

Keanekaragaman Jenis Mikroorganisme Sumber Kontaminasi Kultur *In vitro* di Sub-Lab. Biologi Laboratorium MIPA Pusat UNS

Source of contaminant microorganisms in *in vitro* culture at Sub lab. Biology, Central Laboratory of Mathematics and Sciences, Sebelas Maret University

ARI SUSILOWATI, SHANTI LISTYAWATI
Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Diterima: 17 Juli 2000. Disetujui: 20 Januari 2001

ABSTRACT

The objectives of the research were to know the species and the most dominant microorganisms that become a source of contamination in *in vitro* culture at Sub lab Biology, central laboratory of Sebelas Maret University. As in many general laboratory, there were many microorganisms that able to contaminate *in vitro* culture coming from air, dusts, or from the contaminated experimental materials such as plants or fruits. A qualitative descriptive method was used in the research, involving many steps of making pure culture and identification of microorganisms macroscopically or microscopically. In the research found six microorganisms potentially contaminate *in vitro* culture, that are generally from groups of fungi (mold), such as *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Dictyostelium* and *Saccharomyces*. *Mucor* and *Rhizopus* were the most contaminants present in all contaminated *in vitro* culture.

© 2001 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key Words: *in vitro* culture, contamination, fungi

PENDAHULUAN

Mikroorganisme terdapat di berbagai tempat seperti tanah, debu, air, udara, kulit dan selaput lendir. Mikroorganisme dapat berupa bakteri, fungi, protozoa dan lain-lain. Mikroorganisme mudah terhembus udara dan menyebar ke mana-mana karena ukuran selnya kecil dan ringan. Laboratorium MIPA Pusat, khususnya Sub-lab Biologi, banyak digunakan untuk penelitian mahasiswa dan dosen, termasuk bidang kultur jaringan tanaman dan mikologi. Selama ini kendala yang umum dihadapi para peneliti adalah tingginya kontaminasi kultur *in vitro*. Pada penelitian mikologi, tingkat kontaminasi dapat mencapai 100%. Untuk itu perlu dilakukan usaha-usaha pengendalian. Langkah awal

usaha ini adalah identifikasi jenis-jenis mikroorganisme sumber kontaminasi dan mengetahui jenis paling dominan.

Teknik Aseptik

Mikroorganisme dapat menyebabkan banyak kerusakan. Pengendalian mikroorganisme ditujukan untuk mencegah penyebaran penyakit, membasmi mikroorganisme pada inang, serta mencegah pembusukan dan kerusakan bahan. Mikroorganisme dapat dihambat atau dibunuh secara fisik dan kimia. Secara fisik melalui suhu, tekanan, radiasi dan penyaringan, misalnya sterilisasi, pembakaran atau sanitasi. Secara kimia melalui perubahan komposisi molekul misalnya dengan senyawa-senyawa fenolik, alkohol, klor, iodium dan etilen oksida. Keefektifan zat antimikrobia

tergantung konsentrasi, jumlah dan jenis mikroorganisme, suhu, bahan organik terlarut dan pH (Pelczar dan Chan, 1988).

Sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan tumbuhan, organisme kecil yang masuk ke dalam media, alat yang tidak steril dan lingkungan kerja yang kotor. Sehingga harus dilakukan: sterilisasi lingkungan kerja, alat-alat, media dan bahan tanaman (Gunawan, 1988).

Penanaman eksplan dan prosedur lain seperti isolasi protoplasma, sering dilakukan dalam kotak pindah (*transfer box*). Kotak ini biasanya terbuat dari kaca dan tertutup. Di dalamnya terdapat lampu *germicidal* yang memancarkan radiasi ultra violet untuk sterilisasi. Sterilisasi juga dapat dilakukan dengan alkohol 70%, kaporit atau formalin. Pada masa sekarang, kotak pindah dilengkapi *blower* berkecepatan 100 *flow* per menit, untuk mencegah kontaminasi dari udara. Kotak pindah disebut *Laminar Air Flow Cabinet* apabila dilengkapi aliran udara yang melalui filter HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) berpori-pori kurang dari 0,3 μm (Gunawan, 1988).

Sterilisasi otoclaf menggunakan panas dan tekanan uap air. Temperatur sterilisasi biasanya 121°C, sedang tekanan sekitar 17,5-20 *psi*. Lama sterilisasi tergantung dari volume dan jenis bahan. Alat-alat dan air disterilisasi selama 1 jam, tetapi media hanya 20-40

menit. Sterilisasi media yang terlalu lama menyebabkan: degradasi vitamin dan asam-asam amino, inaktivasi sitokinin zeatin riboside dan perubahan pH yang mengakibatkan depolimerisasi agar.

Teknik Pencirian Mikroorganisme

Metode untuk mencirikan mikroorganisme menurut Pelczar dan Chan (1988) disajikan pada tabel 1. Cendawan yang sering ditemukan berasal dari kelas *Zigomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes*, dengan ciri-ciri disajikan pada tabel 2 (Pelczar dan Chan, 1988).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Sub-lab Biologi, Laboratorium MIPA Pusat Universitas Sebelas Maret Surakarta, selama satu bulan. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif yang dilaksanakan melalui tahap-tahap: (1) pengamatan morfologi koloni mikroorganisme yang mengkontaminasi kultur *in vitro* cendawan *C.versicolor* dan *S.commune*, (2) pembuatan kultur murni masing-masing koloni dan (3) indentifikasi mengacu pada pustaka-pustaka: Alexopoulos dan Bold (1967), Alexopoulos dan Mimms (1979), Dharmaputra (1989) dan Hadioetomo (1993).

Tabel 1. Metode Pencirian Mikroorganisme

Ciri khas	Metode
Morfologi	Pengamatan spesimen dengan bantuan mikroskop cahaya atau elektron, baik diwarnai atau tidak. Teknik mikroskop elektron memungkinkan pengamatan irisan ultra tipis sel-sel mikrobia.
Nutrisi	Penentuan substansi kimiawi dan keadaan fisik yang khusus (suhu, cahaya, gas) yang diperlukan untuk menunjang pertumbuhan mikroorganisme
Kultur	Penentuan tanpang pertumbuhan mikrobia pada berbagai macam medium laboratorium, baik yang cair maupun yang padat
Metabolik	Identifikasi dan pengukuran perubahan kimiawi yang dilakukan dan hanya untuk mengetahui apakah mikroorganisme menyebabkan perubahan kimia pada suatu substansi khusus atau tidak
Susunan antigen	Perincian mikroorganisme terutama bakteri dan virus, dengan penelaahan antigen, substansi kimiawi yang ada pada permukaannya. Antigen adalah substansi kimiawi suatu mikroorganisme yang apabila disuntikkan pada hewan akan memulai pembentukan substansi kimiawi berupa antibodi yang dapat diidentifikasi dengan prosedur laboratoris. Antigen dan antibodi merupakan bagian dari sistem imunologis yang kompleks.
Susunan kimiawi	Penentuan susunan kimiawi berbagai komponen sel. Pelbagai teknik tersedia untuk memecahkan sel dan untuk mengisolasi komponen-komponen sel yang khusus dari campuran yang diperoleh seperti fragmen dinding sel, bahan nukleus dan membran
Sifat Patogeni	Penentuan potensi suatu biakan mikarobe untuk menimbulkan penyakit dilakukan dengan menginokulasi hewan atau tumbuhan dengan biakan murni mikroorganisme yang bersangkutan

Tabel 2. Ciri-ciri utama cendawan

Ciri-ciri	Kelas			
	Zygomycetes	Ascomycetes	Basidiomycetes	Deuteromycetes
Miselium	Aseptat/ senositik	Septat	Septat	Septat
Spora aseksual	Sporangiospora atau konidia	Konidia	Konidia	Konidia
Spora seksual	Zigospora, Oospora	Askospora	Basidio-spora	Tidak diketahui
Habitat alamiah	Air, tanah, hewan	Tanah, tumbuhan, hewan	Tanah, tumbuhan	Tanah, tumbuhan, hewan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur murni *in vitro* cendawan perusak kayu *Coriolus versicolor* dan *Schizophyllum commune* merupakan koleksi Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA UNS yang disimpan di Sub-lab Biologi, Laboratorium MIPA Pusat UNS. Agar kondisi kultur selalu optimum, maka dilakukan peremajaan secara berkala. Peremajaan dilakukan dengan menginokulasikan biakan ke medium taoge sukrosa agar segar secara aseptik. Semua kegiatan dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* yang telah disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70% dan penyinaran lampu UV selama 1-2 jam. Namun ternyata masih terjadi kontaminasi setelah masa inkubasi 3 hari. Mikroorganisme kontaminan berasal dari enam genus, yakni cendawan *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Dictyostelium* dan golongan *Saccharomyces*.

Mucor dan *Rhizopus*

Klasifikasi *Mucor*

Divisi : Amastigomycota
 Subdivisi : Zygomycotina
 Kelas : Zygomycetes
 Ordo : Mucorales
 Familia : Mucoraceae
 Genus : *Mucor*

Ciri morfologi koloni: hifa seperti benang putih; bagian tertentu tampak sporangium dan sporangiofor berupa titik-titik hitam seperti jarum pentul. Ciri mikroskopis: hifa tanpa sekat, terdapat sporangium dan sporangiospora.

Klasifikasi *Rhizopus*

Divisi : Amastigomycota
 Subdivisi : Zygomycotina

Kelas : Zygomycetes
 Ordo : Mucorales
 Familia : Mucoraceae
 Genus : *Rhizopus*

Ciri morfologi koloni: hifa seperti benang berwarna putih sampai kelabu hitam; bagian tertentu tampak sporangium dan sporangiofora berupa titik-titik hitam seperti jarum pentul. Ciri mikroskopis: hifa tanpa sekat, terdapat rizoid dan sporangiospora.

Dalam penelitian ini *Mucor* dan *Rhizopus* ditemukan hampir di semua kultur *in vitro* yang terkontaminasi. Pertumbuhan miseliumnya sangat lebat dan mendominasi seluruh permukaan media kultur. Hampir 80% dari kultur *in vitro* yang diamati pada penelitian ini diserang oleh kedua cendawan ini.

Aspergillus dan *Cladosporium*

Klasifikasi *Aspergillus*

Divisi : Amastigomycota
 Subdivisi : Deuteromycotina
 Kelas : Deuteromycetes
 Subkelas : Hyphomycetidae
 Ordo : Moniliales
 Familia : Moniliaceae
 Genus : *Aspergillus*

Ciri morfologi koloni: koloni berwarna hijau kebiruan dengan area kuning sulfur pada permukaannya; miselium berbentuk benang halus. Ciri mikroskopis: terdapat konidiofor, sel kaki dan kepala berkonidium terdiri dari gelembung, *fialid* serta kadang-kadang *metula* dan konidium; *fialid* dapat dibentuk langsung pada gelembung uniseriat atau *metula* biseriat; kepala konidium berbentuk kolumner atau radial. *Aspergillus* adalah cendawan yang paling sering mengkontaminasi karena pertumbuhan koloninya sangat cepat.

Klasifikasi *Cladosporium*

Divisi : Amastigomycota
 Subdivisi : Deuteromycotina
 Kelas : Deuteromycetes
 Subkelas : Hyphomycetidae
 Ordo : Moniliales
 Familia : Dematiaceae
 Genus : *Cladosporium*

Ciri morfologi koloni: warna hijau kehitaman; struktur kompak seperti beludru; pertumbuhan relatif lambat.

Cendawan kelas Deuteromycetes yang ditemukan pada penelitian ini adalah *Aspergillus* dan *Cladosporium*. Frekuensi kontaminasi kultur oleh *Aspergillus* relatif lebih tinggi dibandingkan *Cladosporium*, tetapi masih lebih rendah dibanding *Mucor* dan *Rhizopus*. *Aspergillus* dan *Cladosporium* adalah cendawan yang banyak menyerang tumbuhan tingkat tinggi (parasit) dan banyak ditemukan pada produk-produk pasca panen (Setyawati, 1989).

Penelitian mikrobiologi dan mikologi di Sub-lab Biologi, Laboratorium MIPA Pusat UNS dilakukan pada ruangan yang sama dengan penelitian pasca panen yang sering memakai buah-buahan seperti duku, salak dan pisang. Buah-buahan tersebut sering ditumbuhi *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* dan *Cladosporium* (Setyawati, 1989). Hal inilah yang diduga sebagai sumber penyebaran jenis-jenis cendawan tersebut.

Untuk mengurangi peluang terkontaminasinya kultur *in vitro* oleh kedua cendawan ini, maka pembagian ruang penelitian harus diperhatikan. Masing-masing aspek penelitian harus menempati ruang yang berbeda untuk mencegah tingginya tingkat kontaminasi kultur. Segi kebersihan ruang termasuk kebersihan lantai, meja, kursi dan peralatan lain juga menentukan keberhasilan penelitian dengan kultur *in vitro*.

Saccharomyces**Klasifikasi *Saccharomyces***

Divisi : Amastigomycota
 Subdivisi : Ascomycotina
 Kelas : Ascomycetes
 Subkelas : Hemiascomycetidae
 Ordo : Endomycetales
 Familia : Saccharomycetaceae
 Genus : *Saccharomyces*

Ciri morfologi koloni: tidak membentuk miselium, koloni berupa lendir berwarna putih,

permukaan koloni licin. Ciri mikroskopis: satu sel, bentuk bulat sampai lonjong, ditemukan adanya tunas.

Cendawan golongan Ascomycetes yang ditemukan pada penelitian ini adalah *Saccharomyces* atau biasa dikenal sebagai khamir. Frekuensinya tidak begitu sering ditemukan pada kultur yang terkontaminasi. Sumber penyebarannya adalah tanah atau bahan penelitian berupa tumbuhan yang terkena parasit. Oleh karena itu kebersihan ruang kultur menjadi sangat penting untuk menekan tingkat kontaminasi khamir ini.

Dictyostelium**Klasifikasi *Dictyostelium***

Kelas : Acraciales
 Genus : *Dictyostelium*

Ciri morfologi koloni: terdapat agregasi yang merupakan pusat struktur seluler pertama yang bersifat amoeboid. Termasuk kapang lendir seluler.

Kapang lendir merupakan kumpulan mikroorganisme yang heterogen. Padanya terdapat ciri-ciri hewan dan tumbuhan. Fase vegetatif atau somatik yang aseluler dan merayap jelas mempunyai struktur dan fisiologi seperti binatang; struktur reproduksifnya seperti tumbuhan, yaitu menghasilkan spora yang terbungkus dinding yang nyata. Gabungan fase seperti binatang dan tumbuhan dalam satu daur hidup ini merupakan ciri pembeda kapang lendir.

Ada empat tipe kapang lendir berdasarkan perbedaan struktur, fisiologi dan daur hidupnya. Keempatnya ialah kapang lendir sejati (*Myxomycetes*), kapang lendir endoparasit (*Plasmodiophoromycetes*), kapang lendir jaring (*Labyrinthulales*) dan kapang lendir selular (*Acraciales*).

Klasifikasi kapang lendir menantang dan sulit dideskripsikan. Mereka kadang-kadang diklasifikasikan sebagai filum tersendiri dalam dunia Protista. Namun kadang-kadang dimasukkan dalam dunia Fungi. Dalam klasifikasi yang lain lagi, *Myxomycetes* dan *Plasmodiophoromycetes* dianggap mempunyai status taksonomi sejajar dengan cendawan sejati, sedang *Acraciales* dan *Labyrinthulales* dianggap terpisah karena pertalian keturunannya tidak jelas.

Kapang lendir seluler merupakan organisme yang hidup bebas dan ameboid; plasmodiumnya tidak multi nukleat. Daur

hidupnya menarik, tumbuh tanah untuk mendapatkan bakteri yang menjadi makanannya. Kapang lendir seluler yang ditemukan pada penelitian ini adalah genus *Dictyostelium*. Hal ini ditentukan dari morfologi koloni yaitu adanya plasmodium yang tersebar di seluruh permukaan medium kultur yang terkontaminasi. Plasmodium ini lama kelamaan membentuk agregat berupa benang miselium yang sangat halus dan menjadi pusat koloni. Setelah munculnya papila apikal, kolum silindris berubah menjadi semacam siput, lalu topi sombrero, terbentuk tangkai dan akhirnya terbentuk tubuh buah (Alexopoulos dan dan Bold, 1967).

Frekuensi ditemukannya *Dictyostelium* relatif jarang. Sumber *Dictyostelium* adalah tanah atau debu (Pelczar dan Chan, 1988), sehingga untuk menghindarinya harus diperhatikan masalah kebersihan ruangan.

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini ditemukan enam jenis mikroorganisme yang menjadi sumber kontaminasi kultur *in vitro* di Sub-lab Biologi Laboratorium MIPA Pusat UNS Surakarta, terdiri dari golongan cendawan dan khamir.

Cendawan yang mengkontaminasi adalah *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Aspergillus* dan *Dictyoteliium*. Sedangkan khamir yang mengkontaminasi adalah *Saccharomyces*. Jenis mikroorganisme yang paling sering ditemukan adalah *Mucor* dan *Rhizopus* yang ditemukan pada hampir semua kultur *in vitro* yang terkontaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, C.J. and H.C. Bold. 1967. *Algae and Fungi*. London: The Macmillan Company.
- Alexopoulos, C.J. and C.E. Mimms. 1979. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley and Sons.
- Dharmaputra, O.S. *et al.* 1989. *Mikologi Dasar*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Gunawan, L.W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor: Laboratorium Kultur Jaringan, PAU Bioteknologi, IPB.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Setyawati, O. 1989. *Penuntun Praktikum Mikologi Dasar*. Bogor: Laboratorium Mikrobiologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA IPB.