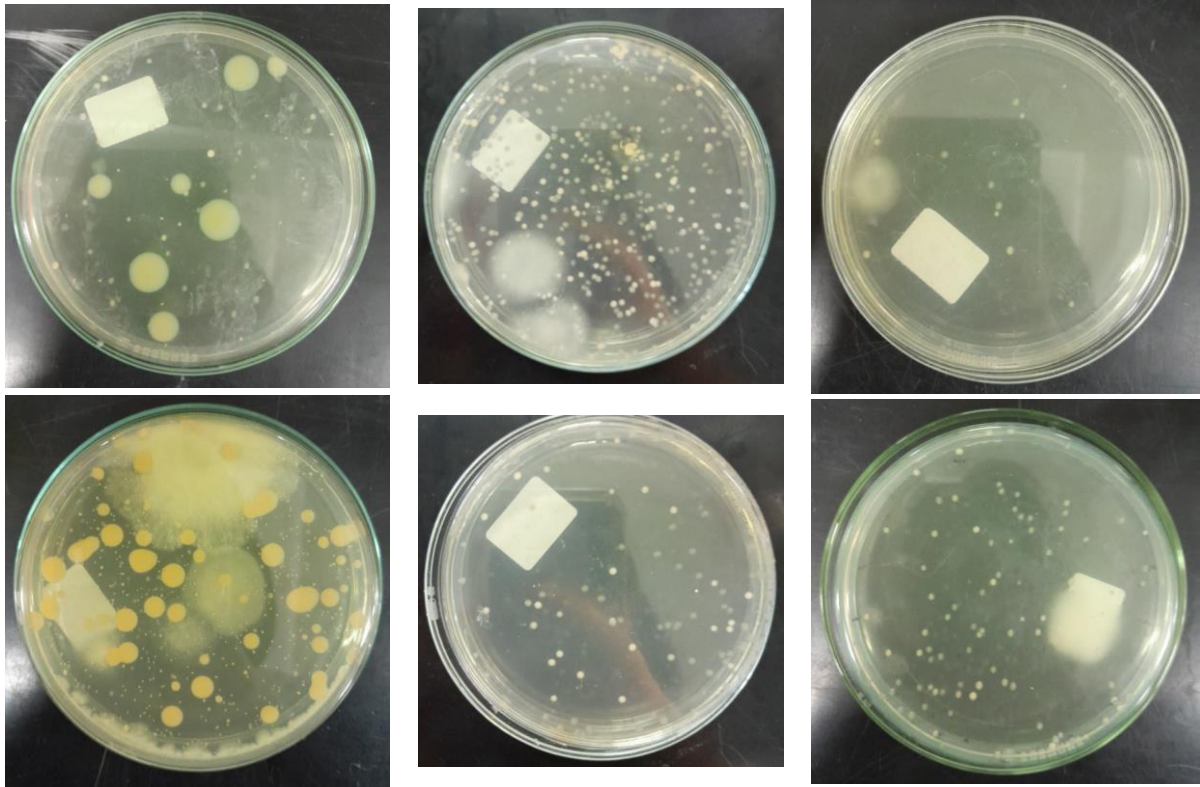
Pengenceran Serial



Lampiran 4 Pengujian Total Plate Count

Lampiran 5 Hasil TPC





Lampiran 5 Hasil TPC Hari ke-12

- **Data TPC**

Contoh Perhitungan TPC

Diketahui :

- Total koloni : 20 koloni
- Pengenceran : 10^{-5}
- Sampel yang diambil : 1 ml

Maka,

$$\text{TPC} = \frac{(\text{jumlah koloni}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume sampel}}$$

$$\text{TPC} = \frac{20 \times 10^5}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{TPC} = 2.000.000 \text{ CFU/ml atau } 2 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$$

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi Gellan gum	Pengenceran Hari ke-12								Standar Error
			Total Koloni Tumbuh				Koloni untuk TPC		Total Plate Count (CFU/ml)		
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
BR-1	Arthobaacter aurescens	2,5%	24	16	16	1	20	16	2x10^6	2x10^7	4
		3%	121	1	40	36	121	38	1x10^7	4x10^7	60
BR-12	Mesorhizobium loti	2,5%	303	293	57	28	298	43	3x10^7	4x10^7	5
		3%	330	319	104	9	325	57	3x10^7	6x10^7	5,5
BR-36	Massilia abidiflava	2,5%	345	236	278	125	291	202	3x10^7	2x10^8	54,5
		3%	245	90	70	59	168	65	2x10^7	6x10^7	77,5
BRU-12	Bradyrhizobium japonicum	2,5%	59	5	17	1	59	17	6x10^6	2x10^7	27
		3%	304	79	92	12	192	52	2x10^7	5x10^7	112,5

Kode Bakteri	Nama Bakteri	Konsentrasi Gellan gum	Pengenceran Hari ke-28								Standar Eror
			Total Koloni Tumbuh				Koloni untuk TPC		Total Plate Count (CFU/ml)		
			10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
BR-1	Arthrobacter aurescens	2,5%	1	0	0	0	1	0	1x10^7	0	0,5
		3%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BR-12	Mesorhizobium loti	2,5%	3	0	1	0	3	1	3x10^7	1x10^8	1,5
		3%	5	3	1	1	5	1	5x10^7	1x10^8	1
BR-36	Massilia abidiflava	2,5%	7	3	4	0	7	4	7x10^7	4x10^8	2
		3%	3	0	1	1	3	1	3x10^7	1x10^8	1,5
BRU-12	Bradyrhizobium japonicum	2,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3%	3	0	6	1	3	6	3x10^7	6x10^8	1,5

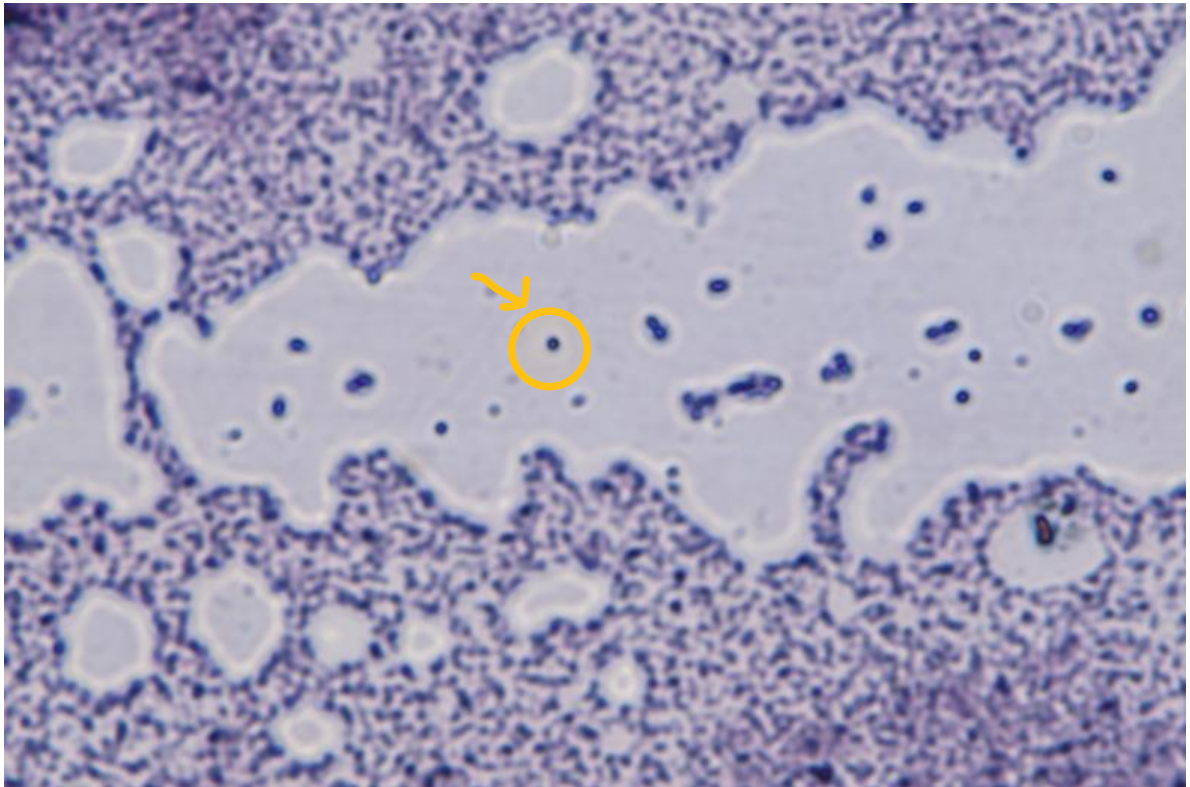
- **Perbandingan Konsentrasi Gellan gum**

Konsentrasi Gellan gum 2,5%				
Kode Bakteri	Nama Bakteri	Hari ke-0	Hari ke-12	Hari ke-28
BR-1	<i>Arthrobacter aureus</i>	0	2×10^6	1×10^7
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	0	3×10^7	3×10^7
BR-36	<i>Massilia abidiflava</i>	0	3×10^7	7×10^7
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0	6×10^6	5×10^7

Konsentrasi Gellan gum 3%				
Kode Bakteri	Nama Bakteri	Hari ke-0	Hari ke-12	Hari ke-28
BR-1	<i>Arthrobacter aureus</i>	0	1×10^7	4×10^7
BR-12	<i>Mesorhizobium loti</i>	0	3×10^7	5×10^7
BR-36	<i>Massilia abidiflava</i>	0	2×10^7	3×10^7
BRU-12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0	2×10^7	3×10^7

Lampiran 6 Pengujian Morfologi Sel dengan Pengecatan Gram

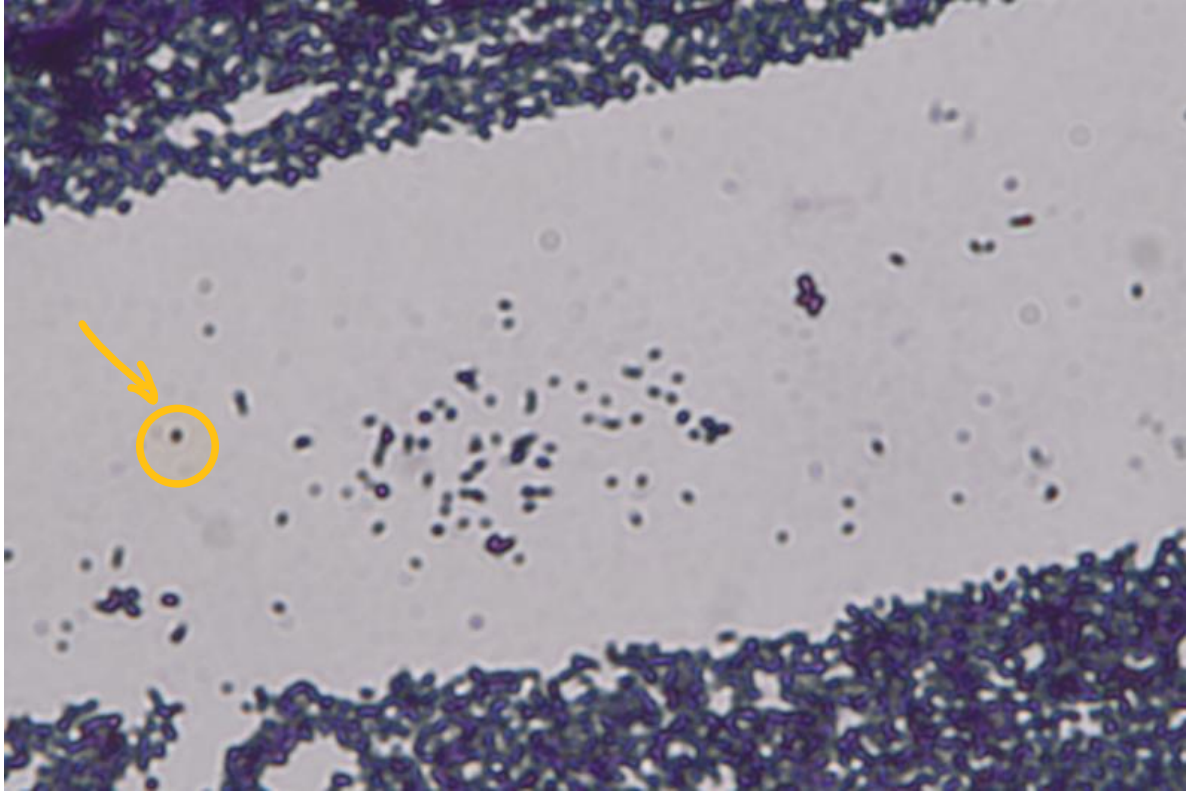
BR-1



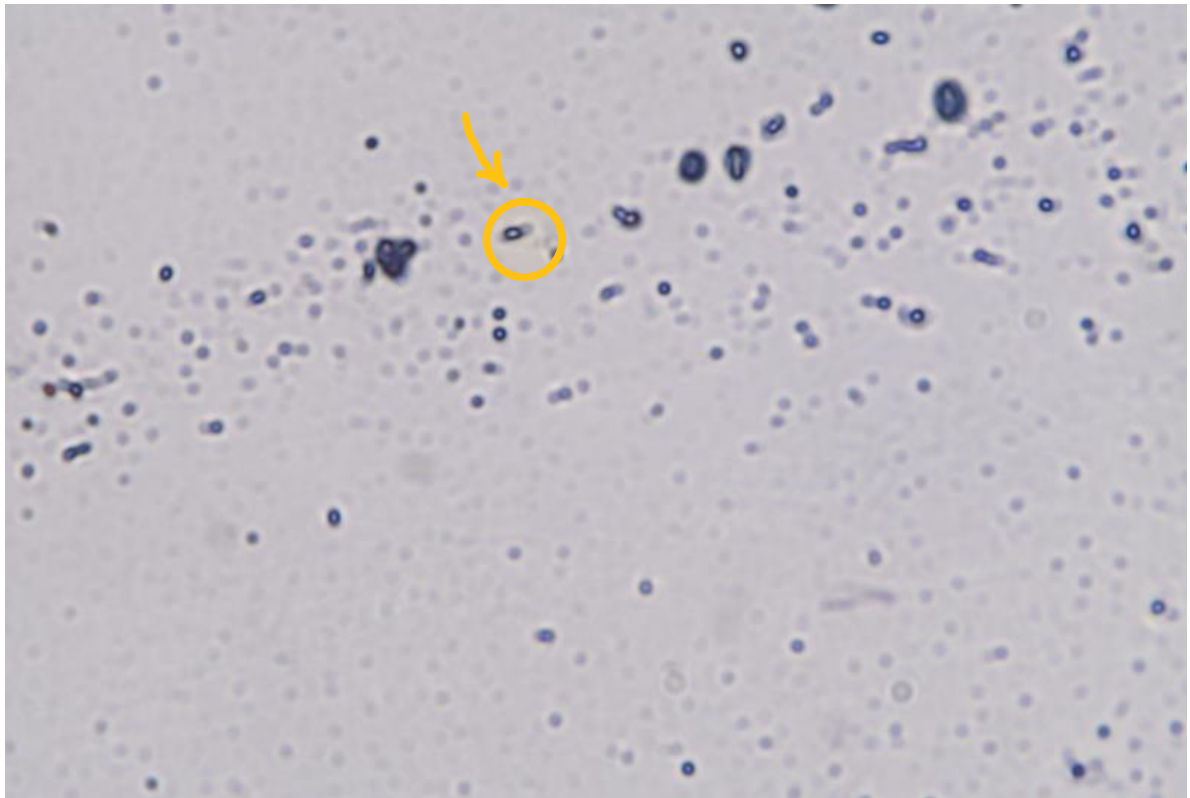
BR-12



BR-36



BRU-12



Lampiran 6 Hasil Pengamatan Pengecatan Gram

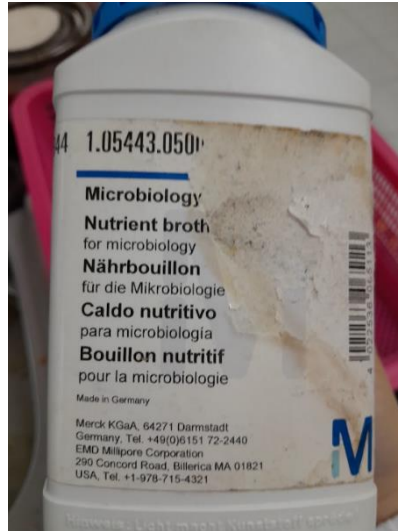
Lampiran 7 : Media yang digunakan saat penelitian



Gellan gum



Nutrient Agar



Nutrient Broth

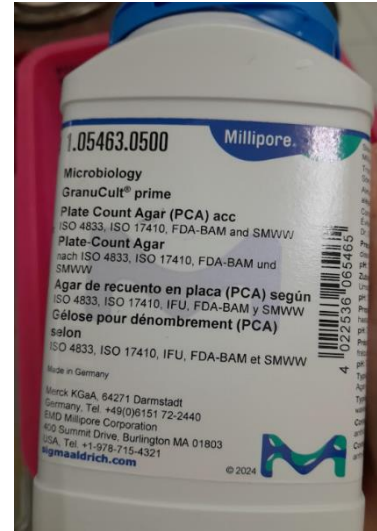


Plate Count Agar

Lampiran 7 Media yang Dipakai Selama Penelitian

- Contoh Perhitungan Pembuatan Media:

1. *Gellan gum*

Diketahui : Dalam media DNB 25 ml maka kebutuhan media GG, sebagai berikut :

- Konsentrasi GG 2,5%

$$\frac{x}{25 \text{ ml}} = \frac{2,5}{100 \text{ ml}}$$

$$x = 0,025 \times 25$$

$$x = 0,625 \text{ gram GG}$$

- Konsentrasi GG 3%

$$\frac{x}{25 \text{ ml}} = \frac{3}{100 \text{ ml}}$$

$$x = 0,03 \times 25$$

$$x = 0,750 \text{ gram GG}$$

2. *Nutrient Agar*

Diketahui: Media NA dalam 1 liter aquades = 20 gram

Maka, untuk membuat larutan NA 50 ml, sebagai berikut :

$$\frac{x}{50 \text{ ml}} = \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}}$$

$$x = 0,02 \times 50$$

$$x = 1 \text{ gram NA}$$

3. *Nutrient Broth*

Diketahui: Media NB dalam 1 liter aquades = 8 gram

Maka, untuk membuat larutan NB 50 ml, sebagai berikut :

$$\frac{x}{50 \text{ ml}} = \frac{8 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}}$$

$$x = 0,008 \times 50$$

$$x = 0,4 \text{ gram NB}$$

4. *Plate Count Agar*

Diketahui: Media PCA dalam 1 liter aquades = 22,5 gram

Maka, untuk membuat larutan PCA 550 ml, sebagai berikut :

$$\frac{x}{550 \text{ ml}} = \frac{22,5 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}}$$

$$x = 0,0225 \times 550$$

$$x = 12,375 \text{ gram PCA}$$

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir pada tanggal 28 Maret 2003 di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. Penulis merupakan anak kelima dari pasangan Bapak Wawan Setiawan dan Ibu Siti Junasih. Pendidikan formal yang ditempuh penulis mulai dari pendidikan di TKA Darul Ulum Tejamaya, Tasikmalaya. Kemudian, penulis melanjutkan pendidikan dasar di SD Negeri Tejamaya dan selesai pada tahun 2015. Setelah itu, penulis melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 1 Rajapolah, yang berhasil diselesaikan pada tahun 2018. Pendidikan menengah atas dilanjutkan di SMA Negeri 6 Tasikmalaya dan lulus pada tahun 2021.

Pada tahun 2021, penulis diterima sebagai mahasiswa di Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia. Saat ini, penulis sedang menyelesaikan penelitian Tugas Akhir sebagai bagian dari syarat kelulusan bagi pendidikan Strata 1 (S1) di Program Studi Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia. Selama masa studi, penulis aktif mengikuti berbagai kegiatan akademik maupun non-akademik. Penulis mengikuti berbagai kegiatan jurusan, dan pada semester 5 penulis ikut berpartisipasi sebagai sekretaris Departemen Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa Teknik Lingkungan (PSDM). Kemudian, di semester 6 pada bulan Maret 2024 sampai Mei 2024, penulis telah melaksanakan Kerja Praktik di PT. Kubota Indonesia, Semarang sebagai bagian dari syarat studi akademik. Topik yang penulis ambil yaitu “Analisis Sistem *Wastewater Treatment* pada Pengolahan Air Limbah di PT. Kubota Indonesia”. Setelah itu, penulis mengikuti program Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Dusun Klile, Sukoharjo, Jawa Tengah, yang berpartisipasi dalam pengabdian kepada masyarakat. Serta penulis aktif dalam kegiatan akademik lainnya yang mendukung penelitian penulis melalui kegiatan asisten praktikum Kimia Dasar pada tahun 2024 dan asisten praktikum Mikrobiologi Lingkungan pada tahun 2025.