

MODIFIKASI MEDIA ALTERNATIF DARI SAYURAN UNTUK ANALISIS KUANTITATIF PERTUMBUHAN MIKROORGANISME ASAL TANAH GAMBUT KALIMANTAN BARAT DENGAN METODE TPC

Rezekikasari¹³, Rudi Harianto^{2,3}

¹Staf Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah (PLP Tingkat Keahlian Muda)

²Staf Laboratorium Ekofisiologi (PLP Tingkat Mahir)

³Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura, Pontianak

*Penulis Korespondensi, Email: rezekispi@yahoo.co.id

ABSTRACT

Medium formulations for quantitative testing and isolation of microorganism from peat soils, require adequate nutrition. This needs to be supported by the type of substrate and incubation conditions that support each other. Isolation media used mostly though available, but the price is quite high. This is what underlies the need to find alternative sources of new substrates that can support the growth of microbes from peat soils. Some of these ingredients include, carrots, Gembili Bulbs, tomatoes, and pumpkin which are abundantly available in West Kalimantan. This study shows that the best substrate in isolation of bacteria and fungi from peat is Gembili Bulbs with a total colony of 26×10^5 (CFU / gr) and fungi of 10×10^5 (CFU / gr). Peat bacteria and fungus cannot grow on carrot and pumpkin substrate media as indicated by the absence of growing microbial colonies. The best formulation of microbial isolation media with Gembili Bulbs is also supported by the highest C / N ratio of 44.8.

Key Words : Bacteria, Fungi, Quantitative, Pour Plate Methode, TPC

PENDAHULUAN

Mikrobiologi tanah merupakan salah satu ilmu yang mempelajari perkembangan mikroorganisme tanah, sehingga perlu didukung dengan media pertumbuhan yang baik. Medium adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran bahan makanan atau nutrient untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme tersebut. Media berfungsi untuk menumbuhkan mikroba, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah mikroba, dimana dalam proses pembuatannya harus disterilisasi dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media. Media pertumbuhan yang digunakan harus memenuhi persyaratan nutrisi yang dibutuhkan oleh suatu mikroorganisme (Atlas, 2004). Nutrisi yang dibutuhkan

mikroorganisme untuk pertumbuhannya meliputi Karbon, Nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, vitamin, air, dan energy (Cappucino, 2014).

Pengembangan formulasi media terus dilakukan yang dipengaruhi oleh semakin mahalnya harga media instant yang mencapai Rp 500.000,- hingga Rp 1.500.000,- setiap 500 g, padahal bahan baku alami yang dapat digunakan melimpah. Persyaratan utama bahan yang digunakan harus mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba seperti karbohidat dan protein. Penelitian yang dilakukan terus dikembangkan untuk menemukan media alternative bagi pertumbuhan mikroorganisme dari bahan-

bahan yang mudah ditemukan di alam. Beberapa bahan alami yang digunakan sebagai sumber protein antara lain kacang tunggak, kacang hijau, kacang kedelai hitam (Arulananthan, 2012).

Media alternative dari sayuran yang sering digunakan seperti wortel, tomat, kubis, dan labu (Deivanayaki, 2012), dan sari buah seperti buah alpukat, dan bit (Al-Azzauy, 2011). Selain itu ditemukan pula bahwa media pertumbuhan dengan sumber karbohidrat berbeda seperti ubi rambat, singkong, kentang, umbi Palmirah, bahkan sagu memberikan pengaruh berbeda bagi pertumbuhan bakteri (Kwoseh 2012).

Selain bahan-bahan tersebut diketahui terdapat beragam sumber karbohidrat lain seperti Umbi Cilembu, Umbi Wortel, labu kuning, dan tomat yang potensinya besar digunakan sebagai sumber nutrient terbaru. Bahan-bahan alami ini selain berpotensi juga tersedia melimpah di pasaran, sehingga akan memudahkan dalam penyiapan bahan baku dan pengolahan. Hingga saat ini penggunaan bahan tersebut belum banyak dilakukan khususnya dalam pengembangan mikroba spesifik asal lahan gambut. Hal inilah yang mendasari perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas penggunaan Umbi Cilembu, wortel, labu kuning, dan tomat sebagai sumber nutrient baru dalam formulasi agar media isolasi bakteri dan cendawan asal lahan gambut Kalimantan Barat.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu Januari – April 2019. Tempat pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Tanah dan Kimia Lingkungan, Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura.

Bahan Penelitian.

Bahan yang digunakan meliputi sampel tanah gambut, umbi Cilembu, wortel, labu kuning, dan tomat segar yang diperoleh dari Pasar Flamboyaan Pontianak, akuades, Agar, media Nutrient Agar instant (Merck), gula pasir, Alkohol 70%, kapas, tissue, Bunsen, Akuades, dan sampel tanah gambut dan Klorox 3%.

Pengumpulan Sampel

Sampel penelitian merupakan tanah gambut, yang diperoleh dari Jalan Sekunder C, Desa Rasau Jaya III, Kabupaten Kubu Raya. Tanah diambil dengan metode purposive sampling, yaitu dengan mengambil tanah gambut pada kedalaman 5-10 cm pada beberapa titik berbeda dalam areal lahan yang belum diolah. Sebanyak 1000 gr dari 10 titik berbeda digabungkan dan dikompositkan hingga homogen, lalu disimpan pada kondisi gelap dengan suhu 15°C hingga siap diisolasi.

Formulasi Media Untuk Pertumbuhan Bakteri

Formulasi media ditentukan berdasarkan persyaratan substrat yang memiliki C/N rasio yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri gambut. Sumber Nitrogen yang digunakan adalah Pepton 0,5% yang digunakan pada semua komposisi media yang digunakan, dengan pematat menggunakan Agar dengan proporsi 1,5% dari total volume akhir media yang dibuat.

Percobaan dilakukan menggunakan 4 perlakuan, sebanyak 2 kali ulangan, sebagai berikut:

- Perlakuan 1 : media umbi Gembili 20% dengan Pepton 0,5%
- Perlakuan 2 : Media wortel 20% dengan Pepton 0,5%
- Perlakuan 3 : Media labu kuning 20% dengan Pepton 0,5%

Perlakuan 4 : media tomat 20% dengan Pepton 0,5%

Kontrol : media nutrient agar instant

Seluruh media diatur tingkat keasamannya pada pH 6, lalu disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Selanjutnya media digunakan untuk isolasi bakteri dan cendawan asal gambut, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pertumbuhan mikroorganisme diamati dengan metode TPC (*total plate count*). Parameter utama yang digunakan untuk menentukan perlakuan terbaik adalah perlakuan media yang memberikan jumlah bakteri gambut terbanyak. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA).

Isolasi Bakteri Asal Gambut dengan Metode Tuang (Pour Plate)

Isolasi dilakukan dengan mengambil 1 gr sampel tanah gambut, ke dalam 9 mL akuadest steril untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya dilakukan resuspensi larutan dan diambil kembali 1 mL sampel ke dalam 9 mL akuades sebagai pengenceran 10^{-2} . Lakukan hal yang sama secara berulang untuk mendapatkan pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Kemudian diambil 1 mL dari masing-masing tabung pengenceran lalu diinokulasikan secara aseptis ke dalam Petri kosong steril. Selanjutnya dilakukan penuangan media uji sesuai perlakuan formulasi sebanyak ± 15 mL dan dilakukan gerakan memutar cawan Petri mengikuti pola angka delapan. Sampel tersebut lalu diinkubasi pada suhu 37°C yang selama 2x24 jam.

Perhitungan Jumlah Sel Dengan Test Plate Count (TPC)

Jumlah koloni bakteri dapat dihitung setelah dilakukan inkubasi suhu selama 48 jam, sedangkan cendawan dihitung setelah

diinkubasi selama 96 jam. Koloni bakteri dapat dihitung dengan rumus *Standard Plate Count* sebagai berikut :

$$N = \Sigma C / \{[(1 * n_1) + (0,1 * n_2) + \dots] * (d)\}$$

Di mana :

N = jumlah koloni per mL atau per gram produk

ΣC = jumlah semua koloni yang dihitung dari 2 cawan

n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama

n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua

d = pengenceran pertama yang dihitung

Limit deteksi metode plating berkisar antara 25 hingga 250 koloni. Ketika dalam cawan terdapat koloni kurang dari 25, maka dalam pelaporannya dikatakan bahwa jumlahnya $< 2,5 \times 10^1$ CFU/mL jika tidak ditemukan koloni dalam cawan hingga pengenceran terendah, maka pelaporannya sebanyak $1,05 \times 10^1$ CFU/mL. Namun, jika koloninya melebihi 250, maka dianggap sebagai TBDU (Tidak Bisa Untuk Dihitung). Dengan demikian, hanya cawan yang tumbuh koloninya berkisar 25 hingga 250 saja yang dapat dihitung sebagai jumlah koloni bakteri yang diinokulasikan.

Karakterisasi Morfologi Koloni Isolat Bakteri

Identifikasi mikroorganisme tanah gambut dilakukan secara makroskopis. Pengamatan makroskopis bertujuan untuk mengamati morfologi koloni yang tumbuh pada media isolasi yaitu meliputi pengamatan bentuk koloni, dan warna koloni. Selain itu dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi koloni yang dimiliki.

Analisis C/N Rasio

Analisis komponen C dalam sampel dilakukan dengan metode Walkley dan Black (AOAC 1999), sedangkan analisis komponen

N dalam sampel dilakukan dengan metode Kjeldahl (AOAC 1980). Analisis ini dilakukan oleh jasa analisis di Laboratorium Kimia Tanah, Universitas Tanjungpura.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode deskriptif yaitu dengan mendeskripsikan hasil *Total Plate Count* pada sampel tanah. Analisis tersebut akan disajikan sesuai *Standard Plate Count* (SPC) dan dalam bentuk tabel untuk mempermudah dalam pembacaan, untuk kemudian ditarik kesimpulan berdasarkan kecocokan jenis media dalam mengisolasi mikroba asal lahan gambut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berbeda Total Kelimpahan Bakteri dan Cendawan Gambut Pada Media

Hasil penelitian yang dilakukan menemukan bahwa, setiap media yang digunakan memiliki kelimpahan mikroba yang berbeda-beda. Perhitungan jumlah mikroba yang dilakukan berdasarkan total koloni yang tumbuh menunjukkan dari kelima jenis media yang digunakan kelompok bakteri lebih banyak tumbuh dibandingkan cendawan. Pengamatan menunjukkan bahwa kelimpahan koloni bakteri tertinggi adalah pada media Nutrient Agar yaitu total 421×10^5 CFU/gr, sedangkan Ubi Gembili sebanyak 26×10^5 CFU/gr, dan Tomat 17×10^5 CFU/gr. Akan tetapi pada media yang menggunakan substrat asal Wortel dan labu sama sekali tidak ditumbuhi bakteri (Tabel 1).

Tabel 1. Total Bakteri Asal Gambut Pada Beberapa Media Berbeda

No.	Jenis Media	Isolat	Kelimpahan Koloni (Jlh x 10 ⁵ CFU/gr)	Karakterisasi Koloni			
				Form	Elevation	Margin	Colour
1.	Nutrien agar	Sp1	136	circular	convex	entire	Putih
		Sp 2	36	circular	raised	entire	Putih kusam
		Sp 3	249	spindel	raised	entire	Putih mengkilap
2.	Ubi gembili	Sp 3	5	spindel	raised	entire	Putih mengkilap
		Sp 4	21	irreguler	flat	undulate	Putih mengkilap
3.	Tomat	Sp 1	7	circular	convex	entire	Putih
		Sp 5	10	irreguler	raised	undulate	Putih mengkilap
4.	Wortel	Tidak ditemukan koloni					
5.	Labu kuning	Tidak ditemukan koloni					

Sumber Data: Hasil eksperimen laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Untan 2019.

Pengamatan yang dilakukan pada beberapa jenis media berbeda substrat menemukan bahwa pertumbuhan golongan cendawan lebih sedikit dibandingkan golongan bakteri. Penelitian menunjukkan bahwa Media dengan Umbi Gembili lebih

baik digunakan berdasarkan total kelimpahan koloni cendawan yang dilakukan yaitu sebesar 10×10^5 CFU/gr, sementara media Nutrient Agar hanya 4 koloni cendawan saja (Tabel 2).

Tabel 2. Total Cendawan Asal Gambut Pada Beberapa Media Berbeda

No.	Jenis Media	Isolat	Kelimpahan Koloni (Jlh x 10 ⁵ CFU/gr)	Karakterisasi Koloni	
				Warna	Tekstur
1.	Nutrien Agar	Sp 1	1	putih	Rapi
		Sp 2	1	Putih bening	merambat
2.	Ubi Gembili	Sp 2	2	Putih bening	merambat
		Sp 4	2	Putih	Tidak rata, menyebar
		Sp 6	4	Putih	Tidak rata, menyebar
		Sp 7	2	Hijau	Kasar, menyebar
3.	Tomat	Sp 8	1	Hitam	seperti titik titik
		Sp 3	1	Putih	Bentuk sabit
		Sp 4	1	Putih	Tidak rata, menyebar
		Sp 5	1	Putih	Seperti jaring laba-laba
4.	Wortel		Tidak ditemukan hifa dan spora		
5.	Labu Kuning	Sp 1	1	Putih	Rapi

Sumber Data: Hasil eksperimen laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Untan 2019.

Media yang digunakan dalam aplikasi isolasi dan perhitungan kelimpahan mikroorganisme gambut ini sangat berpengaruh terhadap total mikroba yang diamati. Hal ini diduga dipengaruhi oleh komposisi susbtat penyusun media yang digunakan. Pemberian beberapa sayuran

berperan penting dalam penyediaan kebutuhan Carbon dan Nitrogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, Media Labu memiliki C/N rasio tertinggi yaitu 32, sedangkan C/N rasio terendah adalah Nutrient Agar (Tabel 3).

Tabel 3. Nilai C/N Rasio Beberapa Media Isolasi Bakteri Asal Tanah Gambut

No.	Jenis Media	Parameter Analisis		
		Walkley & Black	Kjeldhal	Rasio
		C-Organik (%)	N-Total (%)	C/N
1.	Nutrient Agar	1,29	0,21	6,14
2.	Wortel	1,93	0,08	24,13
3.	Labu	1,6	0,05	32
4.	Gembili	2,24	0,05	44,8
5.	Tomat	1,98	0,06	33

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ketersediaan nutrisi yang terdapat masing-masing media sangat berpengaruh terhadap jenis dan kelimpahan dari mikroorganisme yang akan tumbuh. Beberapa media yang diamati menunjukkan bahwa tidak terdapat isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media yaitu wortel dan labu kuning. Sebaliknya jika nutrisi yang dibutuhkan sangat kurang, maka sel-sel harus menyesuaikan dengan lingkungan dan pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat membutuhkan waktu yang lebih lama (Madigan *et al*, 2011).

Pengamatan kelimpahan koloni cendawan dan bakteri menemukan bahwa pada labu kuning hanya sedikit ditumbuhi oleh cendawan, sedangkan pada media wortel tidak ditumbuhi sama sekali baik bakteri maupun cendawan. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa kedua bahan tersebut mengandung senyawa nutrisi yang lebih rendah dibandingkan oleh Nutrien Agar, Kemili, dan tomat, sehingga tidak dapat mendukung pertumbuhan mikroba. Ketersediaan nutrisi yang mencukupi sangat berpengaruh pada cepat atau tidaknya pertumbuhan bakteri (Yunita, *et al*. 2015). Selain itu hasil inkubasi pada media wortel menemukan bahwa tidak terdapat pertumbuhan sama sekali mikroorganisme baik golongan cendawan maupun bakteri.

Hal ini diduga dipengaruhi oleh kandungan senyawa inhibitor yang terdapat pada wortel sehingga menghambat pertumbuhan baik bakteri maupun cendawan.

Pengamatan terhadap jenis dan kelimpahan mikroba asal lahan gambut dengan menggunakan beberapa media berbeda dilakukan menggunakan metode *Test Plate Count* (TPC) yaitu perhitungan jumlah bakteri sesuai dengan pengenceran yang dilakukan secara duplo. Penelitian menemukan bahwa koloni bakteri memiliki sifat-sifat khusus dalam media padat (Dwijoseputro, 2005). Pada agar lempengan bentuk koloni dilukiskan sebagai titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar dan kumparan Dwijoseputro (2005). Permukaan koloni bakteri dapat rata, timbul datar, melengkung, mencembung, membukit, dan serupa kawah. Sedangkan tepian koloni dapat berbentuk utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, dan keriting. Pada warna, koloni bakteri sebagian besar berwarna keputihan atau kekuningan, akan tetapi dapat juga berwarna lain seperti kemerahan, coklat, jingga, biru, hijau dan ungu.

Karakterisasi morfologi makroskopis yang dilakukan menemukan bahwa koloni bakteri yang tumbuh memiliki perbedaan ciri morfologi. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan jenis media yang

paling banyak ditumbuhi jenis media yaitu Media Nutrient Agar dan Ubi gembili yang masing-masing ditumbuhi 3 jenis isolat bakteri, sementara media dengan tomat hanya ditumbuhi dua jenis isolat bakteri berbeda. Karakteristik warna dari keseluruhan koloni bakteri yang diamati menunjukkan bahwa sebagian besar isolate yang tumbuh berwarna putih kusam hingga putih mengkilap.

Kualitas dan kuantitas bahan organik yang ada dalam tanah mempunyai pengaruh langsung terhadap jumlah cendawan dalam tanah, sifat kebutuhan nutrisinya yang heterotrofik Subba Rao, 1985). Selain itu diketahui pula bahwa cendawan tanah hidupnya tergantung ketersediaan bahan organik dan sangat sensitive terhadap tanah kering, sehingga tanah kering mempunyai kandungan cendawan yang rendah.

Selain itu hasil analisis C/N rasio yang mempunyai nilai berbeda-beda juga diduga memegang peranan besar dalam meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme. Berdasarkan penelitian Yeni (2016), sumber karbon yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri adalah media (20% masing-masing bahan sayur berupa umbi cilembu, wortel, labu kuning, dan tomat) + 5% glukosa (rasio C/N 7,4). Salah satu aspek yang penting untuk pertumbuhan bakteri adalah rasio organik Carbon dengan nitrogen (C/N). Rasio C/N bahan organik adalah perbandingan antara banyaknya kandungan unsur Carbon (C) terhadap banyaknya kandungan unsur Nitrogen pada suatu bahan organik. Analisis C/N rasio dilakukan dengan menganalisis kadar C organik dan kadar N total pada media.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menemukan bahwa media yang paling baik digunakan dalam isolasi bakteri asal tanah gambut adalah media ubi gembili dengan total koloni 26 isolat, sedangkan isolasi golongan cendawan adalah menggunakan media Ubi gembili sebanyak 10 isolat cendawan. Media ini memiliki nilai C/N rasio tertinggi yaitu 44,8. Berdasarkan penelitian juga diketahui bahwa media isolasi mikroorganisme gambut sebaiknya tidak menggunakan substrat wortel dan labu kuning karena tidak ditumbuhi oleh koloni cendawan dan bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1980. *Official Methods of Analysis*. Washington DC (US): Assoc of Official Analytical Chemist.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1999. *Official Methods of Analysis*. Washington DC (US): Assoc of Official Analytical Chemist.
- Al-azzaury, Ahmed A.M., and Salman, A.M.H. 2011. The Beetroot Juice As A Bacterial Growth And Maintenance Medium For Many Pathogenic Bacteria.
- Arulanantham, Ravathie., Pathmanathan, Sevel., Ravimannan , Nirmala., and Niranjana , Kularajany. 2012. "Alternative Culture Media for Bacterial Growth Using Different Formulation of Protein Sources". *Journal of Natural Product and Plant Resource*, 2 (6):697-700.

- Atlas, Ronald M. 2004. *Handbook of Microbiological Media fourth Edition Volume 1*. United States Of America: CRC Press.
- Cappuccino, James G and Sherman Natalie. 2013. *Manual Laboratorium Biologi*. Jakarta: EGC.
- Deivanayaki, M., and Iruthayaraj , P. A. 2012. "Alternative vegetable nutrient source for microbial growth". *International Journal of Biosciences (IJB)*, 2 (5):47-51.
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Kwoseh, C.K., Darko. M. A., and Adubofour , K. 2012. "Cassava Starch-Agar Blend as Alternative Gelling Agent for Mycological culture media". *Bots. J. Agric Appl Sci*, 8 (1): 8-15.
- Madigan, Michael T, David P. Clarck, David Stahl, John M. Martinko. 2011. *Brock Microbiology of microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings publishing.
- Subba RNS. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UI-Press.
- Yeni. 2016. Pengembangan starter bakteri asam laktat menggunakan substrat *whey* tahu. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.