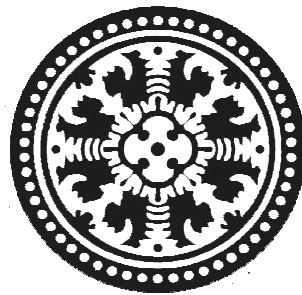


# **MODUL**

## **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI**



Oleh:

Drh. I Gusti Ketut Suarjana, MP  
Dr. drh. I Nengah Kerta Besung, MS  
Dr.drh. Hapsari Mahatmi, MP  
Drh. Ketut Tono PG, M.Kes

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS UDAYANA  
2017**

## MEDIA BIAKAN BAKTERI DAN JAMUR

Media biakan atau pertumbuhan mikroorganisma adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang digunakan untuk tumbuh dan berkembangbiak mikroorganisma pada media tersebut. Media disusun berdasarkan komponen-komponen penting yang diperlukan oleh mikroorganisma seperti mineral, karbohidrat, asam amino, pH, air. Secara komersial media diformulasikan sedemikian rupa sehingga dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi suatu mikroorganisma.

### Macam-Macam Media

A. Berdasarkan bentuknya dikelompokkan menjadi 3 yaitu :

#### 1. Media Padat

Media padat mengandung bahan pematid atau agar sekitar 15% sehingga bentuknya padat. Menurut bentuk dan wadahnya dibedakan menjadi 3 jenis : media tegak, media miring dan media lempeng. Pada umumnya media ini dipergunakan untuk menumbuhkan bakteri maupun jamur. Pada media lempeng agar pada umumnya digunakan untuk mengisolasi mikroorganisma oleh karena pada media ini akan tumbuh isolat atau koloni-koloni bakteri dan jamur yang diduga ada dalam sampel yang kita kultur. Dengan demikian kita dapat mengidentifikasi secara makroskopis isolat mikroorganisma tersebut.

#### 2. Media Setengan Padat atau Semisolid

Media semisolid merupakan media yang mengandung agar sekitar 0,3-0,4% agar sehingga konsistensinya menjadi kenyal atau tidak padat dan tidak cair. Pada umumnya media ini digunakan untuk melihat pergerakan atau motilitas bakteri. Bakteri memiliki flagela yang digunakan untuk bergerak. Pada media semisolid bakteri yang memiliki flagela terlihat pertumbuhannya melebar sampai diluar bidang tusukan. Sebaliknya bakteri yang tidak memiliki flagela pertumbuhannya terbatas pada bidang tusukan pada waktu melakukan inokulasi.

#### 3. Media Cair.

Media cair merupakan media yang tidak ditambahkan bahan pematid atau agar sehingga konsistensinya cair. Media cair pada umumnya dipergunakan untuk melihat sifat pertumbuhan bakteri seperti keruh uniform, membentuk endapan berpasir atau membentuk untaian rambut atau caput medusae.

## B. Berdasarkan Komposisi

### 1. Media alami atau non sintetis

Media alami merupakan media yang disusun dari bahan-bahan alami yang komposisinya tidak dapat diketahui secara pasti. Pada umumnya media ini dibuat ekstrak dari bahan dasar seperti kentang, daging, telur, tomat dsb.

### 2. Media Semi sintetis

Media semi sintetis merupakan media merupakan media yang disusun dari bahan-bahan alami dan sintetis. Media semi sintetis contohnya kaldu nutrisi yang terdiri dari pepton, NaCl, ekstrak daging dan aquades.

### 3. Media Sintetis

Media sintetis merupakan media yang disusun dari senyawa kimia dengan formulasi takaran dan jenisnya diketahui secara pasti. Contohnya Salmonella-Shigella agar, Mac Conkey agar dsb.

## C. Berdasarkan Fungsi

### 1. Media Umum

Media umum merupakan media yang digunakan untuk menumbuhkan semua jenis bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif. Pada media padat dalam bentuk lempeng agar isolat mikroorganisma yang tumbuh membentuk koloni-koloni tertentu yang dapat kita bedakan berdasarkan bentuk, warna, diameter dan tepi koloni. Sebagai contoh media umum adalah nutrisi agar atau nutrisi cair

### 2. Media Diferensial.

Media diferensial merupakan media basal yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri serta bertujuan melihat sifat pertumbuhannya. Contohnya blood agar. Pada media blood agar biasanya digunakan untuk menumbuhkan bakteri secara umum, tetapi sangat ideal untuk menumbuhkan bakteri *fastidious* seperti bakteri kokus, Haemophilus dsb. Disamping itu media blood agar juga digunakan untuk melihat sifat hemolitik bakteri yang dikelompokkan menjadi tiga

yaitu alfa hemolitik atau zona hemolitik tidak sempurna, beta hemolitik atau zona hemolitik sempurna dan gama hemolitik atau tidak terbentuk zona hemolitik.

### 3. Media Diperkaya

Media ini pada umumnya digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Salmonella* dari sampel feces penderita. Sebagai contohnya *selenite broth* dan *tetrathionate broth*. Pada media ini pertumbuhan bakteri Coliform yang terdapat dalam saluran pencernaan hewan maupun manusia akan ditekan oleh selenite atau tetrathionate sebaliknya *Salmonella* bisa tumbuh. Masa inkubasi optimum biakan pada media diperkaya adalah 18 jam pada suhu 37°C.

### 4. Media Selektif

Media selektif merupakan media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri –bakteri tertentu saja oleh karena media ini mengandung zat inhibitor untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain. Contohnya media *Mac Conkey agar plate* (MCA). Pada media MCA mengandung zaat inhibitor garam empedu (*bile salt*) yang berfungsi untuk menekan pertumbuhan bakteri Gram positif tetapi menumbuhkan Gram negatif kecuali *Pasteurella* dan *Haemophilus*. Pada umumnya media selektif digunakan untuk menumbuhkan bakteri Gram negatif yang tergolong dalam famili *Enterobacteriaceae* yang merupakan flora normal dalam saluran pencernaan. Disamping MCA juga ada beberapa contoh media selektif lainnya seperti *Salmonella-Shigella agar* (SSA), *Brilliant green agar* (BGA), *Eosin methylen blue agar* (EMBA), *Bismuth sulphite agar* (BSA), dsb. Pada media selektif juga dapat dibedakan koloni-koloni bakteri *Enterobacteriaceae* yang memfermentasi laktosa maupun tidak memfermentasi laktosa. Pada Media MCA dan SSA bakteri yang memfermentasi laktosa akan tumbuh dengan warna kooni pink, tetapi bakteri yang tidak memfermentasi laktosa tidak berwarna /colorles. Hal ini disebabkan oleh karena zat indikator *neutral red* pada media dalam suasana asam berubah menjadi warna pink sedangkan dalam suasana basa tidak berwarna. Pada media BGA koloni lactose-fermented berwarna kuning sedangkan non lactose-fermented berwarna merah. Pada media EMBA koloni *Escherichia coli* berwarna hijau metalik dan coliform yang lain berwarna coklat gelap dan coklat kemerahan, sedangkn bakteri yang tidak memfermentasi laktosa tidak berwarna. Media selektif yang ideal untuk mengisolasi *Salmonella sp* adalah SSA, BSA dan BGA. Pada media SSA dan BSA koloni bakteri yang memproduksi hidrogen sulfida (H<sub>2</sub>S) membentuk *black spot*.

### 5. Media Biokimiawi dan gula-gula

Media biokimiawi dan gula-gula merupakan media yang digunakan untuk mengetahui sifat-sifat karakteristik mikroorganisma dengan cara melakukan inokulasi pada beberapa media tertentu. Secara konvensional media ini digunakan untuk identifikasi sifat-sifat biokimiawi yang khas dari mikroorganisma tertentu. Beberapa contoh media yang sering digunakan dalam mikrobiologi :

a. Triple sugar iron agar (TSI) agar. Media TSI agar pada umumnya digunakan sebagai tahap awal untuk melakukan identifikasi bakteri terutama yang tergolong Enterobacteriaceae. Dalam pembuatannya media TSI agar pada tabung reaksi terdiri dari bagian tegak dan miring. Tujuan penanaman pada media TSI agar yaitu untuk mengetahui sifat fermentasi, produksi H<sub>2</sub>S dan gas

b. Sulfide indol motility (SIM). Media SIM bentuknya semisolid yang digunakan untuk mengetahui produksi H<sub>2</sub>S, indol dan motilitas atau pergerakan suatu bakteri. Produksi indol dapat diketahui dengan meneteskan 1-3 tetes reagen Kovacs atau Ehrlich ke dalam biakan bakteri. Hasil positif indol akan ditandai warna merah pada permukaan biakan.

c. Media Methyl red-Voges Proskauer (MRVP). Media MRVP digunakan untuk mengetahui sifat bakteri memproduksi asam dengan tes MR dan produksi asetilmetilkarbinol dengan tes VP. Cara untuk mengetahui sifat-sifat tersebut masing-masing biakan bakteri ditetesi dengan reagen MR dan reagen VP. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah pada permukaan media.

d. Simmon citrat agar. Media ini digunakan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dengan mempergunakan citrat sebagai karbon organik.

e. Media gula-gula. Secara umum bakteri memfermentasi beberapa karbohidrat tertentu dan penting dilakukan untuk mengetahui karakteristik bakteri. Pada pembuatan media gula-gula biasanya dilengkapi dengan tabung Durham ke dalam media untuk mengetahui adanya produksi gas sebagai hasil dari proses fermentasi. Beberapa contoh media gula-gula glukosa, laktosa, sukrosa, trehalosa, inositol, dsb.

## PERTUMBUHAN BAKTERI

Pertumbuhan bakteri adalah reproduksi aseksual menggunakan cara pembelahan sel dimana bakteri menjadi dua sel anak yang dikenal dengan proses binary fission. Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan kuantitas konstituen seluler dan struktur organisme yang dapat dinyatakan dengan ukuran, penambahan jumlah, penambahan ukuran sel dan penambahan berat atau massa. Pertumbuhan mikroorganisma akan menjadi optimum atau sempurna apabila didukung

oleh tersedianya nutrisi, air, pH, oksigen dan suhu yang sesuai. Unsur-unsur dasar sebagai nutrisi yaitu karbon, nitrogen, hydrogen, oksigen, sulfur, fosfor, zat besi dan sejumlah kecil logam.

#### A. Pertumbuhan bakteri berdasarkan sumber karbon

Berdasarkan kebutuhan sumber karbon bakteri dikelompokkan menjadi tiga yaitu **kemoheterotrof** bersumber dari bahan organik, **kemoautotrof** bersumber sebagian dari CO<sub>2</sub> dan **fotoautotrof** seluruhnya dari CO<sub>2</sub>.

#### B. Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Suhu

Suhu pertumbuhan mikroorganisme digolongkan menjadi tiga yaitu : **psikrofilik** adalah kelompok bakteri yang dapat tumbuh pada suhu dingin dengan rentangan bervariasi -5- 20°C dengan suhu optimum 10-20°C, **mesofilik** adalah kelompok bakteri tumbuh pada suhu 20-40°C dengan suhu optimum 37°C. dan **termofilik** tumbuh pada rentangan suhu 45-80°C dengan suhu optimum 50-60°C.

#### C. Pertumbuhan Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

Pertumbuhan bakteri kebutuhannya akan oksigen dikelompokkan menjadi empat yaitu : **obligat aerob** adalah kelompok bakteri yang tumbuh bila ada oksigen, **Fakultatif anaerob** kelompok bakteri yang tumbuh baik ada atau tanpa oksigen, **obligat anaerob** kelompok bakteri yang tumbuh bila tak ada oksigen dan **mikroaerofilik** adalah kelompok bakteri tumbuh baik pada kadar oksigen rendah.

#### D. Kebutuhan Akan pH

Pada umumnya bakteri tumbuh pada rentangan pH 4-9 dengan pH optimum 7,2-7,6. Berdasarkan kebutuhan akan pH bakteri dikelompokkan sebagai berikut : **asidofilik** tumbuh baik pada pH 2-5, **neutrofilik** tumbuh pada pH 5,5-8 dan **alkalifilik** tumbuh pada pH 8,5-9.

### Fase Pertumbuhan Bakteri

Apabila bakteri ditanam kembali kedalam medium yang baru maka bakteri tidak akan segera membelah diri tetapi mengalami fase-fase pertumbuhan secara runtut sebagai berikut:

1. **Fase permulaan.** Fase ini juga dikenal sebagai fase initial atau lag phase. Pada fase ini bakteri belum berkembangbiak atau memperbanyak sel. Pada fase ini biasanya terjadi pembentukan enzim induktif atau geminasi spora.

2. **Fase Pertumbuhan.** Pada fase ini terjadi pertumbuhan yang dipercepat dan sel bakteri belum memperbanyak diri secara optimal.

3, **Fase Logaritma.** Fase ini juga dikenal exponential phase oleh karena pada fase ini kecepatan pertumbuhan populasi sel berjalan maksimal dan konstan. Sel bakteri sangat aktif membelah diri,

4. **Fase pertumbuhan diperlambat/terhambat.** Pada fase ini pertumbuhan sel bakteri mulai terhambat, kecepatan pertumbuhan makin lama makin menurun. Penurunan kecepatan pertumbuhan sel disebabkan oleh kehabisan nutrisi, akumulasi substansi toksik hasil metabolisme sel dan perubahan pH yang tajam.

5. **Fase Stasioner.** Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sel adalah nol. jumlah pembentukan sel baru sebagai hasil reproduksi seimbang dengan jumlah sel yang mati.

6. **Fase Kematian.** Fase ini dikenal sebagai phase of decline oleh karena jumlah sel yang hidup makin lama makin menurun, sedangkan jumlah kematian sel makin banyak. Hal ini disebabkan oleh kondisi lingkungan yang tidak sesuai terutama adanya akumulasi toksik hasil metabolisme sel.

## STREPTOKOKUS PADA BABI

Kasus streptokokus pada babi pertama kali muncul pada bulan Mei 1994 di Bali. Kasus berikutnya ditemukan di Flores Timur, Kupang serta daerah lainnya. Pada bulan Oktober 1994 kasusnya ditemukan di Sulawesi Utara, Tana Toraja, Sulawesi Selatan, Pare-pare, Manado dan Gowa. Di awal tahun 2010 kasusnya mereda dan jarang dilaporkan. Namun di awal tahun 2017 kembali menelan korban dan mendapat perhatian serius baik dari kalangan pemerintah, masyarakat, maupun peternak babi.

*S. suis* merupakan penyakit bakteri yang memiliki arti penting di seluruh dunia karena berpotensi zoonotik dan mampu menimbulkan wabah serius baik pada babi maupun manusia (Desjardins *et al.*, 2014). Gejala utamanya adalah meningitis atau gejala syaraf lainnya seperti ketulian, peradangan pada mata hingga kebutaan. Disamping itu bakteri ini menimbulkan gejala klinis seperti *arthritis*, *endocarditis*, pneumonia, dan septicemia pada babi. Kejadian poliserositis pada babi juga pernah dilaporkan pada kasus infeksi *S. suis* serotipe 3 dan 4 di Korea (Kim *et al.*, 2010). *Streptococcus suis* serotipe 2 juga dilaporkan menginfeksi anak babi melalui vertikal maupun horizontal saat masa penyusuan. Anak babi yang mampu bertahan akan mengalami lesi permanen seumur hidupnya dan dapat mengganggu pertumbuhannya.

Resiko kejadian penyakit pada manusia berhubungan erat dengan konsumsi daging yang tertular. Masyarakat Bali yang mengkonsumsi babi berpotensi besar tertular *S. suis*. Kasus meningitis dan penyakit lain akibat *Streptococcus suis* telah banyak dilaporkan namun sampai saat ini belum banyak informasi yang didapatkan tentang patogenesis dan virulensi bakteri ini. Faktor virulensi dan patogenesis *S. suis* yang menyebabkan berbagai gejala syaraf, pernafasan, sepsis, dan lainnya masih diperdebatkan terkait banyak faktor yang mempengaruhinya (Fittipaldi *et al.*, 2012). Bahkan mekanisme terjadinya inflamasi meninges dan berbagai lesi di otak masih belum dipahami secara utuh (Domínguez-Punaro *et al.*, 2007). Minimnya informasi tentang *S. suis* mengakibatkan sulitnya deteksi bakteri, diagnosa penyakit dan metode pencegahannya, sehingga pencegahan dan penanganannya cenderung tidak tepat sasaran.

Isu hangat yang merebak di kalangan masyarakat Bali di awal tahun 2017 berkaitan dengan merebaknya kasus *S. suis pada manusia*. Sebanyak 7 orang menderita kejang-kejang akibat mengkonsumsi makanan yang berasal dari babi. Ditenggarai bahwa adanya kasus meningitis pada manusia diakibatkan oleh bakteri *Streptococcus suis* akibat mengkonsumsi bahan makanan yang berasal dari babi. Bukti ini ditunjukkan dengan ditemukannya kuman *S. suis* pada manusia di laboratorium di RSUP Sanglah. Kejadian streptokokus pada manusia yang menimbulkan gejala



meningitis ini disebabkan oleh bakteri *S. suis* sehingga penyakit disebut dengan meningitis *Streptococcus suis* (MMS) (Bali post, 2017a).

Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh hasil penyidikan dari Balai Besar Veteriner Denpasar terhadap babi yang dicurigai. Upaya isolasi kuman dari babi yang dicurigai menderita *S. suis* tidak mendapatkan hasil. Pengambilan sampel darah, kotoran limbah serta bekas pemotongan ternak tidak menemukan bakteri tersebut (Bali post, 2017b). Tidak ditemukannya bakteri ini pada babi bukan berarti babi terbebas dari infeksi streptokokus. Pada infeksi yang berlanjut atau kronis, bakteri tidak lagi berada di darah tetapi sudah menyebar ke jaringan, sehingga pengambilan sampel darah akan sia-sia.

Studi deteksi *S. suis* pada babi perlu diperdalam seiring dengan fakta bahwa merebaknya kasus *S. suis* di lapangan. Peternak banyak yang mengeluh karena ternaknya tiba-tiba sakit dan sering berakhir dengan kematian. Di sisi lain, masyarakat ketakutan mengkonsumsi daging babi, sehingga berakibat harga jual daging babi di pasaran menjadi anjlok.

#### **Klasifikasi dan sifat *Streptococcus suis***

*Streptococcus suis* merupakan bakteri Gram positif, bersifat anaerob fakultatif dan berdasarkan klasifikasi Lancefield's, mempunyai struktur dinding sel yang masuk dalam klasifikasi *Streptococcus* group D (Gottschalk dan Segura, 2000). *Streptococcus suis* merupakan bakteri yang mudah dikenali karena secara morfologi berbentuk bulat, tunggal atau berpasangan maupun tersusun dalam bentuk rantai panjang, Gram positif, koloni tumbuh seperti titik-titik embun pada permukaan media kultur, tumbuh baik pada kondisi mikroaerofilik atau fakultatif anaerob dan bersifat alpha, beta maupun gamma hemolitik

#### **Infeksi *Streptococcus suis* pada Babi**

Babi dewasa maupun babi muda dapat bertindak sebagai karier *S. suis* pada hidung, tonsil dan nasofaring tanpa menunjukkan gejala sakit. Bakteri *S. suis* berpredileksi pada saluran pernafasan bagian atas terutama bagian cavum nasal dan tonsil, juga pada saluran pencernaan babi (Higgins dan Gottschalk, 2006). Gejala klinis pada babi antara lain anoreksia, depresi, kemerahan pada kulit, kepincangan, inkoordinasi dan demam, selanjutnya diikuti gejala syaraf yang lebih nyata seperti paralisis, *paddling movement*, opistotonus dan spasmus tetanik.

Infeksi *Streptococcus suis* serotipe 2 pada manusia dapat menyebabkan septicemia dan meningitis yang sering kali diperparah dengan endophthalmitis, dan *cochleitis* (Arends dan Zanen, 1988). Infeksi ini seringkali disebabkan oleh serotipe 2 dan sedikit oleh serotipe 4 dan 14 (Higgins and Gottschalk, 2000). *Streptococcus suis* kemungkinan masuk melalui luka kecil atau melalui pernafasan (Arends dan Zanen, 1988). *Streptococcus suis* berperan sebagai agen zoonotik berbagai

penyakit berbahaya pada manusia, terutama pada manusia yang pekerjaannya terekspos babi atau produk olahan babi (Lun *et al.*, 2007; Wertheim *et al.*, 2009).

### **Faktor Virulensi**

*Streptococcus suis* dilaporkan mempunyai berbagai macam determinan virulensi, antara lain: a.

#### *Capsular Polysaccharide (CPS)*

*Capsular Polysaccharide (CPS)* dilaporkan berfungsi sebagai antifagositik. CPS *S. suis* serotipe 2 mempunyai berat molekul (BM) sekitar 100 kDa dan tersusun dari rhamnosa (*N-acetylgalactosamine*), galaktosa, glukosa, *N-acetylglucosamine*, dan asam sialat. Asam sialat adalah yang paling utama dan merupakan faktor virulensi penentu patogenesis suatu serotipe *S. suis*. (Gottschalk dan Segura, 2000).

#### b. Adesin

Adesin merupakan senyawa kimia dengan BM 36 kDa. Adesin memiliki struktur peptida yang mengikat *dissacharidesgalactosyl (alpha1-4)-galactose (Gala-4gal)*. Molekul Gala 1-4 adalah bagian dari *trihexosylceramide (GbO3)* yang terdapat pada membran sel hospes. Senyawa GbO3 merupakan glikolipid yang ada di eritrosit, sehingga adesin bertanggung jawab atas kemampuan dalam mengaglutinasi eritrosit (Gottschalk dan Segura, 2000).

#### c. *Muramidase Released Protein (MRP)* dan *extracellular factor (EF)*

*Muramidase release protein (MRP)* dan *extracellular factor (EF)* merupakan 2 faktor virulensi yang penting pada *S. suis*. berat molekul MRP 136 kDa dan EF 110 kDa. Keberadaan protein EF selalu berkorelasi dengan MRP, namun fungsi protein EF secara pasti belum diketahui dengan jelas. Berdasarkan korelasi protein MRP dan EF, terdapat 3 macam fenotipe dari *S. suis* yaitu MRP+EF+ sebagai faktor virulen yang biasanya diisolasi dari babi sakit, fenotipe MRP-EF- yang biasanya diisolasi dari babi sehat, serta fenotipe MRP+EF- yang dapat diisolasi dari dari manusia sakit akibat infeksi *S. suis*.

#### d. *Haemolysin/Suilyisin (Sly)*

*Suilyisin* mempunyai berat molekul 54 kDa. Karakterisasi strain pathogen *S. suis* serotipe 2 selalu berasosiasi dengan adanya suilyisin (Smith *et al.*, 1997). Keberadaan suilyisin juga berkorelasi dengan protein MRP dan EF. Kejadian babi sakit terinfeksi *S. suis* dengan virulensi tinggi umumnya terekspresi MRP +, EF +, Sly +, sedangkan pada babi sehat terekspresi MRP, EF-, Sly-.

### **Patogenesis *Streptococcus suis***

Anak babi merupakan hospes penting dalam penyebaran agen infeksi ke babi lain dalam suatu populasi peternakan. Mekanisme penularan pada anak babi biasanya melalui transmisi vertikal. Beberapa hewan terkadang menunjukkan kondisi sehat tetapi bersifat *carrier* yang

berbahaya bagi populasi babi lainnya. Babi yang bersifat *carrier* tidak menunjukkan gejala klinis dan dalam waktu cepat atau lambat akan berkembang menjadi bakteremia, terkadang septikemia dan meningitis (Gottschalk dan Segura, 2000).

Mekanisme pathogenesis infeksi *S. suis* seperti teori *Trojan-horse style* yang memperlihatkan kemampuan *S. suis* untuk bertahan dalam sel mononuklear. Bakteri yang bertahan dalam sel mononuklear mampu menyebar dan menyebabkan lesi meningitis yang patognomonik, ditandai dengan tidak ditemukannya lesi pada sel endotel jaringan mikrovaskular otak (Gottschalk dan Segura, 2000).

*Streptococcus suis* menggunakan wilayah tonsil sebagai jalan untuk masuk ke host, kemudian masuk ke leukosit mononuklear dan menuju cairan *cerebrospinal* (CSF) melalui *choroid plexus*. Stimulasi produksi sitokin oleh makrofag yang terinfeksi, diduga menyebabkan peradangan yang menembus dari darah ke CSF (Chanter *et al.*, 1993). Peningkatan sel pada CSF memblok area *fluid efflux*, meningkatkan tekanan intrakranial dan dapat membahayakan sistem saraf.

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan reaksi enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuen nukleotida tertentu secara eksponensial dengan cara *in vitro*. Kelebihan metode ini adalah pelipatgandaan fragmen *deoxyribonucleic acid* (DNA) dapat dilakukan secara cepat dan dapat menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit.

Empat komponen utama proses PCR yaitu DNA *template* (fragmen DNA yang akan dilipatgandakan), primer (suatu sekuen oligonukleotida pendek yang terdiri atas 15-25 basa nukleotida yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari *deoxyadenosine* (dATP), *deoxycytidine* (dCTP), *deoxyguanine* (dGTP), dan *deoxythymidine* (dTTP), enzim DNA polymerase, dan komponen tambahan yaitu *buffer*.

Dengan ditemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA *polymerase* mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi. Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp,  $5 \times 10^{-9}$  mol) sebesar 200.00 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit.

Reaksi ini dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dari reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 µl. DNA *template* yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR.

Elektroforesis gel agarosa umumnya digunakan untuk separasi DNA. Pemisahan molekul-molekul ini didapat dari molekul asam nukleat (DNA) yang bermuatan negatif (katoda) bergerak melalui gel agarosa ke muatan positif (anoda) pada medan elektrik. Molekul yang ukurannya lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding molekul yang ukurannya lebih besar. Keuntungan elektroforesis gel agarosa yaitu mudah diperoleh dan tidak mendenaturasi sampel yang diuji, sedangkan kerugiannya adalah gel dapat meleleh dan *buffer* dapat habis selama elektroforesis berlangsung, selain itu material genetik yang tidak diharapkan bisa berada di tempat yang tidak diharapkan (Yuwono,2006).

#### ***Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis***

Dasar metode *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) adalah elektroforesis. Elektroforesis adalah perpindahan molekul dalam larutan sebagai respon kepada sebuah medan. Kecepatan perpindahan ini tergantung kekuatan medan, muatan medan, besar dan bentuk molekul dan juga kekuatan ion, viskositas serta suhu medium dimana molekul tersebut berpindah (Rybicki dan Purves, 2007). *Polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) terbentuk dari polimerisasi antara *acrylamide* sebagai monomer dengan N, N'-*methylene-bis(acrylamide)* (sebagai *cross-linker*) disertai dengan penambahan katalis yaitu *tetramethylethylenediamine* (TEMED) serta inisiator (*amonium persulfate*).

Muatan ion atau kelompok ion akan berpindah jika berada pada suatu medan listrik. Protein merupakan komponen *amphoteric*, muatannya tergantung pada pH medium dimana protein tersebut tersuspensi. Pada larutan dengan pH dibawah titik iso elektrisnya, protein memiliki muatan negatif dan berpindah menuju anoda pada medan listrik (Rybicki dan Purves, 2007). *Sodium Dodecyl Sulphate* (juga dikenal dengan Lauryl Sulfat) merupakan senyawa anion, artinya ketika dalam larutan, molekul-molekulnya memiliki muatan negatif tanpa memperhatikan kisaran pH. Muatan negatif SDS merusak kebanyakan struktur kompleks protein dan memperkuat tarikan menuju anoda (kutub positif) pada medan listrik.

Beta merkaptoetanol (tiol) digunakan untuk mereduksi semua ikatan disulfida yang ada pada protein. SDS merupakan detergen lemah yang akan mengikat protein dan memutuskan ikatan diantara subunit penyusun. Sistem gel SDS merupakan alat kualitatif yang berguna. Preparat dapat

segera dianalisa sifat homogenitasnya. Protein homogen menghasilkan satu pita. Berat molekul protein dapat ditetapkan dengan mempergunakan protein baku yang telah diketahui berat molekulnya dan membandingkan nilai Rf (mobilitas relatif) yang diperoleh. Pita berwarna atau "band" dapat diketahui dengan suatu reaksi pewarnaan seperti pewarnaan dengan *Coomassie blue*. Elektrogram yang dihasilkan oleh metode elektroforesis dapat segera dikuantitatifkan dengan alat densitometer. Pada gel dengan densitas yang seragam, jarak perpindahan relatif pada protein (Rf) adalah berbanding terbalik dengan log massanya. Jika protein yang telah diketahui massanya bergerak secara simultan dengan protein yang belum diketahui massanya, hubungan antara Rf dan massa dapat diplotkan, kemudian massa dari protein yang belum diketahui dapat dihitung.

### **Antibodi Spesifik**

Antibodi dihasilkan oleh sel plasma yang merupakan fase akhir perkembangan sel B. Berbeda dengan sel T, sel B dapat mengenali antigen dalam bentuk aslinya (*native*). Sel B mengenali antigen melalui antibodi yang terdapat pada permukaan sel, menjadi aktif dan mengalami peralihan produksi immunoglobulin (Ig) kelas IgM menjadi IgG (*class switch*), meningkatkan spesifisitas dan afinitas immunoglobulin yang dihasilkan dan mengalami diferensiasi menjadi sel plasma atau sel memori dan terus mengalami pembelahan selama masih ada sitokin.

Produksi antibodi poliklonal diperoleh secara langsung dari sampel serum hewan yang diimunisasi menggunakan antigen tertentu. Produk ini berasal dari banyak klon limfosit dari tubuh hospes yang diimunisasi serta mampu memberikan respon. Respon antibodi terhadap antigen umumnya merupakan kombinasi sejumlah besar antibodi monoklonal. Untuk menjawab berbagai permasalahan diagnostik, sudah cukup jika digunakan antibodi poliklonal, karena antiserum ini memiliki berbagai antibodi yang dapat berikatan dengan berbagai epitop pada suatu antigen sehingga reaksi yang multiple ini tetap dapat menimbulkan kompleks antigen-antibodi. Antibodi monoklonal dapat digunakan untuk kepentingan deteksi atau diagnosis dan produksi skala besar karena lebih spesifik dibandingkan antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal lebih sensitif daripada antibodi monoklonal tetapi tidak spesifik. Sisi sensitif ini dilihat berdasarkan sifatnya yang heterogen sehingga antibodi poliklonal mempunyai area selektivitas dan afinitas yang lebih luas.

Prinsip produksi antibodi poliklonal dengan cara mengimmunisasi hewan dengan antigen yang memiliki banyak epitop, sehingga antibodi yang dihasilkan banyak jenisnya tergantung bagian epitop yang dikenalnya (Janeway *et al.*, 2001). Waktu produksi antibodi poliklonal pada umumnya 4 hingga 8 minggu.

### **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan metode yang sering digunakan untuk mengetahui adanya reaksi antigen-antibodi, serta untuk pemeriksaan respon imun humoral. Metode ELISA sangat sensitif dan mampu mendeteksi konsentrasi antigen maupun antibodi dalam konsentrasi yang rendah (dalam piko atau nano gram). Ciri utama metode ini adalah penggunaan indikator enzim dalam reaksi imunologisnya (Janeway, *et al.*, 2001). Beberapa teknik ELISA diantaranya adalah langsung (*direct*), tidak langsung (*indirect*), *sandwich/antigen capture* dan kompetitif. Teknik ELISA langsung (*direct*) merupakan deteksi yang paling sederhana diantara metode ELISA yang lain. Teknik ELISA tidak langsung (*indirect*) merupakan teknik ELISA paling sederhana untuk pengukuran titer antibodi. Teknik *antigen capture (sandwich)* ELISA atau penangkapan antigen menggunakan antibodi yang terikat pada dasar *microplate* untuk menangkap antigen secara spesifik. Teknik ini lebih sensitif namun kurang spesifik. Pada teknik ELISA kompetitif antibodi yang dikenal dengan yang tidak dikenal akan bersaing mendapatkan tempat untuk berikatan dengan antigen.

Dibandingkan dengan metode langsung dan non-kompetitif, teknik ini lebih cepat dan spesifik tapi kurang sensitif. *Antigen capture (sandwich)* ELISA merupakan salah satu uji diagnostik untuk mendeteksi adanya antigen dengan menggunakan antibodi poliklonal maupun antibodi monoklonal. Ikatan spesifik antara antigen dan antibodi adalah faktor yang paling penting dalam keberhasilan *antigen capture* ELISA. Spesifisitas uji dimodifikasi dengan menggunakan antibodi monoklonal dari *single strain* atau *multiple strain*. Antibodi monoklonal akan mengenali epitop tunggal sehingga dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi antigen yang spesifik. Akan tetapi, antibodi poliklonal biasanya dipilih untuk meningkatkan sensitifitas. Kelebihan dari metode *antigen capture* ELISA adalah sampel yang digunakan tidak harus dipurifikasi sebelum analisis dan uji ini sangat sensitif, 2 hingga 5 kali lebih sensitif dibandingkan *direct* atau *indirect* ELISA. Uji ini spesifik karena dua antibodi digunakan untuk menangkap dan mendeteksi antigen. Selain itu uji ini memiliki fleksibilitas dan sensitifitas yang tinggi.



## **PRAKTIKUM**

### **PEMBUATAN MEDIA PERTUMBUAHAN BAKTERI**

Media adalah suatu substansi yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan biakan bakteri. Pembiakan sel memerlukan suatu media sebagai tempat hidupnya yang disebut dengan medium kultur dan media biakan. Suatu medium kultur yang baik harus memiliki komposisi yang lengkap antara lain harus berisi zat hara serta memiliki kondisi lingkungan yang mendukung dan sesuai kondisi *in vivo* sel yang akan dikultur. Pembuatan media kultur sel didasarkan pada fungsi, komposisi media, dan konsistensinya sehingga dalam kultur yang dilakukan sel dapat tumbuh dengan baik dan sesuai dengan yang diharapkan.

Media biakan yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri terdapat dalam bentuk padat, semi padat, dan cair. Media biakan harus berisi zat hara dan mempunyai zat fisik yang sesuai dengan pertumbuhan bakteri. Nutrisi yang berada di dalam media biakan digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Pada umumnya, nutrisi atau kandungan unsur dalam media biakan yang dibutuhkan oleh bakteri adalah sumber energi, karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, unsure-unsur logam, vitamin dan air. Macam kondisi fisik lingkungan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimum bakteri adalah suhu, gas atmosfer, dan pH. Untuk berhasilnya kultivasi bakteri, dibutuhkan kombinasi nutrisi serta lingkungan fisik yang sesuai

Berdasarkan bentuknya, terdapat :

- Media cair yang komposisinya dapat sintetik dapat pula alami. Keadaannya cair karena tidak ditambahkan bahan pematat.
- Media padat, sama seperti media cair, bedanya disini tidak ditambahkan pematat (agar-agar, amilum, atau gelatin).
- Media semi padat, sebenarnya media ini termasuk media padat tapi karena keadaannya lembek disebut semi solid.

Berdasarkan kegunaannya :

- Media umum, digunakan secara umum artinya medium ini dapat ditumbuhi oleh berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur, misalnya NA (Natural Agar) dan lain-lain.
- Media selektif, media ini dipakai untuk menyeleksi mikroorganisme sesuai dengan yang diinginkan, jadi hanya satu jenis mikroorganisme yang dapat tumbuh dalam media ini atau hanya satu kelompok tertentu saja, misalnya media salmonella atau sigella dari makanan atau bahan lain.



- Media diferensial, media ini juga diergunakan untuk menyeleksi mikroorganisme. Media ini dapat ditumbuhi berbagai jenis mikroorganisme tapi salah satu diantaranya dapat memberikan cirri yang khas sehingga dapat dibedakan dari yang lain dan dapat dipisahkan media pengaya. Medium ini gunanya untuk menumbuhkan mikroorganisme untuk keperluan tertentu. Dibiakan dalam medium ini supaya sel-sel mikroorganisme tersebut dapat berkembang dengan cepat sehingga diperoleh populasi yang tinggi

### **Bahan-Bahan Yang Digunakan**

Bahan-bahan yang digunakan meliputi swab nasal babi, stuart agar, aquades, *Blood Agar* (base) sebagai media selektif, pewarna Gram, *Triple Sugar Iron (TSI) Agar* (merck), media *Sulphide Indol Motility (SIM)* (merck), MRPV (merck), *Simon Citrat Agar (SCA)*, reagen KOVAC, reagen MR, reagen VP, Glukosa agar, Laktosa agar, Maltosa agar, Sukrosa agar, plasma darah kelinci, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), oksidase strip, alkohol 70%.

### **Peralatan Yang Digunakan**

Peralatan yang digunakan adalah mikro tube, cotton swab (menggunakan kapas steril yang dililitkan pada bambu bentuk batang kecil dan cotton butt), cawan petri, hot plate, steering hot plate untuk pembuatan media, incubator, autoclave, osse, needle, Bunsen, steering magnet, gelas beker, tabung Erlenmeyer, tabung reaksi, objek glass, mikroskop, kertas label, coolbox, timbangan elektrik, aluminium foil, laminar flow.

#### **a. Media transport**

Sterilkan alat-alat yang akan digunakan seperti tabung Erlenmeyer dan tabung effendorf (*mikrotube*) menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Siapkan timbangan kemudian timbang *stuart agar* sesuai dengan takaran yaitu 16 g dalam 1 liter air. Masukkan media stuart agar yang telah ditimbang ke dalam tabung erlenmeyer yang sudah disterilkan dan tambahkan aquades sesuai kebutuhan. Homogenkan pada *hot plate stirer* dengan menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media tersebut dapat diletakkan pada tabung effendorf (*mikrotube*) dan simpan didalam kulkas.

#### **b. Media isolasi**

Alat-alat yang akan digunakam seperti tabung erlenmeyer, cawan petri disterilkan terlebih dahulu pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media *Blood Agar* yang dibutuhkan sesuai takaran yaitu 40g dalam 1 liter air. Tuangkan media dan aquades yang sudah steril kedalam tabung erlenmeyer. Homogenkan media pada *hot plate stirer* dengan

menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang ke dalam cawan petri yang sudah steril. Media dapat digunakan setelah membeku dan permukaannya kering.

### c. Media Identifikasi Bakteri

#### 1. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer dan tabung reaksi pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media TSIA yang digunakan yaitu 65 g dalam 1 liter air. Setelah itu media dapat dituangkan ke dalam tabung erlenmeyer dan di homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang ke dalam tabung reaksi dan disterilkan kembali dalam *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media dikeluarkan dari *autoclave* dan dibiarkan dalam posisi setengah miring hingga memadat.

#### 2. SIM (Sulfid Indol Motility)

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti erlenmeyer dan tabung reaksi pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 30g dalam 1 liter. Masukkan media yang sudah berisi aquades ke dalam tabung erlenmeyer dan homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dituang ke dalam tabung reaksi dan disterilkan kembali dalam *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media dikeluarkan dari *autoclave* dan dibiarkan dalam posisi tegak.

#### 3. SC (Simon Citrat)

Alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer dan tabung reaksi pada pembuatan media ini disterilkan terlebih dahulu pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan yaitu 22,5g dalam 1 liter. Setelah itu media dituang ke dalam tabung erlenmeyer yang sudah berisi aquades sesuai kebutuhan. Media dihomogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen media dapat dituang pada tabung reaksi dan disterilkan kembali dalam *autoclave*. Setelah steril media dibiarkan pada posisi sangat miring hingga memadat.

#### 4. MRVP (Methylen Red Voges Preskauer)

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer dan tabung reaksi dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 17g dalam 1 liter. Media dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan dituang aquades sesuai kebutuhan lalu dihomogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dituang ke dalam tabung reaksi dan disterilkan kembali pada *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril media dikeluarkan dari *autoclave* dan dibiarkan hingga dingin.

#### 5. Glukosa

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer, tabung reaksi dan tabung durham dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 13g dalam 1 liter. Masukkan media kedalam tabung erlenmeyer dan tuang aquades sesuai kebutuhan dan tetesi reagen *bronthymol blue* sampai berubah warna menjadi biru. Homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dan di sterilkan kembali pada *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari dalam *autoclave* dan dibiarkan hingga dingin.

#### 6. Laktosa

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer, tabung reaksi dan tabung durham dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 13g dalam 1 liter. Masukkan media kedalam tabung erlenmeyer dan tuang aquades sesuai kebutuhan dan tetesi reagen *bronthymol blue* sampai berubah warna menjadi hijau. Homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dan di sterilkan kembali pada *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari dalam *autoclave* dan dibiarkan hingga dingin.

#### 7. Maltosa

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer, tabung reaksi dan tabung durham dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 13g dalam 1 liter. Masukkan media kedalam tabung erlenmeyer dan tuang aquades sesuai kebutuhan dan tetesi reagen *bronthymol blue* sampai berubah warna menjadi biru. Homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dan di sterilkan kembali pada *autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari dalam *autoclave* dan dibiarkan hingga dingin.

#### 8. Sukrosa

Sterilkan alat-alat yang digunakan seperti tabung erlenmeyer, tabung reaksi dan tabung durham dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Timbang media yang digunakan sebanyak 13g dalam 1 liter. Masukkan media kedalam tabung erlenmeyer dan tuang aquades sesuai kebutuhan dan tetesi reagen *bronthymol blue* sampai berubah warna menjadi biru. Homogenkan pada *hot plate stirer* menggunakan *magnetic stirer*. Setelah homogen, media dapat dituang kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dan di sterilkan kembali pada

*autoclave* selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari dalam *autoclave* dan dibiarkan hingga dingin.

#### 9. Koagulase

Ambil darah kelinci menggunakan spuit sebanyak 9 ml letakkan pada tabung reaksi. Kemudian sentrifuge darah tersebut selama 15 menit sampai memisah antara plasma darah dengan sel darah lainnya. Kemudian plasma darah dibagi kedalam beberapa tabung.

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI

### Isolasi Bakteri

Sampel yang digunakan berupa organ, usap hidung, feses, darah atau urin.

### Kultur Bakteri

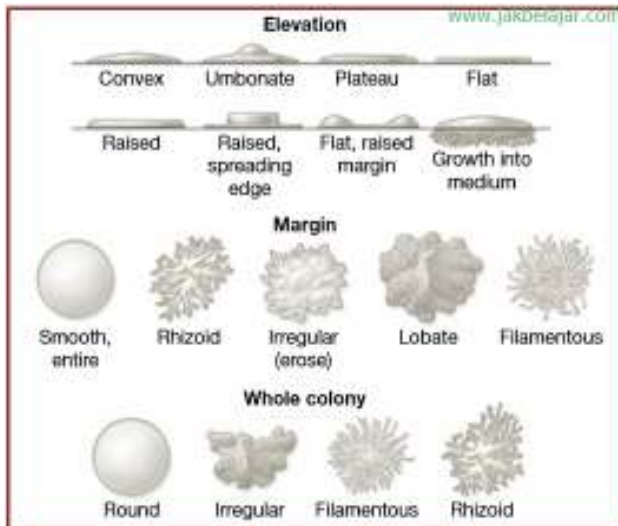
Pengkulturan bakteri menggunakan media umum seperti Nutrient Agar atau media selektif seperti Mac Conkey Agar. Sebelum dilakukan pengkulturan perlu diperhatikan media plate yang digunakan harus steril, permukaan media harus kering dan alat-alat yang digunakan seperti ose harus steril. Sampel yang ada diambil menggunakan ose steril, kemudian dikultur pada media dengan metode garis. Setelah melakukan pengkulturan, media tersebut diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam. Keesokan harinya identifikasi media tersebut dapat dilakukan meliputi bentuk, warna, tepian/margin, elevasi, konsistensi, bau dan diameter koloni.

Mac conkey agar adalah media selektif dan differensial yang paling sering digunakan. Media ini terdiri dari zat warna Kristal violet untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan jamur dan memungkinkan beberapa macam bakteri gram negatif batang tumbuh. Adanya netral red sebagai pH indikator memberikan warna pink sampai merah pada koloni yang memfermentasi laktosa. Untuk bakteri yang tidak memfermentasi laktosa misalnya *shigella spp* memberikan warna koloni jernih transparan

### Bentuk Morfologi Koloni

Adapun beberapa bentuk morfologi koloni bakteri yang perlu diketahui adalah sebagai berikut

- **Bentuk (*shape*) koloni**, dapat berupa *circular* (bulat beraturan), *irregular* (tidak beraturan), dan *punctiform* (berupa titik)
- **Bentuk *margin* atau bentuk pinggiran koloni**, dapat berupa *entire* (halus dan beraturan), *undulate* (bergelombang), *lobate*, *filamentous* (berfilamen), dan *rhizoid* (bercabang seperti akar)
- **Elevasi koloni**, dapat dilihat melalui sisi samping cawan Petri, dapat berupa flat (rata), raised, convex, pulvinate (lebih tinggi dari convex), dan umbonate (raised in the center)
- **Tekstur koloni**, dapat berupa moist, mucoid, dan dry (kering)
- **Pembentukan pigmen atau warna koloni**, berupa warna koloni yang terbentuk, dapat pula digabungkan dengan penampakan warna lainnya seperti *opaque* (buram), *translucent* (agak transparan), *shiny* (mengkilap), dan *dull* (pucat)



### Macam-Macam Pewarnaan

Secara garis besar teknik pewarnaan bakteri dapat dikategorikan sebagai berikut :

1. pewarnaan sederhana
2. pewarnaan differensial : pewarnaan gram dan pewarnaan tahan asam
3. pewarnaan khusus untuk melihat struktur tertentu : pewarnaan flagel, pewarnaan spora, pewarnaan kapsul
4. pewarnaan khusus untuk melihat komponen lain dan bakteri : pewarnaan Neisser (granula volutin), pewarnaan yodium (granula glikogen)

### Pewarnaan negatif (Pewarnaan Sederhana)

Zat warna yang dipakai hanya terdiri dari satu zat yang dilarutkan dalam bahan pelarut. Pewarnaan Sederhana merupakan satu cara yang cepat untuk melihat morfologi bakteri secara umum. Beberapa contoh zat warna yang banyak digunakan adalah biru metilen (30-60 detik), ungu kristal (10 detik) dan fukhsin-karbol (5 detik).

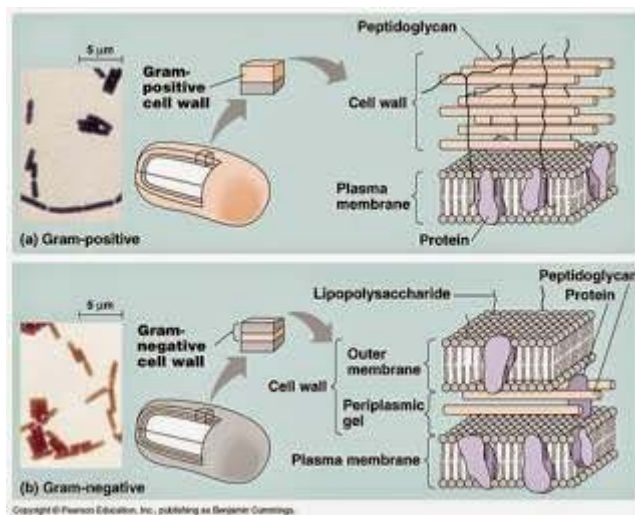
Caranya :

1. buat sediaan oles dan simpan di atas 2 batang kawat horisontal atau menggunakan bak pewarnaan.
2. beri zat warna sehingga seluruh sediaan tertutup penuh
3. biarkan selama waktu yang diperlukan, seperti di atas

4. sediaan dicuci dengan air sampai bersih, lalu keringkan di antara dua kertas saring. Lalu dapat dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif 100x menggunakan minyak imersi.

### Pewarnaan Gram

Pada tahun 1883 Christian Gram seorang ahli mikrobiologi dari Denmark menemukan metode pewarnaan bakteri secara tidak sengaja. Pewarnaan gram merupakan pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi. Pewarnaan ini merupakan tahap penting dalam pencirian dan identifikasi bakteri.



Gambar 0.3

Zat warna yang digunakan lebih dari 1 zat warna, yaitu safranin, kristal violet ditambah 1 macam larutan pencuci yaitu alkohol serta 1 larutan mordan untuk meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri.

Pewarnaan gram memilah antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif berwarna ungu sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah. Pewarnaan gram memberi hasil yang baik jika menggunakan biakan segar yang berumur 24-48 jam, karena pada biakan tua banyak sel yang mengalami kerusakan pada dinding selnya, hal ini mengakibatkan keluarnya zat warna ketika dicuci dengan larutan pemucat, sehingga menyamarkan hasil.

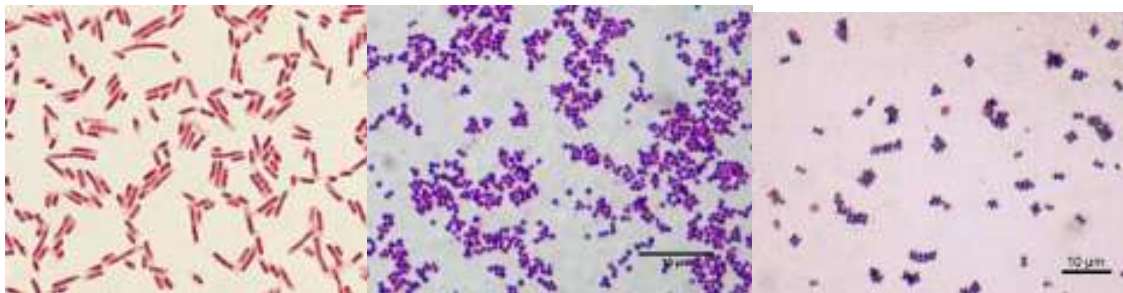
**Prinsip :** Pewarnaan gram didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan larutan pencuci. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tebal sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tebal. Ketika ditambahkan pewarnaan kristal violet maka dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif akan menyerap zat warna tersebut namun ketika diberi alkohol, kristal violet pada Gram negatif akan luntur disebabkan

struktur dinding selnya yang sebagian besar tersusun oleh lipid, sehingga ketika diberi safranin (zat warna kedua) dinding sel bakteri gram negatif akan menyerapnya kembali sehingga **hasil pewarnaan bakteri Gram negatif akan berwarna merah**, sedangkan bakteri gram positif akan tetap berwarna ungu walaupun diberi zat warna kedua, karena dinding selnya tersusun oleh lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga tidak dapat dicuci oleh alkohol. Hal ini memberi **hasil pewarnaan ungu pada bakteri Gram positif**.

Caranya :

- buatlah sediaan oles bakteri
- tuang pada sediaan tersebut zat warna kristal violet, biarkan 1 menit
- zat warna dibuang lalu cuci dengan air mengalir
- beri larutan lugol, biarkan 1 menit
- lugol dibuang dan sediaan dicuci dengan air selanjutnya dicuci dengan alkohol 96% sampai tak ada lagi zat warna yang terlarut
- cuci dengan air sampai bersih
- tuangkan larutan safranin dan biarkan 1 menit, lalu cuci dengan air bersih
- keringkan dengan kertas saring
- periksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x (pakai minyak imersi)

Contoh ;



## Identifikasi Bakteri

### a. TSIA

Media koleksi bakteri yang digunakan yaitu TSIA yang merupakan media padat dan bentuknya setengah miring. Bakteri yang dicurigai berdasarkan morfologinya secara maka koloni bakteri tersebut di tanam pada TSIA dengan cara menusukan pada bagian tegak dari medium lalu digoreskan pada bagian miring medium dan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Koleksi bakteri dilakukan untuk stok bakteri. Pencatatan bakteri dapat dilakukan dengan melihat adanya

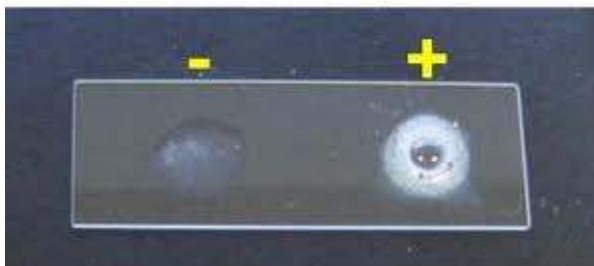


acid slant, acid butt yang ditandai dengan perubahan warna media pada bagian tegak atau miring. Adanya gas dapat diamati dengan adanya gelembung gas pada media, keretakan pada media atau media akan terangkat keujung tabung dan produksi gas  $H_2S$  akan terlihat jika media berubah menjadi hitam.



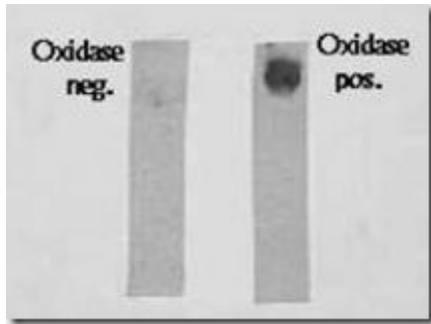
#### b. Uji Katalase

Identifikasi pertama dilakukan dengan uji katalase dan uji oksidase. Uji katalase dilakukan dengan menggunakan reagen hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Prinsip kerja enzim katalase ini adalah mengubah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang bersifat toksin menjadi air ( $H_2O$ ) dan oksigen ( $O_2$ ) yang tidak berbahaya dengan bantuan enzim katalase. Cara kerjanya, bakteri diambil menggunakan ose steril pada media koleksi, lalu diletakkan pada permukaan objek glass steril dan ditetesi reagen hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Reaksi positif akan ditandai dengan terbentuknya aglutinat seperti pasir berwarna putih dalam jangka waktu sekitar 1-2 detik.



#### c. Uji Oksidase

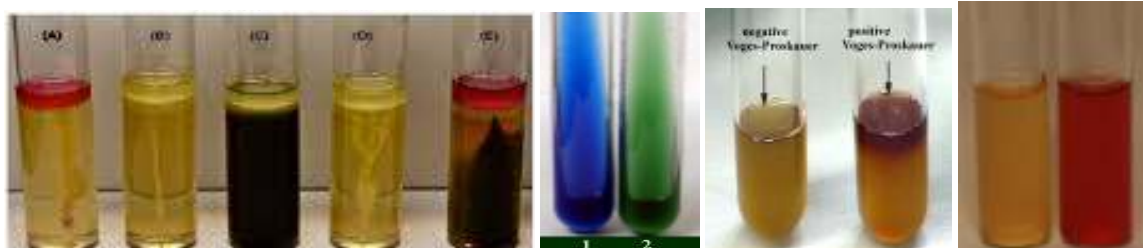
Uji oksidase dilakukan dengan menggunakan osidase strip. Uji ini berfungsi untuk menentukan adanya sitokrom oksidase yang dapat ditemukan pada mikroorganisme tertentu. Cara kerjanya, bakteri diambil dengan menggunakan ose steril pada media koleksi lalu diletakan pada permukaan oksidase strip. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna pada oksidase strip menjadi ungu kebiruan dalam waktu sekitar 1-2 menit.



#### d. Uji Biokimia

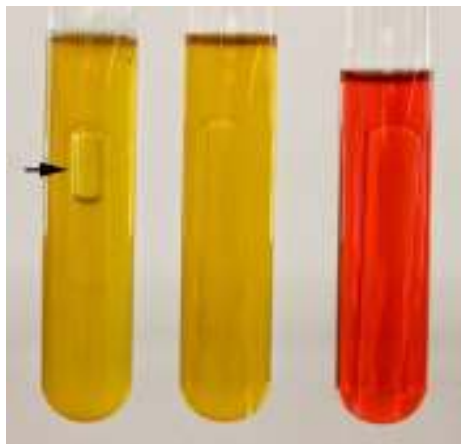
Media uji biokimia yang digunakan yaitu SIM, SC, MRVP, uji gula-gula seperti glukosa, laktosa, maltose, dan sukrose serta uji koagulase. SIM (Sulfid Indol Motility) merupakan media ini termasuk media semi solid (setengah padat). Kegunaan media ini adalah untuk mengetahui sifat kuman dalam memproduksi  $H_2S$ , indol dan pergerakan kuman (motilitas). Cara kerjanya, bakteri diambil pada media koleksi menggunakan ose steril lalu ditusuk secara tegak lurus pada media dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$  selama 24 jam. Hasilnya meliputi produksi  $H_2S$  ditandai dengan media berwarna hitam, produksi indol dapat dilihat setelah ditetesi dengan reagen Erlich/Kocak's sebanyak 3-5 tetes kedalam media, bila indol positif terbentuk cincin merah pada permukaan media, motilitas dapat dilihat apabila terjadi keaburan media ditempat tusukan ose.

SC (Simon Citrat) merupakan media padat dan bentuknya sangat miring. Cara kerjanya, bakteri diambil pada media koleksi menggunakan ose steril lalu diusapkan pada permukaan media tersebut dari pangkal sampai ke ujung yang lain. Inkubasikan media tersebut pada suhu  $37^\circ C$  selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terjadi perubahan warna pada media dari hijau menjadi biru yang berarti bakteri tersebut mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbonnya. MRVP (Methyl Red Voges Preskauer) merupakan media cair yang berfungsi mendeteksi bakteri menggunakan jalur asam campur (MR) dan fermentasi butilena glikol (VP). Cara kerjanya, bakteri diambil dengan menggunakan ose steril lalu dimasukkan kedalam media MRVP lalu diinkubasi dengan suhu  $37^\circ C$  selama 24 jam. Keesokan harinya dilakukan uji MRVP dengan membagi menjadi 2 pada tabung yang berbeda. Tabung pertama ditetesi reagen MR sebanyak 1-2 tetes dan tabung kedua ditetesi reagen VP sebanyak 1-2 tetes. Hasil positif akan ditandai dengan adanya warna merah pada media.



#### e. Uji Gula-gula

Uji gula-gula yang digunakan yaitu glukosa, laktosa, maltose, dan sukrose. Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi gula. Cara kerjanya, bakteri diambil menggunakan ose steril pada media koleksi dan dimasukkan kedalam media glukosa, laktosa, dan maltosa. Setelah itu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



## LEMBAR KERJA

Sampel :

No. :

Tanggal :

No	Media	Hasil
1	Media Umum	
	a. Ukuran	
	b. Elevasi	
	c. Tepian/margin	
	d. Bentuk	
	e. Warna	
	f. Hemolisis	
2	Media selektif	
	a. Ukuran	
	b. Elevasi	
	c. Tepian/margin	
	d. Bentuk	
	e. Warna	
3	Pewarnaan	
	a. Bentuk	
	b. Susunan	
	c. Gram	
4	TSIA	
	a. slant	Acid/alkaline
	b. butt	Acid/alkaline
	c. Gas	
	d. H <sub>2</sub> S	
5	Katalase	
6	Oksidase	
7	SIM	
	a. H <sub>2</sub> S	
	b. Indole	

	c. Motility	
8	Simmons Citrate	
9	MRVP	
	a. MR	
	b. VP	
10	Glukosa	
11	Laktosa	
12	Maltosa	

Laboran

.....