

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Produksi Minyak Mentah (*Crude Oil*)

Minyak mentah atau *crude oil* merupakan campuran yang kompleks. Komponen yang bervariasi ini membuat pengolahan minyak mentah melewati tahapan yang cukup rumit hingga akhirnya dapat digunakan. Mulai dari minyak berat yang tenggelam dalam air hingga material yang penampakkannya menyerupai minyak tanah atau bensin.

Minyak bumi ditemukan dalam resevoir-resevoir yang terdapat dalam perut bumi atau di bawah samudra. Minyak tanah di ekstraksi secara vertikal melalui pipa yang relatif kecil dan bertekanan tinggi. Proses ini mengekstraksi minyak, air dan campuran gas (hidrokarbon sederhana, CO₂, H₂S, dan juga sejumlah kecil N₂ dan gas- gas inert) dari formasi batuan ke permukaan bumi (Ruschau *et al.*, 2006)

2.2 Bioremediasi

Bioremediasi merupakan penggunaan mikroorganismenya yang telah dipilih untuk ditumbuhkan pada polutan tertentu sebagai upaya untuk menurunkan kadar polutan tersebut. Pada saat proses bioremediasi berlangsung, enzim-enzim yang diproduksi oleh mikroorganismenya memodifikasi struktur polutan beracun menjadi tidak kompleks sehingga menjadi metabolit yang tidak beracun dan berbahaya. (Priade, 2012).

Bioremediasi didefinisikan sebagai aplikasi dari prinsip proses biologis pada penyisihan senyawa kimia berbahaya di air tanah dan lumpur (Cookson, 1995). Pelaku utama degradasi kontaminan adalah

mikroorganisme yang memanfaatkan senyawa pencemar sebagai substrat/sumber karbon atau energi.

Merujuk pada Lovley (1995), bioremediasi dapat terjadi secara intrinsik dan direkayasa (*engineered*). Bioremediasi intrinsik adalah bioremediasi yang berlangsung dengan sendirinya tanpa campur tangan manusia karena kondisi lingkungan menunjang (nutrien tersedia) dan mikroba yang berperan dalam jumlah yang mencukupi (Anas, 1997).

Namun demikian sering kali faktor lingkungan tidak optimal sehingga tidak memungkinkan terjadinya bioremediasi intrinsik sehingga memerlukan perbaikan faktor lingkungan, hal ini disebut *engineered bioremediation*.

Tabel 2.1 Kelebihan dan Kelemahan Bioremediasi (Wisnjuprpto, 1996)

Kelebihan	Kekurangan
Dapat dilakukan dislokasi /diluar lokasi	Tidak semua bahan kimia dapat diolah secara bioremediasi
Sistem biologi adalah sistem yang murah	Mebutuhkan pemantauan yang intensif
Masyarakat dapat menerima dengan baik	Mebutuhkan lokasi tertentu
Ramah Lingkungan	Berpotensi menghasilkan produk yang tidak dikenal
Menghilangkan resiko jangka panjang	

Beberapa faktor yang diperlukan proses biologi dalam mendegradasi kontaminan antara lain (Cookson, 1995);

1. Keberadaan mikroorganisme pendegradasi kontaminan.
2. Keberadaan substrat yang menjadi sumber karbon.
3. Keberadaan *inducer* yang dapat mendorong pembentukan enzim spesifik.
4. Keberadaan sistem akseptor – donor elektron.

5. Kondisi lingkungan yang mendukung reaksi katalisis enzim.
6. Nutrien yang menunjang pertumbuhan bakteri dan produksi enzim.
7. Kisaran temperatur yang mendukung aktivitas mikrobial dan reaksi katalisis.
8. Tidak adanya material/substansi yang bersifat toksik terhadap mikroorganisme pendeградasi.
9. Keberadaan organisme yang dapat mendeградasi produk metabolit.
10. Keberadaan organisme yang dapat mencegah terbentuknya senyawa toksik
11. Kondisi lingkungan yang dapat meminimasi organisme kompetitif yang berkaitan dengan keberlangsungan reaksi.

2.3 Nutrisi

Sama halnya dengan makhluk hidup lainnya, mikroba memerlukan suplai nutrisi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan selnya. Unsur-unsur dasar tersebut adalah : Karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, sulfur, fosfor, zat besi dan sejumlah kecil logam lainnya. Ketiadaan atau kekurangan sumber-sumber nutrisi ini dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba hingga pada akhirnya dapat menyebabkan kematian, Menurut Waluyo (2005), peran utama nutrisi adalah sebagai sumber energi, bahan pembangun sel, dan sebagai aseptor elektron dalam reaksi bioenergetik (reaksi yang menghasilkan energi). Oleh karenanya bahan makanan yang diperlukan terdiri dari, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron, sumber mineral, faktor pertumbuhan, nitrogen.” Selain itu, secara umum nutrisi dalam media pembenihan harus mengandung seluruh elemen yang penting untuk sintesis biologis organisme baru (Jawetz, 2001)’’.

2.4 Minyak Mentah (*crude oil*) sebagai Sumber Karbon

Bakteri merupakan makhluk hidup yang tentunya juga membutuhkan karbon sebagai penunjang hidupnya. Oleh karena itu, minyak bumi sangat potensial untuk menjadi sumber makanan bagi bakteri. Menurut Koesomadinata (1980) kandungan karbon pada minyak bumi atau minyak mentah berkisar antara 82,1 % - 87,1 %.

Tabel 2.2. Unsur penyusun minyak mentah (Koesoemadinata, 1980)

No	Unsur	Gas bumi	Aspal	Minyak Mentah
1	Karbon	65 – 80	80 – 85	82.1 – 87.1
2	Hidrogen	1 – 25	8.5 – 11	11.7 – 14.7
3	Belerang	≤ 0.2	2 – 8	0.1 – 5.5
4	Nitrogen	1 – 15	0 – 2	0.1 – 1.5
5	Oksigen	-	-	0.1 – 4.5
6	Logam	-	-	-

2.5 Bakteri

Bakteri merupakan jenis mikro organisme yang termasuk dalam kingdom prokariota . Seperti prokariota lainnya, bakteri merupakan organisme bersel satu atau uniseluler. Sel bakteri umumnya berukuran 0,3 μm – 2 μm kecuali untuk bakteri berfilamen (ukurannya bisa mencapai lebih dari 100 μm) atau *cynobacteria* (berukuran antara 5 μm - 50 μm). Secara umum bentuk sel bakteri ada 3 macam yaitu *cocus* (contohnya *Streptococcus*), *bacillus* (contohnya *Bacillus subtilis*) dan *spirilla* (contohnya *Vibrio cholera* dan *Spirillum volutans*).

Bakteri dapat beradaptasi terhadap berbagai kondisi lingkungan dibandingkan dengan jenis organisme lainnya sehingga dapat ditemukan di mana saja. Kebanyakan bakteri menyerap makanan dari lingkungannya,

namun ada juga yang dapat membuat makanannya sendiri dengan fotosintesis atau proses sintesis lainnya (Black,1999).

2.5.1 Pertumbuhan Bakteri

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada pertambahan total masa sel dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah dan atau masa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya (Pelczar & Chan, 2008)

2.5.2 Morfologi Bakteri

Sel-sel individu bakteri dapat berbentuk seperti elips, bola, batang (silindris), atau spiral (heliks) . Masing-masing ciri ini penting dalam mencirikan morfologi suatu spesies. Sel bakteri yang berbentuk seperti bola atau elips dinamakan *kokus*. Kokus muncul dalam beberapa penataan yang khas tergantung kepada spesiesnya. Sel bakteri berbentuk silindris atau seperti batang dinamakan *basilus*. Ada banyak perbedaan dalam ukuran panjang dan lebar di antara berbagai spesies basilus. Ujung beberapa basilus tampak persegi, yang lain bundar, dan yang lain lagi meruncing atau lancip seperti ujung cerutu. Kadang-kadang basilus tetap saling melekat satu dengan yang lainnya, ujung dengan ujung, sehingga memberikan penampilan rantai.

Bakteri berbentuk spiral, atau *spirillum*, terutama dijumpai sebagai individu-individu sel yang tidak saling melekat. Tercakup di dalam kelompok morfologis ini ialah *spiroketa*, beberapa di antaranya menyebabkan penyakit yang gawat pada manusia. Individu-individu sel dari spesies yang berbeda-beda menunjukkan perbedaan-perbedaan yang mencolok dalam hal panjang, jumlah, dan amplitudo spiralnya serta

kekakuan dinding selnya. Sebagai contoh, beberapa spirillum berukuran pendek, spiralnya berpilin ketat, yang lain sangat panjang dan menunjukkan sederetan pelintiran dan lingkungan. Spiral yang pendek dan tidak lengkap disebut sebagai *bakteri koma*, atau *vibrio*. (Pelczar, Michael J. 1986)

2.5.3 Bakteri Umum Pada Crude Oil

Kelompok bakteri merupakan agen bioremediasi yang banyak digunakan terutama karena bakteri memiliki kecepatan reproduksi yang tinggi dan bakteri merupakan kelompok mikrobial yang mudah beradaptasi dengan lingkungan, sehingga memungkinkan dapat menggunakan residu minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi (Koswara, 2003; Foght, 2008)

Menurut Desai dan Vyas (2006), mikrobial pendegradasi hidrokarbon secara alami terdapat di mana-mana dan relatif lebih tinggi jumlahnya pada tanah tercemar minyak bumi dibandingkan pada tanah tidak tercemar. Bakteri pendegradasi hidrokarbon yang efektif di lingkungan alami adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus laterospor*. Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, mikroorganisme dapat dikelompokkan menjadi 3, yaitu;

1. Psikrofilik : 5 - 15°C
2. Mesofilik : 25 – 40°C
3. Termofilik : 45 - 60 °C

Pada umumnya, bioremediasi limbah minyak menggunakan mikroorganisme mesofilik. (Tuhuloula,2011)

2.6 Isolasi dan Seleksi Mikroorganisme

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan suatu kultur murni atau konsorsium mikroorganisme yang dapat memanfaatkan polutan sebagai substratnya. Biasanya isolasi dilakukan untuk mendapatkan kultur murni karena keuntungan-keuntungannya sebagai berikut. (Young,1985)

1. Memiliki kemampuan untuk tumbuh dalam substrat yang spesifik.
2. Memberikan tingkat pertumbuhan yang memuaskan dalam waktu yang relatif singkat.
3. Memiliki kemampuan untuk menghasilkan produk primer maupun sekunder secara berulang-ulang.
4. Dapat menghasilkan transformasi kimia yang spesifik.
5. Mempunyai kestabilan genetik

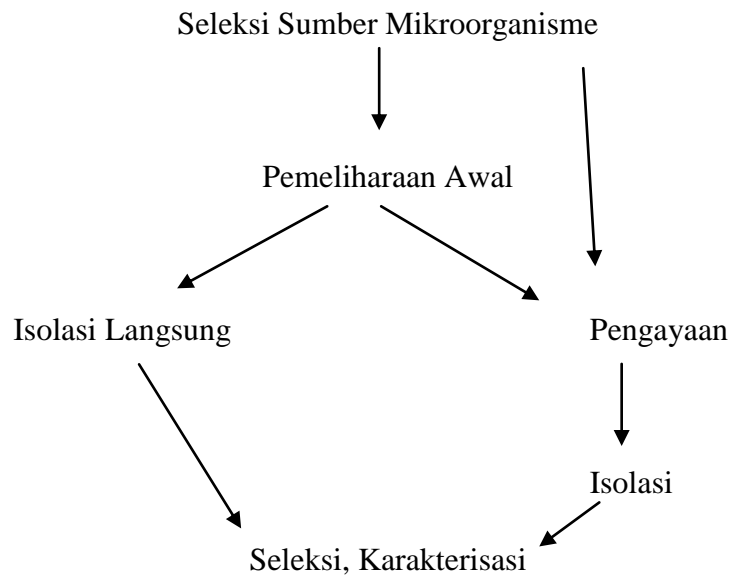
Namun dalam beberapa kasus, konsorsium mikroorganisme yang stabil dapat memberikan proses yang lebih efektif daripada kultur murni.

2.7 Metode Isolasi

2.7.1 Sumber Mikroorganisme dan Strategi Sampling

Sumber mikroorganisme untuk isolasi diambil dari tempat di mana diperkirakan bahwa senyawa yang akan dijadikan substrat ada di lingkungan tersebut. Sumber tersebut dapat diambil dari perairan, tanah, limbah, atau makanan yang sudah basi. Pada umumnya tanah, sedimen, kompos dan lumpur memiliki diversitas dan biomassa yang lebih tinggi daripada perairan. Untuk degradasi senyawa xenobiotik, sumber mikroorganisme dapat diambil dari tanah atau sedimen dengan sejarah kontaminasi yang panjang oleh senyawa xenobiotik yang akan diteliti. Isolasi dapat dilakukan secara langsung misalnya dengan menumbuhkan sampel yang telah diencerkan dengan tepat ke dalam media padat. Untuk senyawa yang relatif sulit didegradasi, pengayaan diperlukan untuk

mengaklimatisasi mikroorganisme pada senyawa yang diteliti. Prosedur isolasi secara umum adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Prosedur Isolasi Secara Umum (Young, 1985)

2.7.2 Metode Isolasi Langsung

2.7.2.1 Pemeliharaan Awal Sampel

Pemeliharaan awal dilakukan untuk meningkatkan jumlah mikroorganisme tanpa melakukan pengayaan. Teknik yang paling sering dilakukan adalah variasi temperatur. Sebagai contoh misalnya pemanasan sampel air sampai 80-100 °C selama 2-5 menit untuk mengisolasi *Clostridium perfringens* yang membentuk endospora pada temperatur tersebut. Contoh lainnya adalah pemanasan sampel (cair atau dari tanah) pada 55 °C selama 6 menit memberikan kemungkinan yang lebih besar untuk mendapatkan *Rhodococcus coprophilus* dan *micromonospora* spp. Hal-hal seperti ini sangat penting untuk diperhatikan karena penyimpanan sampel pada temperatur ruang misalnya dapat menurunkan bahkan menghilangkan bakteri psikrofilik (Young, 1985).

Pemeliharaan sampel juga dapat dilakukan dengan teknik konsentrasi. Teknik ini digunakan pada sampel yang diperkirakan mengandung populasi mikroorganisme yang tidak terlalu tinggi. Filtrasi melalui membran selulosa asetat dengan ukuran pori sekitar $0,45\mu\text{m}$ merupakan metode untuk mengkonsentrasikan bakteri dari suatu sampel. Filter selanjutnya dapat langsung diinkubasikan media nutrisi agar.

2.7.2.2 Dilusi dan Inkubasi Sampel

Isolasi bakteri atau jamur secara langsung sering kali memerlukan pengenceran sampel terlebih dahulu sebelum penanaman pada media nutrisi agar. Pemilihan jenis pengencer merupakan hal yang penting, khususnya pada derajat pengenceran yang ekstrim. Pengencer yang sering digunakan misalnya adalah NaCl (0,9 % b/v) atau dianjurkan untuk menggunakan *buffer* fosfat – NaCl. Selain itu, media nutrisi cair juga dapat digunakan sebagai pengencer. Pengencer yang dicampurkan dengan pereduksi dan indikator redoks misalnya 0.0001 % b/v resazurin biasa digunakan untuk mengisolasi bakteri anaerob.

Hal lain yang harus diperhatikan adalah temperatur. Temperatur pengencer harus sama dengan temperatur inkubasi. Temperatur inkubasi harus disesuaikan dengan temperatur optimum mikroorganisme yang diisolasi. Temperatur inkubasi untuk mikroorganisme psikrofilik biasanya sekitar $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, mikroorganisme termofilik memerlukan temperatur inkubasi sekitar $45\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$, dan mikroorganisme mesofilik memerlukan temperatur sekitar $25\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Waktu inkubasi disesuaikan dengan kebutuhan mikroorganisme juga media pertumbuhan yang digunakan. Hal-hal lain juga yang harus diperhatikan, misalnya pencahayaan yang baik pada inkubasi mikroorganisme fototofilik.

2.7.3 Metode Pengayaan Kultur

2.7.3.1 Metode Pengumpanan

Metode pengumpanan merupakan metode isolasi dengan memanfaatkan substrat padat yang steril. Metode ini biasa digunakan untuk mengisolasi Actinomycetes dan jamur. Kulit ular dan rambut manusia dapat digunakan untuk mengisolasi *Ampullariella* spp serta *Pilimelia* spp. Biji rami yang telah direbus, serbuk sari tanaman konifer (biasanya pinus), daun rumput yang telah direbus serta serangga yang sudah mati dapat digunakan untuk mengisolasi jamur pada tanah dan perairan. *Bait* (umpan) biasanya ditambahkan pada cawan petri yang telah diisi setengahnya dengan air steril atau air sampel untuk kemudian di inokulasikan. Beberapa jenis *bait* (umpan) dapat memberikan efek selektif terhadap media. Sebagai contoh, biji rami dan daun rumput dapat mencegah terbentuknya spora motil dari *Mastigomycotina*. Serbuk sari pinus mencegah pertumbuhan zoospora *darichytridiales*. (Juliani,2002)

2.7.3.2 Metode Pengayaan Kimiawi

Ketika suatu kultur tercampur ditumbuhkan dalam suatu media, maka akan terjadi kompetisi antara populasi mikroorganisme dalam kultur tadi untuk mendapatkan nutrisi. Populasi yang dapat bertahan ditandai dengan tingginya laju pertumbuhan, di mana populasi lainnya akan mati karena tidak mendapatkan faktor-faktor yang dibutuhkannya untuk tumbuh. Efek selektifitas dalam media ini dimanfaatkan dalam pengayaan untuk mengisolasi jenis mikroorganisme tertentu dari suatu sampel. Selektivitas media pengayaan tergantung pada komposisi kimia dari media tersebut serta faktor-faktor penunjang lainnya seperti pH, kondisi aerasi, dan temperatur inkubasi.

Pada media pengayaan untuk mengisolasi mikroorganisme fermentatif, biasanya digunakan gula atau senyawa organik dengan tingkat oksidasi yang sama sebagai sumber karbon dan energi. Untuk memperoleh mikroorganisme anaerob obligat, pengayaan dilakukan pada kondisi anaerobik untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme aerob. Penambahan substrat yang spesifik sebagai sumber karbon merupakan cara untuk memperoleh mikroorganisme yang menggunakan substrat tersebut. Sebagai contoh, *Pseudomonas putida* diperoleh dengan pengayaan media yang ditambah dengan sodium benzoat. Cara ini juga digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme yang dapat mendegradasi senyawa-senyawa senobiotik yang relatif rekalsitran. (Juliani,2002)

2.8 Media Isolasi

Media untuk isolasi dapat dibagi menjadi 2 jenis, yaitu (Shuler, 1994)

1. Media terdefinisi (*defined media*)
2. Media kompleks

Media terdefinisi adalah media yang mengandung senyawa kimia dalam jumlah dan komposisi yang telah diketahui. Sedangkan media kompleks merupakan media yang mengandung senyawa alam di mana komposisinya tidak diketahui dengan jelas. Media yang mengandung *yeast extract*, pepton atau molase merupakan contoh media kompleks. Media kompleks memberikan tingkat pertumbuhan mikroorganisme yang lebih baik dibandingkan dengan media terdefinisi, karena mengandung vitamin, hormon dan *trace elements*. Namun penggunaan media terdefinisi akan mempermudah pengontrolan kultur.

Media selektif biasanya mengandung inhibitor spesifik untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Contoh penggunaan ini misalnya adalah penambahan anti bakteri ke dalam

pengisolasi *actinomycetes* dan jamur. Pada isolasi *Neocardia* spp, media ditambahkan dengan cycloheximide dan mycostatin untuk menghambat pertumbuhan *yeast* dan *mould*. Selain itu ditambahkan pula klorotetracycline dan methacycline sebagai antibakteri.

Hal ini perlu diperhatikan selain komposisi yang perlu ditambahkan pada media, pH juga memberikan efek selektif dalam proses isolasi. Media dengan pH 5 baik untuk mengisolasi jamur tanah. Sebagian besar *Actinomycetes* bersifat netrofilik dan tumbuh dengan baik pada pH antara 6,7 dan 7,5 . Bakteri membutuhkan media dengan kisaran pH 4-9.

Tabel 2.3 Contoh Komposisi Media Terdefinisi (*defined media*) (Shuker, 1992)

Senyawa	Fungsi	Kebutuhan (g/l)
Kelompok A		
Glukosa	Sumber karbon dan atau energi	30
KH ₂ PO ₄	Sumber K dan P	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sumber Mg dan S	0,6
CaCl ₂	Sumber Ca	0.05
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Sumber Fe	15 x 10 ⁻⁴
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Sumber Zn	6x10 ⁻⁴
CuSO ₄ .7H ₂ O	Sumber Cu	6x10 ⁻⁴
MnSO ₄ . 7H ₂ O	Sumber Mn	6x10 ⁻⁴
Kelompok B		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Sumber N	6
(NH ₄) H ₂ PO ₄	Sumber N	5
Kelompok C		
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	Untuk mencegah pembusaan	4
Kelompok D		
Na ₂ HPO ₄	Buffer	20
K ₂ HPO ₄	Buffer	10

2.9 Teknik Pemurnian Kultur

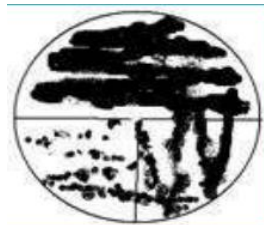
Isolasi bakteri merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan mikrobia tertentu dari lingkungan sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan yaitu dengan cara goresan (*streak plate*), cara tuang (*pour plate*), cara sebar (*spread plate*), dan mikromanipulator (Buckle,1987).

Teknik inokulasi (penanaman) terdiri dari beberapa teknik :

1. Metode Gores

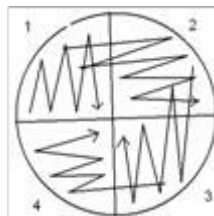
Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah, inokulum digoreskan di permukaan media agar nutrisi dalam cawan petri dish dengan jarum pindah (lup inokulasi). Di antara garis-garis goresan akan terdapat sel-sel yang cukup terpisah sehingga dapat tumbuh menjadi koloni. Ada beberapa Teknik dalam metode goresan:

a. Goresan T



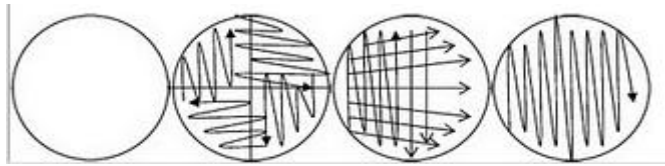
Gambar 2.2 Metode Gores T (Buckle,1987)

b. Goresan Kuadran



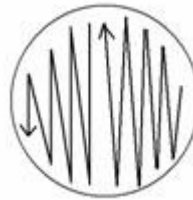
Gambar 2.3 Metode Goresan Kuadran (Buckle,1987)

c. Goresan Radian



Gambar 2.4 Metode Goresan Radian (Buckle,1987)

d. Goresan Sinambung



Gambar 2.5 Metode Goresan Sinambung (Buckle,1987)

2. Metode Sebar

Setetes inokulum diletakkan diletakkan dalam sebuah medium agar nutrien dalam cawan petri dish dan dengan menggunakan batang kaca yang bengkok dan steril. Inokulasi itu disebarkan dalam medium batang yang sama dapat digunakan dapat menginokulasikan pinggan kedua untuk dapat menjamin penyebaran bakteri yang merata dengan baik. Pada beberapa pinggan akan muncul koloni koloni yang terpisah –pisah. (Buckle,1987)

3. Metode Tuang

Isolasi menggunakan media cair dengan cara pengenceran. Dasar melakukan pengenceran adalah penurunan jumlah mikroorganisme sehingga pada suatu saat hanya ditemukan satu sel di dalam tabung. (Buck13,1987)

4. Metode Tusuk

Metode tusuk yaitu dengan dengan cara meneteskan atau menusukkan ujung jarum ose yang di dalamnya terdapat inokulum, kemudian dimasukkan ke dalam media (Winarni, 1997).

5. Teknik Pengenceran

Teknik ini dilakukan menggunakan satu seri pengenceran. Satu seri pengenceran dilakukan sampai diperkirakan pada pengenceran terakhir hanya mengandung seribu organisme. Lalu 1 ml media tersebut ditambahkan pada 9 ml media agar cair (45°C) dan dituangkan secara septik ke dalam cawan petri. Setelah diinkubasi, media dalam cawan tadi hanya akan mengandung sedikit organisme termasuk koloni organisme yang diisolasi.

2.10 Sterilisasi

Sterilisasi merupakan proses penyisihan atau pemusnahan semua organisme hidup pada peralatan dalam hal ini peralatan laboratorium. Hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan memberikan paparan yang mematikan secara fisik maupun kimia dengan cara filtrasi.

Metode yang paling efektif dan sering digunakan terhadap media cair, padat maupun peralatan laboratorium adalah dengan autoklaf. Temperatur 121°C selama 15 menit atau lebih tergantung volume cairan yang disterilisasi akan memusnahkan sel vegetatif bakteri maupun spora.

Metode filtrasi digunakan untuk peralatan atau media dengan bahan yang tidak tahan panas. Filter dapat dibuat dari bahan keramik, asbestos atau membran dari bahan selulosa. Filter dengan ukuran pori 0,45 µm digunakan untuk menyaring sel bakteri, namun beberapa sel bakteri hanya dapat disisihkan dengan filter berpori 0,22 µm. Metode sterilisasi lainnya dengan yang bisa dilakukan misalnya dengan radiasi sinar ultraviolet atau sinar-X. Namun metode ini jarang dilakukan di laboratorium karena kurang efektif.

Contoh lain untuk sterilisasi bahan padat adalah dengan menggunakan alkohol dan pemanasan menggunakan bunsen.

2.11 Pengujian Bakteri

2.11.1 Uji Gram Positif-Negatif

Pewarnaan Gram atau metode Gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dan luas yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Dalam proses ini, olesan bakteri yang sudah terfiksasi dikenai larutan-larutan berikut : zat pewarna kristal violet, larutan yodium, larutan alkohol (bahan pemucat), dan zat pewarna tandingannya berupa zat warna safranin atau air fuchsin. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884 untuk membedakan antara *Pneumokokus* dan bakteri *Klebsiella pneumonia* Warna merah pada olesan bakteri menunjukkan bakteri gram negatif dan jika warna ungu menunjukkan bakteri gram positif (Michael, 2008).

Perbedaan dua kelompok bakteri ini didasarkan pada kemampuan sel menahan (mengikat) warna ungu dari kristal violet selama proses dekolorisasi oleh alkohol. Bakteri gram positif tidak mengalami dekolorisasi karena tetap mengikat warna ungu kristal violet dan pada tahap akhir pengecatan tidak terwarnai safranin. Bakteri gram negatif mengalami dekolorisasi oleh alkohol dan pada tahap akhir pengecatan terwarnai menjadi merah oleh safranin. (Muslimin, 2014).

Tabel 2.4. Ciri-ciri khas dari bakteri Gram positif dan Gram negatif pada fenomena pengecatan (Koes Irianto, 2006)

No	Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif
1	Sangat sensitif terhadap zat	Kurang sensitif terhadap zat warna

No	Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif
	warna trifenilmetan	trifenilmetan
2	Sensitif terhadap penisilin	Sensitif terhadap streptomisin
3	Resisten terhadap alkali, tidak larut oleh 1% KOH	Sensitif terhadap alkali, larut oleh 1% KOH
4	Biasanya kokus atau batang pembentuk spora (kecuali <i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i>)	Biasanya batang tidak membentuk spora (kecuali <i>Neisseria</i> yang berbentuk kokus)
5	Dapat bersifat tahan asam, (Acid fast)	Tampaknya tidak tahan asam

2.11.2 Biosurfaktan

Biosurfaktan merupakan lipid atau turunan dari lipid sederhana atau lipid sederhana atau lipid kompleks yang dihasilkan oleh mikroba selama pertumbuhan (Kosaric, 1983). Biosurfaktan sebagian besar memang dihasilkan oleh bakteri, namun ada juga beberapa fungi yang memproduksi biosurfaktan. (Kosaric 1992) menyatakan jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh setiap mikroba berbeda-beda